

Rita Manuel Viana Araújo Guimarães Gomes

Efeitos da tetraciclina em *Gambusia holbrooki*: enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2013

Rita Manuel Viana Araújo Guimarães Gomes

Efeitos da tetraciclina em *Gambusia holbrooki*: enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2013

Efeitos da tetraciclina em *Gambusia holbrooki*: enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas

Discente:

Rita Manuel Viana Araújo Guimarães Gomes

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia

Co-Orientador:

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

O interesse crescente dos estudos ecotoxicológicos nas várias classes farmacoterapêuticas tem sido o reflexo da frequente detecção destes compostos nos ecossistemas aquáticos. Esta exposição pode resultar em alterações adaptativas dos indivíduos expostos, como modificações a nível tecidular ou ativação de mecanismos antioxidantes, podendo estas ser monitorizadas de modo a determinar o impacto destes compostos nos organismos e respetivos ecossistemas. Dentro destes compostos destacam-se os antibióticos como sendo um grupo largamente utilizado na medicina humana e veterinária, resultando na sua frequente detecção nos compartimentos aquático. A tetraciclina é o antibiótico com a segunda maior taxa de detecção a nível ambiental, sendo utilizado largamente para o tratamento de patologias em humanos e animais. Na medicina veterinária, o uso dos antibióticos é ainda alargado ao tratamento profilático de infeções e promotor de crescimento. Com o interesse de determinar os potenciais efeitos ecotoxicológicos da tetraciclina em peixes, efetuou-se uma exposição aguda (96 h) de *Gambusia holbrooki* a concentrações crescentes deste composto (5, 50 e 500 ng/l) e pesquisou-se eventuais modificações tecidulares das brânquias e do fígado, bem como alterações da atividade das enzimas antioxidantes e a existência de danos lipoperoxidativos. O estudo da atividade enzimática permitiu averiguar quanto à presença de uma resposta de *stress* oxidativo (atividades das enzimas glutathione-S-transferases no fígado e nas brânquias, e a catalase no fígado), e neurotoxicidade (atividade da acetilcolinesterase no tecido nervoso). A quantificação de TBARS no músculo permitiu determinar a ocorrência de danos lipoperoxidativos. Os resultados obtidos sugerem uma relação causa-efeito entre a concentração de tetraciclina usada e as alterações histológicas nas brânquias e a atividade enzimática alterada, nomeadamente nas enzimas catalase no fígado e glutathione-S-transferases nas brânquias, sugerindo assim que este composto tem uma atividade pro-oxidante. Assim, nas brânquias as células poderão já ter entrado em *stress* oxidativo, o que levou a alterações histopatológicas detetáveis. No entanto, ao nível do fígado, e nas concentrações utilizadas no presente estudo, não foram observados danos histológicos significativos.

Palavras-chave: exposição aguda, antibiótico, peixe dulçaquícola, enzimas, histologia

Abstract

The increasing number of ecotoxicological studies performed with several drugs is a natural consequence of the increasingly frequent detection of these compounds in the aquatic ecosystems. This exposure can result in adaptive changes of individuals, such as tissue alterations or activation of antioxidant mechanisms, which can be monitored to determine the impact of these compounds on the aquatic organisms and ecosystems. Antibiotics stand out as a group widely used in human and veterinary clinic, resulting in its detection in the aquatic environment. Tetracycline is the antibiotic with the second highest level of detection in the environment. It is widely used for human and veterinary treatment of infections, and as a prophylactic treatment of infections and growth promoter on animals. To determine the potential ecotoxicological effects of tetracycline on fish, *Gambusia holbrooki* individuals were exposed during 96 h to increasing concentrations of this compound (5, 50 and 500 ng/l) and histological alterations in gills and liver, changes in antioxidant enzyme activity and lipoperoxidative damage were recorded. The enzymatic study allowed assessing the presence of an oxidative stress response (glutathione S-transferases in the liver and gills, and catalase in the liver) and neurotoxicity (head acetylcholinesterase). The quantification of TBARS in muscle also allowed the assessment of lipoperoxidative damage. The results indicate a cause-effect relationship between the concentration of tetracycline used and the detected histological and enzymatic alterations in the liver and gills, suggesting that this compound has a pro-oxidative activity.

Key-words: acute exposure, antibiotic, freshwater fish, enzymes and histology

Agradecimentos

Para a realização deste projeto que conclui o meu percurso académico, tive o apoio e carinho de algumas pessoas a quem gostaria de deixar umas palavras de agradecimento.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Alberto Correia pela sua orientação científica, acolhimento no CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental), disponibilizando o espaço e material necessários para execução de parte deste projeto, e pela sua disponibilidade, simpatia e boa disposição.

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes pela sua disponibilidade, acompanhamento, dedicação, bom humor, rigor e por toda a transmissão dos seus conhecimentos, ajudando tanto na realização prática como teórica deste trabalho. Agradeço igualmente o seu acolhimento no CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), disponibilizando todo o espaço e material necessário.

À Prof^ª. Doutora Sara Antunes pela simpatia, amabilidade, acompanhamento e disponibilidade na realização do trabalho prático, bem como a sua hospitalidade no CESAM.

Aos meus pais pelo apoio que me prestaram ao longo de todo o percurso académico.

E, ao João por ser o meu companheiro desta longa viagem académica, acompanhando-me sempre, com todo o seu carinho, paciência e apoio incondicional.

Um sincero obrigado a todos que fizeram que isto se tornasse possível.

Índice

1. Introdução	13
1.1. Enquadramento geral	13
1.2. Antibióticos no meio aquático	15
1.3. Tetraciclina	16
2. Brânquias e Fígado	17
3. Biomarcadores	19
3.1. Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo	22
3.1.1. Catalase.....	23
3.1.2. Glutationa-S-transferases.....	24
3.1.3. Peroxidação lipídica	24
3.2. Biomarcadores histopatológicos	26
3.3. Biomarcadores de neurotoxicidade.....	26
4. Ensaio de toxicidade usando como organismo-teste o peixe <i>Gambusia holbrooki</i> 27	
5. Objetivos	30
6. Material e Métodos	30
6.1. Caracterização do local de captura	30
6.2. Captura e acondicionamento dos peixes	31
6.3. Exposição à tetraciclina	31
6.4. Ensaio enzimáticos	32
6.4.1. Determinação da atividade da enzima catalase	32
6.4.2. Determinação da atividade das isoenzimas GSTs	33
6.4.3. Determinação da enzima AChE	33
6.4.4. Determinação da extensão de peroxidação lipídica.....	33
6.4.5. Quantificação da proteína total.....	34
6.5. Técnica histológica	34

6.5.1.	Procedimento experimental	34
6.5.2.	Análise qualitativa e semi-quantitativa.....	35
6.5.3.	Análise quantitativa das brânquias	36
6.6.	Análise estatística	37
7.	Resultados	37
7.1.	Biomarcadores enzimáticos	37
7.1.1.	Quantificação de TBARS	38
7.2.	Histopatologia	39
7.2.1.	Qualitativa e semi-quantitativa brânquias	39
7.2.2.	Análise quantitativa das brânquias	42
7.2.3.	Qualitativa e semi-quantitativa fígado.....	43
8.	Discussão	46
9.	Conclusão	51
10.	Bibliografia	53

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química da tetraciclina na forma de sal de cloreto, clorotetraciclina. (Adaptado de Pickens e Tang, 2009).

.....17

Figura 2. Corte transversal de brânquia de *Pimephales promelas* (barra = 16.7 µm; técnica de H&E): (1) Lamela primária; (2) Lamela secundária; (3) Células epiteliais; (4) Células mucosas; (5) Células Pilar; (6) Lacuna (lúmen capilar); (7) Eritrócitos dentro de lúmen capilar; (8) Células de cloreto; (9) Célula bastonete; (10) Células basais indiferenciadas (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).

.....18

Figura 3. Corte transversal de fígado de *Pimephales promelas* (barra = 84.8 µm; técnica de H&E): (1) Cápsula do fígado; (2) Hepatócitos; (3) Sinusóides com eritrócitos no seu interior; (4) Veia central; (5) Duto biliar. (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).

.....19

Figura 4. Exemplar de *Gambusia holbrooki*: fêmea (maior) e macho (menor) (Adaptado de *Global Invasive Species Database*, 2010).

.....29

Figura 5. Exemplificação das medições efetuadas na lamela branquial em *G. holbrooki* após exposição aguda (96 h) a concentrações crescentes de tetraciclina em condições controladas): (SLL) Comprimento da lamela secundária; (SLW) Espessura da lamela secundária; (ID) Distância interlamelar; (BET) Espessura do epitélio basal. Coloração H&E. Magnificação 200X.

.....36

Figura 6. Valores de atividade enzimática no fígado, brânquias e cabeça de *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina (média e erro padrão): **A)** CAT no fígado; **B)** GSTs no fígado; **C)** GSTs nas brânquias; **D)** AChE na cabeça. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco(*)).

.....38

Figura 7. Valores de concentração de TBARS (média e erro padrão) no fígado de *G. holbrooki* referente a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controle ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

.....39

Figura 8. Aparência normal da lamela branquial de *G. holbrooki*, de um indivíduo pertencente ao grupo controle. Técnica de H&E. Magnificação de 200X.

.....40

Figura 9. Exemplificações de achados de alterações histopatológicas (setas) na lamela branquial de *G. holbrooki* após exposição a concentrações crescentes de tetraciclina durante 96 h. (A) Hipertrofia da lamela secundária; (B) Levantamento epitelial da lamela secundária; (C) Aneurisma; (D) Fusão das lamelas secundária; (E) Hipertrofia da lamela primária; (F) Necrose. Técnica de H&E. Magnificação de 200X.

.....41

Figura 10. Valores do índice patológico (IP) das brânquias (médio e erro padrão) em *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controle ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

.....42

Figura 11. Determinações quantitativas das estruturas das brânquias de *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina (média e erro padrão): **A**) BET (Espessura do Epitélio Basal); **B**) ID (Distância Interlamelar); **C**) SLL (Comprimento da Lamela Secundária); **D**) SLW (Espessura da Lamela Secundária); **E**) PAGE. (OneWay Anova; $P > 0,05$).

.....43

Figura 12. Aparência normal do tecido hepático de *G. holbrooki*, num indivíduo do grupo controlo, após exposição a concentrações crescentes de tetraciclina durante 96 h. Técnica de H&E. Magnificação de 400X.

.....44

Figura 13. Exemplos de alterações histopatológicas (setas) no tecido hepático de *G. holbrooki* após exposição a concentrações crescentes de tetraciclina durante 96 horas em condições controladas. (A) Alargamento dos sinusóides; (B) Hemorragia; (C) Inflamação; (D) Vacuolização generalizada. Técnica de H&E. Magnificação de 400 X.

.....45

Figura 14. Valores do índice patológico (IP) hepático (média e erro padrão) em *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina. ($P>0,05$).

.....45

1. Introdução

1.1. Enquadramento geral

Diariamente centenas de toneladas de uma enorme multiplicidade de agentes químicos são descarregadas no meio ambiente aquático, em parte devido ao uso humano e agrícola, bem como devido a descargas de efluentes industriais e hospitalares. Estes compostos podem produzir um impacto negativo, tanto para o ecossistema aquático, como para a saúde humana (Deblonde *et al.*, 2011).

Dentro destes poluentes, têm vindo a destacar-se os designados contaminantes emergentes, ou seja, substâncias novas ou não reguladas, que resultam frequentemente da utilização pessoal, e cujo lançamento no meio poderá ser futuramente regulado. Incluem-se nestes compostos os surfactantes, produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais, dermocosméticos, drogas ilegais, entre muitos outros (Verlicchi *et al.*, 2010; Deblonde *et al.*, 2011). Nesse sentido, torna-se necessário promover pesquisas científicas que visem caracterizar os seus potenciais efeitos a nível ecológico e na saúde humana, bem como potenciar a recolha de dados relativos à monitorização da sua ocorrência no meio ambiente. O principal problema relacionado com estes contaminantes emergentes é a ausência de informação sustentada relativamente à avaliação de risco e dados ecotoxicológicos rigorosos acerca dos seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente (com particular incidência no compartimento aquático), a médio e longo prazo. Adicionalmente, torna-se necessário considerar que a maioria destes compostos, para produzirem um impacto negativo, não necessitam de estar numa elevada concentração no meio ambiente, uma vez que são continuamente introduzidos por diversas vias no ambiente, levando a uma exposição crónica dos seres vivos (Barceló, 2003; Deblonde *et al.*, 2011).

Desde há muito tempo que a presença de produtos farmacêuticos no meio ambiente tem sido alvo de investigação, mas somente a partir de meados dos anos 90 é que esta pesquisa teve os seus avanços mais significativos, essencialmente devido ao desenvolvimento de novas técnicas de deteção analítica. O aparecimento destes novos métodos mais precisos, mais exatos e com limites de deteção mais baixos, na ordem dos ng/l, possibilitou quantificar um maior leque de novas substâncias farmacológicas presentes no meio ambiente, levando os investigadores a considerarem a sua presença na água como algo assinalável e comum (Pfluger e Dietrich, 2001; Kümmerer, 2003;

Zuccato *et al.*, 2006). Vários estudos têm demonstrado a presença de elevados níveis de contaminação por produtos farmacêuticos em influentes (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2007) e efluentes (Koutsouba *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Verenitch *et al.*, 2006) de estações de tratamento de águas residuais (ETARs), águas de superfícies tais como rios, lagos, estuários (Calamari *et al.*, 2003; Bendz *et al.*, 2005; Moldovan, 2006), águas subterrâneas (Sacher *et al.*, 2001; Batt *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2008), oceanos (Weigel *et al.*, 2002) e inclusivamente água potável (Potera, 2000; Loos *et al.*, 2007). Além da contaminação por parte das águas residuais, o solo também pode ser uma importante fonte da presença de substâncias medicamentosas. A poluição dos solos ocorre essencialmente pela aplicação direta de estrume contaminado como fertilizante e corretivo agrícola, que por via de processos como a lixiviação leva à posterior contaminação dos aquíferos (Hammscher *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, tem havido crescentes esforços para a criação de processos mais eficazes de eliminação de compostos nas ETARs, que não se restrinjam à eliminação da contaminação microbiana e nutrientes. No entanto, a eliminação de compostos sintéticos, como os medicamentos, não foi um objetivo plenamente alcançado (Ternes e Wilken, 1999). As ETARs convencionais não foram concebidas para remover eficazmente estes compostos, sendo assim encontrados nos efluentes tratados e nas águas de superfície (Seifrtová *et al.*, 2009).

A presença de produtos farmacêuticos na água e a potencial ocorrência de efeitos deletérios nos organismos aquáticos e na saúde humana é hoje um assunto consensual no seio da comunidade científica. Os efeitos, muitas vezes negligenciados, decorrentes de uma exposição continuada aos produtos farmacêuticos a níveis sub-terapêuticos durante o ciclo de vida dos organismos aquáticos tem vindo a ser reportados (Kidd *et al.*, 2007; Péry *et al.*, 2008). Estes efeitos deletérios vão-se acumulando lentamente, podendo originar um efeito irreversível, o qual somente é verificado muitas gerações depois, quando se torna evidente, podendo afetar os organismos aquáticos a nível populacional (Daughton e Ternes, 1999).

Os fármacos são desenhados de forma a exercerem uma atividade biológica específica, ou seja, são moléculas capazes de penetrar as barreiras fisiológicas, critério que deve ser levado em consideração quando se avalia o seu impacto ecotoxicológico. Na sua

maioria são moléculas resistentes à biotransformação, mantendo a integridade da sua estrutura química o tempo suficiente para exercer o seu efeito terapêutico. Tais características, juntamente com o facto de serem continuamente introduzidos no ambiente, pode conduzir à sua permanência ambiental por longos períodos de tempo (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2002). Para o meio ambiente estas características são preocupantes, uma vez que os fármacos têm a capacidade de atravessar membranas biológicas nos organismos não alvo expostos por via ambiental, e desta forma exercerem atividade farmacológica (Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002). Outra característica importante dos fármacos é a sua lipofilia, um requisito básico para possuir boa absorção através das membranas biológicas (Clemente, 2011), mas que pode levar à sua persistência no meio aquático. Um outro aspeto a ter em consideração é o facto de poder existir uma enorme variedade de metabolitos formados e a ocorrência de possíveis interações toxicológicas como efeitos sinérgicos, antagonismo e adição (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Cleuvers, 2003).

1.2. Antibióticos no meio aquático

Os antibióticos são usados em larga escala na medicina humana e veterinária, bem como na agricultura, pecuária e aquacultura, como promotores de crescimento, em medidas de profilaxia e no tratamento de infeções microbianas (Van den Boggard e Stobberingh, 1999; Kümmerer e Henninger, 2003; Cabello, 2006). O consumo de antibióticos no mundo foi recentemente estimado como estando entre 100 e 200 mil toneladas por ano (Kümmerer, 2003). A maioria destes compostos não é metabolizada completamente no organismo, sendo libertados resíduos pelas fezes e urina, chegando às ETARs onde não são, em regra, eliminados, contaminando desta forma todo o compartimento aquático (Sacher *et al.*, 2001; Zuccato *et al.*, 2002; Castiglioni *et al.*, 2005). As ETARs são a principal fonte para o aparecimento de antibióticos de uso humano e veterinário na água. Contudo os antibióticos administrados aos animais também podem chegar ao ambiente aquático devido ao estrume desses animais medicados ser vulgarmente usado como fertilizante do solo em práticas agrícolas (Hirsch *et al.*, 1999; Kümmerer, 2009). Já os antibióticos usados em aquacultura dissolvem-se diretamente na água e surgem rapidamente no meio aquático (Golet *et al.*, 2002; Díaz-Cruz *et al.*, 2003).

A ocorrência de antibióticos no compartimento aquático tem gerado uma certa preocupação devido ao potencial risco para o ambiente, bem como devido ao impacto

negativo que poderá ter na saúde humana (Hirsch *et al.*, 1999; Boxall *et al.*, 2004; Banik e Hossain, 2006). Tem-se verificado um aumento da sua presença, já de si ubiqüitária, nos ambientes aquáticos, em níveis na ordem dos ng/l até os µg/l (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

1.3. Tetraciclina

As tetraciclinas são o segundo grupo mais comum de antibióticos usualmente detetados no ambiente (Gu e Karthikeyan, 2005). São antibióticos de largo espectro antibacteriano possuindo atividade contra bactérias gram positivas e negativas, *Mycoplasma*, *Rickettsia* e *Chlamydia* (Chopra e Roberts, 2001). Têm sido também usadas para tratamento de protozoários eucariotas, bem como de doenças não infecciosas, como acne (Chaidemenos, 2001; Chopra e Roberts, 2001; Roberts, 2003). São assim fármacos usados em larga escala em medicina humana e veterinária para tratar infeções, e em alguns países estão presentes na alimentação animal como promotores de crescimento e profilático de doenças (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

Estes compostos são caracterizados por possuírem uma estrutura constituída por quatro anéis benzénicos ligados entre si (designados de A a D, da direita para a esquerda) com múltiplos grupos funcionais passíveis de serem ionizados (Fig. 1) (Chen e Huang, 2009). As tetraciclinas têm um comportamento anfotérico por possuírem três valores diferentes de constantes de dissociação ácida (pKa), estando ionizadas a pH ambientais entre 3 e 8. As soluções de tetraciclina são estáveis a pH neutro a fracamente ácido, mas muito instáveis a pH alcalino (Reemstmsma e Jekel, 2006).

As tetraciclinas são maioritariamente eliminadas do organismo pela via renal, e aproximadamente 60% da tetraciclina administrada é eliminada na sua forma inalterada pela urina (Chambers, 2001). A formação dos produtos de degradação da tetraciclina depende das condições ambientais, nomeadamente dos valores de pH, devido à sua estrutura ser constituída por múltiplos grupos funcionais ionizáveis (Chen e Huang, 2009). No entanto, uma vez formados, os respetivos produtos de degradação não possuem tanta atividade biológica quanto o composto original (Halling-Sorensen *et al.*, 2002). Adicionalmente, alguns dos seus produtos de degradação podem ser transformados novamente no composto inicial (Sarmah *et al.*, 2006; Kemper, 2008). Deste modo, constata-se na comunidade científica um maior foco no composto

tetraciclina e nas suas vias de degradação, existindo um menor interesse na atividade dos compostos de degradação (Dolliver *et al.*, 2008; Wang e Yates, 2008; Bao *et al.*, 2009;).

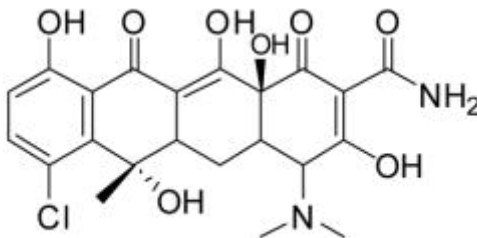


Figura 1. Estrutura química da tetraciclina na forma de sal de cloreto, clorotetraciclina (Adaptado de Pickens e Tang, 2009).

2. Brânquias e Fígado

Nos peixes ósseos as brânquias estão inseridas na cavidade opercular, e encontram-se divididas em arcos, representando órgãos com elevada área superficial em contacto direto com a água. A partir de cada arco divergem filamentos branquiais, nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias. Estas lamelas são extensamente vascularizadas, revestidas por epitélio simples pavimentoso sustentado por células pilares (Fig. 2) (Hibiya, 1982; Fergusson, 1989).

As brânquias desempenham várias funções vitais como respiração, osmorregulação e excreção, e encontram-se em constante contato direto com o meio aquático, apresentando uma espessura do epitélio que separa o meio externo do interno de apenas alguns micrómetros (Hughes, 1984; Wood e Soivio, 1991). Os contaminantes ambientais entram no organismo através deste órgão, o que pode levar a que os seus primeiros efeitos tóxicos sejam ao nível do epitélio branquial. Assim este facto torna-as o alvo primário para a maioria dos poluentes aquáticos (Perry e Laurent, 1993). As alterações histológicas na estrutura das brânquias podem levar a sérios problemas como distúrbios respiratórios, comprometendo as trocas gasosas, causando alterações na manutenção do balanço hidro-electrolítico, e nos processos de destoxificação de compostos encontrados ao nível ambiental (Marshall e Bryson, 1998; Randall e Brauner, 1998; Flores-Lopes e Thomaz, 2011).

Muitos estudos indicam que as brânquias desempenham igualmente um papel importante na biotransformação dos xenobióticos (Lindström-Seppä *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1989; Ueng e Ueng, 1995).

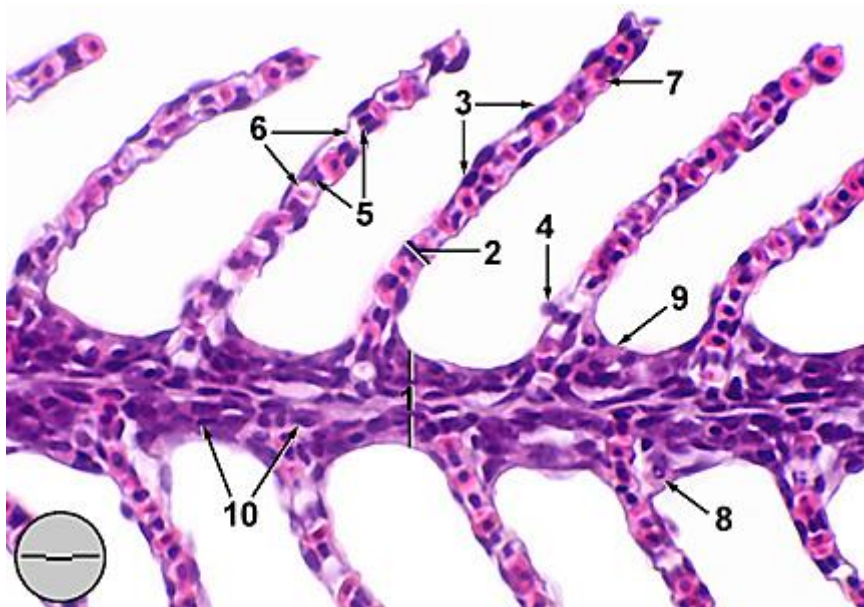


Figura 2. Corte transversal de brânquia de *Pimephales promelas* (barra = 16.7 μ m; técnica de H&E): (1) Lamela primária; (2) Lamela secundária; (3) Células epiteliais; (4) Células mucosas; (5) Células Pilar; (6) Lacuna (lúmen capilar); (7) Eritrócitos dentro de lúmen capilar; (8) Células de clorete; (9) Célula bastonete; (10) Células basais indiferenciadas (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).

O fígado é um órgão também importante pois desempenha funções vitais no metabolismo basal, como participa igualmente na destoxificação, bioativação, acumulação e excreção de xenobióticos (Moon *et al.*, 1985; Triebkorn *et al.*, 1997; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006). Assim, trata-se de um órgão de elevado interesse para se averiguar a possível exposição a contaminantes em peixes (Bernet, 1999). É constituído por hepatócitos que formam o parênquima e por fibras que lhe dão suporte, sendo revestido por uma membrana serosa. Os hepatócitos são células uni- ou binucleadas, com uma forma poligonal. No fígado é também possível encontrar vasos sanguíneos de grande e pequeno calibre (sinusóides) e dutos biliares (Fig. 3) (Yonkos *et al.*, 2000).

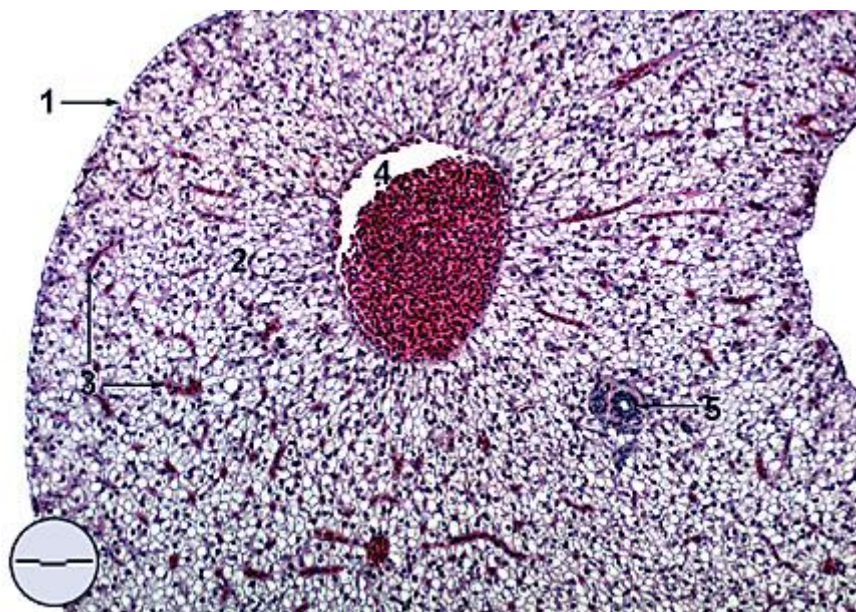


Figura 3. Corte transversal de fígado de *Pimephales promelas* (barra = 84.8 μ m; técnica de H&E): (1) Cápsula do fígado; (2) Hepatócitos; (3) Sinusóides com eritrócitos no seu interior; (4) Veia central; (5) Duto biliar. (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).

3. Biomarcadores

Por ação antropogénica as substâncias contaminantes atingem os ecossistemas aquáticos levando a uma exposição direta e constante do biota. A interação entre o xenobiótico e o ecossistema aquático pode resultar em diversas modificações nas várias cadeias tróficas reflexo das variadas alterações bioquímicas nos níveis tróficos inferiores, sendo estas modificações passíveis de serem medidas de forma a associar a extensão destas alterações com a exposição a determinado composto (Jesus e Carvalho, 2008).

Os biomarcadores são ferramentas úteis em Ecotoxicologia pois permitem avaliar e associar determinadas alterações nos organismos expostos com os diversos contaminantes, aferindo efeitos sub-letais, e consequentemente permitindo delinear ações preventivas e remediadoras. Por isso são usados comumente em programas de avaliação da contaminação ambiental (Bucheli e Fent, 1995; Timbrel, 1998; Jesus e Carvalho, 2008).

Um biomarcador pode ser definido como uma alteração histológica, fisiológica ou bioquímica que serve como indicativo de uma exposição ou de efeitos de um contaminante a nível molecular, celular, tecidual ou individual (Rand, 1995). As alterações que ocorrem nos organismos ao nível molecular ou bioquímico podem

indicar uma resposta precoce do indivíduo ao xenobiótico, permitindo prever alterações profundas nos ecossistemas, possibilitando a tomada atempada de medidas de prevenção (Adams *et al.*, 1989).

Os biomarcadores podem ser subdivididos em três categorias distintas (WHO, 1993; NRC, 1987), designadamente:

a) *Biomarcadores de exposição* que são caracterizados por serem substâncias exógenas, ou os seus produtos de metabolização, bem como substâncias resultantes da interação entre o xenobiótico e determinada molécula ou célula alvo do organismo, capazes de serem medidas num dado compartimento do respetivo organismo – dose interna. Sendo assim, são indicadores que confirmam a exposição do organismo a determinada substância ou grupo de substâncias, através do estabelecimento de uma relação entre a exposição e a dose interna.

b) *Biomarcadores de efeito*, os quais não são específicos relativamente à substância exógena e não fornecem qualquer informação sobre a sua natureza. São assim caracterizados por alterações fisiológicas, bioquímicas e/ou outras alterações mensuráveis ao nível dos tecidos ou fluídos do organismo. São relacionados com determinada anomalia, lesão ou problema de saúde, resultante de um mecanismo de defesa celular, que se inicia sempre como uma resposta adaptativa à presença do xenobiótico ao nível molecular/bioquímico, que no entanto pode falhar ou a sua capacidade de resposta ser ultrapassada.

c) *Biomarcadores de suscetibilidade* são indicadores da capacidade inata ou adquirida que determinado organismo possui para se adaptar face à exposição a substâncias exógenas específicas. Como exemplo, podem-se incluir as alterações nos recetores os quais por sua vez alteram a suscetibilidade do indivíduo ao xenobiótico, bem como fatores genéticos.

Existe igualmente uma outra classificação dos biomarcadores (Peakall, 1992) mais abrangente, defendida por alguns autores que consideram a classificação anterior bastante restrita, do ponto de vista fisiológico ou funcional, nomeadamente:

a) biomarcadores de enzimas de biotransformação (indução ou inibição das atividades das enzimas de biotransformação após exposição a um xenobiótico);

- b) biomarcadores de alteração de proteínas reguladoras (como por exemplo, medição dos níveis de proteínas de *stress*, como as metalotioneínas);
- c) biomarcadores de disfunção endócrina e reprodutiva (por exemplo, avaliação dos níveis de estrogênio, anomalias no sistema reprodutor, capacidade de reprodução);
- d) biomarcadores de genotoxicidade (análise de alterações ao nível da estrutura do DNA) e imunotoxicidade (medição da concentração de imunoglobulinas);
- e) biomarcadores histopatológicos (por exemplo, deteção de lesões tecidulares ou necrose);
- f) biomarcadores de metabolismo energético (teor de reservas lipídicas);
- g) biomarcadores de neurotoxicidade (como por exemplo a avaliação da atividade da acetilcolinesterase);
- h) biomarcadores de *stress* oxidativo (por exemplo, avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, tais como a catalase); e
- i) biomarcadores comportamentais, entre outros.

Os biomarcadores compilam uma série de vantagens, o que os torna ferramentas comumente utilizadas para a avaliação dos efeitos da exposição de um indivíduo a determinado poluente ou conjunto de poluentes. De entre as vantagens dos biomarcadores, destacam-se o seu baixo custo, facilidade de quantificação e aplicação das respetivas técnicas, aplicação generalizada nas mais variadas condições teste, bem como elevada sensibilidade a um elevado número de poluentes ambientais (Timbrell, 1998). Os biomarcadores são capazes de fornecer informações quanto ao mecanismo de toxicidade do poluente, e se usada uma bateria de biomarcadores, como é habitual, estes são capazes de indicar o estado geral do organismo exposto face ao processo tóxico sofrido (van der Oost *et al.*, 2003).

Para escolher o biomarcador mais indicado é necessário levar em consideração as características do organismo teste, as condições ambientais do teste, a resposta esperada, o poluente em análise, a via e duração de exposição ao poluente, bem como a sua concentração (Nunes *et al.*, 2008).

3.1. Biomarcadores de stress oxidativo

A biotransformação altera a toxicidade do composto, o que pode ser prejudicial, caso a sua toxicidade aumente devido a uma bioativação, havendo a formação de um metabolito reativo com toxicidade superior à do composto original. Por outro lado, pode ser vantajosa, caso a sua toxicidade seja reduzida devido a uma reação de destoxificação (van der Oost *et al.*, 2003). O metabolismo determina assim a atividade do composto, a duração da sua atividade e o seu tempo de semi-vida no organismo (Timbrell, 1998).

Existem inúmeras fontes endógenas de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), também chamadas como intermediários de oxigénio reativos (ROIs), radicais livres de oxigénio ou oxiradicais. Assim, estes intermediários podem derivar da respiração celular, mas a própria biotransformação dos xenobióticos pode também levar à sua produção, através do designado ciclo redox (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1989; Winzer, 2001). De entre os referidos radicais, destacam-se o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e o radical hidroxilo (OH \cdot), alcoxilo (RO \cdot) e peróxilo (ROO \cdot) (Barber e Bernheim, 1967; Chance *et al.*, 1979; Winston e Di Giulio, 1991). O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), erradamente incluído na designação de radical livre por não possuir eletrões desemparelhados, é menos reativo que os restantes radicais livres, (Halliwell e Gutteridge, 1989; Pereira, 1994). No entanto, não é por isso que deixa de ter relevância, uma vez que ao atravessar facilmente as barreiras biológicas, e ao receber mais um eletrão, geralmente do ferro ou do cobre, origina o radical livre hidroxilo (Halliwell e Gutteridge, 1989). No ciclo redox, acima mencionado, o composto exógeno é primeiramente reduzido enzimaticamente pela redutase dependente de NADPH (citP450 RED) produzindo um radical xenobiótico. Este radical doa o seu eletrão desemparelhado a uma molécula de oxigénio, formando o radical superóxido e novamente o xenobiótico oxidado. Assim, a cada ciclo redox, ocorrem dois eventos potencialmente deletérios, ou seja, um redutor foi oxidado e um radical livre de oxigénio foi formado (Winston e Di Giulio, 1991; Goeptar *et al.*, 1995).

Se a quantidade de ROS formada for elevada, estas podem acumular-se, havendo desta forma um distúrbio entre as concentrações celulares oxidantes (ROS) e de defesas antioxidantes a favor dos primeiros, causando assim o chamado *stress oxidativo*. Quando em elevadas concentrações, os ROS podem causar sérios efeitos deletérios no organismo ao nível de macromoléculas celulares, tal como peroxidação lipídica, danos

na estrutura do DNA e inativação de enzimas. Em alguns casos este desequilíbrio causa um distúrbio generalizado no balanço celular redox, como nos conteúdos de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) e na taxa de NADH/NAD⁺, podendo levar, em última instância, à morte celular (Valko *et al.*, 2005; Gimbert *et al.*, 2006; Regoli *et al.*, 2006).

Os radicais livres além de possuírem esta capacidade deletéria sobre as macromoléculas endógenas, participam igualmente em processos fisiológicos de defesa como fagocitose, produção de eicosanóides e diversas vias de transdução de sinais (Baber e Harris, 1994; Aruoma, 1998).

No entanto, os organismos possuem sistemas de defesa, tais como os antioxidantes, que exercem proteção celular, mantendo a concentração destas espécies em níveis diminutos (Yang *et al.*, 2012). Dentro das defesas antioxidantes, podemos encontrar formas e enzimáticas e não enzimáticas. Como defesas antioxidantes não enzimáticas incluem-se a glutathiona reduzida (GSH), metalotioneínas, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina B (β-caroteno), vitamina E (α-tocoferol) e coenzima Q10s; os antioxidantes enzimáticos incluem enzimas como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPOX), glutathiona redutase (GRED), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona-S-transferases (GSTs) (Stegeman *et al.*, 1992; Lopez-Torres *et al.*, 1993).

Os efeitos resultantes da produção de radicais livre de oxigénio podem ser usados como biomarcadores de *stress* oxidativo, tal como os que se devem a uma resposta adaptativa do organismo, como o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e concentração de compostos não enzimáticos (Winston e Di Giulio, 1991; Filho, 1996).

3.1.1. Catalase

A catalase é uma enzima citoplasmática pertencente ao grupo das hemoproteínas, sendo considerada um componente de defesa antioxidante primário, responsável pela catálise do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a água (H₂O) e oxigénio (O₂), formado durante o metabolismo celular basal ou após contato com poluentes (Winston *et al.*, 1990), sendo dependente do NADPH (Aebi, 1984), e pela oxidação de compostos hidrogenados, tais como o metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o respetivo consumo de peróxido (Aebi, 1984).

A catalase é ubiqüitária em qualquer organismo que se desenvolva na presença de oxigénio, encontrando-se na maioria dos casos dentro de estruturas subcelulares, como os peroxissomas do fígado e rins, pois é nestas estruturas que se encontram grande parte das enzimas que produzem H_2O_2 , como a glicolato oxidase e as flavoproteínas desidrogenases (Khessiba *et al.*, 2005). O H_2O_2 exerce determinados efeitos tóxicos nas células, entre eles a ativação de iões dos metais de transição das reações de Fenton, gerando desta forma radicais hidroxilo e danos na molécula de DNA (Barynin *et al.*, 2001).

A atividade da enzima catalase é bastante utilizada como biomarcador em inúmeros estudos de monitorização ambiental, por ser indicativa da ocorrência de *stress* oxidativo quando o organismo se encontra exposto a numerosos compostos pro-oxidantes (Ventura *et al.*, 2002; Atli e Canli, 2007; Zanette *et al.*, 2008).

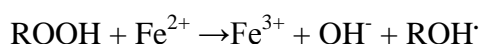
3.1.2. Glutationa-S-transferases

As isoenzimas GSTs desempenham no organismo papéis cruciais, para além de serem responsáveis pelo transporte intracelular de certos componentes, como bilirrubina e ácidos biliares, e ainda participam na síntese de leucotrienos e prostaglandinas. As GSTs possuem uma importante função na defesa do organismo contra os potenciais danos do *stress* oxidativo, por catalisar a conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I) com a glutationa reduzida (GSH) (George, 1994), com a finalidade de os tornar menos tóxicos, com maior solubilidade na água e mais facilmente excretados (Cogo *et al.*, 2009). Encontram-se maioritariamente na fração citosólica do fígado (Sijm e Opperhuizen, 1989).

3.1.3. Peroxidação lipídica

A reação dos radicais livres com os lípidos, nomeadamente com os ácidos gordos polinsaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, origina uma reação em cadeia designada de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (Lima e Abdalla, 2001). Este mecanismo divide-se em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Catalá, 2006). Na primeira etapa ocorre o ataque de um radical, como o hidroxilo ($OH\cdot$), alcóxido ($RO\cdot$), peróxido ($ROO\cdot$) (Gutteridge, 1988) a um ácido gordo polinsaturado extraíndo-lhe um átomo de hidrogénio a partir do grupo metileno ($-CH_2-$), originando um carbono com um eletrão desemparelhado ($-CH\cdot-$), havendo um rearranjo

do ácido gordo insaturado com formação de dienos conjugados (Lima e Abdalla, 2001; Catalá, 2009). A reação inicial que ocorre origina um radical lipídico (L[•]), que por sua vez reage rapidamente com uma molécula de oxigénio formando um radical lipídico peróxido (LOO[•]). Este por sua vez extrai novamente um átomo de hidrogénio da cadeia de ácido gordo adjacente originando um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um segundo lípido radicalar (L[•]) (Catalá, 2006). O LOOH sofre uma clivagem redutiva na presença de iões metálicos, como o Fe²⁺, produzindo desta forma o radical lipídico alcóxil (LOH[•]) (Halliwell e Gutteridge, 2007).



O LOOH também pode sofrer clivagem, devido à presença de metais reduzidos, originando como produtos aldeído reativos, como o MDA (malondialdeído), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) e acroleína (Uchida, 1999; Kehrer e Biswal, 2000; Lee *et al.*, 2001). Tanto o radical LO[•] como o radical LOO[•] são responsáveis pela extração consecutiva de um átomo de hidrogénio das moléculas de ácido gordos ocorrendo assim uma reação em cadeia de peroxidação lipídica (Buettner, 1993). A partir deste mecanismo poderão advir diversos efeitos que são letais para a célula, como o aumento da fluidez e alteração da permeabilidade, inibição de processos de transporte de iões e inibição de processos metabólicos (Nigam e Schewe, 2000). Existem várias formas de terminar com a peroxidação lipídica, como a neutralização dos radicais livres por espécies antioxidantes, formação de produtos não radicalares e consumo dos radicais livres, entre outros.

O malonildialdeído (MDA) é um dos produtos gerados pelo processo de peroxidação lipídica e que pode reagir, em condições de baixo pH, com resíduos de aminoácidos, especialmente a lisina, o que poderá levar a potenciais perdas de função das proteínas. Pode também reagir com bases nitrogenadas do DNA, nomeadamente de guanina, (Halliwell e Gutteridge, 2007). A quantificação deste produto é vulgarmente usada para avaliação da extensão de peroxidação lipídica, por intermédio do método designado por Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

3.2. Biomarcadores histopatológicos

A histologia pode ser uma ferramenta útil na avaliação do estado de saúde do animal refletindo os efeitos da exposição a uma enorme variedade de contaminantes (Hinton *et al.*, 1992). Desta forma, a análise de alterações tecidulares é um método sensível e relativamente rápido para determinar os efeitos dos poluentes nas células, tecidos e órgãos-alvo, especialmente os efeitos crônicos, sendo indicadores da exposição prévia a contaminantes (Hinton *et al.*, 1992; Schwaiger *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 1999). Qualquer efeito tóxico de contaminante ambiental é primeiramente evidenciado nas células e tecidos, antes de serem visualizáveis quaisquer alterações no comportamento ou aparência externa do organismo (van Dyk, 2005).

A avaliação das alterações histológicas centra-se essencialmente no estudo das modificações presentes nos tecidos biológicos, nomeadamente em importantes órgãos-alvo, como sejam as brânquias (Mallatt 1985; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994), pele (Vethaak, 1994), fígado (Hinton e Laurén 1990; Myers *et al.*, 1994) e rins (Oronsaye 1989; Bucher e Hofer 1993). Estes órgãos apresentam elevado interesse de estudo devido às suas funções fisiológicas, pelo que a sua análise histopatológica é utilizada como biomarcador de exposição aguda e crónica a diversos compostos tóxicos, bem como na monitorização ambiental (Stentiford *et al.*, 2003; Triebkorn *et al.*, 1997).

A abordagem clássica na avaliação das alterações histológicas é a análise qualitativa, a partir da qual é possível determinar as lesões com maior expressão. No entanto é difícil estabelecer uma relação causa-efeito entre o contaminante e a alteração tecidular apresentada. Pelo que assim torna-se útil a aplicação de uma análise semi-quantitativa ou quantitativa, que nos fornecem informações numéricas permitindo definir com mais acuidade o efeito toxicológico do contaminante sobre o organismo e aplicar análises estatísticas apropriadas (Bernet *et al.*, 1999; Nero *et al.*, 2006).

3.3. Biomarcadores de neurotoxicidade

Relativamente a este tipo de biomarcador, aquele que apresenta maior interesse para o estudo das funções neurológicas é a inibição das colinesterases (Payne *et al.*, 1996). Existem dois tipos de colinesterases: a) a butirilcolinesterase (BChE), também

designada de pseudo-colinesterase ou esterase não específica, a qual possui maior afinidade para o neurotransmissor butirilcolina; e b) a acetilcolinesterase (AChE), enzima com maior especificidade para o neurotransmissor acetilcolina, sendo esta última presente no cérebro dos peixes, e tal como a BChE também pode ser encontrada no músculo dos peixes (Walker e Thompson, 1991; Sturm *et al.*, 2000). A inibição da acetilcolinesterase é um biomarcador específico para exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos (Fulton e Key, 2001). No entanto, vários estudos indicam que é igualmente sensível a metais, detergentes e complexas misturas de poluentes (Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998; Guilhermino *et al.*, 2000).

A AChE desempenha um papel importante na neurotransmissão, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético ao nível das sinapses colinérgicas, tanto nos vertebrados como invertebrados (Talesa *et al.*, 1992; Guilhermino *et al.*, 2000). A AChE impede uma transmissão nervosa contínua, ou seja, permite o repouso do neurónio após a sua ativação, sendo essencial para o normal funcionamento do sistema neuromuscular e sensitivo (Murphy, 1986; Talesa *et al.*, 1992). Entretanto, sugere-se que a BChE hidrolisa não só a acetilcolina, como também ésteres de cadeia longa de colina (a butirilcolina e succinilcolina), e uma enorme variedade de ésteres de não-colina como o ácido acetilsalicílico e cocaína (Masson *et al.*, 1998; Koetzner e Woods, 2002). Também se tem demonstrado que a BChE liga-se e/ou hidrolisa a maior parte dos inibidores da AChE, tais como os pesticidas organofosforados e organofosfatos (“nerve agents”), carbamatos, protegendo assim a enzima AChE (Casida e Quistad, 2004; Duysen *et al.*, 2007; Masson e Lockridge, 2010).

4. Ensaio de toxicidade usando como organismo-teste o peixe *Gambusia holbrooki*

Os peixes são habitualmente usados em estudos de monitorização de poluição no compartimento aquático por se tratarem de organismos familiares nestes ecossistemas, bem como por responderem com uma elevada sensibilidade a alterações no meio aquático, refletindo os distúrbios em vários níveis devido à sua mobilidade, estilo de vida e por se encontrarem próximo do topo da cadeia alimentar (Freitas e Siqueira-Souza, 2009; Hernández-Moreno *et al.*, 2010). Comparativamente a outros grupos de animais, tais como os invertebrados, os peixes têm vantagem por poderem fornecer

maior quantidade de informações, para além de serem facilmente capturáveis e identificáveis (Freitas e Siqueira-Souza, 2009).

No entanto, há que ter em conta que não existe nenhum organismo ideal que possa ser usado em testes de toxicidade e que reflita todos os efeitos possíveis de determinado contaminante sobre o respetivo ecossistema. Isto deve-se em grande parte à complexidade do ambiente aquático, bem como aos inúmeros processos que um contaminante está sujeito no meio ambiente (Ronco *et al.*, 2004).

Portanto, para obter resultados satisfatórios e representativos, o ideal seria avaliar o efeito tóxico de determinada substância em mais do que uma espécie representativa do local, e preferencialmente, em espécies pertencentes a diferentes níveis tróficos (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990; Ribo, 1997). A utilização de uma bateria de testes com pelo menos quatro organismos-teste pertencentes a diferentes níveis das cadeias tróficas, nomeadamente, produtores (exemplo, algas), consumidores primários (exemplo, microcrustáceos), consumidores secundários (exemplo, peixes) e decompositores (exemplo, bactérias) é recomendado para estimar o efeito que determinado poluente exerce no meio ambiente com mais segurança.

Por razões práticas e económicas, usualmente estes testes utilizam somente um organismo-teste. Este deve possuir determinadas características, tais como seletividade constante e elevada para os contaminantes, disponibilidade e efetivo populacional significativo, serem geneticamente uniformes e estáveis, representativos do seu nível trófico no meio ambiente, amplamente distribuídos, apresentarem facilidade em se adaptar às condições laboratoriais, bem como a sua fisiologia, genética e comportamento serem bem conhecidos para melhor interpretação dos resultados obtidos (Costa *et al.*, 2008).

A gambusia ou peixe- mosquito (*Gambusia holbrooki*) é um peixe originário do sudeste dos Estados Unidos da América, que a partir de 1920, foi globalmente disseminado como agente controlador de mosquitos vetores de patologias humanas, por se alimentar das suas larvas (NSW, 2003). No entanto, o sucesso desta distribuição não é consensual, pois nos locais onde a gambusia foi introduzida, existiam populações nativas de pequenos peixes, anfíbios, e invertebrados os quais se alimentavam desses insetos, pelo que esta iniciativa de se introduzir a gambusia não foi a melhor opção, pois alterou esses

ecossistemas negativamente. Atualmente, esta espécie continua a ter um impacto negativo em algumas zonas onde habita, pois alimenta-se de ovos de anfíbios e girinos, nomeadamente de algumas espécies ameaçadas. Além disso, é também responsável pela diminuição de certas populações endémicas de peixes em todo mundo, através de fenómenos como predação e competição por interferência (Howe, 1995; Ivanstovff e Aarn, 1999; Knight, 1999).

Esta espécie tem preferência por águas mornas, de fluxo lento, ou mesmo águas paradas, e ocorre maioritariamente entre a vegetação aquática que surge próxima das margens, com profundidade de aproximadamente 10 centímetros ou menos (Merrick e Scmida, 1984; McDowall, 1996; Arthington e Marshall, 1999). É um peixe que suporta uma ampla variedade de condições ambientais, no entanto tende a evitar zonas com densa vegetação que o impossibilite de se alimentar à superfície, ou zonas de grande fluxo de água (Meffe, 1984; Arthington *et al.*, 1990; Galat e Robertson, 1992). São peixes de porte pequeno, possuindo uma única barbatana dorsal, barbatana caudal arredondada, olhos grandes e cabeça achatada, e mandíbula inferior que sobressai mais que a superior. Existe dimorfismo sexual nesta espécie, pois as fêmeas são relativamente maiores, medindo cerca de 60 mm, comparativamente com os machos que medem cerca de 35 mm. Além do tamanho, a fêmea distingue-se do macho por possuir uma zona ventral maior e arredondada (Fig. 4), e o macho apresenta um gonopódio (órgão copulador) visível a olho nu (Cabral e Marques, 1999).



Figura 4. Exemplar de *Gambusia holbrooki*: fêmea (maior) e macho (menor) (Adaptado de *Global Invasive Species Database*, 2010).

A sua alimentação é muito diversificada, incluindo pequenos insetos terrestres, tais como formigas e mosquitos, que pousam na superfície da água, bem como invertebrados aquáticos, como insetos (besouros, larvas de mosca), zooplâncton e algas filamentosas, entre outros (Lloyd 1984; Bence e Murdoch, 1986; Arthington e Marshall, 1999).

Esta é uma espécie que apresenta algumas vantagens que a tornam um organismo de eleição para realizar ensaios ecotoxicológicos: facilidade em adaptar-se às diversas condições laboratoriais; ampla distribuição geográfica; elevada fecundidade; facilidade de captura; e devido ao seu pequeno tamanho é possível testar um elevado número de indivíduos, sem que para tal seja necessário dispor de muito espaço de biotério (Nunes *et al.*, 2008).

5. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo avaliar os efeitos ecotoxicológicos decorrentes de uma exposição aguda de 96 horas do peixe *Gambusia holbrooki* ao antibiótico tetraciclina hidroclorada com recurso à determinação da atividade das enzimas de *stress* oxidativo, conjugação, no fígado e brânquias, e neurotoxicidade, no cérebro (catalase, glutationa-S-transferases e acetilcolinesterase, respetivamente), bem como eventuais alterações histológicas em órgãos alvo, nomeadamente no fígado, brânquias.

6. Material e Métodos

6.1. Caracterização do local de captura

A Pateira de Fermentelos é uma lagoa natural, que ocupa uma área de superfície e profundidade variáveis, dependendo da estação do ano. Esta lagoa ocupa uma vasta área (5 km²), maioritariamente no concelho de Águeda, bem como no concelho de Aveiro e Oliveira do Bairro. É alimentada a sul pelo rio Cértima e a noroeste pela Ribeira do Pano (CMA, 2013).

É considerado um sistema semi-léntico o qual se encontra integrado na Zona de Proteção Especial da Ria de Aveiro, e de acordo com o Decreto-lei nº152/97, de 19 de Junho, Anexo II, é considerado *uma importante e extensa zona húmida*. De acordo com a Convenção Ramsar, zonas húmidas são *áreas de sapal, paul, turfeiras ou águas, naturais ou artificiais, permanentes ou temporárias, estáticas ou correntes, doces,*

salobras ou salgadas, incluindo extensões de água do mar, cuja profundidade na maré baixa não exceda os 6 metros e zonas costeiras e ribeirinhas. Como tal, a Pateira de Fermentelos reúne todas as condições para que desempenhe funções cruciais, tais como regulação hídrica e climática, purificação da água, oposição ao efeito de estufa, proteção da costa, manutenção de reservatórios subterrâneos, suportando uma elevada biodiversidade (CMA, 2013).

6.2. Captura e acondicionamento dos peixes

Os exemplares de gambusia foram capturados com o auxílio de redes de mão (camaroeiros) a partir das margens da lagoa. Foram selecionados organismos com tamanhos similares, rejeitando todos aqueles que não se encontrassem entre um tamanho médio de 2,5 a 3,5 cm, incluindo machos e fêmeas imaturas. Após captura, os organismos-teste foram acondicionados e transportados para o laboratório em arcas térmicas com arejamento contínuo.

6.3. Exposição à tetraciclina

Antes da exposição ao fármaco, selecionaram-se os indivíduos com tamanhos similares os quais foram mantidos durante um período de quarentena com duração de quinze dias, sob condições laboratoriais controladas, nomeadamente água desclorada e com temperatura controlada a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ com arejamento contínuo, alimentados todos os dias *ad libitum* com alimento artificial (Sera Vipán® flakes).

Findo o período de quarentena, foram selecionados aleatoriamente 40 indivíduos que foram sujeitos durante 96 h ao ensaio agudo de exposição a concentrações crescentes de tetraciclina hidróclorada de acordo com a norma OCDE 203 (1992). Durante o período de exposição, a água foi renovada 48 h após o início da exposição, e as concentrações de contaminante foram novamente ajustadas. Como a tetraciclina é fotodegradável (Kümmerer, 2009), os aquários foram integralmente cobertos com papel de alumínio de forma a evitar a entrada de luz, de modo a garantir que a concentração de tetraciclina se mantivesse estável ao longo de todo o ensaio.

Os organismos foram divididos em quatro grupos distintos, com dez indivíduos cada, e sujeitos individualmente a três diferentes concentrações sub-letais de tetraciclina ou seja 5 ng/l (concentração baixa), 50 ng/l (concentração média) e 500 ng/l (concentração

alta). No grupo controlo, os organismos foram expostos somente a água desclorada. A solução-mãe de tetraciclina (Sigma-Aldrich) tinha a concentração de 0,1 mg/l. Estas concentrações foram escolhidas uma vez que são ambientalmente relevantes. Segundo Kümmerer (2009), as tetraciclinas são encontradas no ambiente aquático, nomeadamente na água de superfície, numa concentração acima de 110 ng/l; Segundo o estudo de Jia *et al.* (2009), foi analisada a presença de tetraciclina em amostras de água provenientes de influentes e efluentes de uma ETAR (Gao Beidian – Beijing, China) e em água de superfície do rio Tonghui, Beijing, reportando concentrações de tetraciclina de 16,5 ng/l (influyente), 1,9 ng/l (efluente) e 2,1 ng/l (rio). As concentrações adotadas no presente estudo encontram-se assim na mesma ordem de grandeza das referidas na bibliografia.

Após o período de exposição, 5 indivíduos, de cada grupo, foram sacrificados por decapitação e dissecados, sobre uma solução de tampão fosfato 5 mM, pH 7,0, com Triton X - 100 a 0,1%, a 4°C. Os órgãos seleccionados foram o fígado, brânquias, músculo e cérebro, os quais foram usados para os ensaios enzimáticos: os restantes 5 indivíduos intactos foram usados para o estudo histopatológico. De seguida, as amostras para as determinações bioquímicas foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 com 0,1 % Triton X-100, com auxílio de um homogeneizador mecânico (Ystral). Posteriormente foram centrifugadas a 15,000g, onde se isolou o sobrenadante e armazenou-se a -80°C.

6.4. Ensaio enzimáticos

6.4.1. Determinação da atividade da enzima catalase

A determinação da atividade da enzima catalase foi executada de acordo com o método descrito por Aebi *et al.* (1984) previamente adaptado a *G. holbrooki*. Este método baseia-se na medição espectrofotométrica (espectrofotómetro UV1800) num comprimento de onda 240 nm, da decomposição do peróxido de hidrogénio, tanto ao nível do fígado como das brânquias. A solução de peróxido de hidrogénio utilizada foi diluída a 30% de forma a evitar a inativação da enzima catalase por excesso de substrato, e o pH da reação foi de 7,0 através do uso de uma solução tampão de fosfato a 50 mM. A diferença das absorvâncias medidas por unidade de tempo indica-nos a

atividade da enzima catalase; cada amostra foi replicada 4 vezes. Os resultados foram expressos em nmol por minuto por mg de proteína.

6.4.2. Determinação da atividade das isoenzimas GSTs

A determinação da atividade destas isoenzimas foi feita de acordo com o descrito por Habig *et al.* (1974), adaptado para o organismo-teste em estudo, tanto ao nível do fígado como brânquias. Baseia-se na medição do aumento da absorvância a um comprimento de onda de 340 nm, num leitor de microplacas (Labsystem Multiskan Ex), do tioéter que se forma pela conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o grupo tiol da glutathiona reduzida (GSH). Cada amostra foi replicada 4 vezes. Os resultados obtidos foram expressos em nmoles de tioéter produzido por minuto/mg de proteína.

6.4.3. Determinação da enzima AChE

A determinação da atividade da AChE foi realizada no cérebro dos indivíduos, adaptando o protocolo descrito por Ellman *et al* (1961) ao organismo-teste *G. holbrooki*. Esta técnica baseia-se na hidrólise do substrato acetilcolina pela AChE formando tiocolina e acetato. A tiocolina complexa com o composto ditiobisnitrobenzoato (DTNB), originando um produto de cor amarela, o qual pode ser detetado a um comprimento de onda de 414 nm. Os resultados foram expressos em μ mol de substrato hidrolisado por minuto/mg de proteína.

6.4.4. Determinação da extensão de peroxidação lipídica

Para avaliar o grau de peroxidação lipídica utilizou uma porção de músculo e adaptou-se o procedimento descrito por Buege e Aust (1978) ao organismo em estudo. Este método quantifica a quantidade de malonildialdeído (MDA). Este composto é um dialdeído o qual é formado como um produto secundário durante a peroxidação lipídica, por um processo de cisão beta do ácido gordo polinsaturado peroxidado, sobretudo o ácido araquidónico. Este método baseia-se no facto de o MDA, em condições adequadas, nomeadamente, meio ácido e temperaturas elevadas, reagir eficazmente com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um produto corado, passível de ser detetado no espetro do visível a um comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em mmol por mg de proteína.

6.4.5. Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total foi executada de acordo com o descrito por Bradford (1976). Este método tem como base a ligação do corante Coomassie brilliant blue G-250, o qual está presente no reagente de Bradford, à proteína total existente na amostra, o que origina um complexo corado estável que pode ser quantificado a 595 nm.

Simultaneamente, construiu-se uma curva de calibração utilizando as absorvâncias relativas a concentrações crescente do padrão γ -globulina bovina, com o objetivo de converter os valores de absorvâncias obtidas para as amostras em valores de concentração de proteína respetiva. Este passo tem como objetivo padronizar os resultados, uma vez que pode haver variações inter-individuais, que podem condicionar a quantidade de proteína total e os biomarcadores medidos. Desta forma, pela normalização da quantidade total de proteína solúvel, é possível comparar os resultados obtidos entre os indivíduos.

6.5. Técnica histológica

6.5.1. Procedimento experimental

Os indivíduos foram mergulhados durante um período de 24 horas numa solução de Bouin com o objetivo de os fixar quimicamente. Terminado este processo, as amostras foram sujeitas a um processo de descalcificação através do uso de uma solução de descalcificação (Decalcifying Solution-Lite; Sigma Aldrich Ref. D0818) durante 12 horas. Findo este período, prosseguiu-se com o processo de desidratação, sujeitando a amostra a uma série de soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%). De seguida sujeitou-se as amostras a um processo de diafanização utilizando xilol (Xylene Substitute; Sigma Aldrich Ref. A5597) por um período de 2 horas. Seguidamente, as amostras foram incluídas em parafina a uma temperatura de cerca de 59°C. Através de um micrótomo manual rotativo (Reichert-Jung 2030), os blocos de parafina foram seccionados a uma espessura de aproximadamente de 6 a 7 μ m. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e montados com DPX. As preparações foram visualizadas num microscópio óptico composto (Olympus, CX41) acoplado a uma câmara digital USB (Olympus, SC30). Foram tiradas microfotografias das brânquias e do fígado com uma magnificação de 200 e 400 X, respetivamente.

6.5.2. Análise qualitativa e semi-quantitativa

Para cada órgão estudado, nomeadamente fígado e brânquias, identificaram-se as diferentes alterações histológicas classificando-as em cinco categorias, nomeadamente, distúrbios circulatórios alterações degenerativas, inflamação, alterações progressivas e tumores (Bernet *et al.*, 1999).

Nos distúrbios circulatórios incluíram-se alterações como as hemorragias, a hiperemias/congestão, os aneurismas e o edema intercelular.

As alterações degenerativas são lesões que podem levar a uma redução na função orgânica ou até mesmo perda total do órgão, e inclui alterações estruturais ou arquitetónicas do órgão, alterações plasmáticas, depósitos, alterações nucleares, atrofia e necrose.

As alterações inflamatórias subdividem-se em três categorias: exsudado, ativação do sistema reticuloendotelial e infiltração.

As lesões progressivas correspondem a um fenómeno que leva ao aumento da atividade da célula ou tecido, sendo subclassificadas em hipertrofias e hiperplasias.

Por último, o tumor resume-se a uma proliferação incontrolável de células ou tecidos, podendo os tumores ser benignos, quando se trata da proliferação de células diferenciadas, e malignos, quando a proliferação ocorre ao nível de células pouco diferenciadas, que rapidamente se dividem e invadem e destroem tecidos adjacentes, podendo ocorrer metástases.

Após identificar as lesões histopatológicas aferiu-se o fator de importância dessas mesmas lesões, ou seja, avaliou-se de que forma esta alteração pode afetar a funcionalidade do órgão e a capacidade de sobrevivência do organismo. O fator de importância variou de 1 a 3 (1 significa que a lesão é facilmente revertida quando a exposição ao stressor termina; 2 significa que a lesão em causa apresenta uma importância moderada e que na maior parte das vezes pode ser reversível; e 3 quando a lesão é irreversível podendo mesmo levar a perda total ou parcial da funcionalidade do órgão em questão, apresentando assim uma importância patológica marcada

Cada alteração foi igualmente aferida quanto ao grau de severidade, ou seja foi classificada quanto à sua extensão numa escala de 1 a 7 valores (1: 1%-15%, 2: 15%-30%, 3: 30%-45%, 4: 45%-60%, 5: 60%-70%, 6: 70%-90% e 7: 90%-100%).

Por último foi calculado o índice patológico para cada órgão através do somatório dos valores obtidos através da multiplicação do valor de fator de importância pelo valor do grau de severidade para cada lesão histopatológica encontrada no órgão em estudo, obtendo-se assim o índice branquial e o índice hepático (Bernet *et al.*, 1999).

6.5.3. Análise quantitativa das brânquias

As estruturas utilizadas para estudo foram o comprimento e espessura da lamela secundária (SLL e SLW, respetivamente), a distância interlamelar (ID) e espessura do epitélio basal (BET) (Fig. 5). Paralelamente foi realizada a determinação da capacidade respiratória de acordo com o valor de PAGE, sendo este obtido pela seguinte fórmula:

$$PAGE(\%) = \left(\frac{SLL}{BET + SLL} \right) \times 100$$

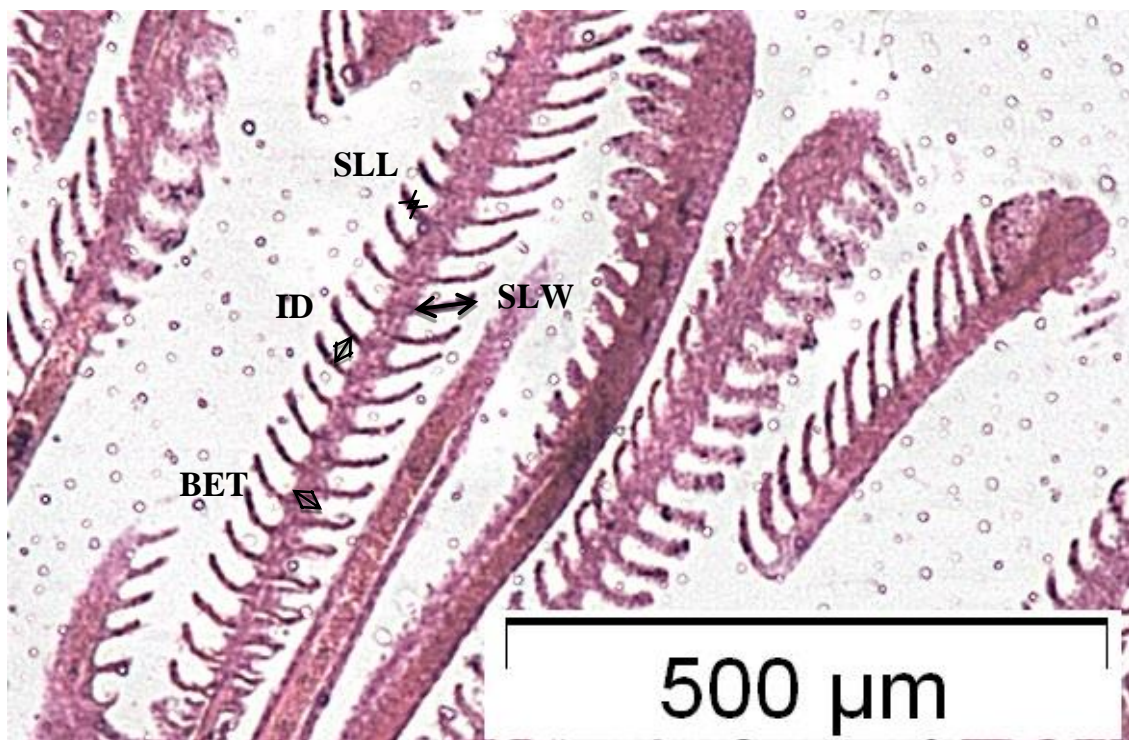


Figura 5. Exemplificação das medições efetuadas na lamela branquial em *G. holbrooki* após exposição aguda (96 h) a concentrações crescentes de tetraciclina em condições controladas): (SLL) Comprimento da lamela secundária; (SLW) Espessura da lamela secundária; (ID) Distância interlamelar; (BET) Espessura do epitélio basal. Coloração H&E. Magnificação de 200X.

6.6. Análise estatística

Após verificação da distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados obtidos, os resultados foram sujeitos a uma análise unifatorial de variância (One-Way ANOVA), seguida, se necessário ($P < 0,05$), de um teste de Dunnett, de forma a verificar se as possíveis diferenças obtidas nos grupos expostos eram significativamente diferentes do grupo controlo. Utilizou-se um nível de significância (α) de 0.05. Os resultados são apresentados como a média \pm erro-padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no SigmaPlot 11.0.

7. Resultados

7.1. Biomarcadores enzimáticos

A determinação da atividade da enzima catalase no fígado permitiu verificar diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os grupos submetidos à exposição a tetraciclina (One-Way Anova: $F = 7,62$; g.l.=3,16; $P = 0,002$), podendo ser observado um aumento significativo da sua atividade em todos os grupos expostos (Fig. 6A).

Relativamente à atividade das GSTs a nível do fígado, verificou-se que a exposição ao composto em estudo levou a um aumento da atividade desta enzima, embora não estatisticamente significativo (One-Way Anova: $F = 1,97$; g.l.=3,16; $P = 0,158$) (Fig. 6B). Em contrapartida, nas brânquias observou-se um aumento mais pronunciado da atividade enzimática das GSTs na concentração de 500 ng/l, sendo este aumento estatisticamente significativo em comparação com o grupo controlo. Os restantes grupos de tratamento apresentaram, um pequeno aumento de atividade, embora não significativo (One-Way Anova: $F = 10,51$; g.l.=3,16; $P = 0,0004$) (Fig. 6C)

A atividade da enzima acetilcolinesterase não sofreu alterações significativas nos diferentes grupos experimentais (One-Way Anova: $F = 0,499$; g.l.=3,16; $P = 0,688$) (Fig. 6D).

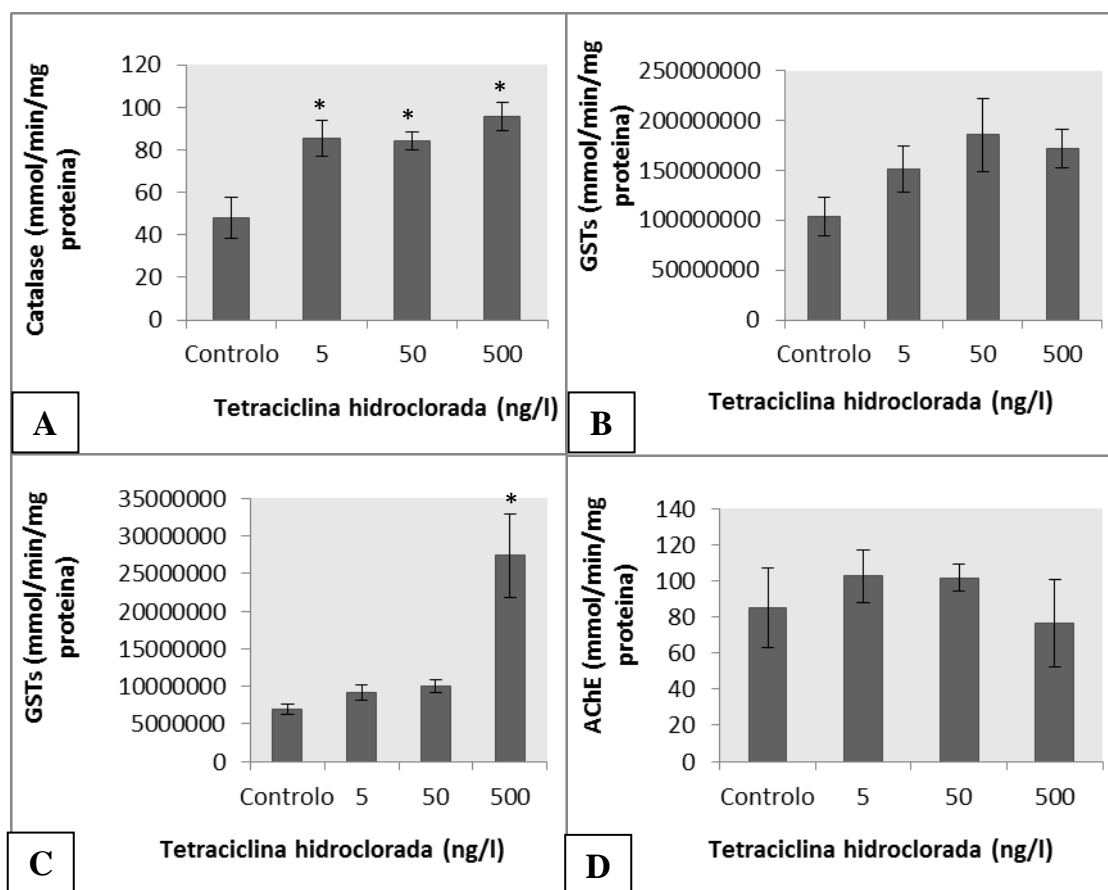


Figura 6. Valores de atividade enzimática no fígado, brânquias e cabeça de *G. holbrooki* referente a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina (média e erro padrão): **A)** CAT no fígado; **B)** GSTs no fígado; **C)** GSTs nas brânquias; **D)** AChE na cabeça. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

7.1.1. Quantificação de TBARS

Foi observada uma diminuição significativa da concentração da TBARS dependente da dose de tetraciclina utilizada, sendo a variação de concentração entre o grupo controlo e os grupos de tratamento estatisticamente significativa (One-Way Anova: $F = 6,53$; $g.l.=3,16$; $P = 0,004$) (Fig. 7).

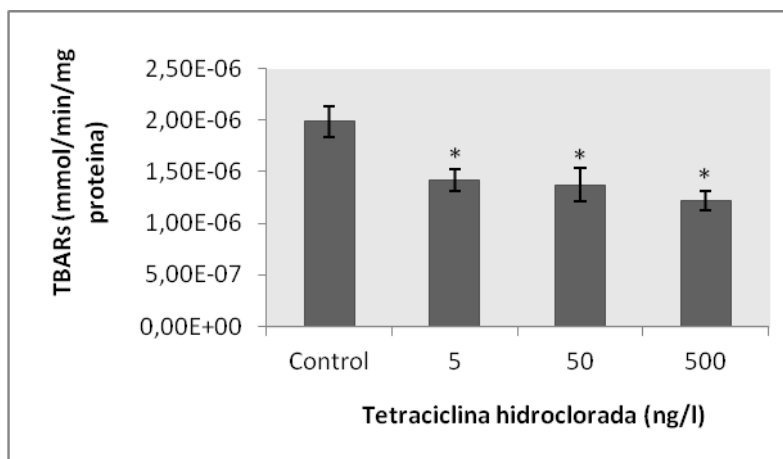


Figura 7. Valores de concentração de TBARS (média e erro padrão) no fígado de *G. holbrooki* referente a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

7.2. Histopatologia

7.2.1. Qualitativa e semi-quantitativa brânquias

A análise qualitativa demonstrou a presença de alterações histopatológicas de forma geral em todos os grupos expostos, no entanto verificou-se um aumento da incidência, gravidade e extensão das alterações em função da concentração de tetraciclina usada.

Os indivíduos do grupo controlo (não-exposto) apresentavam uma aparência normal da arquitetura branquial (Fig. 8). As alterações tecidulares mais frequentemente encontradas nos grupos expostos foram a hipertrofia da lamela secundária (Fig. 9A), o levantamento epitelial da lamela secundária (Fig. 9B), os aneurismas (Fig. 9C), a fusão das lamelas secundárias (Fig. 9D), a hipertrofia da lamela primária (Fig. 9E) e sinais necróticos (Fig. 9F).

O índice patológico branquial apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais (One-Way Anova: $F = 4,14$; g.l.=3,9; $P = 0,042$), nomeadamente entre o grupo controlo e os grupos de tratamento de concentrações de 50 e 500 ng/l (Fig. 10).

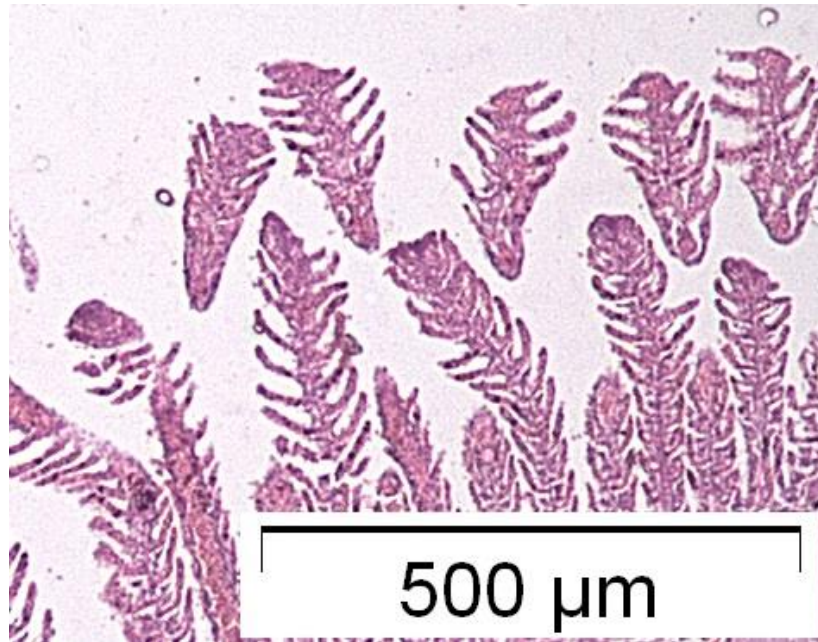


Figura 8. Aparência normal da lamela branquial de *G. holbrooki*, de um indivíduo pertencente ao grupo controle. Técnica de H&E. Magnificação de 200X.

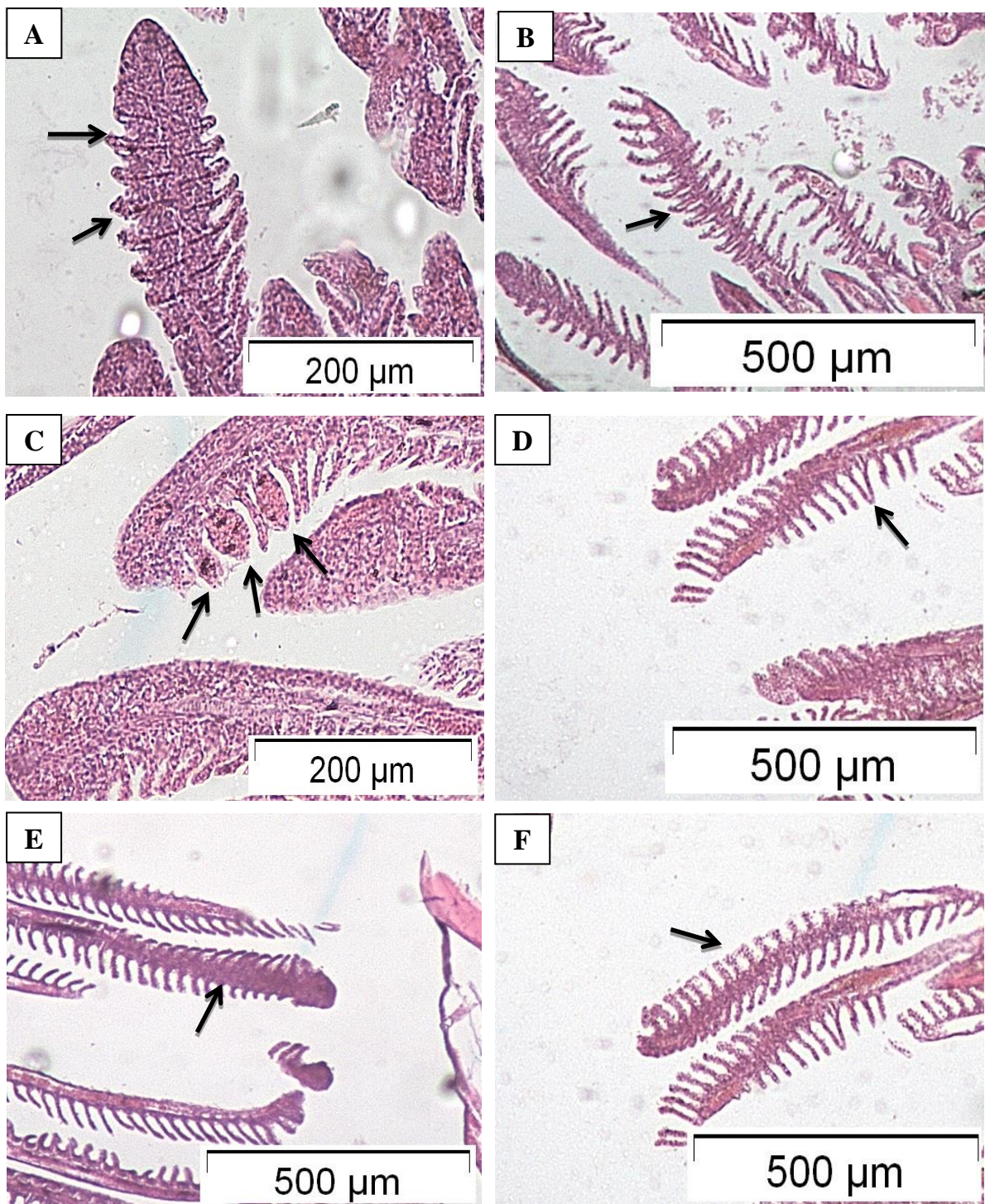


Figura 9. Exemplificações de achados de alterações histopatológicas (setas) na lamela branquial de *G. holbrooki* após exposição a concentrações crescentes de tetraciclina durante 96 h. (A) Hipertrofia da lamela secundária; (B) Levantamento epitelial da lamela secundária; (C) Aneurisma; (D) Fusão das lamelas secundária; (E) Hipertrofia da lamela primária; (F) Necrose. Técnica de H&E. Magnificação de 200X.

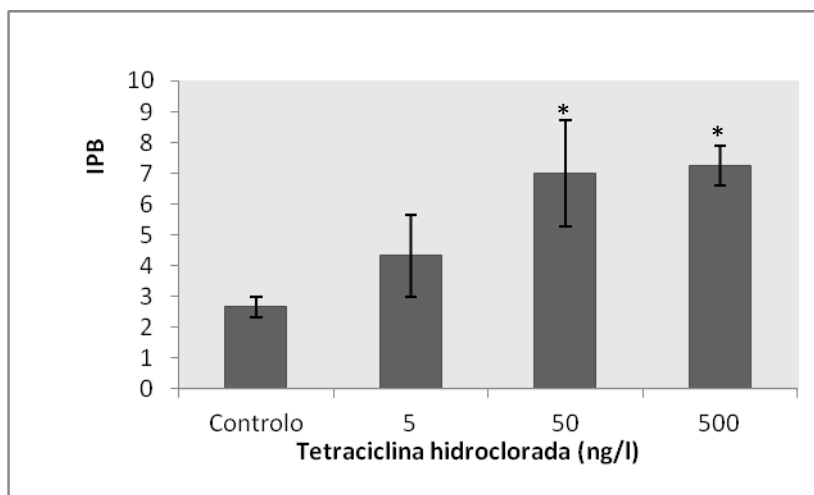


Figura 10. Valores do índice patológico das brânquias (IPB) (médio e erro padrão) em *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo ($P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

7.2.2. Análise quantitativa das brânquias

Não se verificaram diferenças significativas entre os valores morfométricos das brânquias para os diferentes grupos experimentais para qualquer parâmetro analisado (BET - One-Way Anova: $F = 2,88$; g.l.=3,9; $P = 0,096$), (ID - One-Way Anova: $F = 0,62$; g.l.=3,9; $P = 0,620$), (SLL - One-Way Anova: $F = 0,89$; g.l.=3,9; $P = 0,483$); (SLW - One-Way Anova: $F = 2,79$; g.l.=3,9; $P = 0,101$) (Figs. 11 A, B, C e D, respetivamente). A capacidade respiratória, expressa através do valor de PAGE, não foi significativamente afetada pela exposição ao fármaco (One-Way Anova: $F = 2,22$; g.l.=3,9; $P = 0,155$) (Fig. 11E).

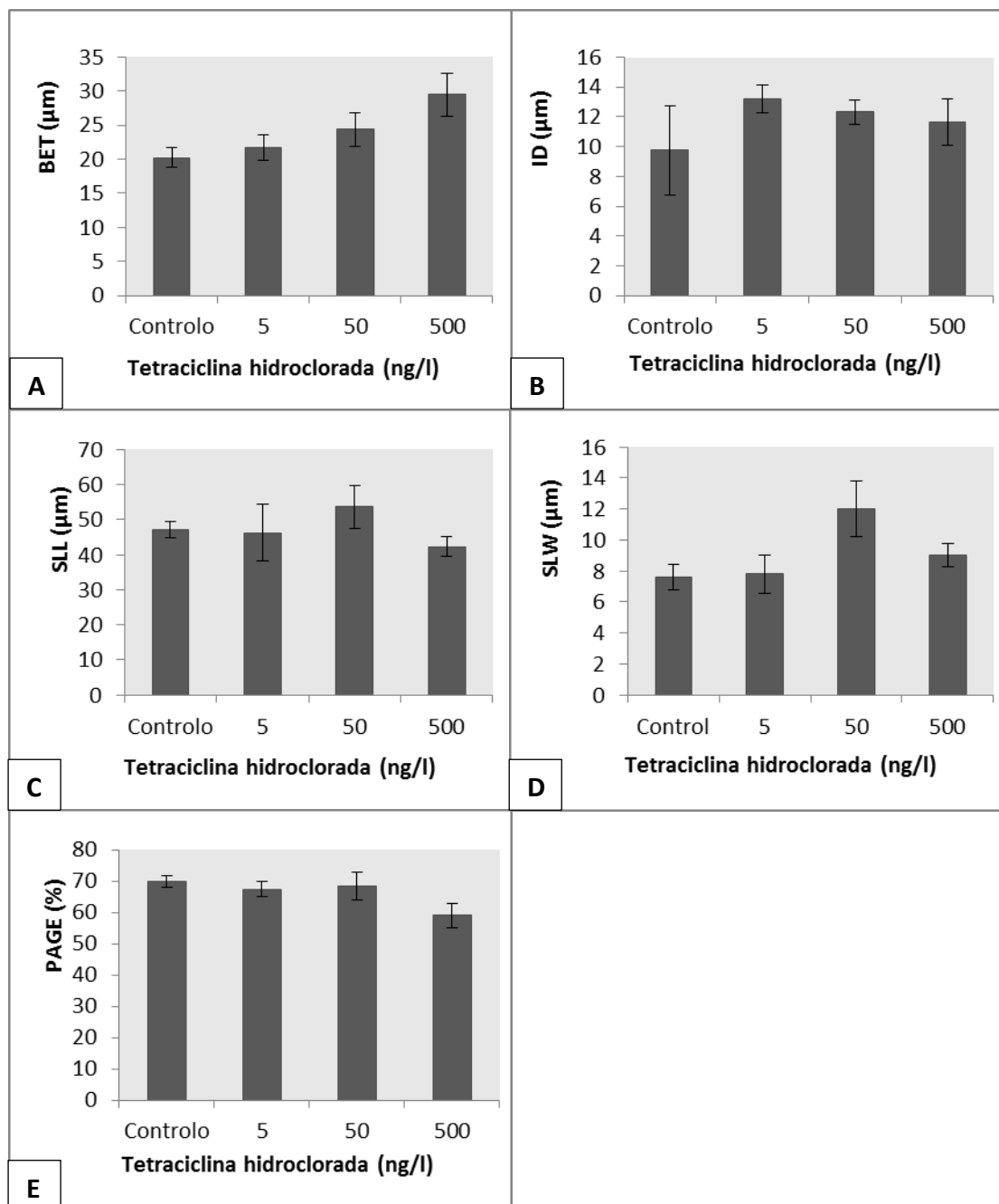


Figura 11. Determinações quantitativas das estruturas das brânquias de *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina (média e erro padrão): **A)** BET (Espessura do Epitélio Basal); **B)** ID (Distância Interlamelar); **C)** SLL (Comprimento da Lamela Secundária); **D)** SLW (Espessura da Lamela Secundária; **E)** PAGE.

7.2.3. Qualitativa e semi-quantitativa fígado

Uma análise qualitativa das microfotografias do fígado permitiu observar diversas alterações em todos os grupos experimentais. Contudo nos grupos expostos as alterações apresentaram maior extensão e gravidade. (Fig. 12). As alterações encontradas nos animais expostos foram: alargamento dos capilares sinusóides (Fig.

13A), estados hemorrágicos (Fig. 13B), inflamação do tecido hepático (Fig. 13C), e vacuolização generalizada (Fig. 13D).

Contudo, o cálculo do índice patológico hepático não indicou a presença de quaisquer diferenças significativas entre grupos experimentais (One-Way Anova: $F = 2,60$; $g.l.=3,9$; $P = 0,117$), embora tenha havido um aumento crescente deste índice com a concentração de tetraciclina à qual os animais estiveram expostos (Fig. 14).

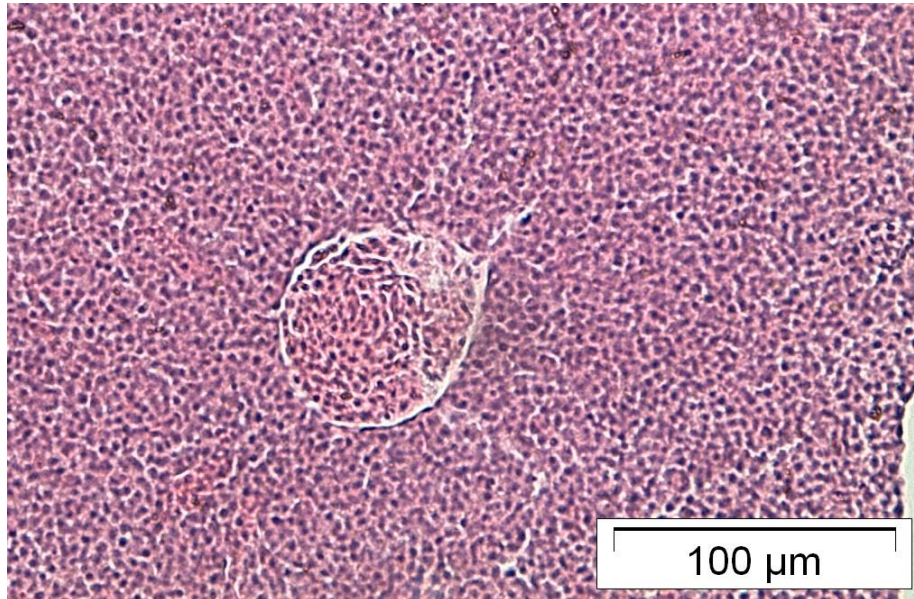


Figura 12. Aparência normal do tecido hepático de *G. holbrooki*, num indivíduo do grupo controlo. Técnica de H&E. Magnificação de 400X.

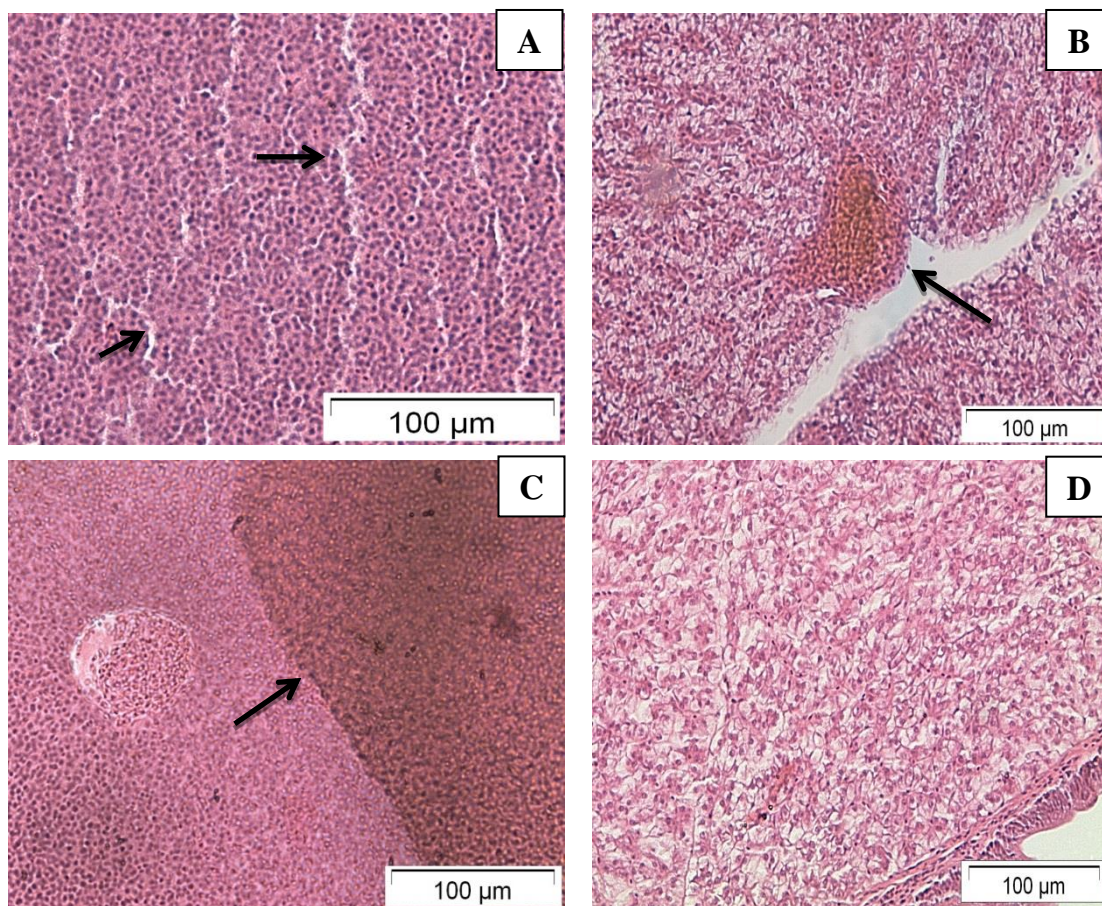


Figura 13. Exemplos de alterações histopatológicas (setas) no tecido hepático de *G. holbrooki* após exposição a concentrações crescentes de tetraciclina durante 96 horas em condições controladas. (A) Alargamento dos sinusóides; (B) Hemorragia; (C) Inflamação; (D) Vacuolização generalizada. Técnica de H&E. Magnificação de 400 X.

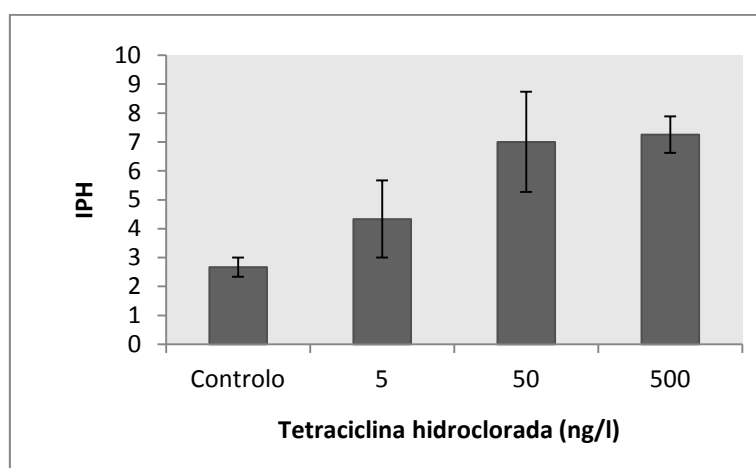


Figura 14. Valores do índice patológico hepático (IPH) (média e erro padrão) em *G. holbrooki* referentes a uma exposição aguda de 96 h a concentrações crescentes de tetraciclina.

8. Discussão

Os antibióticos são usados em larga escala, tanto na medicina humana como veterinária, mas também na agricultura, na apicultura, na pecuária e na aquicultura para tratamento de infecções microbianas, em medidas de profilaxia e como promotores de crescimento (Van den Boggard e Stobberingh, 1999; Kümmerer e Henninger, 2003; Cabello, 2006). O desenvolvimento de novas técnicas de detecção e monitorização ambiental destes compostos, tem permitido detetá-los nos diversos compartimentos aquáticos, o que tem gerado uma crescente preocupação pois, devido às suas características físico-químicas e farmacológicas intrínsecas, podem criar um impacto negativo na saúde ambiental e humana (Hirsch *et al.*, 1999; Boxall *et al.*, 2004; Banik e Hossain, 2006). As tetraciclina são o segundo grupo de antibióticos mais comumente encontrados no ambiente (Gu e Karthikeyan, 2005). Devido a serem maioritariamente excretados por via renal na sua forma inalterada (Chambers, 2001), e por os seus produtos de degradação possuírem menor atividade comparativamente à tetraciclina, podendo mesmo alguns serem transformados no composto original novamente (Kemper, 2008; Sarmah *et al.*, 2006), constata-se um maior interesse por parte da comunidade científica na pesquisa do antibiótico tetraciclina em detrimento dos seus produtos de degradação (Dolliver *et al.*, 2008; Wang e Yates, 2008; Bao *et al.*, 2009).

Durante a metabolização da tetraciclina formam-se radicais livres de oxigénio (ROS) que são facilmente eliminados por ação das enzimas antioxidantes, como por exemplo a catalase e as GSTs. No entanto, se a concentração e/ou o contato com a tetraciclina for o suficientemente elevado, poderá haver a acumulação de ROS, o que causa *stress* oxidativo e poderá levar a danos ao nível das macromoléculas celulares, como peroxidação lipídica, danos na estrutura do DNA, inativação de enzimas, podendo mesmo levar à morte celular (Valko *et al.*, 2005; Gimbert *et al.*, 2006; Regoli *et al.*, 2006). A biotransformação da tetraciclina é capaz de causar *stress* oxidativo por redução da atividade das enzimas antioxidantes e da glutathione reduzida (GSH), sendo responsável por elevar os níveis de peroxidação lipídica (Asha *et al.*, 2007).

Neste trabalho, verificou-se um aumento significativo das atividades tanto da enzima catalase no fígado como das GSTs nas brânquias. Para a catalase a atividade aumentada foi notória e estatisticamente relevante para as três concentrações teste utilizadas comparativamente ao grupo controlo, enquanto para as enzimas GSTs este aumento

somente foi apenas significativo para a concentração teste mais elevada, e só nas brânquias. Paralelamente verificou-se uma diminuição significativa da quantidade de TBARS nas três concentrações utilizadas.

Este aumento da atividade protetora destas enzimas permite concluir que a tetraciclina produziu um efeito pro-oxidante nos organismos testados, sendo este aumento de expressão resultante de uma resposta adaptativa gerada (Sturve *et al.*, 2008). Este tipo de resposta dos organismos na presença de diferentes xenobióticos já foi descrito na literatura, permitindo a monitorização da ação ecotoxicológica destes compostos nos organismos aquáticos (Antunes *et al.*, 2010). Possivelmente, o aumento da atividade destas enzimas permitiu uma proteção eficaz contra os ROS gerados aquando da metabolização da tetraciclina, impedindo ou minimizando assim danos de *stress* oxidativo, como a peroxidação lipídica, o que explica a diminuição da concentração de TBARS (Ozmen *et al.*, 2008; Gravato *et al.*, 2010; Ezemonye e Ikpesu, 2011).

O aumento da atividade das GSTs indica a ativação do metabolismo envolvendo reações de fase II e dos sistemas de defesa antioxidantes (Paulino *et al.*, 2012). Este fenómeno significa que as brânquias estão numa tentativa de eliminar o xenobiótico bem como os ROS, protegendo a células de efeitos como seja a peroxidação lipídica (Ozmen *et al.*, 2008; Gravato *et al.*, 2010; Ezemonye e Ikpesu, 2011).

No entanto, verifica-se que a concentração de TBARS diminuiu significativamente nos grupos teste comparativamente com o grupo controlo, o que sugere uma sobre-expressão destas enzimas integrantes das defesas antioxidantes. Este efeito pode ter levado a um aumento da eficácia do mecanismo de proteção contra os ROS gerados pela presença deste composto, levando a uma neutralização de outros ROS gerados endogenamente.

No caso da enzima acetilcolinesterase, os resultados obtidos não evidenciaram alterações estatisticamente significativos comparativamente com o grupo controlo. Isto pode sugerir que a tetraciclina não exerce efeitos sobre a atividade desta enzima. Seria interessante, através de um ensaio crónico ou aumentando as concentrações utilizadas, verificar quais os potenciais efeitos sobre este biomarcador, nomeadamente em termos da sua inibição. Esta inibição enzimática a concentrações maiores já foi mencionada em alguns estudos com químicos anticolinesterásicos, como pesticidas e carbamatos

(Gupta, 1994; Bretaud *et al.* 2000), organofosfatos e metais pesados (Fossi *et al.*, 2001; Fulton e Key, 2001; Sanchez, 2001). Um outro estudo, demonstrou que para o antibiótico enrofloxacina não houve impacto sobre a atividade, no entanto para o antibiótico furazolidona houve uma diminuição da atividade da enzima AChE mais acentuada (Tu *et al.*, 2009).

As brânquias encontram-se em contato íntimo e direto com o meio aquático, estando expostas a todos os compostos que nele estejam presentes, sendo por isso consideradas órgãos alvo primário para a toxicidade, sendo bastante sensíveis a alterações na qualidade da água (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Mazon *et al.*, 2002; Fernandes e Mazon, 2003). Alterações nos parâmetros ambientais na maioria das vezes provocam danos nas brânquias, exatamente por estarem em contato direto com o meio ambiente (Parashar e Banerjee, 2002). Além disso, são órgãos que apresentam uma extensa área de superfície, bem como uma distância de difusão muito reduzida entre o oxigênio dissolvido e os capilares sanguíneos, permitindo uma eficiente troca gasosa (Sayed *et al.*, 2012). No entanto as brânquias possuem outras funções não menos importantes como sejam a osmorregulação e excreção (Hughes, 1984; Wood e Soivio, 1991).

De uma forma global, as alterações tecidulares observadas foram levantamento epitelial, fusão das lamelas secundárias, hipertrofia da lamela primária, aneurisma e necrose. O levantamento epitelial, bem como a sua fusão lamelar, leva a uma redução drástica da área de superfície e por conseguinte um aumento da distância de difusão, pelo que as trocas gasosas podem estar comprometidas (Skidmore e Tovell, 1972; Sayed *et al.*, 2012). No entanto, os peixes têm a capacidade de aumentar a taxa de ventilação de forma a compensar esta deficiência nas trocas gasosas (Fernandes e Mazon, 2003). Contudo, qualquer descontinuidade verificada no epitélio leva a um balanço iônico negativo e a alterações compensatórias no hematócrito e nos valores médios de hemoglobina celulares no sangue (Peuranen *et al.*, 1994). No entanto, estas alterações como levantamento epitelial, fusão e hipertrofia, apesar de nefastas, consideram-se uma resposta adaptativa reversível, ou seja, são um mecanismo de defesa desenvolvido por parte do organismo aos agressores externos, pois no geral estas alterações resultam num aumento da distância entre o meio externo e o sangue servindo assim como uma barreira à entrada de contaminantes (Hinton e Laurén, 1990; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003).

Os aneurismas observados configuram-se como alterações potencialmente mais deletérias. Os aneurismas são lesões que podem ocorrer devido a um aumento do fluxo de sangue levando à ruptura das células pilar e perda de integridade vascular (Heath, 1987; Stentiford *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2004), ou podem ser devido a uma ação direta por parte do contaminante (Temminck, 1983).

Foi igualmente possível observar danos necróticos nos tecidos dos animais expostos. A necrose é uma alteração degenerativa que possui um elevado fator de importância por ser geralmente irreversível, e é considerada um efeito direto dos contaminantes, pelo que o seu contato se persistir ou progredir pode levar a perda parcial ou total da função do órgão em causa (Nero *et al.* 2006).

Normalmente estas alterações, excluindo a necrose, são reversíveis, embora a reversibilidade de um aneurisma seja mais difícil quando comparada com a reversibilidade de alterações ao nível do epitélio (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Estas lesões são consideradas não específicas para o contaminantes em estudo, podendo ocorrer para uma grande variedade de xenobióticos (Mallat, 1985). Geralmente as alterações histopatológicas ao nível das brânquias resultam em hipoxia, falência respiratória e problemas com o balanço iónico e ácido-base (Alazemi *et al.*, 1996; Yasser e Naser, 2011), tornando o organismo mais suscetível a infeções secundárias e podendo provocar inclusive a morte (Hawkins *et al.*, 1984).

A análise semi-quantitativa das brânquias permitiu definir com mais clareza a importância das alterações encontradas, tendo-se verificado que em concentrações maiores de tetraciclina, o índice patológico é maior e estatisticamente significativo para as concentrações de 50 ng/l e 500 ng/l, ou seja, as lesões histopatológicas encontradas para estas concentrações são significativas quanto à sua importância e extensão. Contudo, de acordo com o valor de PAGE, verificou-se que não houve diminuição da proporção da lamela secundária implicada nas trocas gasosas, ou seja, a área de superfície respiratória não foi afetada (Nero *et al.*, 2006).

O estudo das alterações tecidulares do fígado pode servir como um indicador de toxicidade e, tal como as brânquias, é útil na análise dos efeitos de exposição de organismos aquáticos a contaminantes presentes no meio ambiente (Fernandes *et al.*, 2008).

Através de uma análise qualitativa verificou-se a presença de determinadas lesões hepáticas como sejam o alargamento dos capilares sinusóides, hemorragias, sinais inflamatórios e vacuolização generalizada.

A vacuolização generalizada pode ser descrita como um sinal de um processo degenerativo devido a danos metabólicos correlacionado com a exposição ao contaminante (Pacheco e Santos, 2002), ou devido a um processo metabólico normal do fígado, associado por exemplo ao regime alimentar (Camargo e Martinez, 2007). Houve também evidências desta alteração histopatológica em peixes expostos a metais, como cobre, cádmio e zinco (Arellano *et al.*, 1999; Van Dyk *et al.*, 2007). A mesma alteração foi também encontrada em peixes expostos a outros tipo de contaminantes como metais pesados (Van Heerden *et al.*, 2004; Olojo *et al.*, 2005; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007), herbicidas (Olurin *et al.*, 2006) e inseticidas, como a deltametrina e o malatião (Cengiz e Unlu, 2006; Costa *et al.*, 2009). Esta alteração foi também encontrada em dois outros estudos sobre a influência da tetraciclina em ratos (Machado *et al.*, 2003; Shabana *et al.*, 2012). Um outro estudo indicou que a tetraciclina é responsável por esteatose, ou seja, acumulação de gordura no fígado (Amacher e Martin, 1997).

No entanto estas alterações, segundo a análise semi-quantitativa aplicada, não foram estatisticamente significativas. Um estudo efetuado em peixes, onde se analisou os efeitos da oxitetraciclina (composto análogo à tetraciclina), mostrou que esta pode causar danos deletérios no fígado (Bruno, 1989). Nos ratos, a oxitetraciclina foi responsável pela indução de sinais de toxicidade nos rins e fígado (Gnanasoundari e Pari, 2006; Pari e Gnanasoundari, 2006).

A presença de tetraciclina levou a um aumento das enzimas catalase no fígado e das GSTs nas brânquias o que se deve a uma resposta adaptativa do organismo. Sendo a peroxidação lipídica um efeito resultante do *stress* oxidativo, uma vez que o conteúdo em TBARS diminui ao longo do tempo, pode-se concluir que a célula não entrou em *stress* oxidativo, e que o aumento do sistema antioxidante foi suficiente para minimizar e/ou inibir os potenciais efeitos tóxicos dos ROS. Contudo a análise histopatológica indicou danos significativos nomeadamente ao nível das brânquias. o que pode ser devido a um contato direto da tetraciclina com o órgão, como também pode ser devido a que o tempo de exposição e/ou as concentrações utilizadas de tetraciclina tenham sido suficientes para provocar *stress* oxidativo. Mesmo com o aumento das isoenzimas

antioxidante GSTs, a produção de ROS foi o suficientemente elevada para causar danos histopatológicos ao nível das brânquias. No fígado as lesões tecidulares não foram estatisticamente significativas o que pode ser explicado pelo facto de as concentrações de tetraciclina usadas no estudo não serem suficientes para provocar *stress* oxidativo ao nível dos hepatócitos e por sua vez danos ao nível tecidual, pelo que o aumento das enzimas antioxidantes pode ter sido suficiente para combater o ROS gerados.

9. Conclusão

Os compostos farmacêuticos são considerados poluentes emergentes, tendo os estudos ecotoxicológicos efetuados mostrado que mesmo em concentrações subterapêuticas estes compostos são capazes de ter um impacto importante sobre os ecossistemas aquáticos (Barceló, 2003; Deblonde *et al.*, 2011). A atenção dada ao estudo destes compostos tem aumentado nestes últimos anos, graças ao aparecimento de novas técnicas analíticas que promoveram uma quantificação destes compostos com limiares mais baixos, e a descoberta da presença de novas substâncias nos vários ecossistemas aquáticos (Kümmerer, 2001; Pfluger e Dietrich, 2001; Zuccato *et al.*, 2006).

A entrada constante destes compostos no compartimento aquático por via de diversas atividades humanas, e a falha na sua depuração nas estações de tratamento convencionais leva a que os organismos aquáticos estejam cronicamente expostos aos fármacos (Ternes e Wilken, 1999; Seifrtová *et al.*, 2009). Esta exposição pode conduzir à ocorrência de efeitos deletérios nos organismos, podendo estes efeitos ser cumulativos ao longo de gerações e produzir desequilíbrios nos ecossistemas (Daughton e Ternes, 1999). A capacidade destes compostos levar a várias alterações nos organismos expostos mesmo em concentrações residuais, deve-se ao facto de estes compostos terem sido desenhados para interagir com os organismos biológicos através de diversos mecanismos, tendo características químicas e físicas que os tornam biologicamente ativos (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2002).

Os antibióticos fazem parte deste grupo de substâncias emergentes, sendo o seu impacto aumentado devido ao seu consumo mundialmente elevado em comparação com outros compostos farmacêuticos (Kümmerer, 2003). A presença deste grupo de substâncias tem gerado preocupação em torno do seu potencial risco para o ambiente e para a saúde pública, sendo encontrados compostos desta família em concentrações de ng/l até µg/l

no meio aquático (Hirsch *et al.*, 1999; Boxall *et al.*, 2004; Banik e Hossain, 2006). A tetraciclina representa o segundo antibiótico mais comumente encontrado a nível ambiental, sendo este composto largamente utilizado devido à sua eficácia no tratamento de infecções bacterianas tornando-se evidente a importância da determinação do seu impacto ecotoxicológico (Chopra e Roberts, 2001; Gu e Karthikeyan, 2005).

A exposição aguda às concentrações crescentes de tetraciclina permitiu verificar que este composto tem potencialmente a capacidade de exercer uma ação pro-oxidativa, podendo, em concentrações superiores às utilizadas neste ensaio, levar a uma resposta de *stress* oxidativo e gerar danos peroxidativos graves. No entanto, dos danos obtidos por este ensaio, apenas permitiu verificar uma ação indutora das defesas antioxidantes nomeadamente da enzima catalase no fígado e das glutathione-S-transferases nas brânquias, e ainda uma diminuição dos danos lipoperoxidativos no fígado expressos pela diminuição da concentração dos níveis de TBARS neste órgão. A nível da histologia apenas foram observadas alterações significativas nas brânquias, sendo as alterações histológicas encontradas no fígado não significativas. Os resultados da histopatologia sugerem que este composto é capaz de gerar alterações tecidulares na arquitetura branquial, na maioria inespecíficas e reversíveis, embora sem aparentemente comprometer a função respiratória.

Os dados obtidos neste trabalho são originais e têm relevância ecológica, pelo que seria imperativo a monitorização ambiental desta substâncias e a procura de métodos eficazes para a sua remoção das águas residuais.

10. Bibliografia

Adams, S.M., Shepard, K.L., Gredley, Jr., Jimenez, M. S., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutants stress on fish, *Environmental Research*, 28 (1-4), pp. 459-464.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 6, pp. 105–121.

Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B. (1996). Gill damage in the fresh water fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study, *Environmental Technology*, 17 (3), pp. 225–238.

Amacher, D.E., Martin, B.A. (1997). Tetracycline-induced steatosis in primary canine hepatocyte cultures, *Fundamental an Applied Toxicology*, 40 (2), pp. 256-263.

Antunes, S.C., Marques, S.M., Pereira, R., Gonçalves, F., Nunes, B. (2010). Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution, *Journal of Environmental Monitoring*, 12 (8), pp. 1625-1630.

Arellano, J. M., Storch, V. e Sarasquete, C. (1999). Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, pp. 62-72.

Arthington, A.H., Hamlet, S., Bluhdorn, D.R. (1990). The role of habitat disturbance in the establishment of introduced warm-water fishes in Australia. In: Pollard, D.A. (Ed.). *Introduced and translocated fishes and their ecological effect*. Canberra, Australian Government Publishing Service.

Arthington, A.H., Marshall, C.J. (1999). Diet of the exotic mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in an Australian lake and potential for competition with indigenous fish species, *Asian Fisheries Science*, 12 (1), pp. 1-16.

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, an antioxidants in human health and disease, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75 (2), pp. 199-212.

Asha, K.K., Sankar, T.V., Nair, P.G.V. (2007). Effect of tetracycline on pancreas and liver function of adult male albino rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59, pp. 1241-1248.

- Atli, G., Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & pharmacology*, 145 (2), pp. 282-287.
- Baber, D.A., Harris, S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review, *American Pharmacy*, 34 (9), pp. 26-35.
- Banik, K.K., Hossain, S. (2006). Pharmaceuticals in drinking water: a future water quality threat, *Indian Journal of Environmental Protection*, 26 (10), pp. 926-932.
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y. (2009). Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures, *Waste Management*, 29 (4), pp. 1416–1423.
- Barber, A.A., Bernheim, F. (1967). Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues, *Advances in Gerontology Research*, 2, pp.355-403.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10), pp. 15-16.
- Barnes, K.K., Koplín, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States-I-Groundwater, *The Science of the Total Environment*, 402 (2-3), pp. 192-200.
- Barynin, V.V., Whittaker, M.M., Antonyuk, S.V., Lamzin, V.S., Harrison, P.M., Artymiuk, P.J., Whittaker, J.W. (2001). Crystal structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus plantarum*, *Structure*, 9 (8), pp. 725-738.
- Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S. (2006). Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA, *Chemosphere*, 64 (11), pp. 1936-1971.
- Bence, J.R., Murdoch, W.W. (1986). Prey size selection by the mosquitofish: relation to optimal diet theory, *Ecology* 67(2), pp. 324-336.
- Bendz, D., Paxéus, T.R., Ginn, F.J., Loge F.J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden, *Journal of Hazard Materials*, 122 (3), pp. 195-204.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases*, 22 (1), pp. 25-34.

Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Pemberton, E.J., Croxford, A. (2004). Veterinary medicines in the environment, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 180, pp. 1-91.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P. (2000). Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47 (2), pp. 117-124.

Bruno, D.W. (1989). An investigation into oxytetracycline residues in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, *Journal of Fish Diseases*, 12 (2), pp. 77-86.

Bucheli, T.D., Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25 (3), pp. 201-268.

Bucher F., Hofer R. (1993). The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*), *Water Research*, 27 (2), pp. 255-261.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 52, pp. 302-310.

Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (2), pp. 535-543.

Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environmental Microbiology*, 8 (7), pp. 1137-1144.

Cabral, J. A., Marques, J. C. (1999). Life history, populations, Dynamics and production of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki* (Pisces, Poeciliidae), in rice

fields of the lower Mondego River Valley, western Portugal, *Acta Oecologica*, 20, pp. 607-620.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003). Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy, *Environmental Science & Technology*, 37 (7), pp. 1241-1248.

Câmara Municipal de Águeda – CMA (2013). Pateira de Fermentelos. [Em linha]. Disponível em http://www.cmagueda.pt/PageGen.aspx?WMCM_PaginaId=28901. [Consultado em 25/06/2013].

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream, *Neotropical Ichthyology*, 5 (3), pp. 327–336.

Casida, J.E., Quistad, G.B. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of non acetylcholinesterase secondary targets, *Chemical Research in Toxicology*, 17 (8), pp. 983-998.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 1092 (2), pp. 206-215.

Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (9), pp. 1482-1495.

Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions, *Chemistry and Physics of Lipids*, 157 (1), pp. 1-11.

Cengiz, E., Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquito fish, *Gambusia affinis*: A microscopic study, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, pp. 246-253.

Chaidemenos, G.C. (2001). Tetracycline and niacinamide in the treatment of blistering skin diseases, *Clinics in Dermatology*, 19 (6), pp. 781-785.

Chambers, H.F. (2001). Cloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin and streptogramins. In: Katzung, B. G. (Ed). *Basic and Clinical Pharmacology*, 8ª ed., Nova Iorque, Mc-Graw-Hill, pp.774-783.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews*, 59 (3), pp. 527-605.

Chen, W.R., Huang, C.H. (2009). Transformation of tetracyclines mediated by Mn(II) and Cu(II) ions in the presence of oxygen, *Environmental Science & Technology*, 43 (2), pp. 401-407.

Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), pp. 232-260.

Clemente, G. (2011). Estudo Comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para o cálculo da lipofilia molecular, *Saúde e Tecnologia*, 5, pp. 29-34.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology Letters*, 142 (3), pp. 185-94.

Cogo, A.J.D., Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G. (2009). Utilização de enzimas de estresse oxidativo como biomarcadores de impactos ambientais, *Natureza on line*, 7 (1), pp. 37-42.

Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G. (2008).A Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação, *Química Nova*, 31 (7).

Costa, P., Diniz, M., Caiero, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A., Caetano, M., Valec, C., DelValls, A., Costa, M. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach, *Aquatic Toxicology*, 92, pp. 202-212

Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes?, *Environmental Health Perspectives*, 107 (6), pp. 907-938.

Deblonde, T., Cossu-Leguilla, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, pp. 442-448.

Decreto-lei nº152/97, de 19 de Junho - Transpõe para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de Maio de 1991, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas.

Díaz-Cruz, M.S., Alda, M.J.L. de, Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (6), pp. 340-351.

Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 (12), pp. 1103-1123.

Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S. (2008). Antibiotic degradation during manure composting, *Journal of Environmental Quality*, 37 (3), pp. 1245–1253.

Duysen, E.G., Li, B., Darvesh, S., Lockridge, O. (2007). Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (–)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer’s disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission, *Toxicology*, 233 (1-3), pp. 60-69.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology* 7, pp. 88–95.

Ezemonye, L.I., Ikpesu, T.O. (2011). Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*, *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9), pp. 1898–1903.

Fergusson, H.W. (1989). *Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa, State University Press.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., Salgado, M.A. (2008). Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical

effects in *Liza saliens*, *Environmental Monitoring and Assessment*, 145 (1-3), pp. 315–322.

Fernandes, M. N., Mazon, A.F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A. L., Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield, Science Publishers, pp. 203-231.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium, of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27 (3), pp. 103-109.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., Reis-Henriques, M.A. (2006). Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51 (4), pp. 626–632.

Filho, D.W. (1996), Fish antioxidant defences- a comparative approach, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29 (12), pp. 1735-1742.

Flores-Lopes, F., Thomaz, A.T. (2011). Histopathologic alterations observed in fish gills as a toll in environmental monitoring, *Brazilian Journal of Biology*, 71 (1), pp. 179-188.

Fossi, C., Minutoli, R., Guglielmo, L. (2001). Preliminary results of biomarker responses in zooplankton of brackish environments, *Marine Pollution Bulletins*, 42 (9), pp. 745–748.

Freitas, C.E., Siqueira-Souza, F.K. (2009). O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia Amazônica, *Revista Agrogeoambiental*, 1 (2), pp. 39-45.

Fulton, M.H., Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects, *Environmental Toxicology Chemistry*, 20 (1), pp. 37-45.

Galat, D.L., Robertson, B. (1992). Response of endangered *Poeciliopsis occidentalis sonoriensis* in the Rio Yaqui drainage, Arizona, to introduced *Gambusia affinis*, *Environmental Biology of Fishes*, 33 (3), pp. 249-264.

George, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Ostrander (Ed.). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. New York, Lewis Publishers, pp. 37-85.

Gherardi-Goldstein, E., Bertolotti, E., Zagatto, P.A., Araújo, R.P.A., Ramos, M.L.L.C. (1990). *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB).

Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.M. (2006). Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*, *Environment International*, 32 (7), pp. 866-875.

Global Invasive Species Database (2010). *Gambusia holbrooki*. [Em linha]. Disponível em <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=617&fr=1&sts=&lang=EN>. [Consultado em 15/04/2013].

Gnanasoundari, M., Pari, L. (2006). Impact of naringenin on oxytetracycline-mediated oxidative damage in kidney of rats, *Renal Failure*, 28 (7), pp. 599-605.

Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P.E. (1995). Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450, *Critical Reviews in Toxicology*, 25, pp. 25-65.

Golet, E.M. Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W. (2002). Determination of fluorquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction, *Analytical Chemistry*, 74 (21), pp. 5455-5462.

Gómez, M.J., Martínez, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Aguera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere*, 66 (6), pp. 993-1002.

Gravato, C., Guimarães, L., Santos, J., Faria, M., Alves, A., Guilhermino, L. (2010). Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NM Portugal), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (4), pp. 524–533.

Gu, C., Karthikeyan, K.G. (2005). Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides, *Environmental Science & Technology*, 39 (8), pp. 2660-2667.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M. (1998). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate insecticides be questioned?, *Biomarkers*, 3 (2), pp. 157-163.

Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J., Soares, A.M. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring, *The Science of the Total Environment*, 247 (2-3), pp. 137-141.

Gupta, R.C. (1994). Carbofuran toxicity, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43 (4), pp. 383–418.

Gutteridge, J.M.C. (1988). Lipid Peroxidation: some problems and concepts. In: Halliwell, B. (Ed.). *Oxygen Radicals and Tissue Injury*. Bethesda, M.D., FASEB.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases—the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), pp. 7130–7139.

Halling-Sorensen, B., Nielson, B.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H.C.H., Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review, *Chemosphere*, 36 (2), pp. 357-393.4

Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Tjornelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, pp. 7–16.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York, Oxford University, p. 936.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York, Oxford University Press, p. 851.

Hammerscher, G., Sczesny, S., Hoper, H., Nau, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 74 (7), pp. 1509-1518.

Hawkins, W.E., Overstreet, R.M., Provancha, M.J. (1984). Effects of space shuttle exhaust plumes on gills of some estuarine fishes: a light and electron microscopic study, *Harold W. Manter Laboratory of Parasitology*, 7, pp. 297–309.

Heath, A. G. (1987). *Water pollution and fish physiology*. Boca Raton, CRC Press.

Hernández-Moreno, D., Soler, F., Míguez, M.P., Pérez-López, M. (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde, and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin, *The Science of the Total Environment*, 408, pp. 4976-4983.

Hibiya, T. (1982). *An atlas of fish histology, normal and pathological features*. New York, Gustav Fischer Verlag.

Hinton, D.E., Baumen, P.C., Gardener, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okhiro, M.S. (1992). Histopathological biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Chelsea, MI., Lewis Publishers, pp. 155–210.

Hinton, D. E., Laurén, D. J. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton, Lewis Publishers.

Hirsch, R., Ternes, R., Haberer, K., Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of the Total Environment*, 225 (1-2), pp. 109-118.

Howe, E.H.I. (1995). Studies in the biology and reproductive characteristics of *Pseudomugil signifier*. [Em linha]. Disponível em <http://hdl.handle.net/10453/20211> [Consultado em 02/05/2013].

Hughes, C.M. (1984). General anatomy of the gills. In: Hoar, R.D.J., Marshal, W.S. (Eds.). *Fish Physiology*. New York, Academic Press, pp. 1–72.

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (2013). Convenção Ramsar. [Em linha]. Disponível em <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/ei/ramsar>. [Consultado em 25/04/2013].

Ivanstoffs, W., Aarn (1999). Detection of predation on Australian native fishes by *Gambusia holbrooki*, *Marine and Freshwater Research*, 50 (5), pp. 467-468.

Jesus, T.B., Carvalho, C.E.V. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg), *Oecologia Brasiliensis*, 12 (4), pp. 680-693.

Jia, A., Xiao, Y., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S. (2009). Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, pp. 4655-4662.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals, *Water Research*, 36 (20), pp. 5013-5022.

Kehrer, J.P., Biswal, S.S. (2000). The molecular effects of acrolein, *Toxicological Sciences*, 57 (1), pp. 6-15.

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators*, 8 (1), pp. 1-13.

Khessiba, A., Roméo, M., Aissa, P. (2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane, *Environmental Pollution*, 133 (2), pp. 275-281.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (21), pp. 8897-8901.

Knight, J. (1999). *Density dependent interference competition between the Australian native fish Pseudomugil signifer (Kner, 1865) and the introduced poeciliid Gambusia holbrooki (Girard, 1859). Integrated project prepared as partial fulfilment of the requirements of the Bachelor of Applied Science (Fisheries and Aquaculture Management)*. Lismore, Southern Cross University.

Koetzner, L., Woods, J.H. (2002). Characterization of butyrylcholinesterase antagonism of cocaine-induced hyperactivity, *Drug Metabolism and Disposition*, 30 (6), pp. 716-723.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A. (2003). Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere*, 51 (2), pp. 69-75.

Kümmerer, K. (2001). Introduction: pharmaceuticals in the environment. In: Kümmerer, K. (Ed.). *Pharmaceuticals in the environment: source, fate, effects and risk*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 1-7.

Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (1), pp. 5-7.

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, *Chemosphere*, 75, pp. 417-434.

Kümmerer, K., Henninger, A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospital and households into effluents, *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (12), pp. 1203-1214.

Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1094 (1-2), pp. 122-129.

Lee, S.H., Oe, T., Blair, I.A. (2001). Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins, *Science*, 292 (5524), pp. 2083-2086.

Lima, E.S.L., Abdalla, D.S.P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37 (3), pp. 293-303.

Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., Hänninen, O. (1981). Extrahepatic xenobiotic metabolism in north-European freshwater fish, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 69 (2), pp. 259-263.

Lloyd, L.N. (1984). Ecological interactions of *Gambusia holbrooki* with Australian native fishes. In: Pollard, D.A. (Ed.). *Introduced and translocated fishes and their ecological effect*. Canberra, Australian Government Publishing Service.

Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., Hanke, G. (2007). Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4), pp. 1469-1478.

Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G. (1993). A comparative search for free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 105 (3-4), pp. 757-763.

Machado, A.L.S., Brandão., A.A.H., da Silva, C.M.O.M., da Rocha, R.F. (2003), Influence of tetracycline in the hepatic and renal development of rat's offspring, *Brazilian Achieves of Biology and Technology*, 46 (1), pp. 47-51.

Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42 (4), pp. 630-648.

Marshall, W.S., Bryson, S.E. (1998). Transport mechanisms of seawater teleost choride cells: an inclusive model of a multifunctional cell, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 119 (1), pp. 97-106.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. (2004). Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Brazilian Journal of Biology*, 64 (4), pp. 797-807.

Masson, P., Froment, M.T., Fortier, P.L., Visicchio, J.E., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1998). Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387 (1-2), pp. 41-52.

Masson, P., Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494 (2), pp. 107–20.

Mazon, A.F., Monteiro, E.A., Pinheiro, G.H., Fernandes, M.N. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*, *Brazilian Journal of Biology*, 62 (4A), pp.621-631.

McDowall, R.M. (1996). Family Poeciliidae: Livebearers. In: McDowall, R.M. (Ed.). *Freshwater fishes of south-eastern Australia*. Chatswood, Reed Books.

Meffe, G.K. (1984). Effects of abiotic disturbance on coexistence of predator-prey fish species, *Ecology*, 65 (5), pp. 1525-1534.

Merrick, J.R., Schmida, G.E. (1984). *Australian freshwater fishes: Biology and Management*. Australia, J.R. Merrick.

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, *Journal of Chromatography A*, 952 (1-2), pp. 139-147.

Miller, M.R., Hinton, D.E., Stegman, J.J. (1989). Cytochrome P-450E induction and localization in gill pillar (endothelial) cells of scup and rainbow trout, *Aquatic Toxicology*, 14 (4), pp. 307-322.

Moldovan, Z. (2006). Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania, *Chemosphere*, 64 (11), pp. 1808-1817.

Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42 (11), pp. 1772–1782.

Murphy, S.D. (1986). Pesticides. In: Doull, J., Klassen, C.D., Anders, M.O. (Eds.). *The Basic Science of Poisons*. New York, Macmillan, pp. 519-581.

Myers S.M., Johnson L.L., Olson O.P., Stehr C.M., Lomax D.P., Horness B.H., Anulacion B.F., Willis M.L., Collier T.K., McCain B.B., Stein J.E. & Varanasi U. (1994). Toxicopathic hepatic lesions and other biomarkers of exposure to chemical contaminants in marine bottomfish species from the northeast and Pacific coast, U.S.A. In: Bylund, G., Loennstroem, L.-G. (1994). *Diseases and Parasites of Flounder (Platichthys flesus) in the Baltic Sea*. Turku/Abo, Baltic Marine Biologists Publication, pp. 81-98.

Nero, V., Farwell, A., Lee, L.E.J., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G. (2006). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65 (2), pp. 252–264.

Nigam, S., Schewe, T. (2000). Phospholipase A2s and lipid peroxidation, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488 (1-2), pp. 167–181.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council (1987). Biological markers in environmental health research, *Environmental Health Perspectives*, 74, pp. 3-9.

NSW National Parks and Wildlife Service (2003). *NSW Threat Abatement Plan. Predation by *Gambusia holbrooki* – The Plague Minnow*. NPWS. Hurstville, NSW.

Nunes, B., Gaio, A.R., 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*, 72 (2), pp. 341-354.

OECD/OCDE (1998). OECD Guideline for testing of chemicals: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.

Olojo, E.A.A., Olurin, K.B., Mbaka, G., Oluwemimo, A.D. (2005). Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish, *Clarias gariepinus* exposed to lead, *African Journal of Biotechnology*, 4 (1), pp. 117-122.

Olurin, K.B., Olojo, E.A.A., Mbaka, G.O., Akindele, A.T. (2006). Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate, *African Journal of Biotechnology*, 5, pp. 2480-2487.

Oronsaye J.A.O. (1989). Histological changes in the kidneys and the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., exposed to dissolved cadmium in hard water, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 17, pp. 279-290.

Ozmen, M., Ayas, Z., Gungurdu, A., Ekmekci, G.F., Yerli, S. (2008). Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (1), pp. 167-173.

Pacheco, M., Santos, M.A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effect of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53 (3), pp. 331-347.

Parashar, R.S., Banerjee, T.K. (2002). Toxic impact of lethal concentration of lead nitrate on the gills of air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch), *Veterrinarski Arhiv*, 72 (3), pp. 167-183.

Pari, L., Gnanasoundari, M. (2006). Influence of naringenin on oxytetracycline mediated oxidative damage in rat liver, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98 (5), pp. 456-461.

Paulino, M.G., Souza, N.E.S., Fernandes, M.N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, *Ecotoxicological Environment Safety*, 80, pp. 6-13.

Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland, *Marine Pollution Bulletin*, 32 (2), 225-231.

Peakall, D. W. (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman & Hall, London.

Pereira, B. (1994). Exercício físico como pro-oxidante, *Revista Paulista de Educação Física*, 8 (2), pp. 77-89.

Perry, S.F., Laurent, P. (1993). Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.). *Fish Ecophysiology*. London, Chapman & Hall Fish and Fisheries Series, pp. 231–264.

Péry, A. R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J. (2008). Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates, *Chemosphere*, 73 (3), pp. 300-304.

Peuranen, S., Vuorinen, P. J., Vuorinen, M., Hollender, A. (1994). The effect of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*). *Annales Zoologici Fennicii*, 31 (4), pp. 389-396.

Pflugger, P., Dietrich, D.R. (2001). Effects on pharmaceuticals in the environment – an overview and principle considerations. In: Kümmerer, K. (Ed). *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Berlim, Springer, pp. 11-17.

Pickens, M.S.M., Tang, L.B. (2009). *Antibiotics, Polyketides*. Encyclopedia of Industrial Biotechnology, John Wiley & Sons, Inc.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford, Fishing News Books.

Potera, C. (2000). Drugged drinking water, *Environmental Health Perspectives*, 108 (10), pp. 446-449.

Rand, G.M. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental fate and Risk Assessment*. Washington DC, Taylor & Francis.

Randall, D.J., Brauner, C.J. (1998). Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 119 (1), pp. 3-8.

Reemstma, T., Jekel, M. (2006). *Organic pollutants in the water cycle: properties, occurrence, analysis and environmental relevance for polar compounds*. Berlim, Willeu-VCH.

Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F. (2006). Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach, *Environmental Health Perspectives*, 114 (1), pp. 63-69.

Ribo, J.M. (1997). Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay, *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12 (4), pp. 283-294.

Roberts, M. (2003). Tetracycline therapy: update, *Clinical Infectious Diseases*, 36 (4), pp. 462-467.

Ronco, A., Báez, M.C.D., Granados, Y.P. (2004). Conceptos generales; Monitoreo ambiental; Elementos básicos requeridos para la implementación de pruebas en análisis rutinarios. In: Morales, G.C. (Ed.). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Ottawa, ON, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, pp. 17-36.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H-J., Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany, *Journal of Chromatography A*, 938 (1-2), pp. 199-210.

Sanchez, J.C. (2001). Wildlife exposure to organophosphorus insecticides, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, pp. 21–63

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B., (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere*, 65(5), pp. 725-759.

Sayed, A.E.D.H., Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M. (2012). Histopathological Alterations in some Body Organs of Adult *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to 4-Nonylphenol. In: Garcia, M.D. (Ed.). *Zoology*. InTech, pp. 163-184.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, pp. 75-86.

Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters, *Analytica Chimica Acta*, 649 (2), pp. 158–179.

Shabana, M.B., Ibrahim, H.M., Khadre, S.E.M., Elemam, M.G. (2012). Influence of rifampicin and tetracycline administration on some biochemical and histological parameters in albino rats, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 65 (5), pp. 299-308.

Sijm, D.T.H.M., Opperhuizen, A. (1989). Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.). *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes*. Berlin, Springer, pp. 163-235.

Skidmore, J.F., Tovell, P.W.A. (1972). Toxic effect of zinc sulphate on the gill of rainbow trout, *Water Research*, 6 (3), pp. 217-228.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowlwe, 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. In: Huggart, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.). *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Chelsea, MI, Lewis Publishers, pp. 235-335.

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants, *Marine Environmental Research*, 55 (2), pp. 137–159.

Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M. (2000). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, pp. 1607-1615.

Sturve, J., Almroth, B.C., Forlin, L. (2008). Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (3), pp. 446-452.

Talesa, V., Contenti, S., Principato, G.B., Pascolini, R., Giovannini, E., Rosi, G. (1992). Cholinesterases from *Maia verrucosa* and *Palinurus vulgaris*: a comparative study, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 101 (3), pp. 499-503.

Tauxe-Wuersch, A., Alencastro, L.F. de, Grandjean, D., Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment, *Water Research*, 39 (9), pp. 1761-1772.

Temmink, J.H.M., Bowmieister, P.J., Jong, P., van der Berg, J.H.J. (1983). An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Aquatic Toxicology*, 4 (2), pp. 165-179.

Ternes, T., Wilken, R.D. (1999). Drugs and hormones as pollutants of the aquatic environment: determination and ecotoxicological impacts, *The Science of the Total Environment*, 225 (1-2), pp. 1-2.

Timbrell, J.A. (1998). Biomarkers in toxicology, *Toxicology*, 129 (1), pp. 1-12.

Triebkorn, R., Kohler, H.R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Muller, E.F. (1997). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field?, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6 (1), pp. 57-73.

Tu, H.T., Silvestre, F., Scippo, M-L., Thome, J-P., Phuong, N.T., Kestemont, P. (2009). Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (5), pp. 1463-1470.

Uchida, K. (1999). Current status of acrolein as a lipid peroxidation product, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9 (5), pp. 109-113.

Ueng, Y.F., Ueng, T.H. (1995). Induction and purification of Cytochrome-P450 1A1 from 3-Methylcholanthrene-Treated Tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322 (2), pp. 347-356.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (10), pp. 1161-1208.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (2), pp. 57-149.

van den Boggard, A.E., Stobberingh E.E. (1999). Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health, *Drugs*, 58 (4), pp. 589-607.

Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Van Vuren, J.H.J. (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, pp. 432-440.

Van Dyk, V., Jacobus, C. (2005). *Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation*, Tese de Doutorado. Joahannesburg, University of Joahannesburg.

Van Heerden, D., Vosloo, A., Nikinmaa, M. (2004). Effects of short-term, copper exposure on gill structure metallothionein and hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 69, pp. 271-280.

Ventura, E.C., Gaelzer, L.R., Zanette, J., Marques, M.R., Bairy, A.C. (2002). Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast, *Marine Environmental Research*, 54 (3-5), pp. 775-779.

Verenitch, S.S., Lowe, C. J., Mazumder, A. (2006). Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1116 (1-2), 193-203.

Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options, *Journal of Hydrology*, 389 (3-4), pp. 416-428.

Vethaak A.D. (1994). The use of mesocosms to study disease in flounder (*Platichthys flesus*). In: Bylund, G., Loennstroem, L.G. (1994). *Diseases and Parasites of Flounder (Platichthys flesus) in the Baltic Sea*. Turku/Abo, Baltic Marine Biologists Publication, pp. 121-129.

Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006). Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography A*, 1134 (1-2), pp. 101-111.

Walker, C.H., Thompson, H.M. (1991). Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In: Mineau, P. (Ed.). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides; their impact on wildlife and the environment*. New York, Elsevier, pp. 1-17.

Wang, Q.Q., Yates, S.R. (2008). Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (5), pp. 1683-1688.

Weigel, S., Kulmann, J., Hunerfuss, H. (2002). Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea, *The Science of the Total Environment*, 295 (1-3), 131-141.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquatic Toxicology*, 19 (2), pp.137-161.

Winston, G.W., Livingstone, D.R., Lips, F. (1990). Oxygen reductions metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L., *Journal of Experimental Zoology*, 255 (3), pp. 296-308.

Winzer, K. (2001). *Oxidative stress in marine environment -prognostic tools for toxic injury in fish liver cells*. PhD Thesis. University of Amsterdam.

Wood, C.M., Soivio, A. (1991). Environmental effects on gill function: an introduction, *Physiological Zoology*, 64, pp. 1-3.

World Health Organization (WHO) (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva.

Yang, X., Song, Y., Kai, J., Cao, X. (2012). Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene, *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 86 (1), pp. 162-167.

Yasser, A.G., Naser, M.D. (2011). Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study, *Environmental Monitoring Assessment*, 181 (1-4), pp. 175-182.

Yonkos, L.T., Fisher, D.J., Reimscuessel, R., Kane, A. (2000). Atlas of fathead minnow normal histology. [Em linha]. Disponível em <http://aquaticpath.umd.edu/fhm>. [Consultado em 30/04/2013].

Zanette, J., Nunes, F.F., Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Rodrigues de Melo, C.M., Bairy, A.C. (2008). Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges, *Marine Environmental Research*, 66 (1), pp. 196-198.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R. (2002). Presence of therapeutic drugs in the environment, *The Lancet*, 355 (9217), pp. 1789-1790.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reinato, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D. (2006). Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control, *Environmental Science and Pollution Research International*, 13 (1), pp. 15-21.