



**Vanessa Alexandra Ferreira Francisco**

Licenciada em Química Aplicada

**Desenvolvimento e validação do ensaio  
de mutagenicidade em células de  
mamífero, *Mouse Lymphoma Assay***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia  
e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Célia Maria da Silva Martins, Coordenadora  
do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da  
ASCENZA AGRO

Co-orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora  
Auxiliar, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando – FCT-NOVA

Arguente: Doutor António Sebastião Rodrigues – FCM-NOVA

Vogal: Doutora Célia Maria da Silva Martins – ASCENZA AGRO

“Desenvolvimento e validação do ensaio de mutagenicidade em células de mamífero, *Mouse Lymphoma Assay*” © Vanessa Alexandra Ferreira Francisco, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

Uma Dissertação de Mestrado é um documento pessoal, mas que resulta do esforço e dedicação de muitas outras pessoas, de forma direta ou indireta, e que por isso mesmo, merecem o meu agradecimento.

Quero começar por agradecer a todos os professores do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa por tudo o que me ensinaram, e por toda a paciência para as perguntas, por vezes disparatadas, mas sobretudo à professora Doutora Maria Paula Duarte, co-orientadora desta dissertação, por me ter incentivado a aceitar este projeto, que me fez sair da minha área de conforto, pela disponibilidade e por ter acreditado em mim. Sem esquecer o meu núcleo de amigos do mestrado: Sofia, João e Raquel, que tenho a certeza de que serão amigos para a vida.

Gostaria ainda de agradecer à ASCENZA AGRO por me ter recebido e por me ter disponibilizado as instalações e o material para a realização deste trabalho.

Nunca será demais agradecer aos meus colegas de laboratório: Bernardo, Cátia, Diogo, Inês, João, Oriana por me terem recebido tão bem, pela paciência que tiveram comigo, pela boa disposição e por toda a ajuda que me deram. À nossa Zeza, que esteve sempre pronta a ajudar-nos e a ouvir-nos. Nunca me poderei esquecer de agradecer à Célia, orientadora desta tese, que nunca me deixou ir abaixo quando os resultados não eram os expetáveis, que esteve sempre ao meu lado durante todos os ensaios, que acreditou que erámos capazes de fazer aquilo a que nos propúnhamos. Juntos, aprendemos uns com os outros, brincámos, demos muitas gargalhadas, mas acima de tudo, trabalhámos como uma verdadeira equipa.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família e aos meus amigos, que sempre me apoiaram, principalmente aos meus anjinhos da guarda, meus pais, à minha irmã e ao meu namorado por nunca me deixarem desistir, por me ouvirem quando tudo corria bem, mas também quando corria mal. Tudo o que sou devo-lhes a eles, que contribuíram com várias pecinhas para a construção da pessoa que sou hoje, porque “Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”



## RESUMO

Os alimentos são essenciais à vida, e por isso a sua segurança e qualidade é de extrema importância, sendo avaliada em toda a cadeia alimentar seguindo o lema da Comissão Europeia (CE) “From the farm to the fork”, em português, “Do prado ao prato”. A CE tem alguns objetivos que pretende ver cumpridos até 2030, incluindo o de reduzir em 50% a utilização e o risco de pesticidas.

Assim, os produtos utilizados para proteção de plantas estão sujeitos a uma legislação apertada que obriga à realização de diversos estudos para que estes possam ser registados e comercializados. Uma das vertentes em que são avaliados, tanto os ingredientes ativos, como as impurezas provenientes do seu processo de fabrico ou os metabolitos encontrados no ambiente como produto da sua degradação, diz respeito à sua genotoxicidade.

O potencial genotóxico e/ou mutagénico de um composto é avaliado *in vitro* pelo ensaio de Ames em bactérias, o ensaio de micronúcleos (MN), o ensaio de aberrações cromossómicas (CA) e o ensaio de mutagenicidade em células de mamífero (*Cell Gene Mutation - CGM*).

Esta dissertação foi elaborada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular integrado na ASCENZA AGRO, que por sua vez faz parte do grupo Rovensa. A ASCENZA AGRO tem uma longa experiência no setor da Proteção de Culturas, principalmente pela produção de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Para além da produção, é suportada por Laboratórios de Qualidade, Físico-Química, Síntese, Resíduos de Pesticidas, Ensaio de Campo e o Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, de forma a avaliar os seus produtos.

O trabalho consistiu na execução de ensaios para validação e implementação do método para o ensaio de mutagenicidade em células de mamífero, desenvolvido no âmbito das Boas Práticas de Laboratório. Foram realizados dois estudos, um estudo de otimização e um ensaio de validação. O estudo de otimização consistiu em dois ensaios de 4 horas de exposição sem S9, um ensaio de 4 horas de exposição com S9 e um ensaio de 24 horas. O estudo de validação foi apenas composto por um ensaio de 4H.

**TERMOS CHAVE:** SEGURANÇA E QUALIDADE ALIMENTAR; LEGISLAÇÃO; PESTICIDAS; GENOTOXICIDADE; MUTAGENECIDADE; MUTAGENICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO



## ABSTRAT

Food is essential to life, and therefore its safety and quality is extremely important, being evaluated throughout the food chain following the European Commission (EC) maxim "From the farm to the fork". The EC has some goals it wants to see accomplished by 2030, including reducing pesticide use and risk by 50%.

Thus, products used for plant protection are subject to various legislations that require several studies so that they can be registered and commercialized. One of the aspects in which both the active ingredients, as well as impurities from the manufacturing process or the metabolites found in the environment as a product of their degradation, are evaluated is their genotoxicity.

The genotoxic and/or mutagenic potential of a compound is assessed *in vitro* by the Ames assay in bacteria, the micronucleus assay (MN), the chromosomal aberration assay (CA) and the mutagenicity assay in mammalian cells (Cell Gene Mutation - CGM).

This dissertation was prepared at the Laboratory of Microbiology and Cell Biology integrated at ASCENZA AGRO, which is part of the Rovensa group. ASCENZA AGRO has a long experience in the Crop Protection sector, mainly in the production of fungicides, insecticides and herbicides. In addition to production, it's supported by Quality, Physical-Chemistry, Synthesis, Pesticides Residues, Field Testing and the Microbiology and Cell Biology Laboratories to evaluate their products.

The work consisted of carrying out tests for validation and implementation of the method for the mutagenicity test in mammalian cells, within the Good Laboratory Practices. Two studies were carried out: One for optimization and one for validation. The optimization study consisted of a 24H trial without S9, a 4H trial with S9 and a 24H trial. While the validation test was only composed of one 4H trial.

**KEY WORDS:** FOOD SAFETY AND QUALITY; LEGISLATION; PESTICIDES; GENOTOXICITY; MUTAGENECITY; CELL GENE MUTATION



## Índice Geral

1	Introdução.....	1
1.1.	O DNA – Ácido desoxirribonucleico .....	1
1.1.1	Estrutura do DNA .....	1
1.1.2	Mutações .....	2
1.1.3	Mutações e o Cancro .....	3
1.1.4	Biotransformação e Carcinogénese Química .....	3
1.2	Segurança dos Alimentos .....	6
1.2.1	Riscos e Benefícios dos Produtos Fitofarmacêuticos .....	7
1.2.2	Ensaio de Genotoxicidade.....	9
1.3	Boas práticas de trabalho <i>in vitro</i> .....	18
1.3.1	Boas Práticas de Laboratório .....	18
1.3.2	Cultura celular .....	18
1.3.3	Segurança e assepsia.....	18
1.4	Objetivo do trabalho .....	19
2	Materiais e Métodos .....	20
2.1	Materiais:.....	20
2.1.1	Controlos Positivos e reagentes.....	20
2.1.2	Substância em estudo .....	20
2.1.3	Cultura Celular.....	20
2.2	Métodos:.....	21
2.2.1	Armazenamento/Congelamento.....	21
2.2.2	Descongelação.....	21
2.2.3	Passagem celular .....	21
2.2.4	Ensaio de solubilidade.....	22
2.2.5	Ensaio de precipitação .....	22
2.2.6	Pré-seleção de Mutantes .....	22
2.2.7	Ensaio de Mutagenicidade e Eficiência Clonal .....	23
3	Resultados.....	25

3.1	Determinação Tempo de duplicação.....	25
3.2	Desenvolvimento do Ensaio MLA .....	25
3.2.1	Estudo de otimização .....	25
3.2.2	Ensaio de validação .....	31
4	Discussão de Resultados.....	35
4.1	Tempo de duplicação .....	35
4.2	Ensaios.....	35
4.2.1	Contagem em suspensão vs Contagem em <i>pellet</i> .....	35
4.2.2	Estudo de otimização .....	36
4.2.3	Ensaio de validação .....	39
5	Conclusão.....	41
6	Referências Bibliográficas.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura do DNA e a sua constituição.....	1
Figura 1.2 - Esquema simplificado das etapas de indução do cancro por um agente químico ...	5
Figura 1.3 - Placa de 96 micropoços com identificação de colónias grandes e pequenas .....	13
Figura 1.4 - Princípio base do teste MLA.....	13



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Critérios de aceitação .....	17
Tabela 2.1 - Constituição do S9 mix. ....	23
Tabela 3.1 - Cálculo do tempo de duplicação das culturas celulares.....	25
Tabela 3.2 - Concentrações celulares ao longo da Expressão Fenotípica e cálculo do Crescimento em Suspensão Relativo (RSG).....	26
Tabela 3.3 - Contagens de colónias após 14 dias de incubação e cálculo de Crescimento Total Relativo (RTG) e Frequência de Mutação (MF).....	26
Tabela 3.4 - Resultados do ensaio 4H sem S9 (2). ....	28
Tabela 3.5 - Resultados do ensaio 4H + S9. ....	29
Tabela 3.6 - Resultados do ensaio 24H.....	30
Tabela 3.7 - Resultados obtidos nos ensaios A e B (Contagem das células em suspensão vs Contagem após concentração) .....	31
Tabela 3.8 - Resultados do ensaio de precipitação. ....	32
Tabela 3.9 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.....	33
Tabela 4.1 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação – 4H sem S9 (2). ....	37
Tabela 4.2 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.....	38
Tabela 4.3 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.....	39
Tabela 4.4 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.....	40



## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NQO: 1-Óxido de 4-nitroquinolina

A: Adenina

B(a)P: Benzo(a)Pireno

BER: Reparação por Excisão de Bases

BPL: Boas Práticas de Laboratório

C: Citosina

CE: Eficiência de Plaqueamento

CHMP: Comité de Produtos Médicos para Uso Humano

CP: Ciclofosfamida

CVMP: Comité de Produtos Médicos para Uso Veterinário

DBT: 7,12 – Dimetilbenzatraceno

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ECHA: Agência Europeia das Substâncias Químicas

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EMA: Agência Europeia dos Medicamentos

EURL ECVAM: Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas aos Testes em Animais

G: Guanina

GEF: Fator de Avaliação Global

IARC: Agência Internacional de Pesquisa para o Cancro

MCT: 3-Metilcolantreno

MF: Frequência de Mutação

MLA: *Mouse Lymphoma Assay*

MMC: Mitomicina C

MMS: Metil Metanosulfato

NER: Reparação por Excisão de Nucleótidos

OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

P: Número provável de colónias por poço

PCB: Bifenilos Policlorados

RCE: Eficiência de Plaqueamento Relativa

RSG: Crescimento em Suspensão Relativo

RTG: Crescimento Total Relativo

SG: Crescimento em Suspensão

T: Timidina

T: Número de células por poço

TCDD: Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TFT: Trifluotimidina

THG: Timidina, Hipoxantina, Glicina

THMG: Timidina, Hipoxantina, Metotrexato, Glicina

TK: Timidina Quinase

TMP: Timidina Monofosfato

TW: Número total de poços

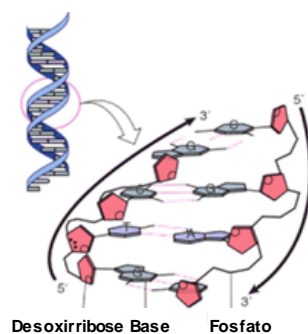
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. O DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Todos os organismos vivos possuem uma natureza hereditária definida pelo genoma, uma sequência complexa de nucleótidos que contém a informação necessária para a produção de proteínas do organismo no tempo e local corretos. Um gene é uma sequência no ácido desoxirribonucleico (DNA) que representa uma proteína específica. O genoma pode conter menos de 500 ou mais de 40 000 genes, no caso de bactérias ou do Homem, respetivamente, sendo que cada um se encontra num local particular do cromossoma, a que se dá o nome de *locus*. Assim, o genoma consiste num conjunto de cromossomas, ou seja, numa série de moléculas de DNA (uma por cada cromossoma) onde estão incluídos os genes (Lewin, 2004; Regateiro, 2003).

#### 1.1.1 ESTRUTURA DO DNA

O DNA é formado por duas longas cadeias de nucleótidos, sendo estes formados por três componentes: a base azotada, o açúcar (pentose) e um grupo fosfato. A base pode ser uma purina (dois anéis) ou uma pirimidina (um anel), que se encontra ligada à pentose (desoxirribose, no caso do DNA) na posição 1 por uma ligação glicosídica. A cadeia é formada por ligações fosfodiéster 5'-3', ou seja, por ligações entre a posição do carbono 5' de uma pentose e a posição 3' da próxima pentose, através de um grupo fosfato. As bases azotadas, encontram-se ligadas à desoxirribose e podem variar entre adenina (purina), guanina (purina) e a citosina (pirimidina) e timina (pirimidina), representadas geralmente pelas suas iniciais, A, G, C e T, respetivamente. O DNA é uma dupla hélice, ou seja, é composto por duas cadeias de nucleótidos ligadas de forma antiparalela através de ligações de hidrogénio que se estabelecem entre adenina e a timina (A-T) e entre a guanina e a citosina (G-C), ficando as bases no interior da hélice (Figura 1.1) (Regateiro, 2003). Estas ligações purina-pirimidina possibilitam um diâmetro constante de 2 nm, formando uma volta completa a cada 3,4 nm, o que sugere que cada volta seja composta por 10 nucleótidos (Lewin, 2004).



**Figura 1.1** - Estrutura do DNA e a sua constituição (Lewin, 2004).

### 1.1.2 MUTAÇÕES

O DNA não é uma molécula inerte, vai sofrendo alterações a que se chamam mutações, que podem originar uma mudança na sua sequência de nucleótidos. Os organismos sofrem algumas mutações decorrentes do seu metabolismo (fator intrínseco) (geração de espécies reativas de oxigénio, alquilação, depurinação, entre outras (Loeb, 1989)), ou de interações com o ambiente (fatores extrínsecos). As mutações induzidas por fatores intrínsecos são chamadas mutações espontâneas e são raras. Por outro lado, temos as mutações induzidas, decorrentes de fatores extrínsecos, que acontecem após exposição a um determinado composto, chamado mutagénico. Estas mutações acontecem com uma frequência muito maior do que as mutações espontâneas. Um agente mutagénico é definido como um agente químico, físico ou biológico que causa alterações no material genético, irreversíveis e transmissíveis às células filhas. O aumento do rácio de mutações induzidas face às mutações espontâneas define a efetividade do agente (Lewin, 2004; Schrader, 2016).

As mutações podem afetar apenas um nucleótido ou serem mais extensas. As mutações pontuais afetam apenas uma base, podendo ser causadas pela conversão química de uma base noutra ou por um erro durante a replicação. Podem ocorrer por transição, quando se dá a substituição de uma purina por outra purina, ou de uma pirimidina por outra pirimidina (por exemplo, G-C → A-T); ou por transversão, havendo uma substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa (por exemplo, A-T → T-A). Por outro lado, temos as mutações por inserção ou deleção, que resultam muitas vezes de elementos transponíveis, ou seja, que podem mudar de local, seguidas, por vezes, da deleção de parte ou da totalidade do material inserido, podendo ainda haver deleção de algumas bases adjacentes (Clancy, 2008; Lewin, 2004; Loewe, 2008).

As mutações que inativam um gene chamam-se *forward mutations* e as *back mutations* revertem o seu efeito. No caso das mutações pontuais pode haver uma reposição da sequência original (*true reversion*) ou um ganho de uma nova mutação compensatória (*secondsite reversion*); as inserções podem ser revertidas por deleções, como referido antes; já as deleções não podem ser revertidas (Lewin, 2004).

Caso a mutação não provoque nenhuma alteração no fenótipo do organismo é chamada de mutação silenciosa. Estas mutações podem resultar da substituição de uma base que leve à inserção do mesmo aminoácido na proteína, ou de uma substituição que leve à inserção de um aminoácido diferente, mas que não tenha implicação na atividade da proteína (substituição neutra) (Lewin, 2004).

### 1.1.3 MUTAÇÕES E O CANCRO

Cada organismo possui uma rede de sistemas de resposta a lesões no DNA, que passa por *checkpoints* do ciclo celular e por mecanismos de reparação do DNA. A reparação por excisão de bases (BER) ou por excisão de nucleótidos (NER), a recombinação homóloga ou reparação direta são alguns exemplos destes mecanismos (Giglia-Mari et al., 2011).

Genes como o p53, que atuam na regulação do ciclo celular, monitorizam a replicação, induzindo uma paragem no ciclo celular de forma a permitir a reparação do DNA, atuam então como genes supressores de tumores, por isso mutações que ocorram nestes genes podem levar à tumorogénese (Shibammoto & Bjeldanes, 2009; Wogan et al., 2004).

As células tumorais, quando comparadas com as células normais, apresentam um número superior de mutações, continuando este número a aumentar durante a progressão do cancro. Estas células apresentam ainda uma instabilidade genética, resultante de alterações no número de genes presentes, devido a pequenas duplicações, deleções ou translocações de material entre cromossomas. As células alteradas ou tumorais podem resultar de mutações que afetam duas classes de genes, os oncogenes e os genes supressores de tumores. Os oncogenes resultam de um ganho de função por mutação de um proto-oncogene que por sua vez contribui para a tumorogénese. Já as mutações num supressor de tumores provocam uma perda de função de regular o crescimento celular. Assim, um cancro pode resultar da acumulação de mutações que ativam oncogenes ou inativam os genes supressores de tumores.

Durante a tumorogénese existem três tipos principais de alterações no funcionamento das células (Lewin, 2004):

- Imortalização: multiplicam-se indefinidamente;
- Transformação: não respeitam os fatores que controlam o crescimento e sobrevivência celular;
- Metástase: aquisição da capacidade de invadirem tecidos normais noutras locais do corpo.

### 1.1.4 BIOTRANSFORMAÇÃO E CARCINOGENÉSE QUÍMICA

Estima-se que uma grande percentagem dos cancros humanos seja o reflexo da exposição, inclusivamente exposição *in útero*, a determinados agentes químicos, decorrente do estilo de vida de cada um. Assim, essa exposição pode variar com fatores como a dieta, o tabagismo, o consumo de álcool ou a toma de determinados medicamentos (Miller & Miller, 1981; Wogan et al., 2004).

Embora alguns químicos não precisem de sofrer nenhum tipo de metabolização para terem uma ação carcinogénica, outros, a grande parte deles, não são carcinogénicos por si só (procarcinogénicos), necessitando previamente de sofrer um processo de biotransformação, mediado por enzimas. A biotransformação visa aumentar a solubilidade em água dos xenobióticos de forma a facilitar a sua excreção do organismo. No entanto, no decurso destas reações podem formar-se metabolitos eletrófilos, quimicamente reativos face ao DNA, que

podem levar à carcinogénese (bioativação). Assim, o potencial carcinogénico de um determinado composto pode estar dependente da forma como decorre a sua biotransformação (Beiras, 2018; Guengerich, 2008; Klaassen, 2001; Miller & Miller, 1981; O'Brien et al., 2006; Sheweita, 2000; Shibamoto & Bjeldanes, 2009; Stone & Bornhorst, 2012; Trent, 2012; Wogan et al., 2004).

As enzimas de biotransformação podem dividir-se em enzimas de fase I e de fase II. As enzimas predominantes na fase I são as da família do citocromo P450 responsáveis por hidrólises, oxidações e reduções. Já as enzimas da fase II são responsáveis por reações de conjugação. Nas reações da fase I a molécula é oxidada de forma a torná-la mais hidrofílica e, portanto, mais reativa para posterior transformação. Esta fase pode ser mais extensa se a substância for muito lipofílica. O metabolito formado é frequentemente mais tóxico do que a molécula que lhe deu origem, e por isso sofre ação das enzimas de fase II, que o conjuga com uma molécula polar não tóxica disponível *in vivo*. Assim, o conjugado obtido é facilmente eliminado pelo sistema excretor. Se a substância original já for hidrofílica, pode sofrer de imediato a ação das enzimas de fase II, não existindo uma ordem predefinida (Beiras, 2018; Guengerich, 2008; Klaassen, 2001; Miller & Miller, 1981; O'Brien et al., 2006; Sheweita, 2000; Shibamoto & Bjeldanes, 2009; Stone & Bornhorst, 2012; Trent, 2012; Wogan et al., 2004).

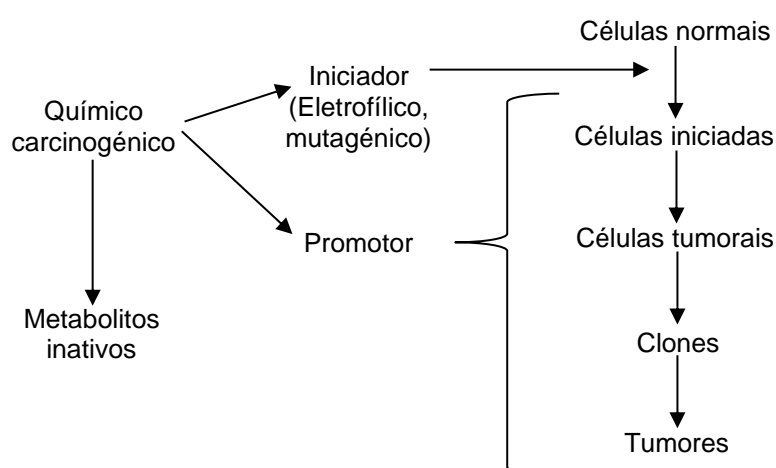
A expressão e atividade das enzimas de biotransformação são afetadas por fatores genéticos e ambientais, podendo assim dizer-se que estes fatores têm um papel importante no risco para o desenvolvimento do cancro. Por exemplo, alguns medicamentos têm a capacidade de alterar a taxa de ativação/destoxificação de carcinogénicos por alteração (inibição/indução) da expressão ou da atividade das enzimas. Da mesma forma, a existência de polimorfismos nos genes das enzimas de biotransformação também pode influenciar a suscetibilidade de cada indivíduo (Stone & Bornhorst, 2012; Trent, 2012; Wogan et al., 2004). Por polimorfismo genético entende-se uma alteração na sequência do DNA, que ocorre em aproximadamente 1% da população, sendo que esta alteração, pode afetar a sequência de aminoácidos da proteína, quando ocorre nas sequências codificantes, ou ter implicações funcionais caso se encontre numa região reguladora do genoma (Stone & Bornhorst, 2012).

O cancro é uma doença multifatorial e a carcinogénese um processo com múltiplos passos. O primeiro passo é chamado de iniciação ao qual se segue a promoção, e depois a progressão, sendo possível que apenas uma exposição com um único carcinogénico possa desencadear estas três etapas. A iniciação é um processo rápido e irreversível que resulta de uma ou mais mutações no DNA, sendo necessário que se complete pelo menos um ciclo celular para que ocorra a fixação da mutação. A sobreexpressão de genes responsáveis pela proliferação das células, os proto-oncogenes, pode contribuir para transformar células normais em cancerígenas. Por outro lado, a inativação de genes que codificam proteínas inibidoras da proliferação, genes supressores de tumores, também pode levar a uma proliferação anormal (Miller & Miller, 1981; Shibamoto & Bjeldanes, 2009).

Segue-se a promoção, fase onde se desenvolvem as células tumorais. A promoção é um processo complexo e mais demorado, sendo composto por diversas etapas, onde as primeiras são facilmente reversíveis. Estudos *in vivo* demonstram que a proliferação diminui

quando o agente promotor é removido, concluindo-se então que esta etapa é reversível. Por agente promotor entende-se um agente que atua por vários mecanismos, que envolvem alterações da expressão genética, resultando num aumento da proliferação celular e/ou na inibição da apoptose (Klaassen, 2001). Estudos *in vivo* revelam ainda que os tumores não se desenvolvem quando ocorre apenas uma das etapas, nem quando o agente promotor é aplicado antes do agente iniciador. Quanto à iniciação, pensa-se que esta é irreversível uma vez que *in vivo* surgem tumores depois da aplicação do agente promotor meses após a exposição ao agente iniciador, enquanto que o promotor se mostra menos efetivo se forem aplicadas doses mais baixas ou mais espaçadas (Miller & Miller, 1981; Shibamoto & Bjeldanes, 2009).

A progressão é uma etapa irreversível que resulta na independência destas células, possibilitando-as de invadirem as células vizinhas e metastizarem (Shibamoto & Bjeldanes, 2009). A Figura 1.2 esquematiza o processo de carcinogénese química.



**Figura 1.2 - Esquema simplificado das etapas de indução do cancro por um agente químico (adaptado de Miller & Miller, 1981).**

De forma a concentrar a informação relevante disponível sobre a carcinogenicidade de diversas substâncias, a IARC, Agência Internacional da Pesquisa do Cancro (*International Agency for Research on Cancer*), desenvolveu um sistema de classificação que permite avaliar a carcinogenicidade para o Homem de diversos agentes, com base em evidências científicas derivadas de ensaios epidemiológicos, ensaios em animais de laboratório, ensaios *in vitro*, dados mecanísticos e outros dados relevantes. De acordo com esta classificação as substâncias podem ser classificadas em quatro diferentes grupos (IARC, 2020):

- Grupo 1: Carcinogénico para humanos – existem evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos, ou em ensaios *in vivo* em animais suportada por fortes evidências em humanos expostos;
- Grupo 2A: Provavelmente Carcinogénico para humanos – existem evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos e evidência suficiente em animais ou fortes evidências mecanísticas;

- Grupo 2B: Possivelmente Carcinogénico para humanos – existem evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos ou evidência suficiente em animais ou fortes evidências mecanísticas;
- Grupo 3: Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos – as evidências de carcinogenicidade em humanos são desadequadas, evidência em animais são limitadas e as evidências mecanísticas são também limitadas.

## 1.2 SEGURANÇA DOS ALIMENTOS

Os alimentos são a fonte de nutrientes para o Homem. No entanto, até os nutrientes quando em excesso podem ser tóxicos. Para além dos nutrientes, os alimentos contêm muitos outros compostos podendo alguns destes ser tóxicos para o Homem. No caso dos nutrientes, a sua ingestão diária ligeira ou excessiva produz respostas que podem ir de letal, no caso da deficiência de nutrientes, a ótima, e de novo a letal, por consumo de elevadas doses, que se tornam intoleráveis. São então estabelecidos valores de Ingestão Diária Recomendada com base no seu papel na dieta e em doenças crónicas, e tendo em conta o limite superior de tolerância (Dabrowski & Sikorski, 2005; Omaye, 2004).

Os alimentos podem conter naturalmente substâncias tóxicas, como é o caso dos cogumelos venenosos. A fonte mais comum de doenças de origem alimentar são as bactérias, quer por infeção (quando envolve o patogénico em si), quer por intoxicação (quando envolve uma toxina do patogénico). Exemplo de uma toxina de origem microbiológica que pode aparecer nos alimentos é a aflatoxina B1, produzida por fungos do género *Aspergillus*, substância indutora de hepatocarcinomas e classificada no Grupo 1 da IARC (IARC, 2020; Omaye, 2004).

A contaminação ambiental e o processamento também podem constituir fontes de introdução de substâncias tóxicas nos alimentos. Exemplo de contaminantes alimentares de origem industrial e ambiental são os bifenilos policlorados (PCB), as dioxinas como a tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) ou os metais pesados tóxicos como o mercúrio, cádmio, chumbo ou arsénio. Dentro dos tóxicos formados durante o processamento dos alimentos a temperatura elevada encontram-se a acrilamida, formada no decurso das reações de Maillard, ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o benzo(a)pireno, composto classificado como carcinogénico para o Homem (IARC, 2020; Omaye, 2004; Shibammoto & Bjeldanes, 2009)

A segurança dos alimentos tem como objetivo garantir que os alimentos se encontram isentos de perigos e que, portanto, o seu consumo nas suas condições previstas não implica nenhum dano para a saúde dos consumidores (OECD, 1993). O *Codex Alimentarius* define perigo como um agente biológico, químico ou físico, presente no alimento, com potencial para causar um efeito adverso na saúde; e risco como a probabilidade de ocorrer um efeito adverso para a saúde e a sua gravidade como consequência da exposição a um perigo (FAO/WHO, 2001).

Não se pode atribuir tolerância zero aos riscos para a maioria dos alimentos, por isso são consideradas dois tipos de abordagens, uma com base nos riscos, e outra com base nos perigos.

A abordagem baseada nos perigos define que a legislação e as ações de gestão de risco apenas têm em conta a presença de um agente potencialmente prejudicial a um nível detetável. Da avaliação baseada nos perigos resultou a interdição de substâncias genotóxicas nos alimentos. Por outro lado, a abordagem baseada nos riscos estabelece valores de referência para a exposição humana (por exemplo, para aditivos e substâncias utilizadas nos materiais de contacto com os alimentos), como a dose de ingestão diária tolerável ou aceitável com base em dados toxicológicos (como é o caso de pesticidas). A exposição humana é então estimada e comparada com os valores de referência para avaliar se existe risco para a saúde e, conseqüentemente, quais as medidas a tomar (Barlow et al., 2015).

De forma a obter alimentos seguros é necessário controlar toda a cadeia de produção alimentar englobando todos os processos desde o cultivo/criação animal até à chegada do alimento a casa do consumidor (Fung et al., 2018). Desta forma, a garantia da segurança alimentar implica também o controlo da produção dos alimentos para animais e dos produtos fitofarmacêuticos utilizado na produção primária.

### 1.2.1 RISCOS E BENEFÍCIOS DOS PRODUTOS FITOFARMACÊUTICOS

Os produtos fitofarmacêuticos, vulgarmente designados por pesticidas, são produtos destinados à proteção das plantas e da produção agrícola, excetuando os adubos e corretivos, que contêm na sua composição uma ou mais substâncias ativas responsáveis pela prevenção ou controlo dos inimigos ou organismos nocivos. Os pesticidas podem ser classificados de diversas formas, como, por exemplo, de acordo com a aplicação, organismo-alvo e natureza química. Com base na aplicação, os pesticidas podem ser agrupados em pesticidas para agricultura (usados para proteger as pragas, insetos e ervas daninhas), saúde pública (usados para controlar vetores que causam doenças) e pesticidas domésticos (usados para matar insetos como baratas, bactérias, protozoários, ratos, etc.). Com base no organismo-alvo, os pesticidas podem ser classificados, entre outros, como inseticidas (combatem insetos), fungicidas (produtos químicos aplicados para inibir ou matar fungos), herbicidas (produtos químicos que podem ser seletivos, eliminando apenas as ervas infestantes e não as culturas, ou mais gerais, podendo eliminar toda a vegetação), rodenticidas (pesticidas usados para eliminar roedores), acaricidas (combatem ácaros), nematodocidas (combatem nemátodos), fumigantes (pesticidas gasosos usados para matar ou controlar pragas como percevejos) e moluscicidas (combatem lesmas e caracóis). Com base na natureza química, os pesticidas podem ser classificados como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, fenilamidas (carbanilatos, acilanalídeos, toluidinas e acetamidas), fenoxialcalonatos, trazinas, derivados do ácido benzóico, benzonitrilos, derivados de ftalimida, dipirídeos e categorias diversas (Rani et al., 2021).

Os pesticidas são amplamente utilizados, antes e após colheita, com o objetivo de proteger as culturas de possíveis pragas e, desta forma, diminuir as perdas de colheita, dando um importante contributo para a garantia do abastecimento alimentar (*food security*). As principais vantagens da sua aplicação são assim o aumento das produções e o aumento do tempo de vida dos produtos agrícolas, representando vantagens económicas para os produtores

e aumentando a oferta e mesmo a variedade de produtos agrícolas para o consumidor. A utilização de pesticidas permite não só controlar as pragas agrícolas e os vetores de doenças de plantas como também aumentar a qualidade e segurança dos produtos produzidos. Por exemplo, a aplicação de fungicidas permite controlar o crescimento de fungos produtores de micotoxinas, como por exemplo, da aflatoxina B1, contribuindo assim para aumentar a segurança alimentar. No entanto a utilização abusiva e não controlada dos pesticidas representa um risco para a saúde do homem e para o ambiente considerando que são compostos a que está sempre inerente um certo grau de toxicidade (Simões, 2005).

A exposição aos pesticidas pode ocorrer por via oral, dérmica ou por inalação, sendo o risco mais elevado para as pessoas que produzem ou manipulam diretamente estes compostos, uma vez que são o grupo de pessoas que podem sofrer uma exposição a doses mais elevadas (Rani et al., 2021). No entanto, o perigo da exposição aos pesticidas não se limita a este grupo de pessoas, uma vez que podem permanecer resíduos destes produtos nos géneros alimentícios em cuja produção foram utilizados. Por outro lado, os pesticidas são propositadamente lançados no ambiente para controlar organismos indesejáveis, podendo, por isso, contaminar os meios terrestre e aquático, e, desta forma, contaminar toda a cadeia alimentar. Assim, os resíduos de pesticidas estão incluídos nos perigos químicos a que o homem está exposto através da dieta. Sabendo que uma das consequências naturais do uso de pesticidas na proteção das plantas é a presença de resíduos nos alimentos, torna-se necessário assegurar que tais resíduos não constituem um risco para a saúde dos consumidores (Araújo, 2011).

A exposição direta ou indireta aos pesticidas está associada a vários efeitos negativos para a saúde que incluem, entre outros, aumento do risco de desenvolvimento de cancro, diabetes *mellitus*, distúrbios reprodutivos, distúrbios respiratórios e distúrbios neurológicos (Rani et al., 2021).

O diclorodifeniltricloroetano (DDT) é inseticida organoclorado que foi largamente utilizado desde 1940 até 1973, ano em que a sua utilização foi proibida, sendo apenas autorizada a sua aplicação *indoor* para controlar a malária em zonas onde esta doença é endémica (EPA, 2021). O DDT é um inseticida bastante eficaz, conferindo uma excelente proteção às culturas, tendo sido usado até nos humanos para combater piolhos. No entanto, a sua elevada resistência à degradação química, física e biológica confere-lhe uma elevada persistência no ambiente. Esta característica aliada ao seu carácter lipofílico confere ao DDT um elevado potencial de bioconcentração e de bioamplificação ao longo das cadeias tróficas. O DDT revelou-se tóxico para uma variedade de animais selvagens, incluindo pássaros e animais marinhos, tendo contribuído para o declínio de várias espécies de aves como a águia careca e pelicano castanho (Harada et al., 2016). O DDT pode induzir a expressão de diversas enzimas envolvidas no metabolismo hormonal e interferir com a fertilidade e com a reprodução. Este inseticida foi classificado pela IARC como provavelmente carcinogénico para o Homem (Grupo 2A) tendo por base a existência de evidências suficientes do efeito carcinogénico em animais de laboratórios e limitadas evidências desse efeito no Homem (Harada et al., 2016; IARC, 2020; Klaassen, 2001; Omaye, 2004; Shibamoto & Bjeldanes, 2009).

Os pesticidas organofosforados são ainda mais tóxicos para os vertebrados do que os organoclorados e são quimicamente mais instáveis, não sendo, por isso, persistentes nos solos, nem acumuláveis nos organismos, sendo rapidamente metabolizados e excretados. Pensa-se que a sua ação tóxica seja devida à inibição da enzima acetilcolinesterase, que é responsável por remover a acetilcolina das fendas sinápticas durante a transmissão do impulso nervoso. A inibição da acetilcolinesterase pode resultar na contração involuntária dos músculos e eventual paralisia (Klaassen, 2001; Omaye, 2004; Shibammoto & Bjeldanes, 2009).

Os carbamatos são inseticidas que possuem uma elevada toxicidade também para os insetos, são compostos hidrossolúveis e podem acumular-se em alimentos com elevado conteúdo de água. Encontra-se descrito que a sua ação tóxica também se deve à inibição da acetilcolinesterase (Klaassen, 2001; Shibammoto & Bjeldanes, 2009).

A forma como alguns herbicidas afetam o ciclo celular constitui mais um exemplo dos efeitos tóxicos dos pesticidas (Klaassen, 2001; Omaye, 2004).

A toxicidade dos pesticidas pode estar associada não só às moléculas ativas como também a alguns contaminantes que podem formar-se durante a sua produção. Por exemplo, a TCDD é um subproduto conhecido na síntese de alguns herbicidas. A utilização em larga escala deste tipo de produtos durante a guerra do Vietnam originou um elevado grau de contaminação ambiental e das cadeias alimentares, fazendo com que ainda hoje a TCDD seja detetada em alimentos oriundos das áreas onde estes herbicidas foram mais manuseados/aplicados (Hoogenboom et al., 2020).

Na União Europeia, os resíduos dos produtos fitofarmacêuticos são avaliados pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e pelos Estados-Membros. A avaliação de pesticidas e biocidas, na Europa, com base nos riscos, é supervisionada pela EFSA, enquanto que a abordagem baseada no perigo é supervisionada pela Agência Europeia das Substâncias Químicas (ECHA) (Barlow et al., 2015).

Um dos aspetos que se reveste da maior importância no estudo da segurança dos pesticidas é a determinação do seu potencial para causar lesões no DNA (genotoxicidade), uma vez que estas podem levar a alterações hereditárias ou ao desenvolvimento do cancro.

### 1.2.2 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Uma substância pode ser de utilização proibida em géneros alimentícios caso se suspeite que seja mutagénica, uma vez que, como já anteriormente referido, existe uma correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade. Tendo em conta que a carcinogénese é um processo complexo e longo, podendo não se manifestar durante anos após a exposição, os testes *in vivo*, em roedores demoram aproximadamente dois anos a serem conclusivos. Além de muito demorados estes ensaios são também bastante dispendiosos. Por outro lado, os testes de genotoxicidade *in vitro* permitem obter resultados em dias ou semanas e são menos dispendiosos. Assim, a realização de uma bateria preliminar de testes de genotoxicidade representa uma ferramenta de grande utilidade na identificação de substâncias potencialmente carcinogénicas (Nicolette, 2017; Omaye, 2004; Shibammoto & Bjeldanes, 2009).

Os testes de genotoxicidade têm, portanto, um papel muito importante na avaliação da segurança de todos os tipos de substâncias relevantes para a legislação referente à proteção da saúde humana, desde os produtos farmacêuticos aos pesticidas e biocidas, passando por aditivos alimentares e cosméticos. Os ensaios de genotoxicidade consistem na avaliação das lesões no DNA que tanto podem ser reparadas, ou seja lesões reversíveis, como ser lesões mais estáveis, que podem ser transmissíveis. O estudo do potencial genotóxico de uma substância passa pela avaliação do seu potencial para provocar diferentes tipos de alterações, como sejam as mutações genéticas ou as modificações estruturais ou numéricas de cromossomas. As alterações avaliadas podem ser divididas em três grandes grupos: mutagenicidade, clastogenicidade e aneugenicidade. Mutagenicidade refere-se a alterações na sequência de nucleótidos, enquanto o termo clastogenicidade tem a ver com agentes que provocam alterações estruturais nos cromossomas uma vez que os quebram originando perda ou rearranjo dos seus segmentos. Já aneugenicidade diz respeito a agentes que causam alterações numéricas de cromossomas (Corvi et al., 2013).

Os ensaios *in vitro* não conseguem substituir os ensaios em animais, pois embora possuam uma elevada sensibilidade, revelam uma especificidade baixa podendo levar a falsos resultados positivos. Recorre-se então a combinações de dois ou três testes de forma a aumentar a sensibilidade na deteção de carcinogenicidade (Kirkland et al., 2005).

Foi estabelecida uma bateria de testes *in vitro* standard que inclui o teste de Ames (ensaio de mutação reversa bacteriana), um ensaio de Aberrações Cromossómicas, um ensaio de Micronúcleos e um ensaio de *Cell Gene Mutation*, os últimos três ensaios realizados em células de mamífero. Caso seja necessário um teste *in vivo* a fim de confirmar resultados, este deve cobrir os mesmos pontos que os ensaios *in vitro* (Corvi et al., 2013).

O Laboratório de Referência da União Europeia para Alternativas aos Testes em Animais (EURL ECVAM) recomenda que sejam feitos esforços para melhorar a performance das baterias de testes *in vitro* de forma a reduzir a necessidade de testes de confirmação *in vivo* e reduzir a utilização de animais durante estes testes (Corvi et al., 2013).

Em linha com esta filosofia, a Agência Europeia dos Medicamentos (EMA), em conjunto com o Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) e com o Comité dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP) implementaram a política dos 3 R's (European Medicines Agency, 2016):

- *Replacement* (Substituição): Utilização de testes que evitem ou substituam o uso de animais vivos, recorrendo a linhas celulares animais e humanas estabelecidas, modelos matemáticos e computadorizados ou métodos físico-químicos;

- *Reduction* (Redução): Ensaio que minimizam o número de animais utilizados num estudo;

- *Refinement* (Refinamento): Abordagens que minimizam o sofrimento e danos causados aos animais, desde a manipulação aos procedimentos utilizados, podendo-se recorrer a analgésicos apropriados.

Tendo em conta a política dos 3 R's algumas entidades já tomaram algumas medidas neste sentido, como é o caso da indústria cosmética, onde a União Europeia proíbe a realização de testes *in vivo* ((CE) N.º1223/2009). Para a indústria química e de biocidas se se obtiver um resultado positivo num dos testes *in vitro* é necessária a confirmação com um teste *in vivo* ((CE) N.º 1907/2006; (UE) N.º 528/2012). Já para os produtos de proteção de plantas os ensaios *in vitro* são sempre seguidos por ensaios *in vivo* ((UE) N.º 283/2013).

O Regulamento (CE) n.º 1107/2009 impõe as regras para comercialização dos produtos fitofarmacêuticos, que obriga a que sejam testadas não apenas as substâncias ativas (a que se dedica o Regulamento UE n.º 283/2013), mas também as impurezas presentes na formulação e os seus metabolitos ((CE) N.º1107/2009).

É a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos que fornece aconselhamento científico à Comissão Europeia apoiando a formação de legislação e políticas comunitárias ((CE) N.º178/2002). Esta entidade sugere então duas baterias de testes, uma composta por testes *in vitro* e outra composta por testes *in vivo*:

- Bateria 1:
  - Teste de Ames
  - Teste de Micronúcleos *in vitro*
- Bateria 2:
  - Teste de Micronúcleos *in vivo*
  - *Comet Assay in vivo*
  - *Cell Gene Mutation in vivo*

A EFSA recomenda que seja feita a bateria de testes *in vitro*, avaliando a necessidade de substituir algum dos testes por outro mais adequado, quer seja *in vitro* ou *in vivo*. Se o resultado for negativo, então considera-se que a substância não é genotóxica e não se realizam ensaios *in vivo*. No caso do resultado ser inconclusivo deve considerar-se a realização de mais testes *in vitro*. Já no caso de um resultado positivo a sugestão é avaliar as informações disponíveis e a necessidade de realização de um teste da bateria de testes *in vivo*. Se o primeiro for positivo então considera-se a substância como genotóxica e não são necessários mais testes, no caso de ser negativo então deve-se realizar um novo teste (EFSA Scientific Committee, 2011).

O teste de mutação reversa bacteriana (teste de Ames) é largamente utilizado para uma avaliação inicial da atividade genotóxica, no entanto a correlação entre compostos positivos e carcinogénicos em células de mamífero não é absoluta (OECD, 2020).

Em 2008, Kirkland *et al*, reuniram resultados de diversas substâncias quando sujeitas a testes *in vivo* e *in vitro* e demonstrou que um conjunto de substâncias que se revelaram positivas no teste de Ames e nos testes *in vitro* e *in vivo* são maioritariamente carcinogénicas, 15 em 19. De um outro conjunto, com resultados negativos para os três tipos de testes, apenas metade revelaram carcinogenicidade. Um terceiro conjunto, com resultados negativos no teste de Ames e nos ensaios *in vivo*, mas positivo nos ensaios *in vitro* obteve um total de 17 substâncias não carcinogénicas em 19 testadas. Estas conclusões sugerem que os resultados positivos nos

testes em células de mamífero não acrescentam preditividade ao teste de Ames positivo, no entanto, os testes em células de mamífero com resultados negativos tendo um teste de Ames positivo são indicativos da ausência de potencial carcinogénico ou genotóxico *in vivo*. Estas falhas devem-se à diferença de complexidade das bactérias e de células animais, desde o metabolismo, à estrutura dos cromossomas e aos processos de reparação de DNA. Embora seja usada uma fonte exógena de ativação metabólica esta é incapaz de mimetizar a 100 % as condições *in vivo*. Além disso, o teste de Ames não é apropriado para avaliar alguns compostos, como o é o caso dos bactericidas ou outros que se pensa, ou sabe, ter interferência direta nos sistemas de replicação de células de mamífero. Por isto é aconselhado que o teste de Ames seja acompanhado de testes em células de mamífero como o *Cell Gene Mutation* (CGM) (Kirkland et al., 2008; Kirkland, Zeiger, Madia, & Corvi, 2014; Kirkland, Zeiger, Madia, Gooderham, et al., 2014; OECD, 2020).

### 1.2.2.1 *In vitro mammalian cell assays*

Existem vários tipos de teste que são aceites para ensaios regulatórios, embora todos estudem o potencial de um composto causar quebras e lesões cromossómicas (Nicolette, 2017):

- Aberrações cromossómicas: estuda lesões cromossómicas
- Micronúcleos: estuda perdas ou lesões cromossómicas
- *Cell Gene Mutation*: estuda mutações genéticas e lesões cromossómicas

#### 1.2.2.1.1 *Mouse lymphoma assay*

O CGM, quando executado em células de ratinho é frequentemente denominado de *mouse lymphoma assay* (MLA). O MLA é um teste de mutação genética que usa a linha celular L5178Y Tk<sup>+/-</sup> para determinar a mutação no *locus* da timidina quinase (TK) (Nicolette, 2017).

A timidina disponível no meio é utilizada pelas células recorrendo à enzima timidina quinase, responsável pela fosforilação da timidina ou dos seus análogos a timidina monofosfato (TMP). A TMP regula a síntese de DNA e a replicação celular, sendo sintetizada naturalmente nas células normais. Sendo assim, o gene TK não é essencial para a replicação do DNA. No entanto, nas células sem o gene TK funcional a timidina exógena não é utilizada, nem os seus análogos. Por outro lado, as células normais também incorporam análogos tóxicos da timidina (quando a síntese natural de TMP não é bloqueada), provocando a sua morte, o que não acontece com as células sem atividade TK, uma vez que não incorporam o agente tóxico (Schisler et al., 2019).

A perda de atividade da enzima TK é resultado de lesões no DNA por agentes químicos ou físicos, levando a uma mutação, de Tk<sup>+/-</sup> para Tk<sup>-/-</sup>. Esta mutação faz com que as células se tornem resistentes aos efeitos citotóxicos da trifluotimidina (TFT), análogo da timidina. Assim, quando expostas ao TFT, as células mutantes (Tk<sup>-/-</sup>) são capazes de se dividir e proliferar, contrariamente às outras. A deficiência na enzima TK pode ser o resultado de vários eventos genéticos, desde mutações genéticas (como mutações pontuais ou deleções) a eventos

cromossômicos (como grandes deleções, rearranjos ou recombinações), sendo que alguns eventos cromossômicos levam à perda de heterozigiosidade, o que é frequentemente observado em genes supressores de tumores. Pelo tamanho das colônias formadas pelo crescimento das células resistentes, pode distinguir-se a mutação ocorrida (OECD, 2016; Schisler et al., 2019; Wiesner et al., 2016). Na Figura 1.3 pode ver-se uma placa com colônias pequenas e grandes. Já a Figura 1.4 ilustra o princípio base do teste.

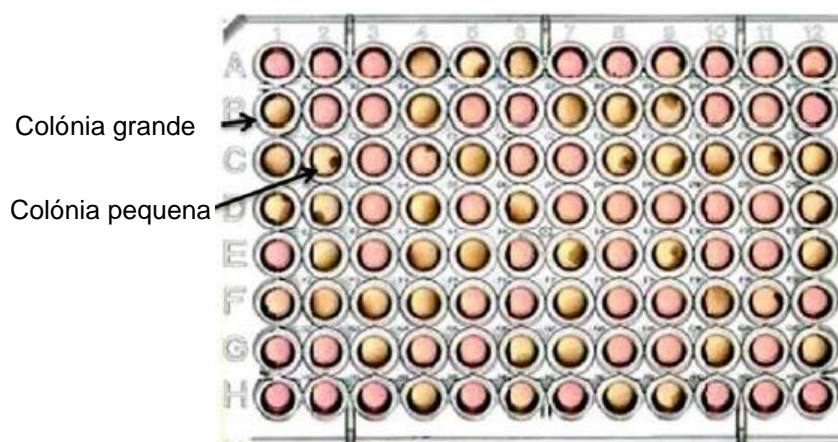


Figura 1.3 - Placa de 96 micropoços com identificação de colônias grandes e pequenas (adaptada de Schisler et al., 2013).

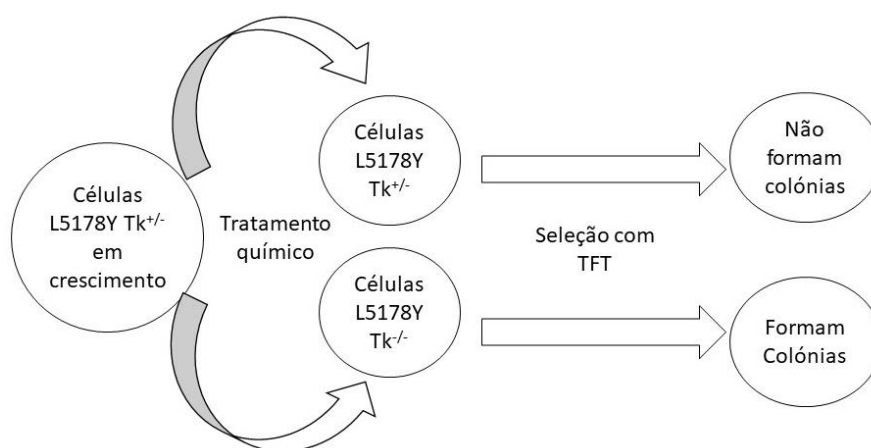


Figura 1.4 - Princípio base do teste MLA.

As colônias grandes apresentam um crescimento semelhante ao das células normais, enquanto que as colônias pequenas têm um crescimento mais lento. Estas últimas resultam de mutações por deleção envolvendo genes reguladores do crescimento próximo ao *locus* TK, estando associadas a produtos químicos que induzem alterações cromossômicas estruturais

(clastogénicos). Já as colónias grandes são derivadas de mutações por substituição (agentes mutagénicos) (Nicolette, 2017; Schisler et al., 2019).

Desta forma, contabilizando os dois tipos de colónias é possível ter mais informação sobre o tipo de lesões induzidas pelo produto em estudo.

Este ensaio foi originalmente desenvolvido com células imobilizadas em *soft agar* para enumerar os mutantes, tendo sido sujeito a diversas alterações, até Jane Cole e os seus colegas, em 1983, publicarem um método usando meio líquido em placas de 96 poços para determinar a frequência de mutação (Clive et al., 1972; Cole et al., 1983). Assim, para a realização deste ensaio, existem duas metodologias igualmente aceites: clonagem em *soft agar* e clonagem em meio líquido em placas de 96 poços (OECD, 2016; Schisler et al., 2019).

### 1.2.2.1.2 Considerações da *Guideline da OCDE* (OECD, 2016)

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) estabeleceu a 29 de julho de 2016 uma *Guideline, TG 490 - In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene*, que define algumas considerações a ter em conta aquando da execução deste estudo como as condições de manipulação das células, que concentrações e solventes usar, bem como os critérios de aceitação.

De acordo com a referida *Guideline*, devem ser evitadas condições que levem a falsos resultados positivos, isto é, que não resultem da interação entre a substância em estudo e as células. Estas condições incluem mudanças no pH, osmolaridade, interação com os componentes do meio ou níveis excessivos de citotoxicidade.

Os produtos químicos análogos da timidina ou que se comportam como tal, também podem levar ao aumento da frequência de mutantes espontâneos, sendo por isso necessários testes adicionais.

Uma vez que o ensaio foi desenvolvido e caracterizado utilizando a sub-linha TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C das células L5178Y deve ser esta a linha a usar para este teste. Esta linha celular foi desenvolvida a partir de células de linfoma de rato, possui um número modal de cromossomas de 40, tendo um cromossoma metacêntrico (t12;13), o *locus* TK está localizado na extremidade distal do cromossoma 11 e apresenta ainda mutação nos dois alelos p53, produzindo a proteína mutante-p53. Deve ainda assegurar-se a ausência de contaminações por *Mycoplasma* e um tempo de duplicação constante.

Antes da realização do ensaio a cultura deve ser limpa, de forma a retirar células mutantes pré-existentes. Esta limpeza é feita com metotrexato, timidina, hipoxantina e glicina.

O laboratório deve ter um stock mãe de células, que deve ser armazenado a -150 °C. Aquando da realização do ensaio, as células devem ser incubadas a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. É importante escolher um meio que garanta um crescimento ótimo das culturas. O grupo de trabalho internacional do ensaio MLA refere ainda que a cultura de células de trabalho não deve exceder os 3 meses (Moore et al., 2000).

O sistema de ativação metabólica exógena não é exatamente igual às condições *in vivo*, no entanto, deve ser usado uma vez que esta linha celular não tem uma capacidade metabólica

endógena adequada. O sistema mais usado é uma fração (S9) pós mitocondrial suplementada com co-fatores preparada a partir de fígado de roedores (geralmente rato), após tratamento com agentes indutores de enzimas. A concentração usada deve estar entre 1 e 2 % (v/v), mas pode chegar aos 10 % (v/v) no final.

Se a substância a estudar for sólida deve ser diluída num solvente adequado. No caso de ser líquida poder ser adicionada diretamente ou diluída. Já se for gasosa ou volátil devem ser previamente estudadas as possíveis alterações nos protocolos, como tratamento em frascos de cultura selados. As preparações devem ser feitas imediatamente antes do tratamento a menos que, a substância em estudo seja, comprovadamente, estável durante o armazenamento.

O solvente deve ser escolhido para facilitar a solubilidade da substância em estudo sem interferir com o teste. É recomendada a escolha de um solvente aquoso sempre que possível. A água e o dimetilsulfóxido (DMSO) são os solventes preferenciais, sendo que os solventes orgânicos não devem ultrapassar 1 % (v/v) e os aquosos devem estar abaixo dos 10 % (v/v). Caso seja necessário utilizar outros solventes devem existir provas de que é compatível com o produto químico, com o sistema teste e que não é genotóxico.

Devem-se evitar concentrações com capacidade de produzir respostas positivas falsas, como precipitação, alteração do pH ou osmolaridade. Se a substância em estudo provocar uma mudança de pH, este pode ser ajustado com o auxílio de um tampão.

A seleção das concentrações é baseada não só na citotoxicidade mas também da solubilidade e precipitação, devendo ser feita a avaliação com pelo menos quatro concentrações.

Se a substância em estudo apresentar citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem cobrir todo o espectro de citotoxicidade incluindo as concentrações onde há pouca ou nenhuma citotoxicidade. Neste caso, a concentração máxima deve ter entre 10 e 20 % de crescimento total relativo (RTG).

Para substâncias sem citotoxicidade e pouco solúveis a concentração mais elevada a utilizar deve produzir turvação ou precipitado visível a olho nu, que não deve interferir com o ensaio. Já no caso de não apresentarem citotoxicidade nem precipitado, a concentração deve ser 10 mM, 20 mg/mL ou 2 µL/mL, escolhendo a inferior.

Ainda de acordo com a Guideline da OCDE, devem ser realizados controlos negativos e positivos. Os controlos negativos consistem na análise do solvente sozinho no meio, tratado da mesma forma que a amostra.

Os controlos positivos são necessários para mostrar a capacidade de identificar mutagénicos nas condições usadas, colónias pequenas e grandes e a eficiência do sistema de ativação metabólica exógena. Como controlos positivos sem necessidade de ativação metabólica são sugeridos o metil metanosulfonato (MMS), mitomicina C (MMC) e 1-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO), enquanto que para controlos positivos com necessidade de ativação metabólica são sugeridos o benzo(a)pireno (B(a)P), a ciclofosfamida (CP), o 7,12 – dimetilbenzotraceno (DBT) e o 3-metilcolantreno (MCT).

### 1.2.2.1.3 Descrição do método e critérios de aceitação (OECD, 2016)

Na realização do MLA em microplaca, as células em suspensão são expostas ao químico em estudo, com ou sem ativação metabólica exógena, por um determinado período de tempo, ao fim do qual se cultivam as células para determinar a citotoxicidade e permitir a expressão fenotípica ótima previamente à seleção mutante. As células são depois colocadas em cultura em placas de 96 micropoços durante 14 dias, ao fim dos quais se contam as colónias existentes.

A citotoxicidade é determinada pelo crescimento total relativo (RTG), que depende do crescimento em suspensão relativo (RSG) e da eficiência clonal relativa (RCE), de acordo com as seguintes expressões:

$$RTG = RSG \times RCE$$

$$RSG = \frac{SG_1(\text{teste}) \times SG_2(\text{teste})}{SG_1(\text{controlo}) \times SG_2(\text{controlo})}, \text{ onde:}$$

SG<sub>1</sub> corresponde à taxa de crescimento entre o dia 0 e o dia 1 (concentração celular no dia 1/concentração celular no dia 0) e o SG<sub>2</sub> corresponde à taxa de crescimento entre o dia 1 e o dia 2 (concentração celular no dia 2/concentração celular no dia 1). O SG<sub>1</sub> deve ser calculado a partir da concentração inicial de células usada no início do tratamento. O RSG consiste então no crescimento da suspensão total para uma determinada cultura celular tratada quando comparado com o controlo. Em seguida apresentam-se as expressões para o cálculo destes parâmetros:

$$SG_1 = \frac{\text{Concentração celular no dia 1}}{\text{Concentração celular no dia 0}}$$

$$SG_2 = \frac{\text{Concentração celular no dia 2}}{\text{Concentração celular no dia 1}}$$

$$SG = SG_1 \times SG_2$$

$$RCE = \frac{CE_{\text{teste}}}{CE_{\text{controlo}}}, \text{ em que:}$$

CE corresponde à eficiência clonal. RCE consiste então na eficiência clonal relativa de uma cultura teste quando comparada com a eficiência clonal relativa do controlo, obtido no período de seleção mutante.

A frequência mutante (MF) é determinada cultivando células no meio contendo o agente seletivo e em meio sem o agente seletivo para determinar a eficiência de clonagem (CE), de acordo com as seguintes expressões:

$$MF = \frac{CE_M}{CE_V}, \text{ onde M se refere ao meio seletivo e V ao meio não seletivo}$$

$$CE = \frac{C}{T} = \frac{P \times TW}{T}, \text{ onde:}$$

P é o número provável de colónias por poço, TW é o número total de micropoços, e T é o número de células por poço.

$$P = -\ln \frac{E_W}{T_W}, \text{ em que:}$$

$E_W$  é o número de poços vazios e  $T_W$  é o número total de poços utilizados.

Devem ser feitos ensaios em duas condições experimentais (tratamento de curta e longa duração), a menos que uma delas apresente resultado positivo. Qualquer ensaio deve avaliar três parâmetros principais, que se encontram na tabela 1.1, assim como os seus valores aceitáveis, relativamente ao não tratado/controlo negativo.

**Tabela 1.1 - Critérios de aceitação**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valores aceitáveis</b>
<b>Frequência de mutação</b>	50 – 170 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Eficiência clonal</b>	65 – 120 %
<b>Crescimento em suspensão</b>	8 – 32 vezes (tratamento de 3-4horas) 32 – 180 vezes (tratamento de 24horas)

Os controlos positivos devem ainda respeitar pelo menos um dos seguintes critérios:

- Aumento absoluto na frequência de mutação, ou seja, um aumento acima da frequência de mutação espontânea (MF induzida) de 300 x 10<sup>-6</sup>, sendo que, 40 % dela deve ser respeitante às colónias pequenas
- Aumento na frequência de mutação de colónias pequenas de pelo menos 150 x 10<sup>-6</sup>, relativamente ao controlo não tratado/negativo

Por fim, o limite superior de citotoxicidade observado no controlo positivo deve ser o mesmo que o das culturas teste, ou seja, o RTG não deve ser inferior a 10 %.

Com o objetivo de assegurar que o aumento da MF é biologicamente relevante recorre-se ao Fator de Avaliação Global (GEF), que é um fator baseado na análise da distribuição de dados de outros laboratórios, representando uma frequência de mutação induzida predefinida. No caso deste ensaio, o GEF é de 126x10<sup>-6</sup>.

Assumindo que todos os critérios de aceitação são cumpridos, só se pode considerar que um químico é claramente positivo se o aumento de MF exceder o GEF e o aumento tiver uma relação com a concentração, considerando-se assim que a substância é capaz de induzir mutação no sistema de teste. Por outro lado, o químico é claramente negativo se não se obtiver uma resposta com uma relação com a concentração ou se o aumento do MF não exceder o GEF, nestes casos, então, o químico não é capaz de induzir mutações no teste.

Se não se obtiver uma resposta claramente positiva ou negativa, de forma a estabelecer a relevância biológica, os dados devem ser reavaliados, podendo-se recorrer à repetição do ensaio alterando as condições experimentais.

### 1.3 BOAS PRÁTICAS DE TRABALHO *IN VITRO*

#### 1.3.1 BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

A OCDE criou um grupo de princípios a que chamou Boas Práticas de Laboratório (BPL) com o objetivo de garantir a qualidade e validade dos testes usados para avaliação da segurança de produtos químicos, sendo considerado um sistema de qualidade, garantindo que os estudos realizados são de qualidade, rigorosos e reprodutíveis. Este sistema abrange não só o estudo em si mas também o seu processo de organização e as condições em que é feito (OECD, 1997).

#### 1.3.2 CULTURA CELULAR

Por cultura celular entende-se a remoção de células de um animal ou planta e o seu crescimento em condições artificiais favoráveis, que dependem de linha para linha celular. Estas podem ser finitas ou contínuas. Geralmente, as células em cultura possuem um limite de divisões, a partir do qual perdem essa capacidade, chamam-se por isso finitas. No entanto, algumas linhas celulares tornam-se contínuas, ou seja, através de uma transformação espontânea ou induzida por exposição a compostos químicos ou a determinados vírus, adquirem capacidade de se dividirem indefinidamente.

A cultura celular é, então, efetuada dentro de um recipiente adequado contendo substrato ou meio, que fornece os nutrientes essenciais (aminoácidos, minerais, vitaminas), fatores de crescimento, hormonas, gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) e num ambiente controlado de pH, temperatura e pressão osmótica. Algumas células, como as fibroblásticas, a que se chamam células aderentes, precisam ainda de crescer agarradas a uma superfície sólida ou semi-sólida, enquanto outras crescem em suspensão, como as linfoblastoides (usadas neste trabalho) (Gibco, 2016).

De forma a garantir um crescimento apropriado das células, é aconselhado um meio que contenha L-glutamina e bicarbonato de sódio. Com o objetivo de suplementar o meio para um melhor crescimento celular pode recorrer-se a suplementação com soro de cavalo inativado por calor (30 minutos a 56 °C) (Ditz et al., 2019; Paim et al., 2019), sendo que a inativação é estritamente necessária para não ocorrer recuperação de clones que não são efetivamente mutantes (Lloyd & Kidd, 2012; Schisler et al., 2019). O soro animal é usado para otimizar a proliferação celular uma vez que é uma mistura complexa de fatores nutricionais (aminoácidos, açúcares, lípidos) e fatores macromoleculares (fatores de crescimento e hormonas) (OECD, 2018).

É ainda aconselhado o uso de penicilina-estreptomicina, um antibiótico, de forma a evitar contaminações (Lloyd & Kidd, 2012).

#### 1.3.3 SEGURANÇA E ASSEPSIA

O trabalho num laboratório onde se realizam culturas celulares apresenta riscos acrescidos decorrentes da manipulação de células e tecidos humanos ou animais, mas também de solventes e reagentes tóxicos, corrosivos e mutagénicos. É, portanto, de grande importância a implementação de regras de segurança como a utilização de equipamento de proteção

individual, nomeadamente luvas e bata, a lavagem das mãos, eliminando quaisquer contaminações que possam afetar as células, desinfecção das superfícies de trabalho antes e depois de estar concluído, e descartar qualquer material possivelmente contaminado.

Todas estas medidas devem ser postas em prática em simultâneo com a utilização de barreiras primárias, como as câmaras de fluxo laminar, possuindo, como o nome indica, um fluxo constante e unidirecional de ar filtrado por filtros HEPA sobre a zona de trabalho, garantindo condições de assepsia. Existem dois tipos de fluxo, o fluxo vertical e o horizontal. Enquanto o horizontal apenas protege a cultura ou o utilizador, o fluxo vertical tem a capacidade de proteger ambos.

Para um bom trabalho, o interior da câmara, assim como todo o material colocado no seu interior, deve ser desinfetado com álcool 70 %. Dentro da câmara deve apenas ser colocado o material necessário ao trabalho a efetuar devendo ficar um espaço de trabalho desocupado. De forma a evitar contaminações deve haver um fluxo de trabalho limpo, ou seja, o material estéril não deve estar ao pé do material contaminado. Todas as soluções, materiais e reagentes devem apenas ser abertos dentro da câmara de forma a manter a esterilidade (Gibco, 2016).

#### 1.4 OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho consistiu na familiarização com os princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e na implementação e validação do ensaio de mutagenicidade em células de mamífero *Mouse lymphoma assay* no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da ASCENZA. A concretização deste objetivo implicou a otimização das condições de ensaio no laboratório, incluindo a otimização do comportamento das culturas celulares de forma a posteriormente proceder à sua validação para aplicação em condições BPL.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS:

#### 2.1.1 CONTROLOS POSITIVOS E REAGENTES

1-Óxido de 4-nitroquinolina (CAS nº 56-57-5; Lote: WXBC2611V; Sigma-Aldrich); cloreto de magnésio (CAS nº 7791-18-6; Lote: 0000511059; Panreac); cloreto de potássio (CAS nº 7447-40-7; Lote: 15J210017; VWR); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lotes: RNBJ2215, RNBJ6525, RNBJ8353; Sigma-Aldrich); DMSO (CAS nº 67-68-5; Lotes: RNBH2324, RNBH8337; Sigma-Aldrich); fosfato de sódio monobásico (CAS nº 10049-21-5; Lote: 0000755212; Panreac); fosfato dissódico (CAS nº 7558-79-4; Lote: 149441; Fisher-Scientific); glicina (CAS nº 56-40-6; Lote: SLBV7625; Sigma-Aldrich); glucose-6-fosfato (CAS nº 54010-71-8; Lote: 343690; Acrôs Organics Enzymatic); solução de sal balanceado de Hanks (HBSS) (Lotes: RNBH2791, RNBJ3509; Sigma-Aldrich); hipoxantina (CAS nº 68-94-0; Lote: SLBH5921V; Sigma-Aldrich); L-glutamina (CAS nº 39537-23-0; Lote: RNBJ4228; Sigma-Aldrich); metil metanosulfato (CAS nº 66-27-3; Lote: MKCL6261; Sigma-Aldrich); metotrexato (CAS nº 133073-73-1; Lote: BCBX0730; Sigma-Aldrich); mitomicina C (CAS nº 50-07-7; Lotes: SLBP4042V, SLBX4310; Sigma-Aldrich); NADP (CAS nº 24292-60-2; Lote: 031018; Tebu-Bio/Gerbu Bitotechnik GmbH); penicilina-estreptomicina (Lotes: 0000093568, 128M4822V; Sigma-Aldrich); piruvato de sódio (CAS nº 113-24-6; Lote: RNBH9724; Sigma-Aldrich); S9 (Lote: 4132; Trinova Biochem); soro de cavalo (Lotes: 18L063, 20A015; Sigma-Aldrich); timidina (CAS nº 50-89-5; Lote: SLBT0908; Sigma-Aldrich); trifluorotimidina (CAS nº 70-00-8, Lotes: BCBW1167, BCCC0309; Sigma-Aldrich)

#### 2.1.2 SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

A substância em estudo foi denominada de XYZ devido ao acordo de confidencialidade estabelecido com a ASCENZA. Trata-se de uma substância ativa de um inseticida pertencente ao grupo dos químicos sintéticos piretroides, semelhantes às substâncias naturais piretrinas, cuja função é manter abertos os canais de sódio nas membranas neurais dos insetos. A substância XYZ foi pesada numa balança analítica (Mettler Toledo, XSE 205DU), no dia de cada ensaio e foram preparadas as diluições necessárias, sendo descartado o restante.

Os controlos positivos foram preparados em concentrações stock que foram armazenadas em alíquotas e posteriormente diluídas às concentrações necessárias.

#### 2.1.3 CULTURA CELULAR

A linha celular L5178Y TK<sup>+/+</sup>-3.7.2C (ATCC, Estados Unidos da América) foi mantida de forma rotineira em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (T75) com meio DMEM suplementado com 10 % de soro de cavalo e 1% de penicilina-estreptomicina numa estufa (Binder, C170) humidificada a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 2.2 MÉTODOS:

De forma a garantir as condições de assepsia, todas as manipulações das células foram efetuadas dentro de uma câmara de fluxo laminar (Faster, SafeFAST Elite 212-D). De forma a evitar contaminações cruzadas, todos os equipamentos utilizados foram de uso exclusivo para esta linha celular.

### 2.2.1 ARMAZENAMENTO/CONGELAMENTO

Para efetuar o armazenamento das células, transferiu-se o *pellet* celular proveniente de um frasco T75 para criotubos estéreis. Preparou-se cada criotubo com 5 % (v/v) de DMSO, 20 % (v/v) de soro e aferiu-se os restantes 75 % com meio completo. De seguida, transferiram-se os *vials* para um ultracongelador (Artiko, ULUF450) à temperatura de - 80 °C. Ao fim de 20 a 30 minutos os *vials* foram transferidos para um criocentor (Thermo Scientific, Locator JR Plus) com azoto, mantendo as células na fase de vapor.

### 2.2.2 DESCONGELAMENTO

Para descongelar as células os *vials* contendo as células congeladas, foram colocados num banho termostaticado (J.P. Selecta, Precistern 20L) a 37 °C. Imediatamente após o descongelamento, o conteúdo foi transferido para um tubo com 8 mL de meio completo (previamente preparado no interior da câmara de fluxo laminar). Após homogeneização, centrifugaram-se (Hettick, Universal 320) as células a 1200 rpm durante 7 minutos, descartou-se o sobrenadante e colocou-se o *pellet* celular em frasco(s) de cultura T25, suplementados com meio completo. Identificou-se cada frasco de cultura com o código interno atribuído, o número de passagens, a data e a rubrica do operador e colocaram-se as células a incubar numa estufa a 37 °C, com 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3 PASSAGEM CELULAR

Distribui-se a cultura celular por tubos de centrífuga e centrifugou-se a 1200 rpm durante 7 minutos, desprezando-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* celular em meio completo. Colocou-se a suspensão celular num frasco ou frascos novos, previamente preparados com meio completo. Identificou-se cada frasco de cultura com o código interno atribuído, o número de passagens, a data e a rubrica do operador. Incubou-se as células numa estufa a 37 °C, com 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.3.1 Contagem de células ao hemacitómetro

Após a preparação da diluição da suspensão celular, ou por contagem direta, procedeu-se à inserção de cerca de 8 µL a 10 µL da suspensão na área central da câmara de Neubauer com o auxílio de uma micropipeta. Com recurso a um microscópio (Olympus, BX43F, 40X), contaram-se as células presentes dentro dos limites dos 25 quadrados da subdivisão quadrada central. As contagens foram efetuadas no mínimo em duplicado.

### 2.2.3.2 Determinação do Tempo de Duplicação

Ao longo das passagens celulares para manutenção das culturas foram sendo realizadas contagens de células utilizando o hemacitômetro, como indicado acima, por forma a definir o tempo de duplicação da linha celular. As contagens foram feitas por remoção de 500  $\mu$ L da suspensão celular e posterior diluição (quando necessário), e o tempo de duplicação calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Tempo de duplicação} = \frac{\Delta t}{\log_2\left(\frac{\Delta N}{N_0} + 1\right)}, \text{ onde}$$

$\Delta N$  corresponde ao aumento do número de células durante o período de observação;

$\Delta t$  é o tempo de observação;

$N_0$  é o número de células iniciais.

### 2.2.4 ENSAIO DE SOLUBILIDADE

De forma a determinar o solvente adequado para utilização na preparação da substância XYZ realizou-se um ensaio de solubilidade de acordo com as recomendações da OCDE já citadas.

A substância em estudo após pesagem foi dissolvida em DMSO, água bidestilada e meio DMEM na concentração de 200 mg/mL.

### 2.2.5 ENSAIO DE PRECIPITAÇÃO

A substância foi dissolvida no solvente determinado no ensaio de solubilidade nas diferentes concentrações (2; 1,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,01 mg/mL) em 5 mL de meio de cultura. Os frascos foram incubados durante 24 horas, sendo que antes e depois da incubação se mediu o pH e analisou-se a existência de precipitação no meio de cultura.

### 2.2.6 PRÉ-SELEÇÃO DE MUTANTES

Num tubo de centrifuga colocou-se a suspensão celular e centrifugou-se a 1200 rpm durante 7 minutos. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* em meio completo com 1 % (v/v) de THMG, ajustou-se a concentração celular a  $2 \times 10^5$  células/mL, e colocaram-se as células a incubar durante 24 horas. Ao fim deste tempo centrifugaram-se de novo as células e ressuspendeu-se o *pellet* em meio completo com 1 % de THG ajustando a  $1 \times 10^7$  células, voltou-se a incubar. Passadas 24 horas, centrifugaram-se as células e ressuspendeu-se o *pellet* em meio completo com 1 % de THG a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. As células incubaram durante 24 horas numa estufa de CO<sub>2</sub> e no fim desse tempo foram centrifugadas e suspensas em meio completo. Foram então congeladas em azoto ou usadas diretamente para ensaio.

## 2.2.7 ENSAIO DE MUTAGENICIDADE E EFICIÊNCIA CLONAL

### 2.2.7.1 Exposição à substância

Retirou-se a suspensão celular de um frasco T25 bem cheio para tubos de centrifuga e centrifugou-se a 1200 rpm durante 7 minutos. Descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* em 1 mL de meio completo para contagem de células, para o cálculo do SG<sub>1</sub>. Num tubo de Falcon de 50 mL adicionou-se aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/mL em meio com 5 % de soro de cavalo, e o volume adequado da substância em estudo e dos controlos. Incubaram-se as células durante 4 horas com e sem ativação metabólica ou 24 horas sem S9 mix. O S9 mix foi preparado conforme descrito na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Constituição do S9 mix.

Matéria Prima	Concentração final
Solução de sais (MgCl <sub>2</sub> (0,4 M) e KCl (1,65 M))	2 % (v/v)
Solução de Glucose-6-fosfato 1 M	5 mM
Solução de NADP 0,1 M	4 mM
Solução tampão fosfatos 0,2 M, pH 7,4	50 % (v/v)
Água bidestilada	-
S9 (reconstituído em água bidestilada)	10 % (v/v)

### 2.2.7.2 Remoção da substância

Após 4 horas ou 24 horas de exposição, centrifugaram-se os tubos contendo as células, descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com adicionaram-se 10 mL de HBSS, para lavagem das células. Efetuou-se uma nova centrifugação para remover o HBSS, descartou-se o sobrenadante, suspendeu-se o *pellet* em 1 mL de meio completo tendo sido contado o número de células. A totalidade das células foi incubada durante mais 20 horas (no caso do ensaio de 4 horas).

### 2.2.7.3 Expressão fenotípica

Após 24 horas da adição da substância, que no caso do ensaio das 24 horas coincide com a remoção do químico, centrifugaram-se as células e contou-se o seu número, sendo este usado para o cálculo do SG<sub>1</sub> e SG<sub>2</sub>. Seguidamente, ajustou-se a concentração celular a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/mL em meio completo e procedeu-se a mais 24 horas de incubação. Decorrido esse tempo voltou-se a centrifugar para remoção do meio e procedeu-se a uma nova contagem do número de células.

### 2.2.7.4 Ensaio de mutagenicidade

Após o período de expressão fenotípica, fizeram-se diluições seriadas até se obter uma concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL em 80 mL de meio DMEM com 20% de soro HS (HS20), onde se adicionou 80 µL de TFT 3 mg/mL, de forma a obter uma concentração final de 3 µg/mL.

Em seguida, em placas de 96 poços, colocaram-se 200  $\mu$ L da suspensão celular em cada poço. Tendo sido efetuadas quatro placas por tubo de Falcon.

As placas foram então incubadas durante pelo menos 14 dias. No final da incubação os poços foram observados, tendo-se registado o número de colónias de cada tipo que se encontravam presentes, tendo sido consideradas colónias grandes, as colónias que ocupavam mais de  $\frac{1}{4}$  do poço, e colónias pequenas, as que ocupavam menos de  $\frac{1}{4}$  do poço.

#### **2.2.7.5 Ensaio de citotoxicidade**

Efetuarão-se diluições seriadas até 16 células/mL em 20 mL de meio DMEM sem soro. Em placas de 96 poços colocaram-se 100  $\mu$ L da suspensão celular e 100  $\mu$ L de meio DMEM com 40 % de soro HS (HS40) por poço. Foram feitas duas placas por tubo de Falcon.

Incubaram-se as placas durante pelo menos 14 dias ao fim dos quais se contou o número de colónias presentes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 DETERMINAÇÃO TEMPO DE DUPLICAÇÃO

O tempo de duplicação foi determinado em culturas com seleção e os valores obtidos estão descritos na Tabela 3.1. Foram usadas as culturas provenientes do congelado LY<sup>++</sup>/02/20/047 onde LY corresponde à linha celular, o símbolo ++ identifica as culturas que sofreram pré-seleção de mutantes, 02/20 indica que foi o segundo lote a chegar ao laboratório no ano de 2020 e os últimos números são o número sequencial atribuído ao congelado efetuados.

**Tabela 3.1 - Cálculo do tempo de duplicação das culturas celulares.**

Código da cultura	Tempo de duplicação (horas)	
	14	
	13	
	15	
<b>LY<sup>++</sup>/02/20/047</b>	13	Média ≈ 12 horas
	10	
	10	
	11	

#### 3.2 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO MLA

Para o desenvolvimento do ensaio, foi necessário efetuar diversos estudos de otimização, que foram realizados sem utilização de uma substância-teste. Depois da otimização iniciou-se o estudo de validação e, para tal, os ensaios decorreram com uma avaliação de uma substância-teste.

O estudo para otimização foi composto por dois ensaios de 4 horas sem S9, um ensaio de 4 horas com S9 e por fim um ensaio de 24 horas sem S9.

Para a validação do método foi efetuado um ensaio de 4 horas sem S9.

##### 3.2.1 ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO

###### 3.2.1.1 Ensaios de 4 horas sem S9

O primeiro ensaio, Ensaio 1, foi realizado com o controlo negativo, DMSO 0,5 % (v/v), e com o controlo positivo 1-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO). As concentrações utilizadas de 4-NQO foram as seguintes: 0,05; 0,075; 0,1 e 0,15 µg/mL (concentrações finais em meio de cultura).

As células foram transferidas dos frascos de cultura para tubos de Falcon e, após centrifugação e contagem, foram incubadas durante 4 horas em tubos de Falcon de 50 mL (um

tubo por substância em estudo). Após a exposição e lavagem com HBSS cada tubo foi dividido em dois.

A Tabela 3.2 reúne as concentrações celulares obtidas ao longo do período de expressão fenotípica, bem como os restantes parâmetros necessários para obter o valor do Crescimento em Suspensão Relativo (RSG). Estes cálculos foram efetuados recorrendo às fórmulas anteriormente apresentadas (Ponto 1.2.2.1.3). A contagem de células foi efetuada após centrifugação da suspensão celular, remoção do sobrenadante e ressuspensão em meio completo. O dia 0 corresponde ao dia em que foi adicionado o químico, o dia 1 a 24 horas após a adição e o dia 2 a 48 horas após a adição, ou seja, corresponde ao período da expressão fenotípica.

**Tabela 3.2 - Concentrações celulares ao longo da Expressão Fenotípica e cálculo do Crescimento em Suspensão Relativo (RSG).**

Teste	Concentração µg/mL	[Cel.]	[Cel.]	[Cel.]	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)
		dia 0	dia 1	dia 2					
4-NQO	-	2,19x10 <sup>5</sup>	2,08x10 <sup>6</sup>	2,48x10 <sup>6</sup>	9,49	1,19	11,31	1,00	100,00
	0,05	2,13x10 <sup>5</sup>	1,93x10 <sup>6</sup>	3,18x10 <sup>6</sup>	9,06	1,65	14,94	1,32	132,06
	0,075	2,81x10 <sup>5</sup>	3,50x10 <sup>6</sup>	5,05x10 <sup>6</sup>	12,44	1,44	17,96	1,59	158,70
	0,1	2,39x10 <sup>5</sup>	2,20x10 <sup>6</sup>	4,68x10 <sup>6</sup>	9,21	2,13	19,58	1,73	173,07
	0,15	4,69x10 <sup>5</sup>	5,40x10 <sup>6</sup>	1,30x10 <sup>7</sup>	11,52	2,40	27,68	2,45	244,65

Após a expressão fenotípica, as células foram diluídas de forma a atingir a concentração celular pretendida para a determinação da mutagenicidade e da eficiência de plaqueamento, em placas de 96 poços. Os resultados obtidos nesta fase do trabalho encontram-se na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 - Contagens de colónias após 14 dias de incubação e cálculo de Crescimento Total Relativo (RTG) e Frequência de Mutação (MF).**

Teste	Concentração µg/mL	Meio seletivo				Meio não seletivo			
		Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P	Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P
4-NQO	-	29	96	67	0,36	49	96	47	0,71
	0,05	8	96	88	0,09	17	96	79	0,19
	0,075	10	96	86	0,11	26	96	70	0,32
	0,1	7	96	89	0,08	24	96	72	0,29
	0,15	14	96	82	0,16	22	96	74	0,26

Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF	IMF
							(x10 <sup>-6</sup> )	(x10 <sup>-6</sup> )
4-NQO	-	2,23x10 <sup>-1</sup>	1,80x10 <sup>-4</sup>	1,00	100,00	100,00	805,72	0,00
	0,05	6,09x10 <sup>-2</sup>	4,35x10 <sup>-5</sup>	0,27	27,29	36,04	714,30	0,00
	0,075	9,87x10 <sup>-2</sup>	5,50x10 <sup>-5</sup>	0,44	44,22	70,18	557,23	0,00
	0,1	8,99x10 <sup>-2</sup>	3,79x10 <sup>-5</sup>	0,40	40,28	69,71	421,09	0,00
	0,15	8,13x10 <sup>-2</sup>	7,88x10 <sup>-5</sup>	0,36	36,44	89,16	968,97	163,24

Para o ensaio 2, apenas se utilizou o controlo negativo, DMSO, em três concentrações diferentes, 0,6; 0,54 e 0,53 % (v/v) durante 4 horas, e uma suspensão não tratada, ou seja, uma suspensão celular que passou por todo o processo normal, mas sem exposição a uma substância.

Os resultados obtidos neste ensaio estão descritos na Tabela 3.4. Neste ensaio a contagem foi feita em suspensão, ou seja, da suspensão celular retiraram-se diretamente (sem recorrer a centrifugação) 500  $\mu$ L para contagem.

Tabela 3.4 - Resultados do ensaio 4H sem S9 (2).

Teste	Concentração % (v/v)	[Cell] dia 0	[Cell] dia 1	[Cell] dia 1	[Cell] dia 2				
Não tratado	-		3,13x10 <sup>6</sup>		6,20x10 <sup>5</sup>				
			3,20x10 <sup>6</sup>		4,60x10 <sup>5</sup>				
DMSO	0,6	2,5x10 <sup>6</sup>	3,35x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>	5,80x10 <sup>5</sup>				
			2,89x10 <sup>6</sup>		4,80x10 <sup>5</sup>				
	2,72x10 <sup>6</sup>		4,30x10 <sup>5</sup>						
	2,74x10 <sup>6</sup>		6,90x10 <sup>5</sup>						
	2,61x10 <sup>6</sup>		6,60x10 <sup>5</sup>						
	3,35x10 <sup>6</sup>		6,80x10 <sup>5</sup>						
0,54									
0,53									
0,53									
Teste	Concentração % (v/v)	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)			
Não tratado	-	1,25	1,77	2,22	1,00	100,00			
		1,28	1,31	1,68	-	-			
DMSO	0,6	1,34	1,66	2,22	1,14	113,69			
		1,16	1,37	1,59	0,81	81,17			
	0,54	1,09	1,23	1,34	0,68	68,43			
		1,10	1,97	2,16	1,11	110,62			
0,53	1,04	1,89	1,97	1,01	100,79				
	1,34	1,94	2,60	1,33	133,29				
Teste	Concentração % (v/v)	Meio seletivo				Meio não seletivo			
		Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P	Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P
Não tratado	-	9	192	183	0,05	0	96	96	0,00
		13	192	179	0,07	0	96	96	0,00
DMSO	0,6	13	192	179	0,07	0	96	96	0,00
		19	192	173	0,10	1	96	95	0,01
	0,54	8	192	184	0,04	0	96	96	0,00
		19	192	173	0,10	2	96	94	0,02
0,53	11	192	181	0,06	0	96	96	0,00	
	9	192	183	0,05	4	96	92	0,04	
Teste	Concentração % (v/v)	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )	
Não tratado	-	3,00x10 <sup>-2</sup>	2,40x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	
		4,38x10 <sup>-2</sup>	3,51x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	
DMSO	0,6	4,38x10 <sup>-2</sup>	3,51x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	
		6,51x10 <sup>-2</sup>	5,21x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	7961,10	-	
	0,54	1,33x10 <sup>-2</sup>	2,13x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	
		3,26x10 <sup>-2</sup>	5,21x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	7919,19	-	
0,53	1,84x10 <sup>-2</sup>	2,95x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-		
	1,50x10 <sup>-2</sup>	2,40x10 <sup>-5</sup>	-	-	-	1804,87	-		

### 3.2.1.2 Ensaio de 4 horas com S9

O ensaio 3 foi realizado na presença de ativação metabólica, S9 mix. Incluiu a suspensão não tratada, o controlo negativo DMSO 0,3 % (v/v), e o controlo positivo ciclofosfamida (CP) na concentração de 3 µg/mL. A Tabela 3.5 reúne os resultados obtidos neste ensaio. Mais uma vez as contagens foram efetuadas em células em suspensão.

Tabela 3.5 - Resultados do ensaio 4H + S9.

Teste	Concentração µg/mL	[Cell] dia 0	[Cell] dia 1	[Cell] dia 1	[Cell] dia 2				
Não tratado	-	1,5x10 <sup>6</sup>	1,19x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>				
DMSO	0,3 % (v/v)		1,31x10 <sup>6</sup>		2,95x10 <sup>5</sup>				
CP	3		7,90x10 <sup>5</sup>		2x10 <sup>5</sup>				
Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)			
Não tratado	-	0,79	1,75	1,39	1,00	100,00			
DMSO	0,3 % (v/v)	0,87	1,48	1,29	0,93	92,79			
CP	3	0,53	1,00	0,53	0,38	37,94			
Teste	Concentração µg/mL	Meio seletivo				Meio não seletivo			
		Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P	Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P
Não tratado	-	10	384	374	0,03	10	176	166	0,06
		14	380	366	0,04	19	190	171	0,11
DMSO	0,3 % (v/v)	10	375	365	0,03	7	189	182	0,04
		12	384	372	0,03	13	189	176	0,07
CP	3	26	384	358	0,07	6	189	183	0,03
Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>M</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )	
Não tratado	-	3,66x10 <sup>-2</sup>	1,32x10 <sup>-5</sup>	1,07	107,33	107,33	360,87	37,92	
		6,59x10 <sup>-2</sup>	1,88x10 <sup>-5</sup>	1,93	193,32	193,32	285,02	0,00	
DMSO	0,3 % (v/v)	2,36x10 <sup>-2</sup>	1,35x10 <sup>-5</sup>	0,69	69,25	64,25	572,94	249,99	
		4,45x10 <sup>-2</sup>	1,59x10 <sup>-5</sup>	1,31	130,75	49,60	356,41	33,47	
CP	3	2,02x10 <sup>-2</sup>	3,51x10 <sup>-5</sup>	0,59	59,19	22,45	1738,57	1415,62	

### 3.2.1.3 Ensaio 24H

Foi efetuado um ensaio com 24 horas de exposição, onde se utilizou a suspensão não tratada, o controlo negativo DMSO 0,5 % (v/v) e dois controlos positivos, 4-NQO na concentração de 0,5 µg/mL e mitomicina C (MMC) na concentração de 0,075 µg/mL. Na Tabela 3.6 estão os resultados do ensaio. A contagem de células foi, mais uma vez realizada em células em suspensão.

Tabela 3.6 - Resultados do ensaio 24H.

Teste	Concentração µg/mL	[Cell] dia 0	[Cell] dia 1	[Cell] dia 1	[Cell] dia 2				
Não tratado	-		2,60x10 <sup>6</sup>		1,30x10 <sup>5</sup>				
			3,53x10 <sup>6</sup>		6,25x10 <sup>4</sup>				
DMSO	0,5 % (v/v)	2,50x10 <sup>6</sup>	2,89x10 <sup>6</sup>	2,00x10 <sup>5</sup>	1,10x10 <sup>5</sup>				
			2,38x10 <sup>6</sup>		1,25x10 <sup>5</sup>				
MMC	0,075		2,70x10 <sup>6</sup>		8,50x10 <sup>4</sup>				
4-NQO	0,5		3,35x10 <sup>6</sup>		1,58x10 <sup>5</sup>				
Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)			
Não tratado	-	1,04	0,65	1,00	1,00	100,00			
		1,41	0,31	0,65	0,65	65,18			
DMSO	0,5 % (v/v)	1,16	0,55	0,94	0,94	93,97			
		0,95	0,63	0,88	0,88	87,83			
MMC	0,075	1,08	0,43	0,68	0,68	67,90			
4-NQO	0,5	1,34	0,79	1,56	1,56	156,10			
Teste	Concentração µg/mL	Meio seletivo				Meio não seletivo			
		Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P	Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P
Não tratado	-	3	328	325	0,01	4	190	186	0,02
		6	376	370	0,02	3	192	189	0,02
DMSO	0,5 % (v/v)	6	384	378	0,02	10	192	182	0,05
		2	384	382	0,02	1	192	191	0,01
MMC	0,075	0	384	384	0,00	0	192	192	0,00
4-NQO	0,5	2	376	374	0,01	1	190	189	0,01
Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )	
Não tratado	-	1,33X10 <sup>-2</sup>	4,59X10 <sup>-6</sup>	0,86	85,73	85,73	345,47	0,00	
		9,84X10 <sup>-3</sup>	8,04X10 <sup>-6</sup>				817,16		
DMSO	0,5 % (v/v)	3,34X10 <sup>-2</sup>	7,87X10 <sup>-6</sup>	1,00	100,00	52,24	235,54	-	
		3,26X10 <sup>-3</sup>	2,61X10 <sup>-6</sup>				800,00		
MMC	0,075	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	
4-NQO	0,5	3,30X10 <sup>-3</sup>	2,67X10 <sup>-6</sup>	0,21	21,26	33,19	808,53	190,97	

### 3.2.1.4 Contagem das células em suspensão vs Contagem após centrifugação

Por forma a perceber se existiam diferenças significativas na contagem do número de células efetuada com e sem centrifugação da suspensão, fez-se um ensaio em que ambos os testes foram feitos da mesma forma, diferindo apenas no método de amostragem para contagem de células. No teste A, a contagem foi efetuada após remoção de 500 µL da suspensão e posterior diluição, como referido anteriormente, enquanto no teste B se centrifugou a suspensão, removeu-se o sobrenadante, ressuspendeu-se em 1mL de meio tendo-se, então, retirado 10 µL da suspensão para diluir e contar.

A Tabela 3.7 mostra os valores de SG obtidos em ambos os ensaios.

**Tabela 3.7 - Resultados obtidos nos ensaios A e B (Contagem das células em suspensão vs Contagem após concentração)**

Teste	Concentração µg/mL	[Cell]	[Cell]	[Cell]	[Cell]	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG
		dia 0	dia 1	Dia 1 (incubação)	dia 2			
A	DMSO	2,50x10 <sup>6</sup>	1,70x10 <sup>6</sup>	2,50x10 <sup>5</sup>	3,63x10 <sup>5</sup>	0,68	1,45	0,99
B	1 % (v/v)	2,02x10 <sup>6</sup>	1,76x10 <sup>6</sup>		2,42x10 <sup>6</sup>	0,87	9,68	8,43

### 3.2.2 ENSAIO DE VALIDAÇÃO

Como já foi referido anteriormente, este ensaio conta com a avaliação de uma substância, sendo parte de um estudo BPL.

#### 3.2.2.1 Ensaio de Precipitação e Solubilidade

Primeiramente foi realizado o ensaio de solubilidade e precipitação da substância em estudo. A substância foi dissolvida com sucesso em DMSO, numa concentração de 200 mg/mL. Assim, desta solução foram feitas as diluições necessárias de forma a obter as concentrações utilizadas no ensaio de precipitação. Os resultados do ensaio de precipitação encontram-se descritos na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8 - Resultados do ensaio de precipitação.**

Substância em estudo			Resultados			
Concentração		Volume adicionado por frasco (µL)	pH*		Sinais de precipitação	
Stock (mg/mL)	Final (mg/mL)		Inicial	Final	Inicial	Final
200	2	50	8	8	Precipitado / Solução turva	Algum precipitado
200	1,5	37,5	8	8	Sem precipitado	Sem precipitado
200	1	25	8,5	8	Sem precipitado	Sem precipitado
200	0,5	12,5	8,5	8	Sem precipitado	Sem precipitado
50	0,25	25	9	8	Sem precipitado	Sem precipitado
50	0,1	10	9	8	Sem precipitado	Sem precipitado
50	0,05	5	9	8,5	Sem precipitado	Sem precipitado
25	0,025	5	9	8,5	Sem precipitado	Sem precipitado
10	0,01	5	9	9	Sem precipitado	Sem precipitado
DMSO	-	50	9	9	Sem precipitado	Sem precipitado
Meio	-	-	9	9	Sem precipitado	Sem precipitado

\*) O valor do pH foi medido recorrendo a papel indicador, sendo, por isso, um valor aproximado.

### 3.2.2.2 Ensaio 4 horas sem S9

O primeiro ensaio, foi efetuado com o controlo negativo, DMSO, o controlo positivo, MMS 10 µg/mL, e a substância em estudo, com 5 concentrações: 100; 250; 500; 1000; 2000 µg/mL. Na Tabela 3.9 estão os resultados obtidos neste ensaio. As contagens celulares foram efetuadas diretamente a partir da suspensão celular (sem centrifugação), removendo 500 µL do frasco.

**Tabela 3.9 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.**

Teste	Concentração µg/mL	[Cell] dia 0	[Cell] dia 1	[Cell] dia 1	[Cell] dia 2
DMSO	1 % (v/v)		1,48x10 <sup>6</sup>		7,88x10 <sup>5</sup>
	100		1,21x10 <sup>6</sup>		8,75x10 <sup>5</sup>
	250		1,56x10 <sup>6</sup>		7,13x10 <sup>5</sup>
XYZ	500	2,00x10 <sup>6</sup>	1,26x10 <sup>6</sup>	2,50x10 <sup>6</sup>	8,88x10 <sup>5</sup>
	1000		1,21x10 <sup>6</sup>		1,24x10 <sup>6</sup>
	2000		1,36x10 <sup>6</sup>		1,20x10 <sup>6</sup>
MMS	10		9,50x10 <sup>5</sup>		1,05x10 <sup>6</sup>

Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)
DMSO	1 % (v/v)	0,74	3,15	2,32	1,00	100,00
	100	0,61	3,50	2,12	0,91	91,34
	250	0,78	2,85	2,23	0,96	95,84
XYZ	500	0,63	3,55	2,24	0,96	96,46
	1000	0,61	4,95	3,00	1,29	129,18
	2000	0,68	4,80	3,27	1,41	140,76
MMS	10	0,48	4,20	2,00	0,86	85,88

Teste	Concentração µg/mL	Meio seletivo				Meio não seletivo			
		Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P	Nº de colónias	Poços totais	Poços vazios	P
DMSO	1 % (v/v)	2	384	382	0,01	6	184	178	0,03
	100	0	384	384	0,00	5	186	181	0,03
	250	1	384	383	0,00	8	192	184	0,04
XYZ	500	2	384	382	0,01	5	192	187	0,03
	1000	2	384	382	0,01	7	192	185	0,04
	2000	1	384	383	0,00	5	188	183	0,03
MMS	10	3	384	381	0,01	1	185	184	0,01

Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )
DMSO	1 % (v/v)	2,07x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	1,00	100,00	100,00	126,01	0,00
	100	1,70x10 <sup>-2</sup>	-	0,82	82,20	75,08	0,00	0,00
	250	2,66x10 <sup>-2</sup>	1,30x10 <sup>-6</sup>	1,28	128,38	123,04	49,01	0,00
XYZ	500	1,65x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	0,80	79,59	76,78	158,32	32,31
	1000	2,32x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	1,12	112,03	144,71	112,48	0,00
	2000	1,68x10 <sup>-2</sup>	1,30x10 <sup>-6</sup>	0,81	81,31	114,45	77,39	0,00
MMS	10	3,39x10 <sup>-3</sup>	3,92x10 <sup>-6</sup>	0,16	16,35	14,04	1157,65	1031,64



## 4 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 4.1 TEMPO DE DUPLICAÇÃO

Por análise da tabela 3.1 conseguimos perceber que o tempo de duplicação obtido para as culturas estudadas ronda as 12 horas, o que está de acordo com a literatura (Chen et al., 2014; Lloyd & Kidd, 2012; Schisler et al., 2019; Sigma-Aldrich, 2021a, 2021c, 2021b).

### 4.2 ENSAIOS

Como referido na introdução, todos os ensaios são sujeitos a aceitação segundo critérios definidos pela Guideline OCDE 490. Desta forma, encontram-se abaixo os critérios de aceitação.

$$\begin{array}{l} \text{Controlo negativo} \\ / \text{ não tratado} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{MF} = (50 - 170) \times 10^{-6} \\ \text{CE} = 65 - 120 \% \\ \text{SG} \left\{ \begin{array}{l} 8 - 32 \text{ vezes} \rightarrow (3-4 \text{ horas}) \\ 32 - 180 \text{ vezes} \rightarrow (24 \text{ horas}) \end{array} \right. \end{array} \right.$$
  
$$\text{Controlo positivo} \left\{ \begin{array}{l} \text{IMF} > \text{MF} = 300 \times 10^{-6} \\ \text{Limite superior citotoxicidade} - \text{RTG} > 10\% \end{array} \right.$$

Substância em estudo  $\rightarrow$  RTG = 10 – 20 %

Substância é POSITIVA se IMF > GEF (GEF =  $126 \times 10^{-6}$ )

#### 4.2.1 CONTAGEM EM SUSPENSÃO VS CONTAGEM EM *PELLET*

Por análise da tabela 3.7 é notório que o teste B, contagem por *pellet* (contagem após centrifugação) obteve resultados muito superiores ao teste A no que diz respeito ao SG, sendo que o teste B encontra-se dentro dos parâmetros da Guideline, contrariamente ao teste A. Esta tendência é ainda confirmada pelo Ensaio 1 do estudo de otimização, cuja contagem também foi efetuada por *pellet*, e em que se obteve um SG dentro dos parâmetros, contrariamente ao ocorrido nos restantes ensaios.

Esta diferença deve-se provavelmente a uma maior facilidade de homogeneização de volumes pequenos, como acontece na contagem por *pellet*, e, portanto, a amostragem é mais fidedigna do que retirar uma amostra de um volume muito superior.

Podemos concluir que o facto de, nos ensaios 2 e 3 do estudo de otimização e no ensaio 1 do estudo de validação, o SG não ter sido de acordo com o espectável (entre 8 a 32 nos ensaios de 4 horas, e entre 32 a 180 nos ensaios de 24 horas) deveu-se à contagem ter sido feita diretamente da suspensão. Desta forma, decidiu-se que a contagem começaria a ser efetuada por *pellet*.

Alguns autores adicionaram L-glutamina e piruvato de sódio ao meio de cultura, que são suplementos que potenciam o crescimento celular. A L-glutamina é um dos aminoácidos mais facilmente disponíveis para uso como fonte de energia e é a principal fonte de energia para

muitos tipos de células de divisão rápida *in vitro*. O piruvato de sódio é uma fonte de carboidratos. Embora não se encontre descrito neste trabalho estas condições já foram testadas e não melhoraram a performance das células (Chen et al., 2014; Lloyd & Kidd, 2012; Schisler et al., 2019; Sigma-Aldrich, 2021a, 2021c, 2021b).

#### 4.2.2 ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO

##### 4.2.2.1 Ensaios 4H sem S9

Para o ensaio 1, por observação da Tabela 3.2 é possível constatar que o crescimento em suspensão do dia 1 (SG<sub>1</sub>) foi, em todas as amostras, muito superior ao crescimento em suspensão do dia 2 (SG<sub>2</sub>). De acordo com a literatura (Chen et al., 2014) o SG<sub>1</sub> deveria ser inferior ao SG<sub>2</sub>, o que seria esperado uma vez que no SG<sub>1</sub> passaram-se apenas 20 horas desde a exposição das células à substância e no SG<sub>2</sub> já se passaram mais 24 horas, tempo no qual algumas células recuperaram atividade. No entanto, o DMSO apresenta um valor de SG total de aproximadamente 11 vezes, o que está de acordo com o critério de aceitação estabelecido pela Guideline, tendo de estar entre 8 e 32 vezes, para um ensaio de 3-4 horas.

Na Tabela 3.3, podemos observar que o número de colónias no meio não seletivo foi superior ao do meio seletivo, como seria de esperar, uma vez que, não tendo o agente seletor, o TFT, as células cresceriam melhor, dado que este é tóxico para as células. No entanto, o número de colónias foi maior no controlo negativo, com e sem TFT. Os valores de CE também se encontram dentro dos critérios de aceitação, já o valor de MF do DMSO encontra-se fora, com  $805,72 \times 10^{-4}$ , devendo estar no intervalo  $(50-170) \times 10^{-6}$ . Quanto aos resultados da IMF, apenas na concentração mais alta do controlo positivo temos um valor superior ao Fator de Avaliação Global (GEF =  $126 \times 10^{-6}$ ), com  $163,24 \times 10^{-6}$ . Logo, o resultado obtido para a concentração 0,15 µg/mL de 4-NQO determina que esta será a concentração mais adequada a utilizar nos próximos ensaios.

De forma a simplificar a interpretação dos resultados, transformou-se a tabela dos resultados do ensaio 2 (Tabela 3.4), deixando apenas os dados relevantes para análise (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação – 4H sem S9 (2).**

Teste	Concentração % (v/v)	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)	
Não tratado	-	1,25	1,77	2,22	1,00	100,00	
		1,28	1,31	1,68	-	-	
DMSO	0,6	1,34	1,66	2,22	1,14	113,69	
		1,16	1,37	1,59	0,81	81,17	
	0,54	1,09	1,23	1,34	0,68	68,43	
		1,10	1,97	2,16	1,11	110,62	
0,53	1,04	1,89	1,97	1,01	100,79		
	1,34	1,94	2,60	1,33	133,29		

Teste	Concentração % (v/v)	CE <sub>v</sub>	CE <sub>M</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )
Não tratado	-	3,00X10 <sup>-2</sup>	2,40X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-
		4,38X10 <sup>-2</sup>	3,51X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-
DMSO	0,6	4,38X10 <sup>-2</sup>	3,51X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-
		6,51X10 <sup>-2</sup>	5,21X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	7961,10	-
DMSO	0,54	1,33X10 <sup>-2</sup>	2,13X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-
		3,26X10 <sup>-2</sup>	5,21X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	7919,19	-
	0,53	1,84X10 <sup>-2</sup>	2,95X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-
		1,50X10 <sup>-2</sup>	2,40X10 <sup>-5</sup>	-	-	-	1804,87	-

Analisando a tabela podemos ver que este ensaio não foi bem sucedido uma vez que não foi possível calcular dois dos critérios de aceitação da guideline para todas as amostras, a Frequência de Mutação (MF) e a Eficiência de Clonagem Relativa (RCE), visto que não se obtiveram colónias na maior parte das placas de meio não seletivo (sem TFT). Neste ensaio verificou-se também que o SG foi muito inferior ao dos critérios, o que quer dizer que as células não tiveram um crescimento adequado.

#### 4.2.2.2 Ensaio 4H com S9

A Tabela 4.2 contém os dados obtidos para este ensaio que são relevantes para a discussão dos resultados.

**Tabela 4.2 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.**

Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)
Não tratado	-	0,79	1,75	1,39	1,00	100,00
DMSO	0,3 % (v/v)	0,87	1,48	1,29	0,93	92,79
CP	3	0,53	1,00	0,53	0,38	37,94

Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>M</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )
Não tratado	-	3,66x10 <sup>-2</sup>	1,32x10 <sup>-5</sup>	1,07	107,33	107,33	360,87	37,92
		6,59x10 <sup>-2</sup>	1,88x10 <sup>-5</sup>	1,93	193,32	-	285,02	0,00
DMSO	0,3 % (v/v)	2,36x10 <sup>-2</sup>	1,35x10 <sup>-5</sup>	0,69	69,25	64,25	572,94	249,99
		4,45x10 <sup>-2</sup>	1,59x10 <sup>-5</sup>	1,31	130,75	-	356,41	33,47
CP	3	2,02x10 <sup>-2</sup>	3,51x10 <sup>-5</sup>	0,59	59,19	22,45	1738,57	1415,62

Neste ensaio o número de colónias obtidas foi semelhante em ambos os tipos de meio, com e sem TFT, embora o SG esteja abaixo do critério de aceitação e seja muito baixo, possivelmente pela determinação de forma errada do número de células, conforme discutido no ponto 4.2.1. O valor de MF encontra-se fora dos critérios, mas para a CP esse valor encontra-se acima do não tratado e do controlo negativo, conforme esperado. O valor de CE está de acordo com os parâmetros determinados pela Guideline.

Para o controlo positivo, CP, o valor do IMF foi superior ao GEF, e 9 vezes superior ao da média do DMSO (141,73), e 37 vezes superior ao do Não tratado.

### 4.2.2.3 Ensaio 24H

A Tabela 4.3 apresenta a simplificação dos dados da Tabela 3.6.

**Tabela 4.3 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.**

Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)	
Não tratado	-	1,04	0,65	1,00	1,00	100,00	
DMSO	0,5 % (v/v)	1,41	0,31	0,65	0,65	65,18	
		1,16	0,55	0,94	0,94	93,97	
		0,95	0,63	0,88	0,88	87,83	
MMC	0,075	1,08	0,43	0,68	0,68	67,90	
4-NQO	0,5	1,34	0,79	1,56	1,56	156,10	

Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )
Não tratado	-	1,33X10 <sup>-2</sup>	4,59X10 <sup>-6</sup>	0,86	85,73	85,73	345,47	0,00
DMSO	0,5 % (v/v)	9,84X10 <sup>-3</sup>	8,04X10 <sup>-6</sup>	1,00	100,0 0	52,24	817,16	-
		3,34X10 <sup>-2</sup>	7,87X10 <sup>-6</sup>				235,54	
		3,26X10 <sup>-3</sup>	2,61X10 <sup>-6</sup>				800,00	
MMC	0,075	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
4-NQO	0,5	3,30X10 <sup>-3</sup>	2,67X10 <sup>-6</sup>	0,21	21,26	33,19	808,53	190,97

Também neste ensaio o número de colónias apresentou semelhanças entre os dois tipos de meios, e o SG manteve-se abaixo dos valores estabelecidos pela Guideline. Mais uma vez, tendo sido este ensaio efetuado antes do teste contagem em suspensão vs contagem em *pellet*, o método usado para contagem de células pode não ter sido o mais adequado, afetando as posteriores culturas celulares e, conseqüentemente, a frequência de mutação. Contudo, o valor do CE do controlo negativo e do não tratado permaneceram dentro dos parâmetros. O 4-NQO registou também um RTG superior a 10 %, como exigido, o valor do IMF está de acordo com o pretendido (acima do GEF). Já o controlo positivo testado, MMC não obteve a resposta desejada, e por isso não foi usado nos ensaios seguintes.

### 4.2.3 ENSAIO DE VALIDAÇÃO

#### 4.2.3.1 Ensaio de Precipitação e Solubilidade

A concentração mais elevada foi a única que revelou alguma precipitação. De acordo com a Guideline a concentração a utilizar é aquela que sem apresentar citotoxicidade, produzir turvação ou precipitado visível a olho nu, e por isso, a concentração de 2 mg/mL foi a concentração mais alta a utilizar no ensaio.

#### 4.2.3.2 Ensaio 4 horas sem S9

A Tabela 4.4 resulta da transformação da Tabela 3.9, contendo o resumo dos resultados após tratamento.

**Tabela 4.4 - Cálculos de Crescimento em Suspensão, Crescimento Total Relativo e Frequência de Mutação.**

Teste	Concentração µg/mL	SG <sub>1</sub>	SG <sub>2</sub>	SG	RSG	RSG (%)	
DMSO	1 % (v/v)	0,74	3,15	2,32	1,00	100,00	
	100	0,61	3,50	2,12	0,91	91,34	
	250	0,78	2,85	2,23	0,96	95,84	
XYZ	500	0,63	3,55	2,24	0,96	96,46	
	1000	0,61	4,95	3,00	1,29	129,18	
	2000	0,68	4,80	3,27	1,41	140,76	
MMS	10	0,48	4,20	2,00	0,86	85,88	

Teste	Concentração µg/mL	CE <sub>v</sub>	CE <sub>m</sub>	RCE	RCE <sub>v</sub> (%)	RTG (%)	MF (x10 <sup>-6</sup> ) )	IMF (x10 <sup>-6</sup> )
DMSO	1 % (v/v)	2,07x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	1,00	100,00	100,00	126,01	0,00
	100	1,70x10 <sup>-2</sup>	-	0,82	82,20	75,08	0,00	0,00
	250	2,66x10 <sup>-2</sup>	1,30x10 <sup>-6</sup>	1,28	128,38	123,04	49,01	0,00
XYZ	500	1,65x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	0,80	79,59	76,78	158,32	32,31
	1000	2,32x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-6</sup>	1,12	112,03	144,71	112,48	0,00
	2000	1,68x10 <sup>-2</sup>	1,30x10 <sup>-6</sup>	0,81	81,31	114,45	77,39	0,00
MMS	10	3,39x10 <sup>-3</sup>	3,92x10 <sup>-6</sup>	0,16	16,35	14,04	1157,65	1031,64

Neste ensaio verificou-se um valor de SG para o DMSO, controlo negativo, de 2,32, encontrando-se abaixo do intervalo estabelecido para estes ensaios, podendo resultar da utilização do método errado para contagem celular, como discutido no ponto 4.2.1. No entanto, os outros dois parâmetros estabelecidos pela OCDE para o controlo negativo (MF e RCE) encontram-se dentro dos limites. Também os resultados para o controlo positivo estão dentro dos limites estabelecidos.

A substância XYZ embora não tenha um aumento do seu efeito relacionado com o aumento da sua concentração, também não aparenta ser positiva, uma vez que o IMF nunca é superior a GEF.

Com base na citotoxicidade demonstrada neste ensaio escolheram-se as concentrações para usar nos próximos ensaios, de 2000; 1000 e 500 µg/mL.

## 5 CONCLUSÃO

Um dos objetivos deste trabalho prendia-se com a aprendizagem e utilização e implementação dos métodos de Boas Práticas de Laboratório para o ensaio CGM, envolvendo a criação de procedimentos e impressos próprios para este estudo. O objetivo foi cumprido, mas os documentos gerados não podem constar nesta dissertação devido ao acordo de confidencialidade assinado pelas duas partes.

A parte prática deste trabalho iniciou com a receção do *via*/ inicial de células e posterior cultura e congelamento a fim de construir um *stock* de trabalho. De seguida, foram colocadas células em cultura para tentar perceber o comportamento das culturas, desde o seu tempo de duplicação até ao meio ideal para o seu crescimento, utilizando diferentes meios e diferentes percentagens de suplementos. De acordo com os dados obtidos, verificou-se que o tempo de duplicação é de aproximadamente 12 horas e que as células cresciam de forma ótima em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro de cavalo inativado pelo calor.

Para o desenvolvimento do método, primeiro optou-se por otimizar o número de células a incubar para se obterem colónias nos poços, e verificar se o TFT apresentava resposta. De seguida, começou-se a utilizar controlos para perceber se as células respondiam da forma desejada na presença dos mesmos, ou seja, se havia uma diferença de resposta entre controlos negativos e positivos.

Com o decorrer do trabalho concluiu-se também que é preferível efetuar a pré-seleção de mutantes após o descongelamento e imediatamente antes do ensaio, de forma a evitar a reversão espontânea.

Passou-se então para um ensaio de validação com uma substância ativa XYZ cuja identidade irá também permanecer confidencial, devido ao mesmo acordo.

Segundo a Guideline da OCDE, de forma a demonstrar uma experiência suficiente do laboratório, deve ser efetuada uma série de ensaios (no mínimo 10, idealmente 20) com controlos positivos que atuem com e sem ativação metabólica e vários controlos negativos (incluindo meio não tratado e diversos solventes), cujos resultados devem ser coincidentes com a literatura. A seleção dos controlos positivos deve ser feita com base nos diferentes ensaios (curtos e longos, com e sem ativação) de modo a provar a eficácia na deteção de mutagénicos, o funcionamento da ativação metabólica e a adequação das condições de crescimento durante as diversas fases do ensaio. Deve ser escolhida uma gama de concentrações que permita um aumento reprodutível e relacionado com a concentração, demonstrando a sensibilidade do sistema de teste.

Tendo em conta os ensaios aqui apresentados, o controlo positivo que demonstrou ser mais sensível nos testes sem S9 foi o 4-NQO na concentração de 0,15 µg/mL, e o controlo CP para o ensaio com S9, numa concentração de 3 µg/mL, demonstrando a eficiência dos ensaios efetuados para a deteção dos mutagénicos. O método de contagem de células foi otimizado e no futuro serão realizados mais ensaios de acordo com a metodologia implementada por forma a cumprir com a exigência de pelo menos 10 replicados.

Após a validação completa o método será usado para determinar o potencial mutagénico de substâncias usadas em produtos de proteção de culturas, assim como das impurezas presentes no produto formulado e metabolitos formados após a sua degradação no ambiente.

Como já foi referido a qualidade e segurança alimentar são dois fatores de extrema importância para a vida da população mundial, e por isso têm de ser assegurados desde “o prado até ao prato” e por isso têm de ser feitas análises e estudos não só aos alimentos, mas a tudo o que é utilizado para a sua produção e conceção. Os ensaios *in vitro* são o tipo de ensaio a que se recorre, em detrimento dos ensaios *in vivo*, obedecendo à política dos 3 R's, à semelhança do que já acontece com a indústria cosmética, estando por isso em constante evolução/reinvenção.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (CE) N.º1107/2009. (2009). REGULAMENTO (CE) N.º 1107/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 21 de Outubro de 2009 relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado e que revoga as Directivas 79/117/CEE e 91/414/CEE do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 50. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:PT:PDF>
- (CE) N.º1223/2009. (2009). Regulamento (CE) N.º1223/2009 Do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 151.
- (CE) N.º178/2002. (2002). REGULAMENTO (CE) N.º 178/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 42.
- (CE) N.º 1907/2006. (2006). Rectificação ao Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH), que cria a Agência Europeia das Substâncias Químicas qu. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 278.
- (UE) N.º 283/2013. (2013). REGULAMENTO (UE) N.º 283/2013 DA COMISSÃO de 1 de março de 2013 que estabelece os requisitos em matéria de dados aplicáveis às substâncias ativas, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à coloca. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 84. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0283&from=EN>
- (UE) N.º 528/2012. (2012). REGULAMENTO (UE) N.º 528/2012 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas. *Jornal Oficial*, 167. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:PT:PDF>
- Araújo, D. S. (2011). Análise dos resultados dos Planos de Controlo de Resíduos de Pesticidas em produtos de origem vegetal: Anos 2007-2009. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Barlow, S. M., Boobis, A. R., Bridges, J., Cockburn, A., Dekant, W., Hepburn, P., Houben, G. F., König, J., Nauta, M. J., Schuermans, J., & Bánáti, D. (2015). The role of hazard- and risk-based approaches in ensuring food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 46(2), 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.007>
- Beiras, R. (2018). Biotransformation. In *Marine Pollution* (pp. 205–214). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813736-9.00012-x>
- Chen, T., Guo, X., & Moore, M. M. (2014). The Mouse Lymphoma Assay. In L. M. Sierra & I. Gaivão (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach* (First Edit, pp. 323–342). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1068-7>
- Clancy, S. (2008). Genetic mutation. *Nature Education*, 1(1), 187.
- Clive, D., Flamm, W. G., Machesko, M., & Bernheim, N. J. (1972). A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma celss. *Mutation Research*, 16(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(72\)90066-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(72)90066-8)
- Cole, J., Arlett, C. F., Green, M. H. L., Lowe, J., & Muriel, W. (1983). A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in

- L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Research*, 111(3), 371–386.
- Corvi, R., Madia, F., Worth, A., & Whelan, M. (2013). EURL ECVAM Strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing. In *JRC Scientific and Policy Report*. <https://doi.org/10.2788/44623>
- Dabrowski, W. M., & Sikorski, Z. E. (2005). Toxins in Food. In W. M. Dabrowski & Z. E. Sikorski (Eds.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). CRC Press.
- Ditz, T., Schnapka-Hille, L., Noack, N., Dorow, J., Ceglarek, U., Niederwieser, D., Schiller, J., Fuchs, B., & Cross, M. (2019). Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum. *Differentiation*, 105, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.12.002>
- EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 69. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2379>
- EPA. (2021). DDT - A Brief History and Status. Disponível em <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/ddt-brief-history-and-status>
- European Medicines Agency. (2016). Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches. *EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012*, December, 12. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2017/03/WC500224306.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/03/WC500224306.pdf)
- FAO/WHO. (2001). *Codex Alimentarius - Food Hygiene - Basic Texts* (2ª edição). Joint FAO/WHO Food Standards Programme.
- Fung, F., Wang, H. S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical Journal*, 41(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
- Gibco. (2016). *Cell Culture Basics Handbook* (G. Education (ed.)). Thermo Fisher Scientific.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
- Guengerich, F. P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 70–83. <https://doi.org/10.1021/tx700079z>
- Harada, T., Takeda, M., Kojima, S., & Tomiyama, N. (2016). Toxicity and carcinogenicity of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicological Research*, 32(1), 21-33.
- Hoogenboom, R. L., Malisch, R., Van Leeuwen, S. P., Vanderperren, H., Hove, H., Fernandes, A., Schächtele, A., & Rose, M. (2020). Congener patterns of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls as a useful aid to source identification during a contamination incident in the food chain. *Science of the Total Environment*, 746, 141098.
- IARC. (2020). *List of Classifications - Agents classified by the IARC Monographs*. <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/>
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., & Müller, L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 584, 1–256. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004>
- Kirkland, D., Kasper, P., Müller, L., Corvi, R., & Speit, G. (2008). Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 653, 99–108.
-

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.03.008>

- Kirkland, D., Zeiger, E., Madia, F., & Corvi, R. (2014). Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? II. Construction and analysis of a consolidated database. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775–776, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.10.006>
- Kirkland, D., Zeiger, E., Madia, F., Gooderham, N., Kasper, P., Lynch, A., Morita, T., Ouedraogo, G., Parra Morte, J. M., Pfuhler, S., Rogiers, V., Schulz, M., Thybaud, V., van Benthem, J., Vanparys, P., Worth, A., & Corvi, R. (2014). Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775–776, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.10.005>
- Klaassen, C. D. (2001). *Casarett and Doull's Toxicology the basis science of poisons* (C. D. Klaassen (ed.); Eighth Edi). McGraw-Hill Education.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. In *Pearson Education Limited*. Prentice Hall.
- Lloyd, M., & Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. In J. M. Parry & E. M. Parry (Eds.), *Genetic Toxicology: Principles and Methods* (First Edit, p. 433). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6>
- Loeb, L. A. (1989). Endogenous Carcinogenesis: Molecular Oncology into the Twenty-first Century - Presidential Address. *Cancer Research*, 49, 5489–5496.
- Loewe, L. (2008). Genetic mutation. *Nature Education*, 1(1), 113.
- Miller, E. C., & Miller, J. A. (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 47(5), 1055–1064. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810301\)47:5+<1055::aid-cncr2820471302>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810301)47:5+<1055::aid-cncr2820471302>3.0.co;2-3)
- Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M. C., Richard, S., Shimada, H., & Stankowski, L. F. (2000). Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures workgroup report. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 185–190. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<185::AID-EM5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<185::AID-EM5>3.0.CO;2-6)
- Nicolette, J. (2017). Genetic Toxicology Testing. In A. S. Faqi (Ed.), *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (Second Edi, pp. 129–154). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803620-4.00006-2>
- O'Brien, J., Renwick, A. G., Constable, A., Dybing, E., Müller, D. J. G., Schlatter, J., Slob, W., Tueting, W., van Benthem, J., Williams, G. M., & Wolfreys, A. (2006). Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: A critical appraisal. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1613–1635. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.004>
- OECD. (1993). *Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology e concepts and principles*. <http://www.oecd.org/science/biotrack/41036698.pdf>
- OECD. (1997). OECD Principles on Good Laboratory Practice. In *OECD SERIES ON PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE AND COMPLIANCE MONITORING: Vol. Number 1*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361450>
- OECD. (2016). Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Thymidine Kinase Gene. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264264908-en>
- OECD. (2018). *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)* (OECD Series

on Testing and Assessment N°286).

- OECD. (2020). Test N° 471: Bacterial Reverse Mutation Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* (p. 11).
- Omaye, S. T. (2004). Food and Nutritional Toxicology. In *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203485309.sec1>
- Paim, W. P., Weber, M. N., Cibulski, S. P., da Silva, M. S., Puhl, D. E., Budaszewski, R. F., Varela, A. P. M., Mayer, F. Q., & Canal, C. W. (2019). Characterization of the viral genomes present in commercial batches of horse serum obtained by high-throughput sequencing. *Biologicals*, 61, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.08.005>
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., Srivastav, A. L., & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657.
- Regateiro, F. J. (2003). *Manual de Genética Médica* (1º Edição). IMPRENSA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0436-7>
- Schisler, M. R., Moore, M. M., & Gollapudi, B. B. (2019). In Vitro Mouse Lymphoma Cell (L5178Y Tk+/\_3.7.2.C) Forward Mutation Assay. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Eds.), *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols* (Second Edi, Vol. 1044, Issue Tg 487, pp. 363–372). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9>
- Schrader, T. J. (2016). Mutagens. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 20–28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00476-1>
- Sheweita, S. A. (2000). Drug-Metabolizing Enzymes: Mechanisms and Functions. *Current Drug Metabolism*, 1(2), 107–132. <https://doi.org/10.2174/1389200003339117>
- Shibamoto, T., & Bjeldanes, L. F. (2009). Introduction to Food Toxicology. In S. L. Taylor (Ed.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (Second Edi). Academic Press.
- Sigma-Aldrich. (2021a). *L-Glutamine solution*. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/g7513>
- Sigma-Aldrich. (2021b). *Sodium pyruvate*. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/p5280>
- Sigma-Aldrich. (2021c). *Sodium pyruvate solution*. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/s8636>
- Simões, J. S. (2005). Utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura. Agricultura e Ambiente, Sociedade Portuguesa de Inovação. Porto, Portugal, disponível em [https://www.drapc.gov.pt/base/geral/files/utilizacao\\_fitofarmaceuticos\\_agricultura.pdf](https://www.drapc.gov.pt/base/geral/files/utilizacao_fitofarmaceuticos_agricultura.pdf).
- Stone, A., & Bornhorst, J. (2012). An Introduction to Personalized Medicine. In A. Dasgupta (Ed.), *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers* (1st ed., pp. 121–142). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385467-4.00006-3>
- Trent, R. (2012). DNA Genetic Testing. In *Molecular Medicine* (4th ed., pp. 81–115). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381451-7.00003-7>
- Wiesner, J., Ziemann, C., Hintz, M., Reichenberg, A., Ortman, R., Schlitzer, M., Fuhst, R., Timmesfeld, N., Vilcinskis, A., & Jomaa, H. (2016). FR-900098, an antimalarial development candidate that inhibits the non-mevalonate isoprenoid biosynthesis pathway, shows no evidence of acute toxicity and genotoxicity. *Virulence*, 7(6), 718–728. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1195537>
-

Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473–486. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.010>