

Ana Sofia Caldas Coelho

Avaliação enzimática e histológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda ao diazepam
em *Gambusia holbrooki*.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

Ana Sofia Caldas Coelho

Avaliação enzimática e histológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda ao diazepam
em *Gambusia holbrooki*.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

Ana Sofia Caldas Coelho

Avaliação enzimática e histológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda ao diazepam
em *Gambusia holbrooki*.

Monografia apresentada à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de licenciada em
Ciências Farmacêuticas.

Resumo

A presença de compostos com capacidade neuroactiva nos ambientes aquáticos tem sido uma das principais preocupações dos ecotoxicologistas que avaliam os potenciais efeitos de fármacos nos organismos aquáticos. As alterações fisiológicas decorrentes da presença de resíduos de medicamentos de utilização humana nos diversos compartimentos ambientais são hoje em dia tema de pesquisa, em face das alterações eventualmente causadas nos organismos não alvo. Os dados existentes actualmente, recolhidos em estudos de monitorização destes agentes em compartimentos aquáticos e que visam avaliar o seu impacto, demonstram a presença sistemática de compostos deste tipo nas mais variadas matrizes; no entanto, existe uma manifesta falta de dados científicos que demonstrem, ou não, que estes compostos podem ser potencialmente nocivos do ponto de vista ambiental. O composto sobre o qual incidiu o presente estudo, o diazepam, é um composto de utilização como anticonvulsivante, tranquilizante e relaxante muscular, e existem já evidências que decorrem de estudos já publicados, de que pode estar envolvido em cenários de stress oxidativo. Sendo um composto que actua sobre uma via de comunicação fisiológica altamente conservada (inibição da neurotransmissão por aumento da condutância ao cloreto ao nível das células neuronais), este composto pode potencialmente comprometer um vasto leque de funções neuronais em muitas espécies. Assim, e visto actuar directamente ao nível do sistema nervoso central dos organismos, foi o nosso objectivo estudar alterações enzimáticas e histológicas na espécie *Gambusia holbrooki*, após exposições agudas (96 horas) a diversas concentrações deste agente (0,0025; 0,005; 0,02; 0,02; 0,04 μ g/l). Os efeitos decorrentes da exposição ao referido composto foram avaliados ao nível da actividade enzimática (catalase e glutathione S-transferases) e de alterações histológicas observadas no fígado e brânquias dos organismos expostos.

O diazepam causou evidentemente alterações regressivas histológicas nas brânquias e no fígado dos animais expostos às três concentrações mais altas. A actividade da catalase mostrou também estar aumentada, indicando stress oxidativo. Já o caso da glutathione S-transferase demonstrou não ser um biomarcador viável para a avaliação do risco ambiental, pelo menos em exposições agudas.

Avaliação enzimática e histológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda ao diazepam em *Gambusia holbrooki*.

*É com carinho e muita saudade
que dedico a minha Monografia
ao meu querido avô José Caldas.*

Agradecimentos

A todos os professores que me acompanharam durante o meu percurso académico, mas em especial ao Prof. Doutor Bruno Nunes e ao Prof. Doutor Alberto Correia, respectivamente orientador e co-orientador deste trabalho, que sempre estiveram presentes e acima de tudo pela disponibilidade que demonstraram ao longo da realização deste trabalho e no esclarecimento atempado das dúvidas que entretanto foram surgindo.

Ao CIMAR e ao CESAM por terem disponibilizado todos os recursos materiais dos quais necessitei para a longa elaboração do trabalho e claro a todos os colaboradores destes fantásticos centros de investigação científica, em especial ao Hugo Vidal pela preciosa ajuda na execução das preparações histológicas.

Aos meus amigos Dra. Joana Silva e Carlos Pacheco pela força que sempre me deram e pela compreensão sempre que era necessário trocar folgas para que eu fosse para o Porto ou para Aveiro.

Ao meu namorado pelo companheirismo, ajuda e disponibilidade de me levar a Aveiro e para o Porto sempre que necessário, e acima de tudo pela paciência de esperar por mim horas e horas até que concluísse o trabalho

Aos meus pais pelo carinho, amor, compreensão e pelo esforço que sempre fizeram para que eu tivesse a melhor educação e por nunca colocarem entraves em qualquer das escolhas feitas até hoje na minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma são importantes para mim...

MUITO OBRIGADA.

Índice

	Pág.
I. Introdução.....	6
1.1 Efeitos Toxicológicos.....	7
1.2. Avaliação de risco ecológico ou ambiental.....	8
1.3. Biomarcadores na monitorização ambiental.....	10
1.3.1. Stress Oxidativo.....	12
1.3.1.1 Glutationa S-transferase (GST).....	14
1.3.1.2. Catalase.....	15
1.3.2. Histopatologia.....	16
1.4. Classes de fármacos no ambiente.....	17
1.4.1. Benzodiazepinas.....	18
1.5. <i>Gambusia holbrooki</i>	21
II. Objectivos do trabalho.....	22
III. Considerações metodológicas.....	22
3.1. Captura.....	22
3.2. Teste agudo (96 horas).....	23
3.3. Determinação das actividades enzimáticas: GSTs e catalase.....	24
3.4. Determinação histopatológica.....	25
3.4.1. Avaliação qualitativa das alterações histológicas.....	27
3.4.2. Avaliação semi-quantitativa das alterações histológicas.....	27
3.5. Tratamento estatístico dos dados.....	27
IV. Resultados.....	28
4.1. Histologia.....	28
4.2. Ensaio enzimático.....	31
V. Discussão.....	33
VI. Conclusão.....	40
VII. Bibliografia.....	42
VIII. Anexos.....	52

Índice de imagens

Fig.1 Distribuição de fármacos no ambiente e as suas principais transformações.....	7
Fig.2 Representação esquemática da ordem sequencial de envolvimento quando expostas a um poluente dentro de um sistema biológico	9
Fig.3. Diagrama esquemático do stress oxidativo.....	14
Fig.4 Estrutura da enzima GST	15
Fig 5. Estrutura da enzima catalase.	16
Fig.6 Classes terapêuticas encontradas no ambiente.....	18
Fig.7 Estrutura química geral das benzodiazepinas.	18
Fig.8 Esquemática do mecanismo de acção das benzodiazepinas.....	19
Fig.9 Estrutura química do diazepam.	20
Fig.10 Ilustração de um animal pertencente à família <u>Poeciliidae</u>	21
Fig.11 Imagem panorâmica do local de captura	23
Fig.12 Esquema de montagem dos sistemas para exposição ao tóxico	24
Fig.13 Esquema de corte das amostras.....	26
Fig.14 Moldes metálicos onde são colocadas as amostras e posteriormente cobertas com parafina de forma a montar os moldes.	27
Fig. 15 Histopatologia das brânquias de <i>Gambusia holbrooki</i> capturadas na Pateira de Fermentelos.	28
Fig.16 Valor médio (e respectivo erro padrão) do índice patológico calculado para as brânquias nos diferentes grupos.	29
Fig.17 Histopatologia do fígado de <i>Gambusia holbrooki</i> capturadas na Pateira de Fermentelos.	30
Fig.18 Valor médio (e respectivo erro padrão) do índice patológico calculado para o fígado nos diferentes grupos.	31
Fig.19 Efeito da diazepam na actividade da enzima GST nas brânquias de <i>G. holbrooki</i>	32
Fig.20 Efeito da diazepam na actividade da enzima GST no fígado de <i>G. holbrooki</i>	32
Fig.21. Efeito da diazepam na actividade da enzima catalase no fígado de <i>G. holbrooki</i>	33

I. Introdução

Em todo o mundo é usada diariamente uma quantidade massiva de medicamentos, quer de uso veterinário, quer de uso humano, fármacos esses que de várias formas acabam dispersos no meio ambiente. Assim, desde os anos 60 o Homem teve conhecimento dos potenciais efeitos a longo prazo e o potencial risco para os ecossistemas aquáticos e terrestres que estes compostos podem provocar e desde então tornaram-se num objecto de estudo dos ecotoxicologistas (Fent et al., 2008).

Dentro dos compostos químicos actualmente existentes e disponíveis, os agentes terapêuticos são uma classe caracterizada por terem um uso e uma actividade biológica contínua e indiscriminada. (Daughton e Ternes, 1999; Jones et al., 2002; Miao et tal., 2002). É também conhecido, que alguns compostos farmacêuticos exibem resistência à degradação metabólica, o que resulta na sua presença contínua após o uso terapêutico, e alguma lipofilia, o que resulta na sua presença contínua no ambiente após o uso terapêutico. Os fármacos podem ainda causar efeitos tóxicos sinérgicos quando na presença de outros compostos (Cleuvers, 2003).

Estas características intrínsecas dos fármacos são a principal razão porque estes são considerados potencialmente perigosos para a saúde pública e para o ambiente. Nos últimos anos o conhecimento e a atenção dos investigadores centrou-se nos temas relacionados com a exposição ambiental aos xenobióticos antropogénicos, assim como para a variedade de efeitos que estes podem exercer nos sistemas biológicos. Outras das preocupações são as consequências a longo prazo e as implicações na população humana no uso pouco racional dos medicamentos (Nunes e tal., 2004).

A avaliação dos efeitos dos fármacos nos ecossistemas aquáticos é de elevada importância uma vez que é aqui onde se fazem normalmente as descargas dos poluentes não tratados. Um largo número de bioindicadores e organismo teste foram propostos no passado para fazer a avaliação da ecotoxicidade de compostos antropogénicos em ambientes aquáticos (Nunes e tal., 2004).

Os fármacos de uso humano entram nos sistemas aquáticos, após a ingestão pelos pacientes e subsequente excreção na forma de compostos não metabolizados ou metabolitos, por várias vias. A principal via de entrada de fármacos e seus resíduos no ambiente aquático ocorre pelas águas residuais. Muitas vezes os fármacos e/ou seus metabolitos não estão totalmente degradados e podem ser susceptíveis de passar nas estações de tratamento sem serem

degradados e posteriormente podem conseguir chegar aos rios, lagos, estuários, águas do subsolo e por consequência à água para consumo humano (Fig.1).

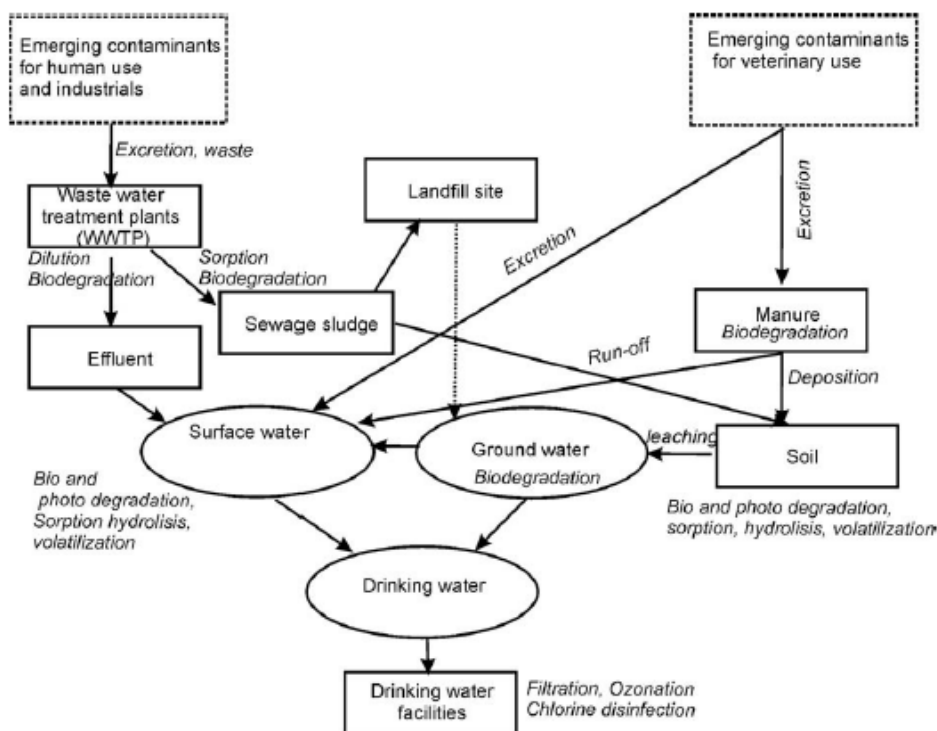


Fig 1. Distribuição de fármacos no ambiente e as suas principais transformações (adaptado a partir de Farré et al.2008)

O comportamento dos fármacos e seus metabolitos nos ambientes aquáticos não é totalmente conhecido. A fraca volatilidade dos fármacos indica que a distribuição pelo ambiente ocorre primariamente pelo ciclo hidrológico, assim como por dispersão através da cadeia alimentar. No tratamento de águas residuais existem dois processos pelos quais a eliminação de resíduos é feita, nomeadamente a biodegradação e adsorção incluídas no tratamento secundário. A adsorção depende das interações hidrofóbicas e electrostáticas dos fármacos com as partículas e os microrganismos (Fent et al., 2006).

1.1 Efeitos ecotoxicológicos

Os fármacos são desenhados e sintetizados para interagirem com determinados mecanismos moleculares e metabólicos nos humanos e animais, mas por vezes demonstram efeitos secundários. Quando estes fármacos são introduzidos no ambiente podem produzir efeitos semelhantes aos que são provocados nos humanos mas neste caso em animais que possam ter mecanismos de metabolização semelhantes ou órgãos e tecidos-alvo similares;

outras vezes os mecanismos são diferentes ou até nem existem, o que implica que outras formas de actuação possam ocorrer nesses animais (Fent et al., 2006).

É importante reconhecer que para muitos princípios activos o mecanismo de acção não é bem compreendido, e que muitas vezes um dado composto não actua de uma só forma, o que complica as análises toxicológicas em animais inferiores. Assim sendo, as análises toxicológicas devem ser desenhadas e direccionadas para um alvo específico do fármaco, mesmo em vertebrados inferiores e invertebrados, baseando-se em hipóteses de similaridade de mecanismos de acção. No entanto, os testes de toxicidade não são efectuados desta forma, pelo que são usados testes gerais e pré-estabelecidos de acordo com normas internacionais, assim como organismos teste tradicionais, onde parâmetros como a mortalidade e outros biomarcadores são pesquisados (Fent et al., 2006).

Nem sempre a presença de compostos xenobióticos num determinado ecossistema aquático indica por si só um efeito prejudicial. Devem ser estabelecidas conexões entre níveis externos de exposição e níveis internos de contaminação de tecidos, assim como efeitos adversos a curto prazo. Muitos dos compostos orgânicos hidrofóbicos e os seus metabolitos, que contaminam os ecossistemas aquáticos, não foram ainda sequer identificados e o seu potencial impacto na vida aquática não foi ainda determinado (Oost et al., 2003).

Assim sendo, os testes ecotoxicológicos indicam meramente resultados de testes agudos in vivo nos organismos de diferente nível trófico após um curto espaço de exposição ao composto, e muito raramente testes de longa exposição, os chamados testes crónicos e subcrónicos. Os dados recolhidos a partir das exposições são posteriormente usados na avaliação do risco ecológico. Nos locais contaminados, todo o ambiente aquático está exposto durante todo o ciclo de vida aos contaminantes. Os efeitos crónicos desta exposição são menos conhecidos uma vez que são menos investigados, e por vezes os resultados dos testes agudos são relacionados com os possíveis resultados dos testes crónicos. Daí que são necessários testes mais longos de forma a avaliar correctamente o risco ambiental que um determinado composto apresenta (Fent et al., 2006).

1.2. Avaliação de risco ecológico ou ambiental

A avaliação de risco ambiental define-se como o procedimento no qual se usam metodologias científicas para identificar os possíveis efeitos adversos de um actual ou provável poluente ou composto com actividade antropogénica num determinado ecossistema.

Esta avaliação vem cada vez mais a tornar-se importante, uma vez que os ecotoxicologistas e o público em geral sabem que alguns produtos químicos que não são tóxicos para humanos podem exercer efeitos deletérios em animais (Van Leeuwen et al., 1995).

O processo da avaliação de risco pode ser dividido em dois campos: a análise de risco (orientada cientificamente) e a gestão do risco (orientada politicamente). A análise do risco é um processo que compreende vários procedimentos, de entre os quais se destacam; i) identificação do perigo, ii) avaliação do efeito e da exposição, iii) e no final a caracterização do risco. A gestão do risco está relacionada com a tomada de medidas regulamentais para a solução de um problema ambiental baseando-se para isso na avaliação do risco (Van Leeuwen et al., 1995).

Os danos causados nas populações são por vezes difíceis de detectar em organismos selvagens uma vez que muitos desses efeitos tendem a manifestar-se após longos períodos de tempo. Quando finalmente os efeitos se tornam claros, o processo destrutivo pode já estar num ponto onde não há forma de reverter a situação e reduzir o risco (Oost et al., 2003).

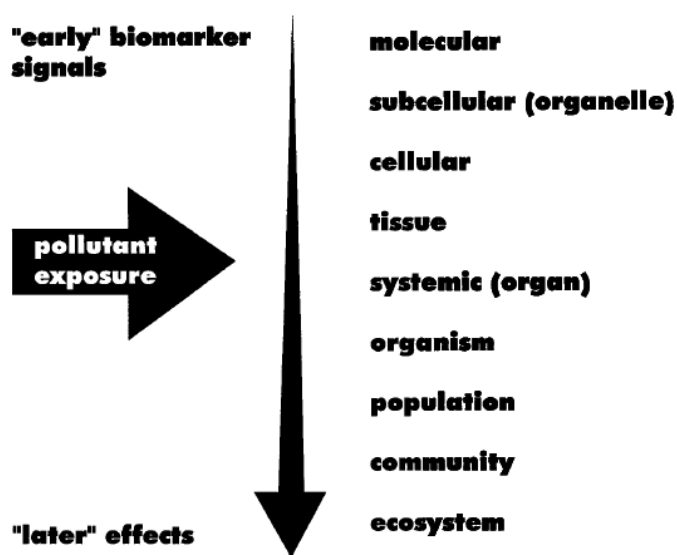


Fig.2 Representação esquemática da ordem sequencial de envolvimento quando expostas a um poluente dentro de um sistema biológico (adaptado a partir de Oost et al., 2003).

Cenários como os demonstrados na imagem anterior (Fig.2) alertaram os investigadores a estabelecerem sinais de alerta precoces, os chamados biomarcadores, que facilmente demonstrem que está a haver uma resposta biológica adversa em relação a toxinas antropogénicas veiculados por via ambiental (Bucheli e Fent, 1995).

Efeitos em níveis superiores biológicos são sempre precedidos por alterações precoces nos processos biológicos, permitindo o desenvolvimento de avisos antecipados na forma de biomarcadores (Bayne et al., 1985).

Num contexto ambiental, a variada oferta de biomarcadores promete ser um indicador sensível que demonstra que o composto tóxico entrou no organismo, começou a ser distribuído nos tecidos e está a começar a produzir efeitos tóxicos em alvos críticos (McCarthy e Shugart, 1990).

1.3. Biomarcadores na monitorização ambiental

Segundo a World Health Organization (1993) a definição de biomarcador é normalmente usada num contexto geral onde inclui qualquer alteração que reproduza uma interacção entre um sistema biológico e um potencial perigo, que pode ser químico, físico ou biológico (Oost et al., 2003).

Um biomarcador é definido pela alteração numa resposta biológica (que pode ser uma resposta molecular, celular, fisiológica ou ainda uma alteração comportamental) que pode estar relacionada com a exposição ou efeitos tóxicos provocados por químicos ambientais (Peakall, 1994).

De acordo com a WHO (1993), os biomarcadores podem ser divididos em três classes: a) biomarcadores de exposição: abrange a detecção e a medição de uma substância exógena ou um metabolito ou ainda um produto de uma interacção entre o agente xenobiótico e a molécula ou célula alvo; b) biomarcadores de efeito: incluem alterações bioquímicas e fisiológicas ou de outro tipo nos tecidos celulares ou fluídos biológicos dos organismos que possam ser associadas a problemas de saúde, desde que essas alterações sejam mensuráveis; c) biomarcadores de susceptibilidade: indicam uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo a responder ao desafio da exposição a um xenobiótico específico. Inclui factores genéticos e transformações nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo à exposição.

As respostas dos biomarcadores podem ser relativas a efeitos biológicos ou bioquímicos após uma exposição a um determinado fármaco, o que faz deles ferramentas teoricamente úteis como indicadores de exposição e efeito. Os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou populações a uma substância

particular, fornecendo uma ligação entre exposição externa e dosagem aplicada no ensaio (Fent et al., 2008).

Os biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar alterações pré-clínicas ou efeitos adversos na saúde devido a exposições externas e absorção do composto. Os biomarcadores de susceptibilidade ajudam a elucidar variações no grau de resposta observados entre os vários organismos expostos aos tóxicos (Oost et al., 2003).

Existem alguns critérios para que um biomarcador seja considerado adequado, tais como; ter índices de sensibilidade em relação a biodisponibilidade de vários poluentes e às respostas biológicas precoces, deve ter baixo custo, procedimentos simples, aplicabilidade em várias condições de teste (Nunes et al., 2008).

A razão pela qual os biomarcadores são cada vez mais utilizados como ferramentas em análise ambiental é porque estes dão informação sobre os efeitos biológicos dos poluentes em vez de uma mera quantificação dos seus níveis ambientais. Os biomarcadores podem fornecer uma visão do potencial mecanismo do poluente que provoca efeitos nos organismos. Ao avaliar múltiplos biomarcadores consegue-se obter informações importantes do organismo exposto e relativos ao stress sofrido. Uma situação de stress causada por poluentes normalmente desencadeia uma cascata de respostas biológicas, onde cada uma dessas respostas pode na teoria servir como biomarcador (McCarthy et al., 1991)

De forma a avaliar objectivamente o poder dos biomarcadores em peixes, Oost et al (2003) propuseram seis critérios que compreendem as informações mais importantes que devem estar disponíveis ou que devem ser estabelecidas para cada candidato a biomarcador: 1) o teste para quantificar o biomarcador deve ser de confiança, relativamente barato e fácil de executar; 2) a resposta do biomarcador deve ser sensível à exposição aos poluentes e aos efeitos que estes causam para que possam ser usados como um parâmetro precoce de aviso; 3) a base de dados do marcador deve ser bem definida de forma a distinguir entre a variabilidade natural (ruído) e o stress induzido pelos contaminantes (sinal); 4) o impacto dos factores que possam causar confusão na resposta do biomarcador deve estar bem estabelecido. 5) o mecanismo subjacente das relações entre o biomarcador e a exposição ao poluente (dose e tempo) deve ser estabelecido; 6) a significância toxicológica do biomarcador deve estar estabelecida (as relações entre a sua resposta e o impacto no organismo a longo termo).

Fossi e Marsili (1997) sugerem e defendem que aos critérios atrás expostos deve ser ainda adicionado o facto de que o biomarcador deverá ser preferencialmente não-invasivo ou não-

destrutivo de forma a permitir e facilitar a monitorização ambiental dos efeitos provocados em espécies protegidas ou em perigo de extinção (Oost et al., 2003).

É possível analisar o impacto dos tóxicos xenobióticos nos peixes com vários tipos de biomarcadores de efeito e exposição (Oost et al., 2003): a) *enzimas de biotransformação*, são geralmente os biomarcadores de efeito mais sensíveis. Nos peixes a actividade destas enzimas podem estar induzidas ou inibidas após a exposição a determinados compostos; b) *parâmetro de stress oxidativo*, a toxicidade do oxigénio define-se como efeitos prejudiciais derivados da citotoxicidade das espécies reactivas de oxigénio, dos radicais livres, que podem provocar inactivação enzimática, danos no ADN, peroxidação lipídica; c) *produtos da biotransformação*, aumento dos níveis dos produtos da biotransformação nos fluídos corporais; d) *proteínas resultantes do stress, metalotioneinas e resistência xenobiótica*, proteínas envolvidas na protecção e reparação celular contra o stress e condições nocivas; e) *parâmetros hematológicos*, hematócrito, hemoglobina, proteínas e glicose, assim como níveis de algumas hormonas específicas; f) *parâmetros imunológicos*, poderá ocorrer uma diminuição da imunidade celular na presença de determinados compostos; g) *parâmetros endócrinos e reprodutivos*, alterações na regulação hormonal; h) *parâmetros neuromusculares*; i) *parâmetros genotóxicos*, alterações na estrutura do ADN; j) *parâmetros fisiológicos e morfológicos*, determinação dos efeitos adversos através da histopatologia, onde se procuram lesões, alterações ou formação de tumores nos tecidos dos peixes.

1.3.1. Stress Oxidativo

A atmosfera da Terra era originalmente redutora, sendo dominada por seres vivos como os microrganismos anaeróbios. A abundância de dióxido de carbono, água e energia solar permitiu que as cianobactérias evoluíssem e utilizassem a fotossíntese como processo de obtenção de energia, resultando na produção de oxigénio molecular (Lesser, 2006). Este composto passou assim a ser abundante e a libertar-se para a atmosfera.

Uma vez disponível o oxigénio na atmosfera, outros organismos começaram a ter caminhos metabólicos alternativos muito mais eficientes. A respiração aeróbia era mais eficiente e dava mais rendimento energético, mas ao mesmo tempo era mais tóxica ao nível celular. A forma molecular do oxigénio é pouco reactiva, mas no entanto pode converter-se em espécies reactivas de oxigénio (ROS); estas entidades de existência fugaz são altamente

reactivas e estão constantemente a ser produzidas nas células como subproduto do metabolismo aeróbio.

Existem outras fontes de ROS que podem afectar os organismos, e que decorrem da exposição a radiação, luz UV, ou que se devem à produção de peróxido de hidrogénio e oxigénio reduzido pelos macrófagos e fagócitos activados, ou à interacção de organismos com poluentes. Desde sempre se pensou que as ROS apenas causavam danos celulares e doenças consequentes, mas alguns investigadores começam a reconhecer a importância destas moléculas na manutenção da actividade celular, incluindo a sinalização intra e intercelular (Droge 2002, Hensley e Floyd, 2002)

Os organismos aeróbios desenvolveram um sistema de defesa antioxidante complexo, que une defesas moleculares e enzimáticas contra os perigos dos radicais de hidrogénio, prevenindo a oxidação e danos posteriores (Halliwell e Gutteridge, 1999). Os mecanismos de defesa incluem inactivação de moléculas de peróxido e de compostos do ciclo redox, reacções metabólicas onde se dá a transformação de ROS em água e oxigénio molecular.

O stress oxidativo é então uma perturbação no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes que pode conduzir a efeitos prejudiciais a nível bioquímico e fisiológico. Isto é uma condição prejudicial onde há o aumento da produção de radicais livres e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes que pode levar a potenciais danos celulares (Thannickal e Fanburg 2000).

Os indicadores do stress oxidativo incluem alterações na actividade das enzimas antioxidantes, danos nas bases de ADN, produtos da oxidação proteica e produtos da peroxidação lipídica (Thannickal e Fanburg 2000).

A actividade das enzimas metabólicas de fase I pode levar a um aumento da produção de ROS ou de intermediários reactivos do ciclo redox. As enzimas antioxidantes facilitam a remoção destes compostos intermediários reactivos assim como a remoção das ROS. A acção do citocromo P450 da família 1A (reacção de fase I) pode resultar na produção de $O_2^{\bullet-}$ que por sua vez pode ser metabolizado pela superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 . Esta molécula de peróxido de hidrogénio pode ser reduzida a H_2O e O_2 pela catalase (CAT). Os radicais hidroxilo (iões OH) podem formar-se através do H_2O_2 e O_2 por reacções com os iões metálicos do ciclo redox, como por exemplo o ferro e o cobre. Este radical hidroxilo altamente potente pode atacar tanto as proteínas como os lípidos, para formar os produtos resultantes dos danos oxidativos. A glutathiona peroxidase (GPx) pode reduzir os peróxidos lipídicos aos seus respectivos álcoois e água (Dinkova-Kostova e Talalay 2000).

No seguinte esquema pode observar-se todas as reacções descritas no parágrafo anterior (Fig.3.)

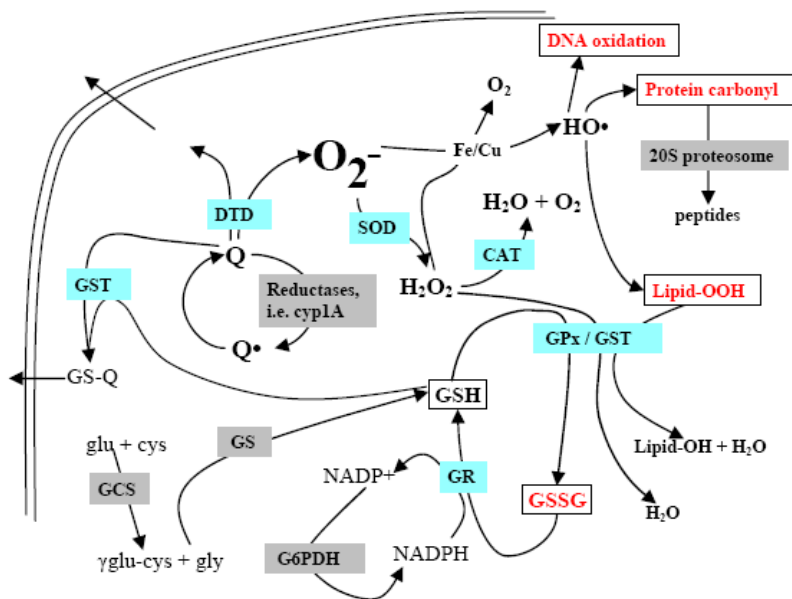


Fig.3. Diagrama esquemático do stress oxidativo. As enzimas antioxidantes estão representadas em azul, outras enzimas em cinza e as moléculas oxidadas a vermelho (Almroth 2008).

Biomarcadores que recorrem a enzimas biotransformadoras

A remoção dos xenobióticos e de algumas substâncias produzidas pelas células é catalisada por um conjunto de diferentes enzimas de fase I e de fase II. As enzimas de fase I estão envolvidas na biotransformação de xenobióticos através da introdução de uma molécula polar que faz com que os contaminantes lipófilos tenham mais afinidade para a água, ou seja se tornem mais hidrófilos. As enzimas de fase II estão envolvidas na conjugação de xenobióticos metabolizados com moléculas endógenas facilitando o processo de excreção. Um exemplo das enzimas mais usadas na biomonitorização dos peixes são a quantificação das actividades da glutathione S-transferase (GST) e a UDP glucoronil transferase (UDTGT) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.3.1.1 Glutathione S-transferase (GST)

A sua família é composta por proteínas diméricas solúveis (Fig.4) e multifuncionais que se podem conjugar com moléculas electrofílicas, de modo a torná-las menos tóxicas. Dentro

destas enzimas as mais conhecidas são as GST M1 e GST T1. A glutathione S-transferase contribui para a biotransformação de xenobióticos nas reacções de fase II, conjugando estes compostos com a glutathione reduzida de forma a facilitar a dissolução no meio intra e extracelular, sendo assim mais fácil a sua eliminação (Halliwell e Gutteridge, 1999)

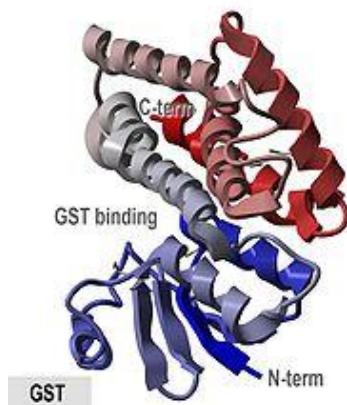
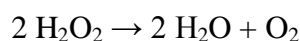


Fig.4 Estrutura da enzima GST (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.3.1.2. Catalase

A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio segundo a seguinte reacção química:



A catalase é uma enzima tetramérica (Fig.5) ou seja, é formada por quatro cadeias polipeptídicas. Cada cadeia polipeptídica liga um grupo heme, semelhante ao que existe na hemoglobina, possuindo então cada heme um ião de ferro. É este centro metálico que reage com o peróxido de hidrogénio (Nelson, 2005).

O peróxido de hidrogénio é um produto resultante do metabolismo celular nos organismos que estão expostos ao oxigénio atmosférico. Uma das fontes de peróxido de hidrogénio é a β -oxidação de ácidos gordos, necessária para a produção de diversos metabolitos essenciais. A hiperprodução de peróxido de hidrogénio, sem a existência de mecanismos compensatórios que o removem, está relacionada com diversas patologias ligadas ao stress oxidativo.

Sendo tóxico para as células, o peróxido de hidrogénio tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua. A catalase tem o mais alto número de *turnover* (k_{cat}) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40 000 000 moléculas de peróxido de hidrogénio por segundo, tornando-a numa enzima

importante para a desintoxicação desta substância. Esta enzima encontra-se dentro de um organelo celular denominado peroxissoma (Nelson, 2005).

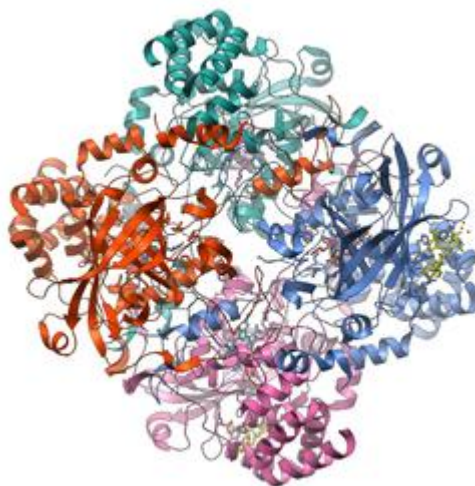


Fig 5. Estrutura da enzima catalase.

1.3.2. Histopatologia

Hoje em dia assume-se que alterações estruturais observadas em diversos tecidos, estruturas e órgãos são importantes como indicadores gerais de saúde dos peixes, e um reflexo dos efeitos da exposição a vários poluentes antropogênicos. (Hinton et al., 1992).

Como em qualquer biomarcador, também na histologia as alterações agudas são encontradas quando os níveis de contaminantes são suficientemente altos, no entanto para se determinar aspectos subletais é necessário que a contaminação seja crônica. Muitas alterações persistem mesmo após a exposição ao composto tóxico ter terminado, ou seja, são irreversíveis (Hinton, 1994).

Normalmente nos estudos histopatológicos são estudados alguns tecidos em particular, os quais são responsáveis pela absorção e metabolismo de xenobióticos, que são respectivamente e no caso dos organismos aquáticos as brânquias e o fígado. Alterações do estado de saúde de cada indivíduo podem indicar a ocorrência de consequências ecológicas e interferência com a cadeia alimentar local, causada por níveis de contaminação que não causou a morte ao peixe a curto prazo mas podem alterar parâmetros importantes (Fanta et al., 2001).

A investigação histológica dos órgãos do peixe, especialmente o fígado, provou ser uma ferramenta extraordinariamente sensível para revelar os processos adaptativos e os efeitos prejudiciais nos animais induzidos por poluentes orgânicos. Uma das principais razões porque

o fígado do peixe é usado, é devido ao facto de ser um local onde ocorre a acumulação, biotransformação e excreção de pesticidas (Cengiz et al., 2006). As brânquias são usadas pois são o primeiro local de contacto do xenobiótico e o organismo uma vez que a função delas é realizar as trocas gasosas entre o sangue e a água (Cengiz et al., 2006).

1.4. Classes de fármacos no ambiente

De acordo com Santos et al., 2009, o caminho mais óbvio para a contaminação ambiental pelos fármacos é a através da excreção urinária e fecal, embora possam ser considerados outros mecanismos, nomeadamente: a) metabolismo pós-consumo; b) compostos de diagnóstico; c) descargas caseiras; d) descargas poluentes das indústrias farmacêuticas.

Pelo mundo fora, existem diferenças no que diz respeito à prevalência de determinadas doenças, processos de tratamento de resíduos, hábitos culturais e restrições económicas relacionadas com o mercado farmacêutico (Zucatto et al., 2006).

Contudo, parece que nas regiões urbanas a maior fonte de contaminação se fica a dever à proximidade dos hospitais e das estações de tratamento de águas residuais. Adicionalmente, a contribuição das regiões rurais é importante, depois a agricultura, o tratamento dos animais e a aquacultura representam formas de vida importantes e que devem ser consideradas relevantes (Santos et al., 2009).

O consumo contínuo de medicamentos, mesmo em doses sub-terapêuticas, representa uma potencial ameaça à saúde pública, embora deve ter-se em mente que ainda é impossível avaliar os efeitos de uma exposição sobre a saúde humana (Daughton e Ternes, 1999).

Por outro lado, muitos organismos não-alvo (que possuem mecanismos metabólicos, receptores e biomoléculas semelhantes aos humanos e animais) estão inadvertidamente expostos a substâncias activas libertadas no ambiente (Daughton e Ternes, 1999).

Recentes desenvolvimentos de metodologias sensíveis de identificação e quantificação de medicamentos e seus resíduos foram importantes para a elaboração de padrões de distribuição em várias amostras ambientais, destacando assim as classes terapêuticas mais relevantes na contaminação do meio ambiente (fig.6). Estes dados são úteis para estabelecer quais as substâncias activas mais relevantes para que sejam determinados os seus efeitos toxicológicos. De acordo com dados presentes, a comunidade científica tem direccionado a sua atenção para determinadas classes terapêuticas, tais como, anti-inflamatórios não

esferóides, hormonas sexuais, antibióticos e moléculas usadas no tratamento de dislipidémias (Santos et al., 2009).

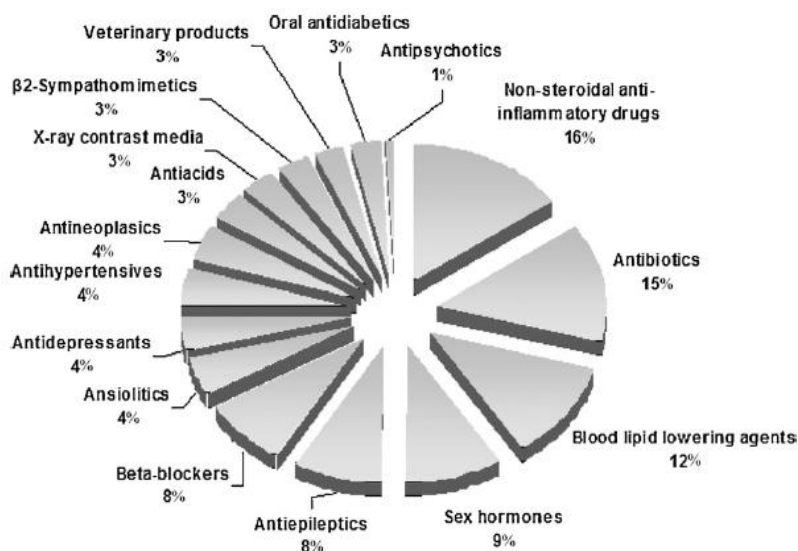


Fig.6. Classes terapêuticas encontradas no ambiente, expressas em percentagem relativa. (adaptado de Santos et al., 2009)

1.4.1. Benzodiazepinas

Nos anos 60, a descoberta das benzodiazepinas permitiu fazer a distinção entre sedativos hipnóticos e tranquilizantes. Os tranquilizantes exercem efeitos semelhantes aos sedativos e distinguem-se deles por uma maior selectividade da acção calmante, ansiolítica e correctora da tensão emocional, com menor capacidade de provocar sonolência (Osswald e Moura, 2006). As indicações terapêuticas das benzodiazepinas são tão amplas que a sua utilização conseguiu sobrepor-se aos barbitúricos, uma vez que ao contrário destes, não tem acção depressora do centro respiratório, logo são mais seguras (Osswald e Moura, 2006). Estes tipos de fármacos são usados em situações de ansiedade, insónias, convulsões, epilepsia, relaxamento muscular (Osswald e Moura, 2006).

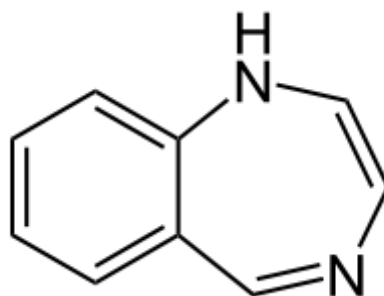


Fig.7 Estrutura química geral das benzodiazepinas.

O mecanismo de acção deste grupo terapêutico ainda demonstra causar dúvidas, mas o mais provável é que actuem através de um aumento da actividade das sinapses em que o GABA (Ácido gama-aminobutírico) é o neurotransmissor envolvido. No entanto estes fármacos não têm afinidade para os receptores GABA, mas actuam pela facilitação da ligação do GABA aos seus receptores específicos, aumentando consequentemente a condutância ao ião cloreto, fazendo com que o interior da célula fique mais negativo, e logo mais refractário ao despoletar de um potencial de acção (Osswald e Moura, 2006).

O GABA actua sobre dois tipos de receptores: os receptores GABA_A (activados pelo muscinol e bloqueados pela bicuculina) e os receptores GABA_B (activados pelo baclofeno e bloqueados pelo faclofeno). Os receptores das benzodiazepinas localizam-se na mesma estrutura macromolecular onde se situa o receptor do tipo GABA_A (Osswald e Moura, 2006).

O receptor GABA_A, tal como o receptor nicotínico da acetilcolina, controla a abertura de um canal iónico da membrana celular. Este canal dependente da activação GABA_A é selectivamente permeável ao cloreto e tem a forma de um cilindro que atravessa perpendicularmente a membrana neuronal (Osswald e Moura, 2006).

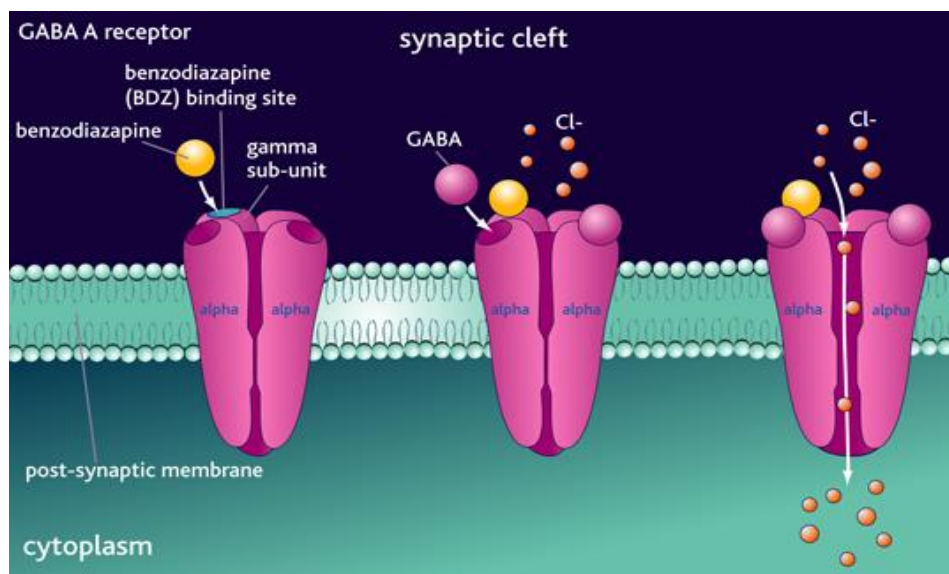


Fig.8 Esquematização do mecanismo de acção das benzodiazepinas (adaptado de http://www.cnsforum.com/imagebank/item/drug_benzo/default.aspx)

A fixação do GABA provoca um aumento da permeabilidade do canal de cloro, o que permite a passagem pela membrana desse anião a favor do gradiente de concentrações. Em regra a concentração de cloretos no espaço extracelular é superior à do meio intracelular e, por isso, a activação do receptor GABA_A produz um acréscimo de cargas negativas na face

interna da membrana celular e conseqüente aumento da diferença de potencial transmembranar. A membrana hiperpolarizada possui um limiar de excitabilidade aumentado e a actividade neuronal sofre diminuição. Por um mecanismo que ainda não é totalmente conhecido, a activação dos receptores das benzodiazepinas pelos seus agonistas aumenta a afinidade do GABA para o receptor GABA_A (Osswald e Moura, 2006).

Quando devido ao stress diário ou por causas mais sérias, determinadas áreas do cérebro funcionam exageradamente, pode resultar num estado de ansiedade, onde as benzodiazepinas exercem um efeito contrário, isto é, inibem os mecanismos que estavam a funcionar em excesso e a pessoa fica mais tranquila e menos reactiva aos estímulos externos (Osswald e Moura, 2006).

A resposta máxima dos agonistas dos receptores das benzodiazepinas está limitada pela quantidade de GABA na biofase e pela intensidade máxima das acções desse composto endógeno. Esta condição explica a escassa toxicidade aguda destes fármacos, que mesmo administrados em doses múltiplas das terapêuticas, são desprovidos de acção depressora do SNC fatal (Osswald e Moura, 2006).

As benzodiazepinas são fármacos marcadamente lipossolúveis, e, por isso, atravessam facilmente as barreiras biológicas. No entanto, há diferenças acentuadas entre a lipossolubilidade dos diferentes compostos deste grupo. Entre os mais lipossolúveis encontra-se o diazepam (Osswald e Moura, 2006).

Diazepam

O diazepam é uma benzodiazepina, pois na sua estrutura apresenta um anel benzénico unido a um diazepínico onde se podem encontrar as funções amida e hidrocarboneto (Fig.9).

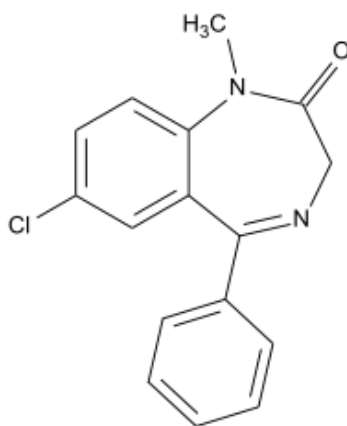


Fig.9 Estrutura química do diazepam.

É usado como ansiolítico e anticonvulsivante. Em Portugal é uma das benzodiazepinas mais populares sendo por isso uma das mais prescritas em neuroterapia e psicoterapia (Osswald e Moura, 2006).

O diazepam foi seleccionado para este trabalho devido ao seu uso frequente na terapêutica do dia-a-dia em humanos. Consequentemente, a sua presença no compartimento aquático tem sido frequentemente determinada, tendo sido já reportada em concentrações até 0,04µg/l em efluentes de um grande número de estações de tratamento de águas residuais na Alemanha (Ternes, 1998). A presença de diazepam nas ETARs resulta exclusivamente do seu uso humano (Nunes et al., 2005).

De acordo com, Van der Hoeven (2004), a percentagem máxima de remoção por parte das ETARs de diazepam é de 93%.

1.5. *Gambusia holbrooki*

Gambusia holbrooki é uma espécie de peixe de água doce que pertence à família Poeciliidae e que pode crescer até aos 3,5 cm de comprimento, é um peixe nativo das regiões costeiras Este dos Estados Unidos da América, mas tem sido massivamente introduzido em locais com temperaturas mais altas e regiões tropicais pelo mundo fora em programas de controlo de mosquitos, no sentido de reduzir a transmissão de patologias como a malária. Esta espécie foi posteriormente introduzida na Península Ibérica em 1921 e invadiu as regiões mais baixas dos rios, lagoas costeiras (Cabral e Marques, 1999).

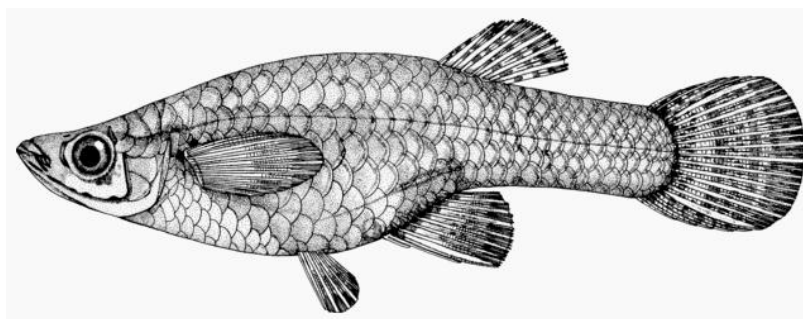


Fig.10 Ilustração de um animal pertencente à família Poeciliidae (adaptado de <http://www.briancoad.com/species%20accounts/Poeciliidae.htm>)

Sendo uma espécie invasora com grande capacidade de adaptação, as suas populações cresceram exponencialmente pois adapta-se muito bem a ambientes extremamente hostis e

condições agrestes como temperaturas elevadas e água pouco oxigenada (Cabral e Marques, 1999).

Este peixe vivíparo é conhecido por consumir larvas de insectos, zooplankton e outros invertebrados, mas também por ser uma ameaça para os peixes nativos dos locais onde foram introduzidos. Já foram reportados consequências perigosas da introdução destes peixes em vários locais uma vez que eles comem os ovos dos peixes economicamente relevantes e põem em risco a viabilidade de espécies endógenas raras (Cabral e Marques 1999).

Esta espécie reproduz-se rapidamente, podendo reproduzir-se quatro vezes num ano. Os ovos são fecundados no ventre materno e as suas crias nascem não completamente desenvolvidas, mas já com alguma autonomia, já conseguindo alimentar-se, nadar e comer larvas (Cabral e Marques 1999).

O uso de *Gambusia holbrooki* na ecotoxicologia deve-se às suas características intrínsecas assim como as características adicionais relacionadas com a manutenção e experimentação no laboratório e a sua facilidade de adaptação a várias condições ambientais. É ainda importante dizer que é um peixe com ampla distribuição em sistemas de água doce e em estuários de regiões temperadas, incluindo rios portugueses e estuários. Além da ampla distribuição geográfica, este peixe é caracterizado pela alta fecundidade e pode ser considerado um consumidor secundário na cadeia alimentar aquática. (Nunes et al., 2008)

II. Objectivos do trabalho

O objectivo principal desta monografia foi avaliar os efeitos sub-letais de um fármaco de utilização generalizada, o diazepam, ao nível histológico e na quantificação das actividades da glutathione-S-transferases (GST) e da catalase presente nas brânquias e fígado, em peixes da espécie *Gambusia holbrooki*, após exposição aguda (96h) a várias concentrações do fármaco.

III. Material e métodos

3.1. Captura

Os espécimes *Gambusia holbrooki* foram capturados durante o mês de Abril de 2010 na Pateira de Fermentelos (40° 34' 48" N, 8° 31' 12" W), a maior lagoa natural da Península Ibérica que ocupa actualmente uma área de superfície e profundidade variáveis, de acordo com a

estação do ano, que, no seu expoente máximo, atinge mais de 5 km² e estes estendem-se, maioritariamente, pelo concelho de Águeda, abrangendo também o concelho de Aveiro e Oliveira do Bairro. Em termos hidrográficos, a lagoa está compreendida na bacia hidrográfica do rio Cértima a qual, por sua vez, se insere na bacia hidrográfica do rio Águeda e esta, na bacia do rio Vouga (Laranjeira, 2008).

A lagoa é alimentada pelo rio Cértima (a montante), pela ribeira do Pano (a poente), pontualmente por outras escorrências, e por água subterrânea (sistema aquífero Cretácico de Aveiro), sendo o rio Cértima o principal curso a condicionar a hidrologia (Laranjeira, 2008).



Fig.11 Imagem panorâmica do local de captura

Os peixes foram capturados com a ajuda de redes de mão (camaroeiros), e imediatamente transportados para o laboratório acondicionados em pequenas arcas aerificadas. Os animais ficaram em quarentena durante algumas semanas em arcas térmicas com água sem cloro, com oxigenação contínua e alimentação diária. Foram feitas inspeções diárias aos tanques de forma a retirar animais feridos, doentes ou mortos (Nunes et al., 2004).

3.2. Teste agudo (96 horas)

Os testes foram realizados de acordo com as normas internacionais para testes de toxicidade agudos em peixes da OECD (OECD, 1993), com as seguintes modificações: os animais foram expostos individualmente em garrafas de plástico previamente lavadas com água desionizada e posteriormente cheias com 200 ml de água sem cloro, com oxigenação contínua (Fig.12). Foram usados 15 animais por cada concentração.



Fig. 12 Esquema de montagem dos sistemas para exposição ao tóxico

A solução mãe de diazepam foi preparada com água desionizada. As concentrações usadas foram 0.04; 0.02; 0.01; 0.005; 0.0025 $\mu\text{g/l}$. As concentrações usadas foram escolhidas tendo em conta a concentração reportada por Ternes, 2008 num efluente alemão de 0,04 $\mu\text{g/L}$, tendo sido esta a concentração máxima usada no presente trabalho. Todas as restantes concentrações são derivadas da atrás descrita, sendo assim concentrações subletais e um controlo.

Durante o teste com duração de 96 horas não foi fornecido alimento aos animais. A observação foi feita às 0, 24, 48, 72 e 96 horas de forma a observar todas as alterações, e o meio foi trocado às 48 horas.

3.3. Determinação das actividades enzimáticas: GSTs e catalase

Após o período de exposição os animais foram sacrificados por decapitação, em gelo com tampão fosfato. Retiraram-se posteriormente as brânquias e os fígados que foram homogeneizados em tampão fosfato (50mM, pH=7) com 0,1% Triton X-100. Devido à reduzida quantidade de material biológico por peixe, foi necessário proceder à homogeneização de amostras compostas. Cada amostra homogeneizada foi constituída por 4 fígados ou 4 brânquias. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 15000G durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C (Nunes et al 2008).

A actividade das isoenzimas GSTs foram determinadas por espectrofotometria, de acordo com Habig et al. (1974) adaptada a microplaca. Estas isoenzimas catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4,dinitrobenzeno (DTNB) com a glutathiona na sua forma reduzida (GSH), formando um tioéter que pode ser monitorizado por um aumento da absorvância a 340nm. Os

resultados são expressos em nanomol de tioéter produzido por minuto, por miligrama de proteína (Habig et al., 1974).

A catalase exerce dupla função, decomposição de H_2O_2 e oxidação de dadores de hidrogénio com consumo de peróxido. A decomposição enzimática do peróxido de hidrogénio ocorre de acordo com uma reacção de primeira ordem, sendo a sua velocidade sempre proporcional à quantidade de peróxido presente. No entanto as cinéticas da catalase não obedecem a um padrão normal. Por um lado, não é possível saturar a enzima com o substrato dentro das concentrações possíveis (até 5M de H_2O_2) e por outro lado dá-se uma rápida inactivação da catalase para concentrações de H_2O_2 acima de 0,1 M, quando o complexo I activo enzima- H_2O_2 é convertido em complexos inactivos II ou III. A actividade da catalase é então determinada com um método que monitoriza a decomposição de H_2O_2 a 240 nm durante 30 segundos.

A quantidade de proteína das amostras foi determinada em quadruplicado de acordo com o protocolo de Bradford (1976) usando γ -globulina como padrão, de forma a expressar a actividade enzimática tendo em conta o conteúdo de proteína contida nos tecidos analisados. Esta reacção envolve a ligação de um corante (reagente de Bradford) à proteína total, dando origem a um complexo corado e estável passível de ser quantificado a 595nm.

3.4. Determinação histopatológica

Dos 15 animais expostos a cada uma das concentrações, 12 foram usados para a determinação enzimática e 3 para determinações histopatológicas. Estes últimos não foram sacrificados por decapitação, mas foi-lhes apenas cortado uma pequena porção da barbatana caudal (Fig.13), para que a impregnação dos compostos químicos usados nos processos posteriores seja mais eficaz, e ainda vivos, foram colocados em cassetes. As cassetes foram rapidamente colocadas em reagente de Bouin, de modo a manter os órgãos e os vários tecidos nas melhores condições, pois inibe a autólise tecidual e melhora a diferenciação dos tecidos. Ao fim de 24 horas substituiu-se o Bouin por álcool a 70° para se desidratar os tecidos. O passo seguinte é fazer a descalcificação das amostras: durante 24 horas são retirados os sais de cálcio dos tecidos orgânicos sem que haja alteração das estruturas celulares, com uma solução de ácido fórmico e citrato de sódio.

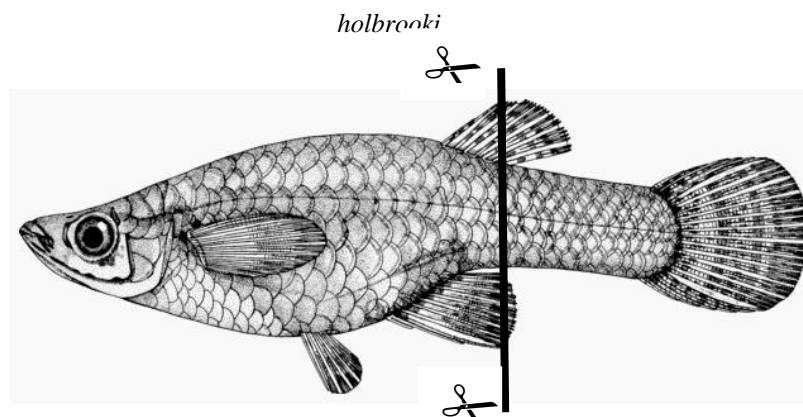


Fig.13 Esquema de corte das amostras

Posteriormente fez-se a desidratação dos tecidos usando-se concentrações crescentes de álcool (de 70° até 100°) de forma a evitar a retracção pronunciada dos tecidos que pudesse causar lesões estruturais da célula de forma irreversível. A diafanização foi o passo seguinte e consistiu na impregnação dos tecidos com xilol. Este passo visou duas funções: actuar como agente clareador dos tecidos (tornando-os translúcidos) e facilitar o passo seguinte da inclusão. Uma vez que a parafina (utilizada durante a fase da inclusão) não se mistura com o álcool, o xilol vai substituir todo o álcool presente nos tecidos e assim a parafina consegue penetrar facilmente nas amostras.

A inclusão ou infiltração foi o passo final do tratamento dos tecidos, e teve como finalidade eliminar completamente o xilol contido no material e a total penetração da parafina nos vazios deixados pela água e gordura antes existentes nos tecidos. De uma forma mais grosseira, consiste num processo que consiste em rodear um tecido com uma substância firme, a parafina, de forma a ser possível obter blocos com a consistência adequada para se proceder à realização de cortes bem finos na amostra para observação. São usados quatro tipos de parafina, com níveis de pureza progressivos para assegurar que todo o agente clareador é substituído pela parafina.

Após todos os processos descritos atrás, as cassetes foram abertas e as amostras colocadas em moldes metálicos (Fig.14) para se fazerem os blocos de parafina que foram cortados numa fase seguinte em micrótomo, em películas com um tamanho médio de 5 a 7µm.

As películas cortadas foram usadas para fazer preparações definitivas coradas para observação ao microscópio.

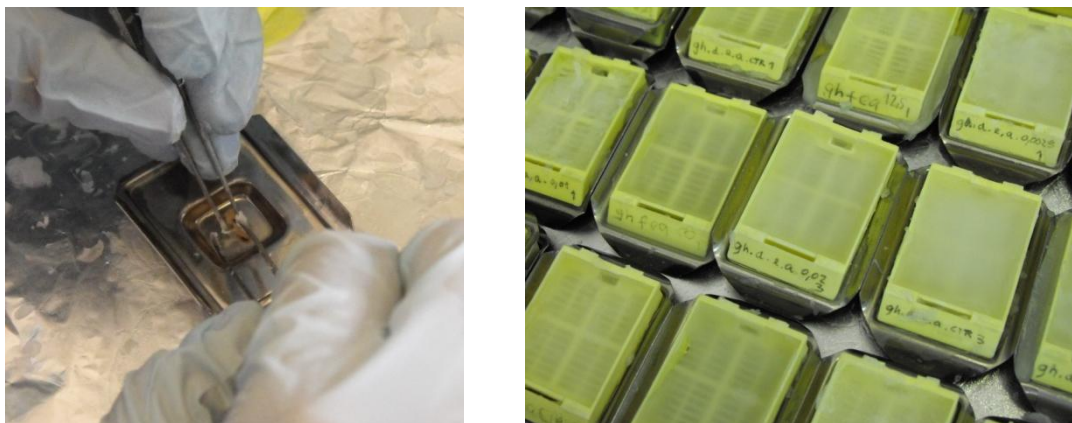


Fig.14 Moldes metálicos onde são colocadas as amostras e posteriormente cobertas com parafina de forma a montar os moldes.

3.4.1. Avaliação qualitativa e semi-qualitativa das alterações histopatológicas

Para cada órgão investigado, as respectivas alterações estruturais foram classificadas em cinco reacções padrão (distúrbios da circulação, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e tumores) de acordo com Bernet et al. (1999).

3.4.2. Avaliação semi-quantitativa das alterações histopatológicas

A cada lesão observada foi atribuído um factor de importância à patologia (w, 1-3) e um “score” (a, 0-6) que aferia a extensão da lesão. O índice patológico para cada órgão (I_g e II, brânquias e fígado, respectivamente) resultou do somatório do factor de importância a multiplicar pelo “score” (Bernet et al., 1999).

3.5. Tratamento estatístico dos dados

Foram usados no mínimo uma amostra de 15 animais por cada grupo de concentrações usadas e no controlo. Na análise estatística foi usado um programa disponível comercialmente designado Sigma Plot ® v.11.0 (Systal Software. Inc)

A avaliação estatística decorreu pela análise de variância simples, seguida de um teste de Dunnet para discriminar as diferenças significativas em relação aos tratamentos controlo. O nível de significância adoptado foi $p < 0,05$.

IV. Resultados

4.1 Histologia

As brânquias dos peixes do tratamento controlo mostram uma boa preservação estrutural, com excepção de alguns e um ligeiro levantamento epitelial. Globalmente pode-se afirmar que nos animais controlo, as lamelas secundárias estavam normalmente alinhadas com as lamelas primárias, as células clorídricas e as células mucosas estavam bem visíveis nas bases das lamelas secundárias (Fig.15 (A)).

Nos restantes peixes tratados com as várias concentrações de diazepam, os órgãos respiratórios desenvolveram alterações patológicas. A patologia mais recorrente foi o edema difuso e o desprendimento do epitélio lamelar (levantamento epitelial) com a formação de grandes espaços subepiteliais (Fig.15 (B)). Foram ainda observadas situações de hiperplasia em alguns animais expostos a concentrações mais altas (Fig.15 (C)), assim como alguns aneurismas (Fig.15 (D)).

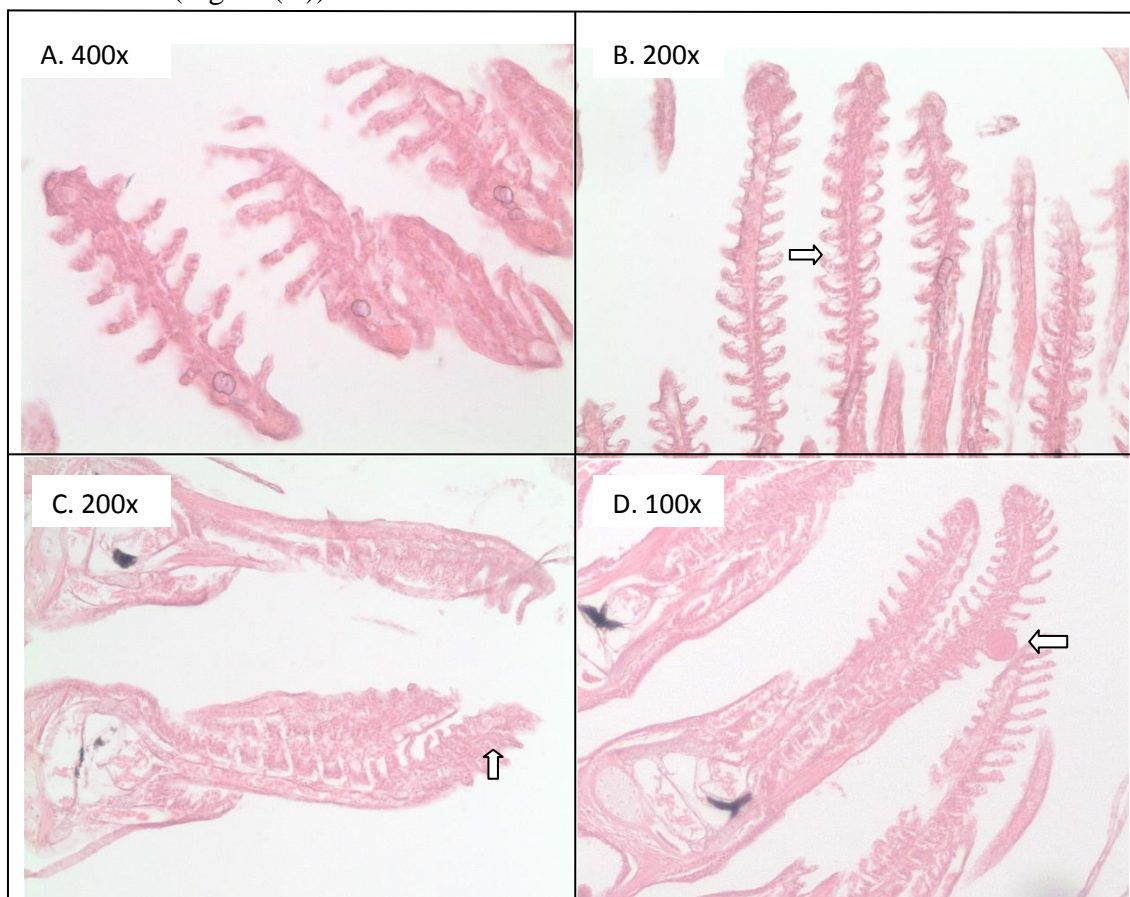


Fig.15 Histopatologia das brânquias de *Gambusia holbrooki* capturadas na Pateira de Fermentelos. (A) Estrutura branquial normal (0,005 μ g/l); (B) Levantamento epitelial (Controlo); (C) Hiperplasia do epitélio branquial (0,01 μ g/l); (D) Aneurisma (0,02 μ g/l).

Foram detectadas diferenças significativas nas médias dos diferentes grupos para o índice patológico das brânquias (IPB) (Análise de variância Unifactorial; $F_{5,12}=16.686$; $P<0.001$), sendo que os animais expostos às três concentrações mais elevadas, apresentam um valor médio de IBF estatisticamente superior ao grupo controlo (teste de Dunnett, $P <0,05$) (Fig. 16).

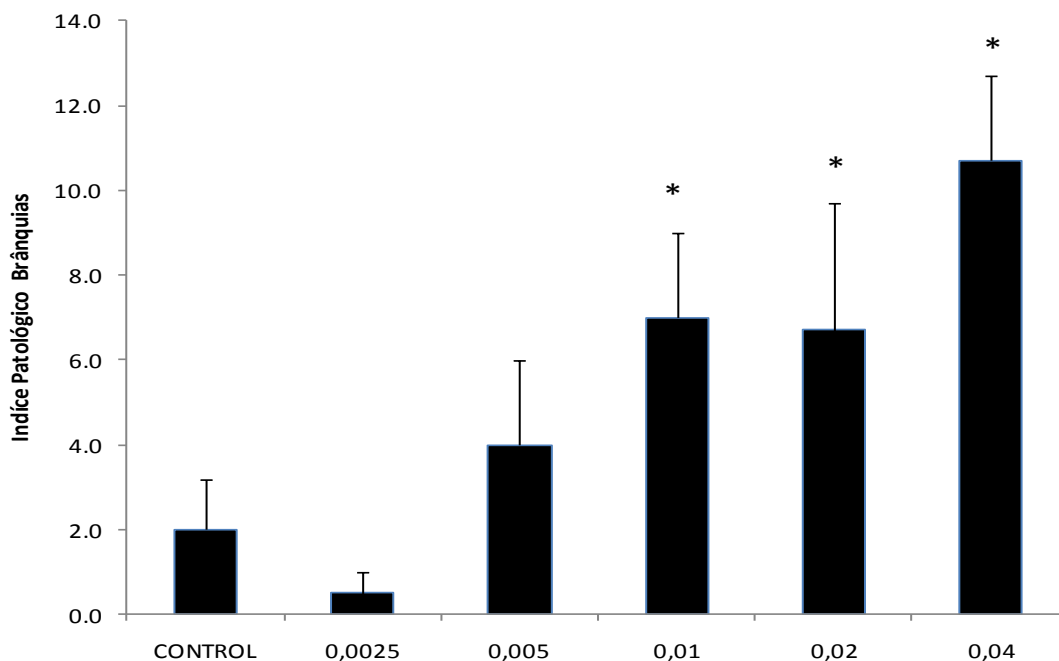


Fig.16 Valor médio (e respectivo erro padrão) do índice patológico calculado para as brânquias nos diferentes grupos. Os grupos marcados com um asterisco são significativamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett, $P<0.05$)

Nos animais do grupo controlo a morfologia estrutural do tecido hepático encontrava-se normal (Fig.17 (A)), evidenciando hepatócitos com o citoplasma e núcleo com aspecto normal.

Em animais expostos a concentrações mais elevadas de diazepam, os danos no fígado tornam-se mais pronunciados e visíveis, como é o caso do alargamento dos capilares sinusóides (Fig.17 (B)). Nas concentrações mais altas foram ainda encontradas duas amostras onde se visualizam alguns núcleos picnóticos (Fig.17 (B)).

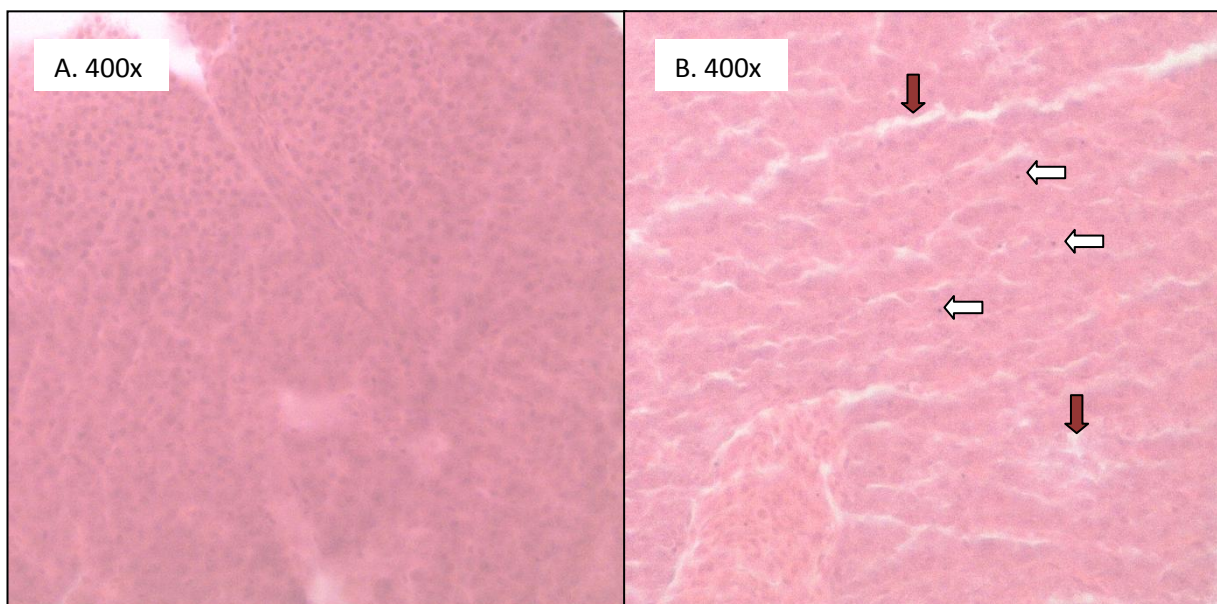


Fig.17 Histopatologia do fígado de *Gambusia holbrooki* capturadas na Pateira de Fermentelos. (A) Estrutura celular hepática normal (controlo); (B) Alterações nucleares – núcleos picnóticos (0,02 μ g/l) (setas brancas), alargamento dos sinusóides (setas vermelhas).

Foram detectadas diferenças significativas nas médias dos diferentes grupos para o índice patológico do fígado (IPF) (Análise de variância Unifactorial; $F_{5,11}=9.083$; $P=0.001$), sendo que os animais expostos às três concentrações mais elevadas, apresentam um valor médio de IF estatisticamente superior ao grupo controlo (teste de Dunnett, $P < 0,05$) (Fig. 18).

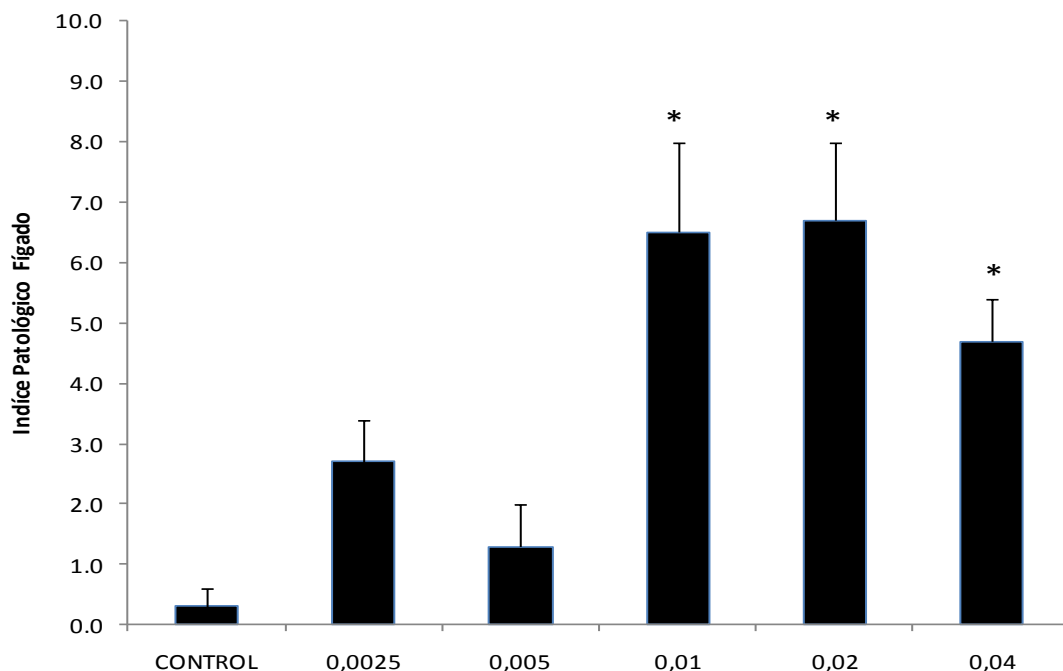


Fig.18 Valor médio (e respectivo erro padrão) do índice patológico calculado para o fígado nos diferentes grupos. Os grupos marcados com um asterisco são significativamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett, $P < 0.05$)

4.2. Ensaio enzimático

Após a observação da Fig.19, podemos constatar que os valores da actividade da GST nas brânquias são levemente superiores comparando com o resultado do controlo, ainda que apenas a actividade encontrada na concentração de $0,005 \mu\text{g/l}$ seja considerada significativamente diferente ($F = 4,73 \times 10^{-5}$; $g.l = 3,7$; $p < 0,05$).

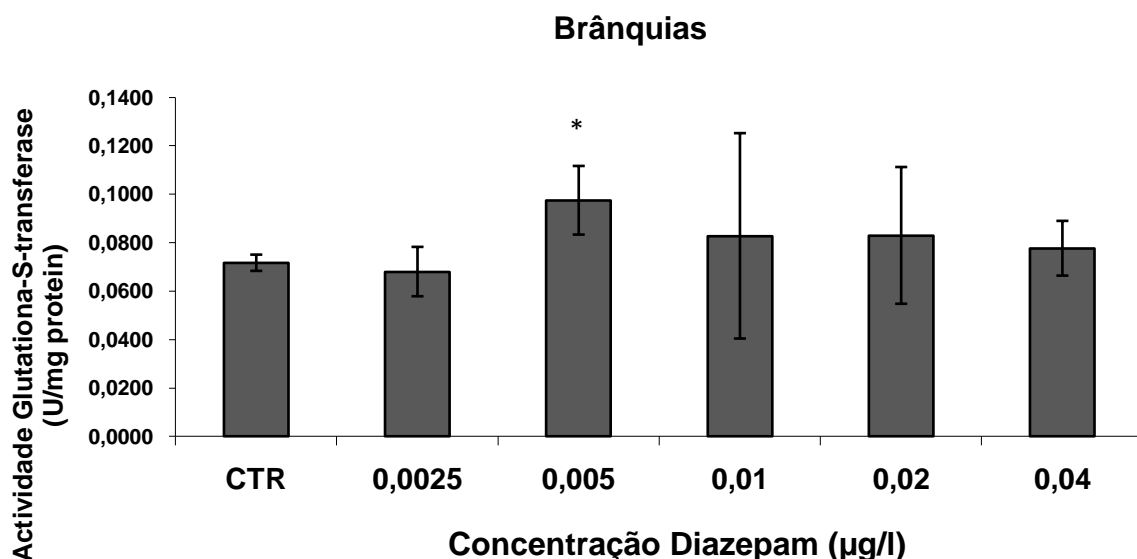


Fig.19 Efeito da diazepam na actividade da enzima GST nas brânquias de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão. *-diferenças significativas, $p < 0,05$.

Já no caso do fígado (Fig.20) verifica-se não haver uma tendência marcada quer de aumento ou diminuição. Não há valores significativamente diferentes em relação ao controlo ($F = 0,004856$; g.l. = 5,10; $p > 0,05$).

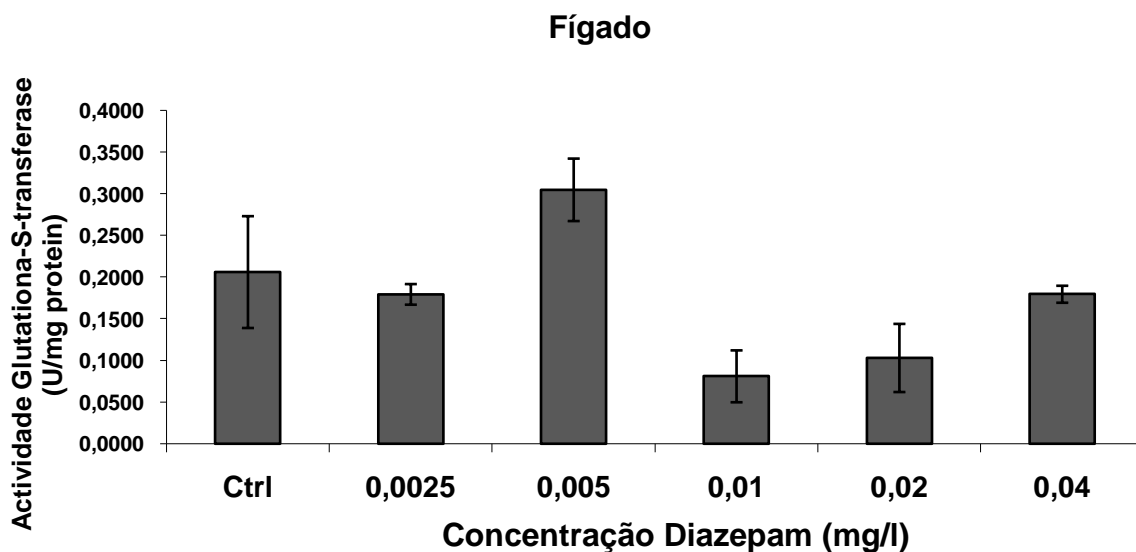


Fig.20 Efeito da diazepam na actividade da enzima GST no fígado de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão. *-diferenças significativas, $p < 0,05$.

No caso dos valores da actividade catalase no fígado, podemos observar através da Fig.21 que ao longo das concentrações usadas há uma grande variabilidade dos dados recolhidos, que no entanto, e comparando com o controlo observa-se que são por norma superiores tendo sido encontradas diferenças significativas nas duas concentrações mais altas de 0,02 e 0,04 $\mu\text{g/l}$ ($F= 0,01$; g.l.= 5,12 $p< 0,01$)

Não foi efectuada a medição da actividade da catalase em brânquias uma vez que não foi possível a sua quantificação dada a sua baixa actividade neste tecido.

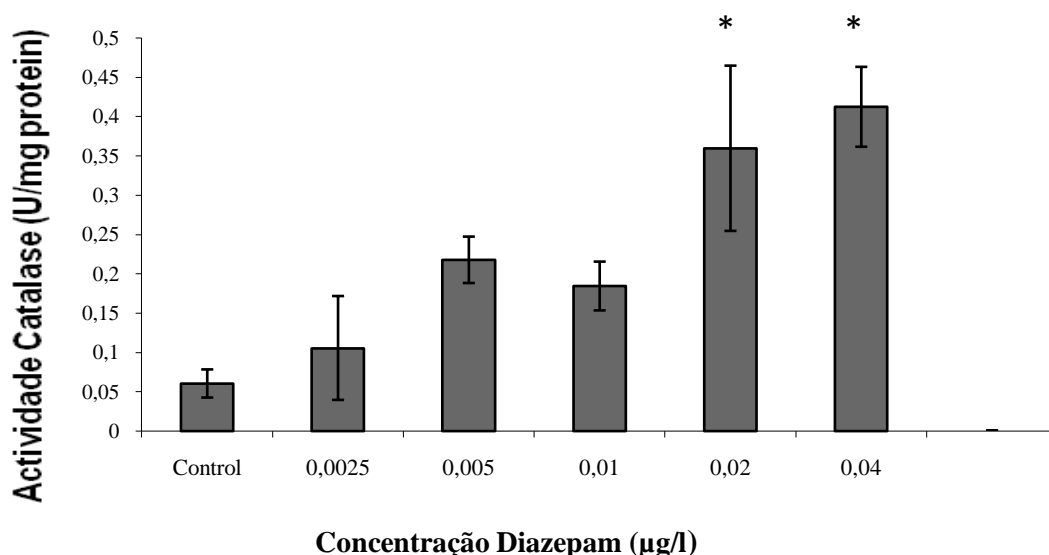


Fig.21. Efeito da diazepam na actividade da enzima catalase no fígado de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão. *-diferenças significativas, $p<0,01$.

V. Discussão

A exposição a contaminantes químicos, no caso particular dos peixes é uma causa provável de indução de um número elevado de lesões em diferentes órgãos (Sindermann, 1979). As alterações estruturais nos tecidos e órgãos aparecem normalmente a médio prazo como resposta dos organismos à exposição aos agentes subletais presentes num determinado meio (Johnson et al., 1993; McCain & Varanasi 1993). As brânquias, o fígado e a pele são os órgãos mais usados como marcadores primários para a poluição aquática: as brânquias e a pele têm uma grande área de contacto com a água (e portanto com o potencial poluente), além

do mais que ambos os órgãos têm células mucosas, sendo que o muco tem um papel importante na resistência às doenças contra os patógenos e as substâncias tóxicas (Wood and Soivio, 1991; Bernet et al., 1999). O fígado tem um importante papel no metabolismo e a subsequente excreção dos xenobióticos (Shephard, 1994).

Contudo, a ausência de dados numéricos torna difícil o estabelecimento de relações causa-efeito entre as patologias e os xenobióticos a que os organismos estão expostos e complica também a avaliação das diferenças significativas entre os grupos testados e o controle. Por esta razão, a investigação sobre as características histopatológicas dos animais expostos tem agora a correspondência com índices histopatológicos de forma a fornecer dados numéricos para se fazer uma abordagem semi-quantitativa. Algumas destas abordagens foram usadas com sucesso atribuindo índices de lesões para comparar efeitos provocados nos espécimes expostos a contaminantes por via de análise estatística adequada (DeIvalls et al., 1998; Riba et al., 2004; Costa et al., 2005). Foi então descrita por Bernet et al. (1999), uma ferramenta de avaliação histopatológica que é aplicável a qualquer órgão, e que tem como objectivo uma quantificação standard, permitindo comparações legítimas entre diferentes estudos e entre diferentes órgãos.

Uma das dificuldades mais importantes relacionada com os estudos histopatológicos nos peixes é a falta de especificidade das lesões e das alterações provocadas por um contaminante, o que prejudica bastante a avaliação da causa-efeito quando estão envolvidos vários contaminantes. Por outro lado, as patologias ao nível tecidular são de longe mais descritas na medicina humana do que na ictiologia, e as discrepâncias na identificação e na terminologia das lesões surgem frequentemente (Koehler, 2004).

As alterações das brânquias mais comuns encontradas no presente estudo foram o levantamento epitelial com a formação de grandes espaços subepiteliais, edema e hiperemia (por ordem decrescente de incidência). Foram ainda observados aneurismas em alguns animais expostos a concentrações mais altas, assim como algumas situações de hiperplasia e fusão das lamelas secundárias.

Neste estudo foram detectadas diferenças significativas nas médias dos diferentes grupos para o índice patológico das brânquias, sendo que os animais expostos às três concentrações mais elevadas, apresentam um valor médio de IBF estatisticamente superior ao grupo controle.

As lesões das brânquias são indicadores de exposição a contaminantes usados em numerosos estudos laboratoriais por todo o mundo (Dalzell and Macfarlane, 1999; Oliveira

Oliveira Ribeiro et al., 2002; Thophon et al., 2003). Estudos histopatológicos prévios de peixes expostos a poluentes mostraram que as brânquias são os marcadores primários para avaliar a poluição aquática (Alazemi et al., 1996). Portanto o comprometimento funcional das brânquias causado por poluentes pode danificar significativamente a saúde dos peixes. No entanto há ainda pouca informação sobre o impacto que o diazepam tem nas brânquias dos peixes, em particular no peixe usado neste estudo, *G.holbrooki*. Segundo Heath (1987) e Cardoso et al (1996), As brânquias são os órgãos alvo principais da acção tóxica provocada por xenobióticos, mas por outro lado são também um dos principais locais de destoxificação dos organismos (Heath, 1987) e Cardoso et al., 1996). Diferentes concentrações e diferentes tempos de exposição mostram diferentes graus de alterações degenerativas, fazendo a distinção entre efeitos agudos e crónicos (Gill et al., 1988); Cengiz e Unlu, 2002 e Sinhasen et al., 1987).

O levantamento epitelial e a fusão das lamelas secundárias podem ser um mecanismo de protecção uma vez que faz com que haja uma diminuição da área de superfície das brânquias e portanto reduzindo contacto com o agente tóxico (Richmonds e Dutta, 1989). Contudo, a hiperplasia epitelial e o levantamento epitelial causam ainda um aumento considerável na distância de difusão dos gases respiratórios entre o epitélio e os vasos sanguíneos o que acaba por afectar a função respiratória das brânquias (Heath, 1987). Vários outros estudos mostraram que a fusão das lamelas secundárias e a hiperplasia, provocadas pela exposição ao malatião, a endossulfano e dimetoato, implicam uma redução drástica da superfície respiratória (Richmonds e Dutta, 1989; Gill et al., 1988; Cengiz e Unlu, 2002).

Os danos estruturais nas brânquias como por exemplo a hiperplasia com fusão lamelar, a telangectasia, o edema, o levantamento epitelial representam as reacções fisiológicas mais comuns de stress, tendo a maioria destas alterações funções de defesa (Mallat, 1985). Estas respostas quer sejam adaptativas ou patológicas, invariavelmente determinam a extensão da regulação homeostática do meio interno (Laurent e Perry, 1991), em particular a diminuição da eficiencia respiratória (Jagoe et al., 1996).

O fígado tem um papel importante nas funções vitais, metabolismo básico, acumulação, transformação e excreção de contaminantes (Moon et al. 1985; Triebkorn et al. 1997). A histopatologia hepática é uma ferramenta de biomonitorização que prevê a avaliação dos efeitos de compostos que provoquem stress em populações piscícolas; é também um dos indicadores com um índice de confiança bastante elevado para a avaliação do estado de saúde

dos animais, causados por actividades antropogénicas (Hinton 1994; Braunbeck, 1998; Bernet et al., 1999).

O fígado dos peixes da classe dos teleósteos, é um dos órgãos mais sensíveis para mostrar alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais derivadas da exposição a vários tipos de poluentes ambientais (Hinton 1994).

Nos animais controlo a morfologia estrutural dos hepatócitos encontrava-se normal.

Com concentrações crescentes de diazepam, os danos no fígado tornam-se mais pronunciados e visíveis, com o alargamento dos sinusóides e aparecimento de alguns núcleos picnóticos (0,02µg/l). As patologias detectadas neste estudo, são consistentes com as encontradas em outros trabalhos similares (Gupta e Rajbanshi, 1982; Wani e Latey, 1983; Raniand e Ramanurthi, 1989). Neste trabalho foram detectadas diferenças significativas nas médias dos diferentes grupos para o índice patológico do fígado, sendo que os animais expostos às três concentrações mais elevadas, apresentam um valor médio de IPF estatisticamente superior ao grupo controlo.

A degeneração mais frequente provocada por poluentes no fígado é aumento dos hepatócitos com o aparecimento de vacúolos, alterações nos sinusóides e aparecimento de núcleos picnóticos que são derivados de casos de intoxicação por poluentes (Jiraungkoorskulet al., 2003). O bloqueio dos sinusóides faz com que o fluxo sanguíneo da artéria hepática para a veia central ocorra com dificuldade. Estas patologias desenvolvidas vão de encontro aos reportados por Ptashynski et al. (2001), Arellano et al. (1999) e Gul et al. (2004). Estas alterações sugerem que houve uma actividade metabólica aumentada nos hepatócitos em resposta à presença de vários poluentes (Cooley et al., 2000; Ptashynskiet al., 2001 e Thophan et al., 2003). A presença de vacúolos deve ser provavelmente devido à acumulação de glicogénio nos hepatócios (Wester e Canton, 1986).

No presente estudo, foi possível fazer uma abordagem ainda pouco explorada dos efeitos do diazepam em espécimes de *G. holbrooki* ao nível enzimático e histológico, tema onde ainda existem poucos dados específicos. De facto, é uma regra geral a ausência de estudos relativos à realização de trabalhos experimentais que relacionem exposição de organismos a compostos de utilização farmacêutica no âmbito ecotoxicológico com uma abordagem baseada em biomarcadores enzimáticos. Tal facto torna difícil, ou mesmo impossível, estabelecer comparações com dados pré-existentes, em condições similares ou diferentes, com a mesma espécie de peixe ou inclusivamente com outros organismos. Apesar do diazepam, 1,4-benzodiazepina, ser a substância activa com efeitos ansiolíticos mais estudada (Halling-

Sørensen et al., 1998; Ternes, 1998, Ternes et al., 2001), poucos estudos ecotoxicológicos incidiram até hoje na tipificação dos seus efeitos em espécies não-alvo.

Estudos anteriores (Nunes et al 2005), observaram que o diazepam é um composto que exerce toxicidade letal em *G. holbrooki* e outros organismos aquáticos, tais como o crustáceo *Artemia parthenogenetica* a microalga *Tetraselmis chuii*, tendo-se obtido valores de LC50 para *G.holbrooki* de 12,7mg/l, e de 12,2mg/l para *A. Parthenogenetica*; a concentrações inibitória a 50% para a microalga cifrou-se em de 16,5mg/l. No entanto, estes dados referem-se a valores de concentrações letal e inibitória a 50%, que estão muito longe das concentrações às quais os organismos foram expostos no presente trabalho. As concentrações usadas neste trabalho foram escolhidas tendo em conta a concentração reportada por Ternes (2008) de 0,04µg/L, encontrada num efluente alemão. Sendo as concentrações adoptadas no presente trabalho todas subletais, é mais provável que os efeitos daqui decorrentes sejam mais subtis. De acordo com este princípio, o estudo conduzido por Pascoe et al., (2003) demonstrou que a exposição de indivíduos de *H. vulgaris* a concentrações de cerca de 10µg/l resultaram na inibição da habilidade de regenerar partes do corpo dissecadas. Apesar da inexistência de estudos que demonstrem efeitos ecotoxicológicos em organismos aquáticos decorrentes da exposição a resíduos de benzodiazepinas, não é de excluir que tais interações toxicológicas possam ocorrer. Os receptores benzodiazepínico foram encontrados numa grande variedade de espécies, incluindo os peixes ósseos (Nielsen et al., 1978). Vários estudos identificaram receptores benzodiazepínicos GABA-A em peixes e estes tem características semelhantes de ligação aos dos humanos e roedores (Anzelius et al., 1995a; Anzelius et al., 1995b; Carr et al., 1999), embora a nível funcional existam algumas diferenças em relação aos humanos (Betti et al., 2001). Existem evidências que os receptores GABA das benzodiazepinas são farmacologicamente menos activos nos peixes, pelo menos no que diz respeito no controlo da actividade anti-convulsivante (Corda et al., 1989).

Um efeito que não foi explorado no presente trabalho, e que se encontra relacionado em múltiplos estudos com a toxicidade do diazepam, reside na capacidade que este composto parece ter em induzir alterações na ploidia de células, e que eventualmente poderá igualmente ocorrer em organismos aquáticos expostos a este agente terapêutico. Em humanos, exposição a níveis subletais de diazepam deve ser uma preocupação, uma vez que parece induzir aneuploidia, inviabilidade da gravidez e cancro (Aardema et al.,1998). Em 2007, um estudo sobre contaminantes farmacêuticos e o seu potencial associado a mulheres grávidas e crianças reportou que há efeitos cumulativos aquando da ingestão de água contaminada com apenas

5% da concentração mínima usada clinicamente (tendo em referência a ingestão de 2 litros de água por dia, durante 36 semanas e uma concentração de 0,235mg/l) (Collier, 2007). Na opinião de Collier (2007) este facto não deve ser ignorado, uma vez que poderá ser uma evidência que o diazepam pode causar várias disfunções na gravidez quando usado nos estados mais tardios da gestação.

Muitos fármacos resistem à biodegradação nas ETARS e continuam na sua forma activa (Herberer, 2002; Velagaleti, 1997), e cerca de 90% dos resíduos dos fármacos são possivelmente lançados para os efluentes após o tratamento (Ternes, 1998). Após o tratamento, o efluente proveniente das ETARs é lançado directamente para o ambiente aquático, onde os fármacos que podem ter sido modificados durante o tratamento podem ser novamente convertidos para formas activas (Ternes, 1998).

As concentrações dos fármacos encontradas nas águas de superfície são valores geralmente bem abaixo dos valores que são conhecidos de poder causar toxicidade aguda em organismos aquáticos. No entanto, as exposições crónicas a um fármaco tem um maior potencial para numerosos efeitos nefastos subtis, como por exemplo alterações metabólicas ou reprodutivas em organismos que não são os alvos primários (Daughton e Ternes, 1999).

O confronto entre exposições agudas e crónicas para vários fármacos, revelou que os efeitos ecotoxicológicos crónicos não podem ser correlacionados com os efeitos agudos (Carlsson et al., 2006). Devido às propriedades bioactivas dos fármacos e da sua continua libertação para o ambiente, a avaliação do risco ecotoxicológico privilegia os estudos crónicos em relação aos agudos devido à sua persistência e bioacumulação que podem dar resultados mais precisos (Carlsson et al., 2006). Embora a informação fornecida pelos testes crónicos seja a mais indicada, uma vez que consegue dar acesso a dados mais variados, como por exemplo os efeitos na reprodução e nos mecanismos farmacológicos, são os que estão em falta para a maioria dos compostos farmacêuticos, onde se inclui o diazepam.

Este estudo mostrou que a nível da enzima GST nas brânquias houve um aumento da actividade enzimática, mas que apenas se mostrou significativo na concentração de 0,005µg/L.

A enzima GST desempenha um papel importante na destoxificação e na eliminação de compostos eletrofílicos. A sua estimulação envolve reacções de conjugação na presença da glutatona. Assim, animais aquáticos que estejam expostos a xenobióticos, neste caso o diazepam, utilizam mecanismos de destoxificação que são mediados pela glutatona na sua forma reduzida, catalisada pela enzima glutatona S-transferase. Esta enzima de

biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo na monitorização de poluentes de origem industrial (Fenet et al. 1998; Kantoniemi et al., 1996) e agrícola (Cho et al., 1999).

No fígado a variação da actividade da GST não parece estar relacionada com a presença de diazepam uma vez que não há diferenças significativas. O facto de não haver resultados significativos no fígado, ao contrário do que ocorre nas brânquias, pode dever-se ao facto do teste efectuado ter sido agudo, o que não proporcionou um tempo suficiente para exercer alterações e/ou as concentrações usadas também podiam não ser suficientemente elevadas para que a absorção e consequente distribuição desta substância até ao fígado fosse suficiente para causar alterações significativas na actividade da enzima em causa.

As brânquias mostram um aumento da actividade da enzima GST uma vez que são o primeiro local de contacto do xenobiótico com o indivíduo, sendo também o primeiro local onde ocorrem os mecanismos iniciais de destoxificação como referiu o estudo de McKim et al (1985) que as lâminas brânquiais são o local onde se dão as primeiras trocas gasosas e os primeiros locais de destoxificação, absorvem com eficiência químicos lipofílicos, como é o caso do diazepam.

A actividade da GST hepática não parece ser um biomarcador viável para a avaliação do risco ambiental colocado pelo diazepam e provavelmente pelas benzodiazepinas, uma vez que o aumento da sua actividade é apenas observada num número limitado de espécies de peixes (Oost et al., 2003).

Os resultados obtidos na actividade da enzima catalase no fígado mostram claramente que houve um aumento, tendo sido registadas alterações significativas nas concentrações usadas mais altas. A catalase é uma enzima cuja função é degradar o peróxido de hidrogénio, e este é resultante de situações de stress oxidativo, sendo este um composto tóxico é logo que possível transformado em metabolitos menos reactivos principalmente pela catalase (Nelson, 2005). A biotransformação dos xenobióticos é uma fonte importante da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROSs), que correspondem aos produtos da redução do oxigénio molecular; o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Stegeman et al., 1992). Essas espécies reactivas de oxigénio são agentes oxidantes extremamente potentes, capazes de reagir com macromoléculas celulares críticas, causando diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular. Para travar as ROSs existem enzimas-chave que fazem parte do sistema de defesa antioxidante: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (Lackner, 1998). A catalase está presente em todos os tecidos dos

vertebrados, com actividade particularmente alta nos eritrócitos e no fígado, em contraste, a actividade da enzima no cérebro é geralmente baixa (Hermes-Lima, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2005).

O aumento da actividade da enzima catalase significa que é provável o estabelecimento de uma situação de stress oxidativo que presumivelmente é devido ao aumento da concentração de diazepam testado.

VI. Conclusão

Uma vez que em Portugal, o diazepam é uma das benzodiazepinas mais populares (Osswald e Moura, 2006), e que a percentagem máxima de remoção por parte das ETARs de diazepam é de 93% (Van der Hoeven, 2004), é provável que cada vez mais a sua presença no meio aquático aumente, o que implica a contaminação ambiental e consequente interacção com a fauna local, como já foi reportado por Ternes (1998) na Alemanha uma concentração em efluentes até 0,04µg/l. Sendo assim é necessária a avaliação ambiental recorrendo a vários espécimes de forma a observar as consequências intrínsecas de cada espécie assim como a implicação possível entre espécies diferentes. Desta forma, e sendo a *G. holbrooki* uma espécie abundante, fácil de capturar e de manter em condições laboratoriais é um modelo adequado para executar testes como os descritos neste trabalho.

Ao observar os resultados obtidos nos testes enzimáticos, podemos concluir que das duas enzimas testadas, a catalase mostrou ser a única enzima demonstrativa da ocorrência de stress oxidativo em *G. holbrooki*. Pelo contrário, a GST, como referido por Oost et al. (2003) não parece ser um biomarcador viável para a avaliação do risco ambiental colocado pelo diazepam e provavelmente pelas benzodiazepinas, uma vez que o aumento da sua actividade é apenas observada num número limitado de espécies de peixes, o que foi concordante com os resultados do presente estudo. Em suma, apenas a catalase se mostrou responsiva em relação ao diazepam, mostrando a ocorrência de stress oxidativo, que pode desencadear danos celulares que a longo prazo podem implicar o funcionamento de determinados órgãos, acelerar o envelhecimento e em alguns casos desenvolver cancros, uma vez que os radicais livres produzidos podem combinar-se com o DNA celular, alterando o seu código genético e produzindo uma multiplicação celular desordenada.

A histologia, mostrou ser um bom biomarcador para ser usado na avaliação das alterações ao nível tecidular em peixes expostos ao diazepam (mesmo em concentrações sub-letais,

como as usadas no presente trabalho), uma vez que foram encontrados valores de índices patológicos significativamente diferentes nas brânquias e no fígado dos espécimes expostos às concentrações mais altas. As brânquias, o fígado são os órgãos mais usados como marcadores primários para a poluição aquática: as brânquias porque têm uma grande área de contacto com a água (e portanto com o potencial poluente (Wood and Soivio, 1991; Bernet et al., 1999) e o fígado por ter um importante papel no metabolismo e a subsequente excreção dos xenobióticos (Shephard, 1994).

Após a conclusão deste trabalho e análise dos resultados acho que muito há ainda para fazer ao nível da avaliação ambiental dos efeitos do diazepam, tanto em *G. holbrooki* como noutras espécies. Falando na espécie usada, a avaliação de outros biomarcadores deve ser considerada de forma a ter resultados mais abrangentes, como por exemplo; a avaliação de outras enzimas (ex: glutathione peroxidase, acetilcolinesterase), fenómenos de stress oxidativo (ex: peroxidação lipídica), parâmetros hematológicos, parâmetros endócrinos e reprodutivos, avaliação comportamental a vários níveis (natação, padrões de alimentação, reprodução). Outro dos pontos que acho importante é a avaliação dos efeitos em exposições crónicas de forma a poder tirar ilações sobre os efeitos a longo prazo.

VII. Bibliografia

- Aardema, M.J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L.M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J.M., Sarraf, A.M., Stringer, D.A., Taalman, R.D.F., (1998). *Aneuploidy: a report of an ECETOC task force*. Mutat. Res. 410, pp. 3–79.
- Alazemi, B.M.; Lewis, J.W.; Andrews, E.B. (1996). *Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study*. Environ. Technol., 17 (3), pp. 225–238.
- Anzelius M, Ekstrom P, Mohler H, Richards JG. (1995a) *Immunocytochemical localization of GABAA receptor beta 2/beta 3-subunits in the brain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L)*. J Chem. Neuroanatomy vol.8. pp.207–21.
- Anzelius M, Ekstrom P, Mohler H, Richards JG.(1995b) *Immunocytochemical localization of the GABAA/benzodiazepine receptor beta2/beta3 subunits in the optic tectum of the salmon*. J Recept. Signal Transduction Res vol.15. pp.413–25.
- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. (1999). *Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis**. Ecotoxicologic Environmental Safety vol.44: pp.62–72.
- Bayne B. L., Brown D. A., Burns K., Dixon D. R., Ivanovici A., Livingstone D. R., Lowe D. M., Moore M. N. (1985). *The effects of stress and pollution on marine animals*. Marine Pollution Bulletin, Vol.17, pp.519-520
- Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. (1999), *Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution*. J. Fish Diseases vol.22, pp.25–34.
- Betti L, Giannaccini G, Gori M, Bistocchi M, Lucacchini A. (2001). *[3H]Ro 15-1788 binding sites to brain membrane of the saltwater *Mugil cephalus**. Comp Biochem Physiol, Toxicology Pharmacology pp.128:291–7.
- Braunbeck, T., 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*., pp. 61–140.
- Briancoad. [em linha]. Disponível em <http://www.briancoad.com/species%20accounts/Poeciliidae.htm> [Consultado em 21/08/2010]

- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003a. *Aquatic ecotoxicology of fluoxetine*. Toxicology Vol. 142, pp.169–183.
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B., (2003). *Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms*. Chemosphere vol.52, pp.135–142.
- Bucheli, T.D., Fent, K., (1995). *Induction of cytochrome P450 as biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems*. Crit. Rev. Environmental Science Technology Vol.25, pp.201-268.
- Cabral J. A., Marques J. C., (1999). *Life history, population dynamics and production of eastern mosquitofish, Gambusia holbrooki (Pisces, Poeciliidae), in rice fields of the lower Mondego River Valley, western Portugal*. Acta Oecologica Vol.20, pp.607–620.
- Cardoso, E.L.; Chiarini-Garcia, H.; Ferreira, R.M.A.; Poli, C.R. (1996) *Morphological changes in the gills of Lophiosilurus alexandri exposed to un-ionized ammonia*. J. Fish Biology, vol.49, pp.778–787.
- Carlsson C, Johansson A, Alvan B, Bergman K, Kuhler T. (2006). *Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients*. Science Total Environmental vol.364: pp.67–87.
- Carr R.L., Couch T.A., Liu J., Coats J.R., Chambers J.E. (1999). *The interaction of chlorinated alicyclic insecticides with brain GABA(A) receptors in channel catfish (Ictalurus punctatus)*. J Toxicology Environmental Health Part A vol.56: pp.543–53.
- Cengiz, E., Unlu, E., (2006). *Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, Gambusia affinis: A microscopic study*. Environmental Toxicology and Pharmacology. vol.21, pp. 246–253.
- Cengiz, E.I.; Unlu, E. (2002) *Histopathological changes in the gills of mosquitofish, Gambusia affinis exposed to endosulfan*. B. Environ. Contaminants Toxicology. Vol.68, pp.290–296.
- Charney, D.S., Mihic, S.J., and Harris, R.A. (2001). *Hypnotics and Sedatives*. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edition.

Edited by Hardman, J.G., Limbird, L.E. and Goodman Gilman A. Chap. 17, pp. 399–428.

- Cho J.R.; Kim Y. J.; Hong K. J.; Yoo J. K.; Lee J.O.; Ahn Y. J.; (1999) *Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, Aphis citricolat*. Journal of Asian Pacific Entomology, v. 2, p.113–119.
- Cleuvers, M., (2003). *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology Lett. Vol.142, pp.185–194.
- Collier, A.C., (2007). *Pharmaceutical contaminants in potable water: potential concerns for pregnant women and children*. EcoHealth vol.4, pp.164–171.
- Cooley HA, Evans RE, Klaverkamp JF. (2000). *Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (Coregonus clupeaform)*. Aquatic Toxicology vol.48:pp.495–515.
- Corda MG, Longoni B, Cau A, Paci S, Salvadori S, Laudani U, (1989). *Distribution and pharmacological properties of the GABAA/ benzodiazepine/ chloride ionophore receptor complex in the brain of the fish Anguilla anguilla*. J Neurochemical vol.52: pp.1025–34.
- Costa, P.M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., Del- Valls, T.A., Costa, M.H., (2008). *Genotoxic damage in Solea senegalensis exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants*. Mutat. Res. Vol.654, pp.29–37.
- Dalzell, D.J.B., Macfarlane, N.A.A., (1999). *The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: A comparison of two grades of iron sulphate*. J. Fish Biology vol.55, pp.301–315.
- Daughton CG, Ternes T. (1999). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?*. Environ Health Perspect vol.107: pp.907–38.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., (1999). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?* Environ. Health Perspect. Vol.107, pp.907–938.
- DelValls, T.A., Blasco, J., Sarasquete, M.C., Forja, J.M., Gomez-Parra, A., (1998). *Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish Sparus aurata*. Ecotoxicologic Environmental Safety. Vol.41, pp.157–167.

- Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P. (2000). *Persuasive evidence that quinonereductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen*. Free Radical Biology and Medicine. Vol.29, pp.231.
- Dröge, W. (2002). *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Physiol. Rev. vol.82, pp.47-95.
- Faganello FR, Mattioli R. (2007). *Anxiolytic-like effect of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation*. Prog Neuro-Psychopharmacol Biology Psychiatry; vol.31: pp.269–74.
- Fanta, E., Rios, F., Vianna, A.C., Freiburger, S., (2001). *Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food*. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.54, pp. 119–130
- Farré, M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D., (2008). *Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in aquatic environment*. Trends in Analytical Chemistry. Vol.11, pp.993.
- Fenet, H.; Casellas, C.; Bontoux, J. (1998) *Laboratory and field caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout*. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.40, pp.137-143.
- Fent K., Weston A., Caminada D., (2006). *Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. Aquatic Toxicology*. Vol.76, pp.112-159.
- Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Rocha E, Salgado MA (2008) *Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in Liza saliens*. Environmental Monit. Assess vol.145: pp.315–322.
- Fong, P.P., (1998). *Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors*. Biology Bulletin. Vol.194, pp.143–149.
- Gill, T.S.; Pant, J.C.; Pant, J. (1988). *Gill, liver and kidney lesions associated with experimental exposures to carbaryl and dimethoate in the fish (Puntius conchoniuss Ham)*. B. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 41 (1), pp.71–78.
- Gul S., Belge-Kurutas, E, Yildiz E, Sahan A, Doran F. (2004). *Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey*. Environ Int. vol.30: pp.605–609.

- Gupta, A.K., Rajbanshi, V.K., (1982). *Cytopathological studies resulting in cadmium bioassay with Heteropneustes fossilis (Bloch)*. Acta Hydrochim. Hydrobiol. Vol.10 (4), pp.345–351.
- Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., (2009). *Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: Potamopyrgus antipodarum and Valvata piscinalis*. Environ. Pollut. Vol.157, pp.423–429.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., (1998). *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review*. Chemosphere vol.36, pp.357–393.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (2005). *Free radicals in biology and medicine*. 3ª edição. Oxford, Oxford University Press, pp.936.
- Heath, A.G. (1987) *Respiratory and cardiovascular responses*. In *The Water Pollution and Fish Physiology*; CRC Press: Florida, pp.31–50.
- Hensley, K. and Floyd, R. A. (2002). *Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in Aging: A Look Back, A Look Ahead*. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol.397, pp.377-383.
- Herberer T. (2002). *Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicology Letter; vol.131: pp.5–17.
- Hermes-Lima, M. (2004). *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. STOREY, K.B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368.
- Hinton D.E., Lauren D.J. (1990) *Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fish – potential biomarkers of exposure*. In: McCarthy JF, Shugart ELR (eds) *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis, Boca Raton, pp 17–57
- Hinton, D.E., (1994). *Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fish: relationship to experimentally-induced neoplastic responses*. Fish Ecotoxicology. Birkhauser Verlag, pp. 141– 164.

- Hinton, D.E., (1994). *Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes*. Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers CRC press, pp. 207-240.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihira, M.S., (1992). *Histopathologic biomarkers*. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, pp. 155-210.
- Jagoe, C.H., Faivre, A., Newman, M.C., (1996). *Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (Gambusia holbrooki) after exposure to mercury (II)*. Aquatic Toxicology vol.34, pp.163–183.
- Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S., Pokethitiyook P. (2003). *Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Environmental Toxicology vol.19, pp.260 - 267.
- Johnson L.L., Stehr C.M., Olson O.P., Myers M.S., Pierce S.M., Wigren C.A., McCain B.B. & Varanasi U. (1993) *Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (Pleuronectes americanus) from the Northeast Coast of the United States*. Environmental Science and Technology. Vol.27, pp.2759-2771.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N., (2002). *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. Water Res. Vol.36, pp.5013–5022.
- Kantoniemi, A.; Kirsi, V.; Oikari, A. (1996). *The capacity of liver microsomes to form benzo(a)pyrene-diolepoxide DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents*. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.35, pp.136-141.
- Kimerle, R.A.; Mehrle J.R.; Bergman, H.L. (eds.) *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton, Lewis Publishers, pp. 235-335.
- Koehler, A., (2004). *The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (Platichthys flesus (L.)) at the German Wadden Sea coast*. Aquatic Toxicology. Vol.70, pp.257–276.
- Lackner, R. (1998). *“Oxidative stress” in fish by environmental pollutants*. Fish ecotoxicology. pp. 203-224.

- Laranjeira C., *Pateira de Fermentelos: Paisagem a proteger*. Publicações Câmara Municipal de Águeda. 1ª Edição, 2008.
- Laurent, P., Perry, S.F., (1991). *Environmental effects on fish gill morphology*. *Physiol. Zool.* Vol.64 (1), pp.4–25.
- Lesser, M. P. (2006). *Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology*. *Annual Review of Physiology*. Vol.68, pp.253-278.
- Mallat, J., (1985). *Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review*. *Can. J. Fish. Aquatic Sciences*. Vol.42, pp.630–648.
- McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., (1991). *Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability*. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., (1990). *Biological markers of environmental contamination*. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, pp.3-16.
- McKim, J., Schmieder, P., Veith, G., (1985). *Absorption dynamics of organic chemical transport across trout gills as related to octanol–water partition coefficient*. *Toxicology Appl. Pharmacology*. Vol.77, pp.1–10.
- Miao, X.-S., Koenig, B.G., Metcalfe, C.D., (2002). *Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *J. Chromatography*. Vol.952, pp.139–147.
- Moon TW, Walsh PJ, Mommsen TP (1985) *Fish hepatocytes: a model metabolic system*. *Can J Fish Aquatic Sciences*. Vol.42: pp.1772–1782.
- Nelson, David L., COX, M., (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª edição, W. H. Freeman.
- Nielsen M, Braestrup C, Squires RF. (1978). *Evidence for a late evolutionary appearance of brain-specific benzodiazepine receptors: an investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species*. *Brain Res*. Vol.141: pp.342–6.
- Nunes B., Gaio A., Carvalho F., Guilhermino L., (2008). *Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol.71 pp.341-354.

- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino L., (2005). *Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species Gambusia Holbrooki, Artemia parthenogenetica and tetraselmis chuii*. Ecotoxicology and Environmental safety. Vol.61, pp.413-419.
- OECD, 1993. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C., (2002). *Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the Arctic charr (Salvelinus alpinus)*. Environenta. Res. Vol.90, pp.217–225.
- Oost R., Beyer J., Vermeulen N., (2003). *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol.13, pp.57-149.
- Oswald W., Moura D. Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas, 4ª Edição, Porto Editora, 2001.
- Pascoe D, Karntanut W, Muller CT. (2003). *Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian Hydra vulgaris*. Chemosphere vol.51, pp.521.
- Peakall, D.W., (1994). *Biomarkers: the way forward in environmental assessment*. Toxicol. Ecotoxicol. News vol.1, pp.55-60.
- Ptahynski MD, Pedlar RM, Evans RE, Wautier KG, Baron CL, Klaverkamp JF. (2001). *Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake whitefish (Coregonus clupeaformis) and lake trout (Salvelinus namaycush)*. Comp Biochemichal Physics Part C. vol.130, pp.145–162.
- Raniand, A.U., Ramanurthi, R., (1989). *Histopathological alterations in the liver of freshwater teleost Tilapia mossambica in response to cadmium toxicity*. Ecotoxicol. Environmental Safety. Vol.7, pp.221–226.
- Riba, I., Casado-Martínez, M.C., Blasco, J., DelValls, T.A., (2004). *Bioavailability of heavy metals bound to sediments affected by amining spill using Solea senegalensis and Scrobicularia plana*. Mar. Environ. Res. Vol.58, pp.395–399.
- Richmonds, C.; Dutta, H.M. (1989). *Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill Lepomis macrochirus*. B. Environ. Contam. Toxicol. Vol.43 (1), pp.123–130.

- Santos L., Araújo A.N., Fachinia A., Penab A., Delerue-Matosc C., Montenegro A., (2009). *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. Journal of Hazardous Materials. Vol.175, pp.45–95.
- Simpson, M.G., (1992). *Histopathological changes in the liver of dab (Limanda limanda) from a contamination gradient in the North Sea*. Mar. Environ. Res. Vol.34, pp. 39–43.
- Sinhaseni, P.; Tesprateep, T. (1987). *Histopathological effects of paraquat and gill function of Puntius gonionotus, Bleeker*. B. Environ. Contam. Toxicology, vol.38 (2), pp.308– 312.
- Stegeman, J.J; Brouwer, M.; Di Giulio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. (1992). *Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect*. Environ Pollution. Vol.121, pp.307–320.
- Ternes TA. (1998). *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Res ; vol.32: pp.3245–60.
- Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., (2001). *Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. J. Chromatography. Vol.938, pp.175–185.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000). *Reactive oxygen species in cell signaling*. Physiology Lung Cell Mol Physiology. Vol.279, pp.1005-1028.
- The Lundbeck Institute. [em linha]. Disponível em http://www.cnsforum.com/imagebank/item/drug_benzo/default.aspx [Consultado em 21/08/2010]
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S. (2003). *Histopathological alterations of white seabass, Later calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure*. Environ Pollution. Vol.121, pp.307–320.
- Triebkorn R, Koehler H, Honnen W, Schramm M, Adams S (1997). *Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field?* Aquatic Ecosystem Stress Recovery. Vol.6, pp.57–73.
- Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M., (1995). *Risk Assessment of Chemicals: an Introduction*. Kluwer Academic Publishers.

- Varanasi U., Stein J.E., Nishimoto M.(1989). *Biotransformation and disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish*. CRC, pp. 94–149.
- Velagaleti R. (1997). *Behavior of pharmaceutical drugs (human and animal health) in the environment*. Drug Inf. Vol.31, pp.715–22.
- Wani, G.P., Latey, A.N., (1983). *Toxic effects of cadmium on the liver of freshwater teleost Gata mullya*. Curr. Sci. vol.52, pp.1034–1035.
- Wester, P.W., Canton, J.H., (1986). *Histopathological study of Oryzias latipex (medaka) after long-term β -hexachlorocyclohexane exposure*. Aquatic Toxicology vol.9, pp.21–45.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.
- Wood, C.M., Soivio, A., (1991). *Environmental effects on gill function: an introduction*. Physiologic Zoology. Vol.64 (1), pp.1–3.
- Z. Bencan, Damiyon S., Edward D. Levin I. (2009). *Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety / Pharmacology*. Biochemistry and Behavior. Vol.94, pp.75–80.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. Lancet 355, 1789–1790.

VIII. Anexos

Anexo I. Ferramenta de avaliação histopatológica para os dois órgãos dos peixes estudados (adaptado de Bernet et al., 1999).

Reaction pattern	Functional unit of the tissue	Alteration	Importance factor	Score value	Index
Gills					
Circulatory disturbances		Haemorrhage/hyperaemia/aneurysm	W _{GC1} = 1	a _{GC1}	I _{GC}
		Intercellular oedema	W _{GC2} = 1	a _{GC2}	
Regressive changes	Epithelium	Architectural and structural alterations	W _{GR1} = 1	a _{GR1}	I _{GR}
		Plasma alterations	W _{GR2} = 1	a _{GR2}	
		Deposits	W _{GR3} = 1	a _{GR3}	
		Nuclear alterations	W _{GR4} = 2	a _{GR4}	
		Atrophy	W _{GR5} = 2	a _{GR5}	
		Necrosis	W _{GR6} = 3	a _{GR6}	
		<i>Rupture of the pillar cells</i>			
	Supporting tissue	Architectural and structural alterations	W _{GR7} = 1	a _{GR7}	
		Plasma alterations	W _{GR8} = 1	a _{GR8}	
		Deposits	W _{GR9} = 1	a _{GR9}	
		Nuclear alterations	W _{GR10} = 2	a _{GR10}	
		Atrophy	W _{GR11} = 2	a _{GR11}	
		Necrosis	W _{GR12} = 3	a _{GR12}	
Progressive changes	Epithelium	Hypertrophy	W _{GP1} = 1	a _{GP1}	I _{GP}
		Hyperplasia	W _{GP2} = 2	a _{GP2}	
	Supporting tissue	Hypertrophy	W _{GP3} = 1	a _{GP3}	
		Hyperplasia	W _{GP4} = 2	a _{GP4}	
Inflammation		Exudate	W _{GI1} = 1	a _{GI1}	I _{GI}
		Activation of RES	W _{GI2} = 1	a _{GI2}	
		Infiltration	W _{GI3} = 2	a _{GI3}	
Tumour		Benign tumour	W _{GT1} = 2	a _{GT1}	I _{GT}
		Malignant tumour	W _{GT2} = 3	a _{GT2}	
Regressive changes	Liver tissue	Intercellular oedema	W _{LC2} = 1	a _{LC2}	I _{LR}
		Architectural and structural alterations	W _{LR1} = 1	a _{LR1}	
		Plasma alterations	W _{LR2} = 1	a _{LR2}	
		Deposits	W _{LR3} = 1	a _{LR3}	
		Nuclear alterations	W _{LR4} = 2	a _{LR4}	
		Atrophy	W _{LR5} = 2	a _{LR5}	
		Necrosis	W _{LR6} = 3	a _{LR6}	
		<i>Vacuolar degeneration</i>			
	Interstitial tissue	Architectural and structural alterations	W _{LR7} = 1	a _{LR7}	
		Plasma alterations	W _{LR8} = 1	a _{LR8}	
		Deposits	W _{LR9} = 1	a _{LR9}	
		Nuclear alterations	W _{LR10} = 2	a _{LR10}	
		Atrophy	W _{LR11} = 2	a _{LR11}	
		Necrosis	W _{LR12} = 3	a _{LR12}	
	Bile duct	Architectural and structural alterations	W _{LR13} = 1	a _{LR13}	
		Plasma alterations	W _{LR14} = 1	a _{LR14}	
		Deposits	W _{LR15} = 1	a _{LR15}	
		Nuclear alterations	W _{LR16} = 2	a _{LR16}	
		Atrophy	W _{LR17} = 2	a _{LR17}	
		Necrosis	W _{LR18} = 3	a _{LR18}	
Progressive changes	Liver tissue	Hypertrophy	W _{LP1} = 1	a _{LP1}	I _{LP}
		Hyperplasia	W _{LP2} = 2	a _{LP2}	
	Interstitial tissue	Hypertrophy	W _{LP3} = 1	a _{LP3}	
		Hyperplasia	W _{LP4} = 2	a _{LP4}	
	Bile duct	Hypertrophy	W _{LP5} = 1	a _{LP5}	
		Hyperplasia	W _{LP6} = 2	a _{LP6}	
		<i>Wall proliferation of bile ducts or ductules</i>			
Inflammation		Exudate	W _{LI1} = 1	a _{LI1}	I _{LI}
		Activation of RES	W _{LI2} = 1	a _{LI2}	
		Infiltration	W _{LI3} = 2	a _{LI3}	
Tumour		Benign tumour	W _{LT1} = 2	a _{LT1}	I _{LT}
		Malignant tumour	W _{LT2} = 3	a _{LT2}	
					I _L