

Susana Cristina da Rocha Ferreira

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados.

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020

Susana Cristina da Rocha Ferreira

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados.

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020

Susana Cristina da Rocha Ferreira

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados.

(Susana Cristina da Rocha Ferreira)

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia (Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa / Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto)

Coorientador:

Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro)

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

Sumário

Os metais pesados, embora existam naturalmente no ecossistema aquático em níveis vestigiais, podem tornar-se preocupantes por via da sua libertação, fruto das diversas atividades antropogénicas. Estes elementos podem ser essenciais, como o zinco, ou não essenciais, como o chumbo. Estes metais, quando excedem certas concentrações, tornam-se prejudiciais para a saúde dos organismos aquáticos, pois não são biodegradáveis, são potencialmente tóxicos, ambientalmente persistentes, bioacumuláveis e biomagnificáveis. O presente estudo visou a avaliação dos efeitos histopatológicos provocados pela exposição crónica (28 dias), em condições ambientais controladas, a concentrações subletais e ecologicamente relevantes de contaminantes metálicos comuns (zinco: 0, 30, 90 e 270 µg/L; e chumbo: 0, 300, 900 e 2700 µg/L) em fígados de pregados (*Scophthalmus maximus*). Na avaliação histopatológica, após exposição ao zinco e ao chumbo, observaram-se, no geral, distúrbios circulatórios (e.g. hemorragia, hiperemia/congestão e dilatação dos capilares sinusóides), regressivos (e.g. vacuolização citoplasmática e núcleos picnóticos), progressivos (e.g. hipertrofia dos hepatócitos) e inflamatórios (e.g. centros de melanomacrófagos), embora com diferentes prevalências e severidades. As alterações mais observadas no parênquima hepático foram as circulatórias, seguindo-se as regressivas, em ambas as exposições, nomeadamente para as doses mais altas testadas. Contudo, em tecidos de animais previamente expostos ao chumbo, não foram observadas alterações inflamatórias e progressivas. Este trabalho demonstrou os efeitos tecidulares perniciosos que os metais pesados podem ter em organismos aquáticos, em particular nos peixes, quando sujeitos a concentrações subletais e ecologicamente relevantes de elementos metálicos a longo prazo.

Palavras-chave: Ensaio ecotoxicológico; biomarcador tecidular; peixes; zinco; chumbo.

Abstract

Heavy metals, although naturally occurring in the aquatic ecosystems in trace levels, may become of concern due to their release as a result of various anthropogenic activities. These elements can be essential like zinc, or non-essential like lead. When these metals exceed certain concentrations, they are harmful to the health of aquatic organisms because they are not biodegradable, are potentially toxic, environmentally persistent, bioaccumulative and biomagnifiable. The present study aimed to evaluate the histopathological effects caused by a chronic exposure to sub-lethal and ecologically relevant concentrations of metallic contaminants (zinc: 0, 30, 90 and 270 µg/L; and lead: 0, 300, 900 and 2700 µg/L) in turbot (*Scophthalmus maximus*) livers, in a controlled environment. In the histopathological evaluation, after exposure to zinc and lead, circulatory (e.g. hemorrhage, hyperemia/congestion and dilation of sinusoidal capillaries), regressive (e.g. cytoplasmic vacuolization and pycnotic nuclei), progressive (e.g. hepatocyte hypertrophy) and inflammatory disorders (e.g. melanomacrophage centers) were observed, although with different prevalence and severity levels. The most visualized alterations in the liver parenchyma were circulatory ones, followed by the regressive ones, in both assays, namely for the highest doses tested. However, no inflammatory nor progressive changes were observed in previously exposed animal tissues to lead. This study demonstrated the harmful effects of heavy metals on aquatic organism's tissues, particularly on fish, when long-term exposed to sublethal and ecologically relevant concentrations of metallic elements.

Keywords: Ecotoxicological test; tissue biomarker; fish; zinc; lead.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia, pela supervisão, conhecimentos transmitidos, esclarecimento de dúvidas e pela oportunidade de fazer parte de um projeto de investigação num centro de investigação de referência nesta área, o Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto.

Ao Doutor Bruno Nunes, meu coorientador, obrigada pelo apoio prestado.

À Santa Casa da Misericórdia de Braga, em particular à Dra. Daniela Ponte, o meu obrigada, por me ter permitido e apoiado na concretização deste sonho.

Um agradecimento especial à Nathalie pela motivação, companheirismo, amizade e auxílio em todos os momentos.

O meu obrigada ao Samuel, que sempre me motivou e me fez acreditar que a conclusão deste sonho seria possível.

Um agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o sucesso do meu percurso académico, em particular à Tânia, à Simone, à Patrícia, à Catarina, à Andreia, à Vera e à Vânia.

À minha Família, em especial aos meus pais e irmã Margarida, o meu obrigada pelo apoio constante.

Índice

Sumário	v
Abstract	vi
Agradecimentos.....	vii
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas	xii
I. Introdução	1
II. Materiais e Métodos	5
1. Organismos teste	5
2. Exposição ao zinco e chumbo	6
3. Sacrifício dos animais	8
4. Processamento histológico dos fígados.....	8
5. Análise histológica qualitativa e semi-quantitativa do fígado	9
6. Análise estatística.....	10
III. Resultados	10
1. Zinco.....	11
i. Avaliação qualitativa.....	11
ii. Avaliação semi-quantitativa.....	12
2. Chumbo	14
i. Avaliação qualitativa.....	14

ii. Avaliação semi-quantitativa.....	15
IV. Discussão	16
V. Conclusão	26
VI. Referências Bibliográficas	28

Índice de Figuras

- Fig. 1 - Cortes histológicos de fígados de pregados expostos durante 28 dias a concentrações ecologicamente relevantes de zinco (coloração H&E, ampliação 400 X). Microfotografias de: grupo controlo (A) com arquitetura normal do tecido hepático, grupos expostos a 90 µg/L (B) e 270 µg/L, respetivamente (C e D). Núcleos picnóticos (seta preta preenchida), vacuolização citoplasmática (seta branca), dilatação dos capilares sinusóides (estrela) e hiperemia/congestão (seta preta estreita), centros de melanomacrófagos (círculo) e hipertrofia dos hepatócitos (ponta de seta)..... 12
- Fig. 2 - Índices patológicos totais e categóricos (circulatórios, regressivos, progressivos e inflamatórios) para os fígados de pregados, após exposição crónica (28 dias) a concentrações ecologicamente relevantes de zinco. Os dados são expressos como média para cada tratamento ± erro padrão. O asterisco representa os índices categóricos que possuem alterações significativamente distintas comparativamente com o grupo controlo (análise de variância unifatorial, seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$)..... 14
- Fig. 3 – Cortes histológicos de fígados de pregados expostos durante 28 dias a concentrações ecologicamente relevantes de chumbo (coloração H&E, ampliação 400 X). Microfotografias de: grupo controlo (A) com arquitetura normal do tecido hepático do grupo controlo, grupo exposto a 300 µg/L (B), 900 µg/L (C) e 2700 µg/L (D). Vacuolização citoplasmática (seta branca), hemorragia (círculo tracejado), núcleos picnóticos (seta preta preenchida), dilatação dos capilares sinusóides (estrela) e hiperemia/congestão (seta preta estreita). 15
- Fig. 4 - Índices patológicos totais e categóricos (circulatórios e regressivos) para os fígados de pregados, após exposição crónica (28 dias) a concentrações ecologicamente relevantes de chumbo. Os dados são expressos como média para cada tratamento ± erro padrão. O asterisco representa os índices categóricos que possuem alterações significativamente distintas comparativamente com o grupo controlo (análise de variância unifatorial, seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$). 16

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Enumeração dos padrões de reação e exemplos de modificações específicas relativas ao fígado observadas no presente estudo, segundo Bernet et al. (1999). Os fatores de importância (w) atribuídos a cada alteração específica do fígado são mostrados. Para cada distúrbio específico é descrita a prevalência de cada alteração, em percentagem, num total de 30 organismos expostos (exceto controlo); cada aquário (tratamento) contou com cinco pregados, e com duas réplicas por concentração. Para obter informação mais detalhada, consultar a secção de M&M..... 11

Abreviaturas

°C	Graus Celsius
µg/L	Micrograma por Litro
AAS-FA	Espectrofotometria de Absorção Atômica por Atomização por Chama
Alt	Alterações Patológicas
CIIMAR	Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha Ambiental
cm	Centímetros
DPX	Distireno, Plastificante e Xileno
e. g.	Por exemplo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Fig.	Figura
g	Gramas
h	Horas
HE	Coloração com Hematoxilina-Eosina
HNO ₃	Ácido Nítrico
H&E	Coloração Hematoxilina-Eosina
kg/m ²	Quilograma por Metro Quadrado
LOD	Limites de Detecção
mg/L	Miligrama por litro
mm	Milímetro

MMCs	Centros de Melanomacófagos
MMs	Melanomacrófagos
NH ₃	Amoníaco
NO ₂	Dióxido de Azoto
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORBEA	Órgãos Responsáveis pelo Bem-estar dos Animais
Pb	Chumbo
PbCl ₂	Cloreto de chumbo (II)
pH	Potencial de Hidrogénio
psu	Unidade de Salinidade Prática
rp	Padrões de Reação
S.A.	Sociedade Anónima
t	Tempo
w	Fator de Importância
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
Zn	Zinco
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de Zinco Heptahidratado

I. Introdução

Os metais pesados são elementos metálicos que ocorrem naturalmente na terra e que possuem um peso atômico elevado e uma densidade pelo menos cinco vezes maior que a da água (Tchounwou *et al.*, 2012; Łuczyńska *et al.*, 2018; Al Osman *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, o rápido avanço da indústria e da agricultura levou ao aumento da poluição por metais pesados, representando um risco ambiental significativo para todos os organismos vivos, incluindo o Homem (Yi *et al.*, 2011; Arantes *et al.*, 2016; Maccotta *et al.*, 2016). Os metais pesados surgem no meio ambiente devido a causas naturais, normalmente associadas a fenômenos de atividade vulcânica, mas também por ação antrópica, por via da fertilização dos solos, disposição inadequada de efluentes industriais, derramamento de óleos, descarga de esgotos domésticos não tratados, exploração de minérios, água da chuva contaminada e deposição atmosférica (Yang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

Os metais pesados existem dispersos no ambiente aquático pois são facilmente dissolvidos e transportados pela água, sendo conseqüentemente absorvidos pelos diversos organismos aquáticos (Rose e Shea, 2007; Connan e Tack, 2010; Aktar *et al.*, 2011). Estes encontram-se dispersos na coluna de água, mas também adsorvidos a sedimentos e em águas intersticiais (Rose e Shea, 2007; Connan e Tack, 2010; Aktar *et al.*, 2011). Como tal, os metais pesados são frequentemente detetados na água do mar, embora em concentrações vestigiais, mas que ultrapassam os níveis naturais (Kargin *et al.*, 2001; Arantes *et al.*, 2016; Rajeshkumar e Li, 2018).

Os metais podem ser classificados como essenciais e não essenciais, de acordo com as funções biológicas desempenhadas (Sfakianakis *et al.*, 2015). Deste modo, metais essenciais, como por exemplo o cobre, o zinco, o crómio, o níquel, o cobalto, o selénio e o ferro, em concentrações bastante baixas permitem a realização de determinadas funções bioquímicas e fisiológicas em organismos vivos (Jaishankar *et al.*, 2014; Maccotta *et al.*, 2016; Yılmaz *et al.*, 2017). Contudo, quando excedem certas concentrações tornam-se prejudiciais ao organismo (Tchounwou *et al.*, 2012; Jaishankar *et al.*, 2014; Maccotta *et al.*, 2016). Apesar destes metais possuírem importantes funções biológicas em plantas e animais, por vezes as suas capacidades de coordenação química e as suas propriedades de oxidação-redução atribuem-lhes um benefício extra, para que consigam evadir-se de

mecanismos de controlo, como homeostase, transporte, compartimentação e ligação aos constituintes celulares (Valko *et al.*, 2005). Esses metais ligam-se a proteínas, em locais inespecíficos, deslocando os metais originais dos seus locais de ligação próprios (Stohs e Bagchi, 1995). Isto leva a um funcionamento inadequado das células e, por fim, a efeitos nocivos (Stohs e Bagchi, 1995).

Por outro lado, os metais não essenciais, como o alumínio, o cádmio, o mercúrio, o estanho e o chumbo, não desempenham nenhuma função biológica conhecida, sendo bastante tóxicos, mesmo em baixas concentrações (Sfakianakis *et al.*, 2015; Yılmaz *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019). Estes metais provocam toxicidade sistémica induzindo danos em múltiplos órgãos essenciais, como o fígado, o cérebro e os rins, causando, deste modo, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade (Valko *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2014a; Karri *et al.*, 2016).

Os metais pesados encontrados com mais frequência nas águas residuais são o arsénio, o cádmio, o crómio, o cobre, o chumbo, o níquel e o zinco, originando riscos para a saúde animal e humana, mas também para o meio ambiente (El-Naggar *et al.*, 2009; Fair *et al.*, 2018; Saibu *et al.*, 2018).

Os peixes assimilam metais através de diferentes vias, incluindo absorção através de brânquias e do tegumento, ou por ingestão através dos alimentos ou sedimentos, concentrando-se em níveis distintos em função do órgão em causa, sendo a intensidade dos efeitos tóxicos influenciada pela temperatura, concentração de oxigénio, pH e dureza da água (Newarman, 1998; Squadrone *et al.*, 2013; Abalaka, 2015). A toxicidade dos metais é dependente da dose absorvida, da via de exposição e da duração da exposição, isto é, se é aguda ou crónica (Tchounwou *et al.*, 2012; Jaishankar *et al.*, 2014; Junejo *et al.*, 2019).

Os metais pesados acumulam-se de forma distinta em diferentes órgãos dos peixes, de acordo com a afinidade entre os órgãos e os metais (Gallego Ríos *et al.*, 2018). O fígado e os rins apresentam maior tendência à acumulação de metais comparativamente com brânquias e músculos (Bervoets *et al.*, 2001; Koca *et al.*, 2005).

O fígado é o órgão principal de destoxificação em vertebrados, particularmente em peixes (El-Naggar *et al.*, 2009). É um dos locais principais de síntese e armazenamento de lípidos

nestes animais (Chen *et al.*, 2013). Deste modo, o fígado é considerado o órgão mais adequado para avaliar os efeitos tecidulares resultantes da exposição dos peixes a muitos poluentes, uma vez que tem um papel fundamental na transformação e subsequente excreção de xenobióticos, sendo por isso um dos órgãos mais afetados por contaminantes na água (El-Naggar *et al.*, 2009; Hadi e Alwan, 2012; Dang *et al.*, 2017). Tendo em conta o seu papel central no metabolismo e sua alta sensibilidade aos poluentes ambientais, o fígado tem sido alvo de várias investigações toxicológicas em distintas espécies de peixes (Al-Balawi *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2019a; Ghribi *et al.*, 2019).

Os estudos histológicos quantitativos são bastante pertinentes para analisar os efeitos subagudos e crónicos dos contaminantes e para auxiliar na comparação de respostas toxicológicas em condições distintas (Jagoe *et al.*, 1996; Bernet *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2008). A histopatologia representa um método eficaz, enquanto biomarcador ecotoxicológico, pois permite uma rápida avaliação dos efeitos provocados pela exposição a contaminantes em diversos tecidos de organismos aquáticos (Bernet *et al.*, 1999). Esta ferramenta permite situar, descrever e quantificar lesões que ocorrem em órgãos alvo específicos de peixes expostos, expressando as condições ambientais e o tempo de exposição a que os organismos foram submetidos (Nero *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2019b).

O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais pesados tem provocado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nos organismos que aqui vivem (Golovanova, 2008; Santos *et al.*, 2012). Neste sentido, as alterações histopatológicas têm sido bastante usadas como biomarcadores para avaliar a saúde de peixes expostos a contaminantes (Gernhöfer *et al.*, 2001; Banihashemi *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019b). Do mesmo modo, os índices histopatológicos têm sido bastante utilizados como biomarcadores no controlo do estado de saúde dos peixes durante a exposição a metais pesados (Safahieh *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem que os índices de condição histopatológica devem ter em conta a importância relativa das lesões, isto porque algumas modificações podem provocar maior dano a um órgão do que outras (Costa *et al.*, 2009). O uso de uma escala métrica de avaliação histológica permite obter um valor de classificação ordinal para uma lesão específica tendo em conta o seu impacto no peixe, reduzindo a subjetividade da avaliação e permitindo a aplicação da estatística convencional (Bernet *et al.*, 1999).

A utilização de biomarcadores histopatológicos para monitorização ambiental acarreta inúmeros benefícios pois, estes biomarcadores possibilitam a análise de órgãos alvo específicos, como brânquias, rins e fígado, que são responsáveis por diversas funções vitais do organismo, incluindo respiração, excreção, armazenamento e biotransformação de xenobióticos nos peixes (Gernhöfer *et al.*, 2001). As alterações histopatológicas encontradas nesses órgãos são habitualmente fáceis de identificar e servem como sinais de alerta para efeitos prejudiciais à saúde dos peixes (Safahieh *et al.*, 2012).

Os peixes estão no topo da cadeia alimentar aquática e, por isso, acumulam uma quantidade significativa de metais pesados, constituindo uma fonte destes para os consumidores (Squadrone *et al.*, 2013; Javed e Usmani, 2016). Estes são os vertebrados mais abundantes e diversos no compartimento aquático e, como tal, estão mais suscetíveis à poluição (Brown *et al.*, 2014). Deste modo, estes vertebrados marinhos são bons bioindicadores para a monitorização a longo prazo da acumulação de metais (Yılmaz *et al.*, 2017).

Os peixes pleuronectiformes, como o pregado (*Scophthalmus maximus*), são organismos teste comuns no que toca a aferir efeitos tóxicos provocados por agentes causadores de *stress* ambiental, como sejam metais pesados, uma vez que estão expostos a estes através da cadeia alimentar (ingestão de presas contaminadas) e estão em contacto direto com os contaminantes aquáticos dispersos na coluna de água (Nunes *et al.*, 2014a). Para além disso, estas espécies de peixes bentónicos vivem no fundo dos compartimentos aquáticos em contacto direto com o sedimento e com as águas intersticiais que dissolvem, de forma frequente, grandes quantidades de contaminantes, incluindo metais (Schlicht *et al.*, 2019).

O pregado, *S. maximus* (Linnaeus, 1758), é uma espécie relevante em termos económicos, quer na pesca, quer na aquicultura, pertencente à família *Scophthalmidae*. O pregado é um peixe chato, naturalmente distribuído ao longo da costa europeia este e nordeste do oceano Atlântico, podendo ainda ser encontrado no Mar Báltico, ao longo do Mediterrâneo, e no Mar Negro (Schlicht *et al.*, 2019). É um peixe que prefere águas frias, sendo mais comum nas latitudes mais a norte (Henriques, 1998). A produção de pregado em aquicultura tem vindo a crescer nos últimos anos, particularmente na China (64000 toneladas em 2013), pois a sua biologia e fisiologia são bem conhecidas (FAO, 2012). Na Europa, o pregado é considerado como um peixe de preço elevado no mercado *gourmet*

de luxo, sendo produzido maioritariamente em Espanha e em Portugal (Schlicht *et al.*, 2019). *S. maximus* existe em grande abundância em meio selvagem, tendo uma grande importância trófica no ecossistema aquático e adaptabilidade a vários níveis de salinidade (Kerambrun *et al.*, 2012; Vandamme *et al.*, 2014). Além disso, devido à sua sensibilidade a inúmeros compostos químicos, é um dos organismos de teste mais utilizados em estudos ecotoxicológicos, sendo recomendado por diretrizes de teste padronizados (OECD, 2000).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos histopatológicos provocados pela exposição crónica (28 dias), em ambiente laboratorial controlado, a concentrações subletais e ecologicamente relevantes de contaminantes metálicos comuns (zinco e chumbo) em fígados de pregados (*Scophthalmus maximus*).

II. Materiais e Métodos

1. Organismos teste

Os organismos teste usados neste trabalho foram juvenis de *Scophthalmus maximus* adquiridos numa unidade de produção de aquicultura, na Torreira (Aquacria Piscícolas S.A.), norte de Portugal. Após a sua aquisição, estes foram transportados vivos em arca refrigerada e aerificada até ao laboratório.

Os animais foram mantidos durante 15 dias em condições laboratoriais controladas (período de quarentena/ aclimação), em tanques de 500 litros em água salobra (20 psu) artificial, com fotoperíodo controlado (12h luz/12h escuro), aerificação contínua e temperatura constante ($17,1 \pm 1,6$ °C). Os peixes foram avaliados diariamente e os indivíduos que não se encontrassem aparentemente saudáveis, ou que apresentavam alterações anatómicas externas e/ou um comportamento anormal de natação, foram descartados imediatamente. Não se verificou qualquer morte ou sintoma de doença durante o período de quarentena e aclimação.

No final do período de quarentena, foram selecionados aleatoriamente peixes com tamanhos semelhantes (comprimento total de $17,4 \pm 1,5$ cm e peso médio de 100 g). Foram replicados dois aquários para cada grupo de exposição, incluindo um grupo

controlo negativo. No total, foram preparados oito aquários de 50 litros (densidade 5,28 kg/m²), cada um com cinco indivíduos.

2. Exposição ao zinco e chumbo

Os indivíduos foram expostos cronicamente (28 dias) a metais pesados previamente selecionados (zinco e chumbo), em concentrações subletais e consideradas ecologicamente relevantes, segundo as especificações da diretriz 215 da OECD, “Peixe, Teste de Crescimento Juvenil” (OECD, 2000).

A escolha das concentrações de zinco e chumbo teve por base o trabalho de Mucha *et al.* (2003), que determinou as concentrações mínimas e máximas de zinco (6,2 a 457 µg Zn/g sedimento) e chumbo (0,25 a 192 µg Pb/g sedimento) em estuários portugueses (baixo Douro) fortemente expostos a atividades antrópicas. Tiveram ainda a finalidade de simular as condições de exposição que provavelmente ocorrerão em cenários reais e foram determinadas a partir de estudos anteriores, realizados em diferentes estuários, nomeadamente no Paquistão, Bélgica e Arábia Saudita (Tariq *et al.*, 1991; Bervoets *et al.*, 2001; Abdel-Moneim *et al.*, 2012).

Deste modo, os níveis mais baixos de zinco e chumbo selecionados para o presente estudo foram semelhantes aos encontrados na natureza para um dado estuário em condições reais. Por outro lado, as concentrações mais altas testadas, tiveram a finalidade de simular os piores cenários de contaminação por estes agentes.

As exposições aos dois metais pesados foram independentes. No decorrer da exposição, um grupo controlo negativo foi exposto à água não contaminada, e os outros três grupos foram submetidos a concentrações distintas e crescentes (baixa, média e alta) dos elementos selecionados. As concentrações de zinco testadas foram 30, 90 e 270 µg/L, e as concentrações de chumbo foram de 300, 900 e 2700 µg/L. As soluções testadas de cada metal foram obtidas pela dissolução do composto puro [sulfato de zinco (ZnSO₄ · 7H₂O, Sigma-Aldrich 204986, 99,0%) e cloreto de chumbo (PbCl₂, Sigma-Aldrich 268690, 98,0%)] em água da torneira previamente desclorada.

De modo a confirmar os níveis nominais de contaminantes, efetuaram-se análises da água por espectrofotometria de absorção atômica por atomização por chama (AAS-FA) utilizando um Varian SpectrAA 220FS (Varian Inc., Califórnia, EUA). As amostras de água foram colhidas e armazenadas em frascos de plástico, previamente descontaminados, através de uma lavagem com ácido nítrico (HNO_3) a 10% e congeladas para análises posteriores.

As concentrações medidas estavam de acordo com as concentrações nominais: faixa de controlo, baixas, médias e altas concentrações, respetivamente: Zn (< limites de deteção (LOD), 29, 117 e 242 $\mu\text{g/L}$) e Pb (< LOD, 291, 878 e 2,629 $\mu\text{g/L}$). Os LOD foram 5 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ para Zn e Pb, respetivamente. A análise da precisão de replicação dos elementos individuais foi menor que 10% do desvio padrão relativo.

Utilizou-se um sistema de exposição semi-estático, no qual 80% do meio foi renovado a cada 48 horas. Os pregados foram alimentados até a saciedade (*ad libitum*) com *pellets* a cada dois dias. Os parâmetros físico-químicos da água, como o oxigénio dissolvido ($9,2 \pm 0,4$ e $8,6 \pm 0,6$ mg/L para Zn e Pb, respetivamente), pH ($8,2 \pm 0,2$ e $8,1 \pm 0,2$ para Zn e Pb, respetivamente) e temperatura ($17,0 \pm 0,6$ e $20,2 \pm 0,6$ $^\circ\text{C}$ para Zn e Pb, respetivamente) foram avaliados diariamente durante o período experimental, recorrendo a uma sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS).

Adicionalmente, os níveis de amónia ($0,25 \pm 0,01$ e $0,32 \pm 0,02$ mg/L para Zn e Pb, respetivamente) e nitritos ($0,39 \pm 0,02$ e $0,29 \pm 0,02$ mg/L para Zn e Pb, respetivamente) foram avaliados antes de cada renovação do meio, através de um fotómetro (YSI, 9300 Photometer), com recurso a pastilhas para teste de água (Palintest, NH_3 e NO_2).

Nenhum dos peixes do grupo controlo morreu durante o período de exposição, o que se encontra em conformidade com a diretriz de teste usada, pois esta impõe uma taxa de mortalidade, no grupo controlo, inferior a 10% dos organismos expostos para que o teste seja válido (OECD, 2000).

3. Sacrifício dos animais

A utilização dos organismos para o presente estudo foi previamente autorizada pelo Comité de Ética (ORBEA) da instituição de acolhimento (CIIMAR). Para além disso, os procedimentos experimentais tiveram em linha de conta as normas portuguesas para testes de bem-estar animal (Decreto-Lei 113/2013).

No final do ensaio, os peixes foram sedados por arrefecimento rápido, com imersão imediata numa mistura de água e gelo (temperatura da água inferior a 4 °C) em partes iguais até que os peixes perdessem a capacidade de nadar e o movimento opercular. Depois procedeu-se à eutanásia por secção da espinal medula. Este método provou ser rápido e eficaz, não apresentando evidências de originar alterações histológicas (Wilson *et al.*, 2009).

4. Processamento histológico dos fígados

A preparação dos tecidos para posterior análise das eventuais alterações histológicas seguiu um procedimento padrão (Behmer e Tolosa, 2003). O fígado foi retirado e fixado quimicamente em solução de Bouin por um período de 24 horas.

As amostras foram posteriormente desidratadas utilizando soluções de etanol de concentração crescente (70%, 80%, 90% e 100%). Depois procedeu-se à diafanização/clareamento das amostras com xilol por um período de 2 horas e por fim, as amostras foram incorporadas em parafina (56-58 °C). Os blocos foram cortados (4-7 µm) no plano parasagital usando um micrótomo manual (Reichert-Jung 2030). As secções finas, em duplicado, foram desparafinadas com xilol, reidratadas em etanol com concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70%) e água destilada (5 minutos). As secções foram depois coradas com hematoxilina-eosina (HE).

A montagem das lamelas na lâmina de vidro foi efetuada com DPX (temperatura ambiente), seguida de secagem durante a noite. As preparações foram examinadas em microscópio ótico composto (Olympus CX41) acoplado a uma câmara digital USB (Olympus, SC30). Foram tiradas fotomicrografias, de fígados, com uma ampliação de 400 X.

5. Análise histológica qualitativa e semi-quantitativa do fígado

Efetuiu-se a avaliação qualitativa da histologia do fígado para detecção de eventuais alterações tecidulares. As alterações histológicas foram determinadas com base em trabalhos publicados anteriormente em histopatologia de *S. maximus* (Bell *et al.*, 1995; Olojo *et al.*, 2005; Barja-Fernández *et al.*, 2013).

Seguiu-se uma avaliação semi-quantitativa para obtenção do índice de condição histopatológica ponderada por padrão de reação e para o órgão, utilizando uma versão modificada do protocolo descrito por Bernet *et al.* (1999). As alterações patológicas (alt) foram classificadas em cinco padrões de reação (rp): alterações circulatórias; alterações regressivas; alterações progressivas; alterações inflamatórias e alterações neoplásicas.

A importância patológica da alteração visualizada foi definida com base num “*fator de importância*” (w) pré-estabelecido, classificado com 1, 2 ou 3, correspondendo a uma importância patológica mínima (lesões patológicas reversíveis), moderada (lesões que, na maioria das vezes, regridem depois da neutralização do agente causador de *stress*) e grave (lesões na maioria das vezes irreversíveis, que provocam perda parcial ou total da função do órgão afetado).

A extensão de cada alteração foi estimada utilizando um “valor de pontuação” (a), variando de 0 a 6 dependendo do grau e extensão da alteração: (0) inalterada; (2) ocorrência leve; (4) ocorrência moderada; e (6) ocorrência severa (os valores intermédios não foram aplicados). Utilizando o “*fator de importância*” e o “*valor de pontuação*” foram calculados dois índices: o índice de reação do órgão ($I_{org\ rp}$) e o índice total do órgão (I_{org}), segundo as equações: $I_{org\ rp} = \sum alt (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$ e $I_{org} = \sum rp \sum alt (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$.

Os índices de condição histopatológica exibem o significado das lesões e o grau de dano tecidular, e possibilitam uma avaliação objetiva com recurso a testes estatísticos (Bernet *et al.*, 1999).

6. Análise estatística

Depois de se verificarem os pressupostos de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variâncias (teste de Brown-Forsythe) dos dados obtidos, procedeu-se a uma análise de variância unifatorial (One-Way ANOVA), seguida, caso necessário ($p < 0,05$), de um teste de Dunnett, para avaliar se os resultados obtidos nos grupos expostos eram significativamente distintos do grupo controlo. Os resultados foram exibidos como a média \pm erro padrão para cada tratamento sob a forma de gráficos de barras. A análise estatística foi efetuada com o *software* SigmaPlot 14.0 com um nível de significância (α) de 0,05.

III. Resultados

O tipo e a prevalência de cada lesão específica, observados neste estudo após exposição a zinco e chumbo, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Enumeração dos padrões de reação e exemplos de modificações específicas relativas ao fígado observadas no presente estudo, segundo Bernet *et al.* (1999). Os fatores de importância (w) atribuídos a cada alteração específica do fígado são mostrados. Para cada distúrbio específico é descrita a prevalência de cada alteração, em percentagem, num total de 30 organismos expostos (exceto controlo); cada aquário (tratamento) contou com cinco pregados, e com duas réplicas por concentração. Para obter informação mais detalhada, consultar a secção de M&M.

Padrões de reação	Exemplos de lesões observadas	w	Prevalência (%)	
			Zinco	Chumbo
Circulatórios	Dilatação dos capilares sinusóides	1	86	97
	Hemorragia	1	9	53
	Hiperemia/ Congestão	1	100	100
Regressivos	Vacuolização do citoplasma	1	100	90
	Núcleos picnóticos	2	36	33
Progressivos	Hipertrofia dos hepatócitos	1	45	-
Inflamatórios	Centro de melanomacrófagos	2	27	-
Neoplásicos	Não observado	2/3	-	-

1. Zinco

i. Avaliação qualitativa

Os pregados do grupo controlo apresentaram uma arquitetura hepática normal (Fig. 1A). Os peixes expostos cronicamente (28 dias) ao zinco revelaram várias alterações no fígado, nomeadamente alterações progressivas, como hipertrofia dos hepatócitos (Fig. 1B). Foram ainda observadas alterações circulatórias, como hemorragia, dilatação dos capilares sinusóides (Fig. 1C) e hiperemia/congestão (Fig. 1C). Também se observaram modificações regressivas, como vacuolização citoplasmática (Fig. 1C) e núcleos picnóticos (Fig. 1C). Observaram-se ainda modificações inflamatórias, como a presença

de centros de melanomacrófagos (Fig. 1D). Não foram observadas modificações neoplásicas.

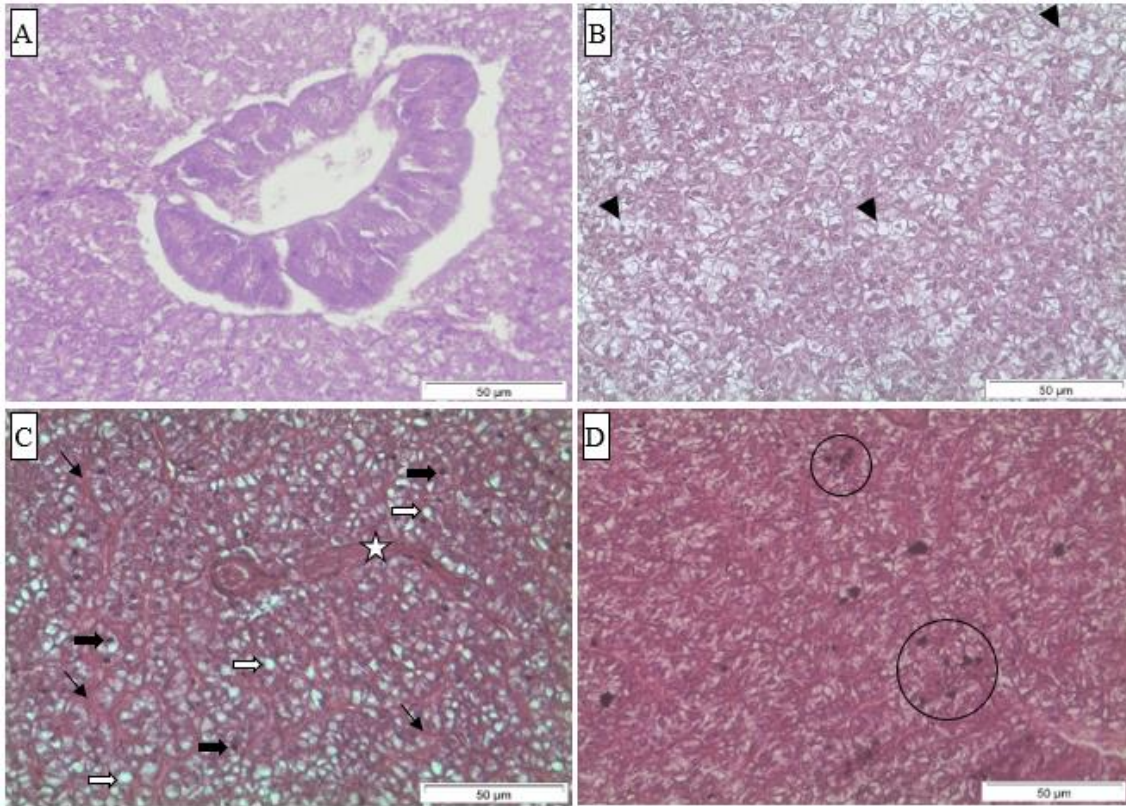


Fig. 1 - Cortes histológicas de fígados de pregados expostos durante 28 dias a concentrações ecologicamente relevantes de zinco (coloração H&E, ampliação 400 X). Microfotografias de: grupo controle (A) com arquitetura normal do tecido hepático, grupos expostos a 90 µg/L (B) e 270 µg/L, respetivamente (C e D). Núcleos picnóticos (seta preta preenchida), vacuolização citoplasmática (seta branca), dilatação dos capilares sinusóides (estrela) e hiperemia/congestão (seta preta estreita), centros de melanomacrófagos (círculo) e hipertrofia dos hepatócitos (ponta de seta).

ii. Avaliação semi-quantitativa

Nas alterações circulatórias observaram-se diferenças significativas entre tratamentos (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 16,281$; $p < 0,05$), mas apenas nos indivíduos submetidos à mais alta concentração de zinco testada (270 µg/L) comparativamente ao grupo controle (teste de Dunnett, $p < 0,05$) (Fig. 2).

Para as alterações regressivas, também se obtiveram diferenças significativas entre tratamentos (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 7,392$; $p < 0,05$), em particular na concentração mais alta testada em relação ao grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) (Fig. 2).

Do mesmo modo, nas modificações progressivas também foram observadas diferenças significativas entre grupos (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 5,930$; $p = 0,001$), nomeadamente entre o grupo controlo e os indivíduos expostos à concentração mais elevada (teste de Dunnett, $p < 0,05$) (Fig. 2).

Contudo, em relação aos distúrbios inflamatórios não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 1,942$; $p = 0,146$) (Fig. 2).

Não foram encontradas alterações neoplásicas nos indivíduos expostos a concentrações ecologicamente relevantes de zinco.

Em geral, os peixes expostos às concentrações mais elevadas de zinco (90 e 270 $\mu\text{g/L}$) apresentaram índices patológicos totais superiores relativamente aos do grupo controlo (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 13,163$; $p < 0,001$; seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$) após um período de exposição crónica (28 dias) (Fig. 2).

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados

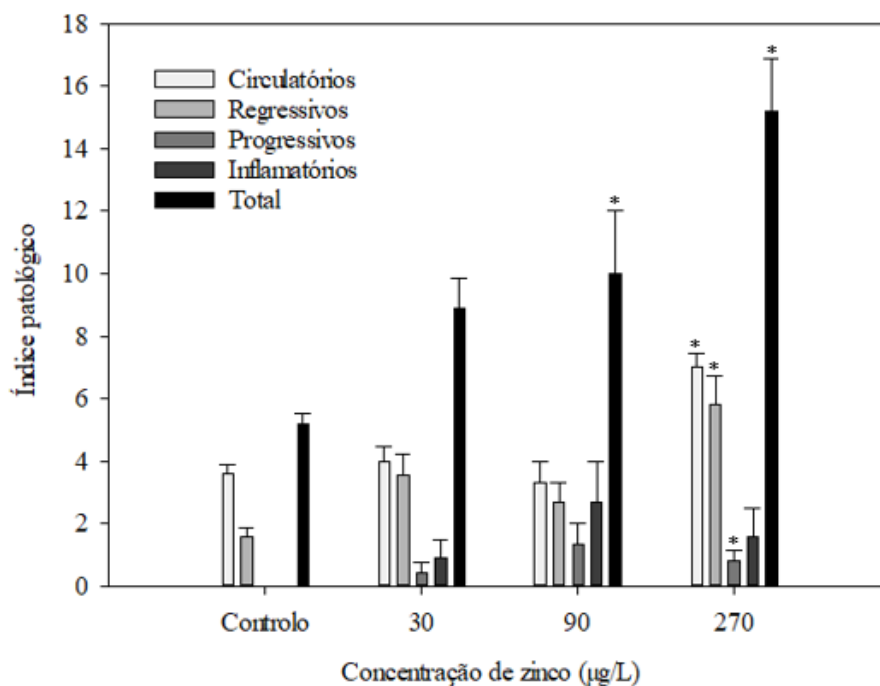


Fig. 2 - Índices patológicos totais e categóricos (circulatórios, regressivos, progressivos e inflamatórios) para os fígados de pregados, após exposição crónica (28 dias) a concentrações ecologicamente relevantes de zinco. Os dados são expressos como média para cada tratamento \pm erro padrão. O asterisco representa os índices categóricos que possuem alterações significativamente distintas comparativamente com o grupo controlo (análise de variância unifatorial, seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$).

2. Chumbo

i. Avaliação qualitativa

Os pregados do grupo controlo apresentaram uma arquitetura hepática normal (Fig. 3A). Os peixes expostos cronicamente (28 dias) ao chumbo revelaram várias alterações no fígado, nomeadamente modificações regressivas, como vacuolização citoplasmática (Fig. 3B e 3C) e núcleos picnóticos (Fig. 3B). Também se observaram distúrbios circulatórios, como dilatação dos capilares sinusóides (Fig. 3C e 3D), hiperemia/congestão (Fig. 3C e 3D) e hemorragia (Fig. 3D). Contudo, não foram observadas alterações progressivas, inflamatórias e neoplásicas.

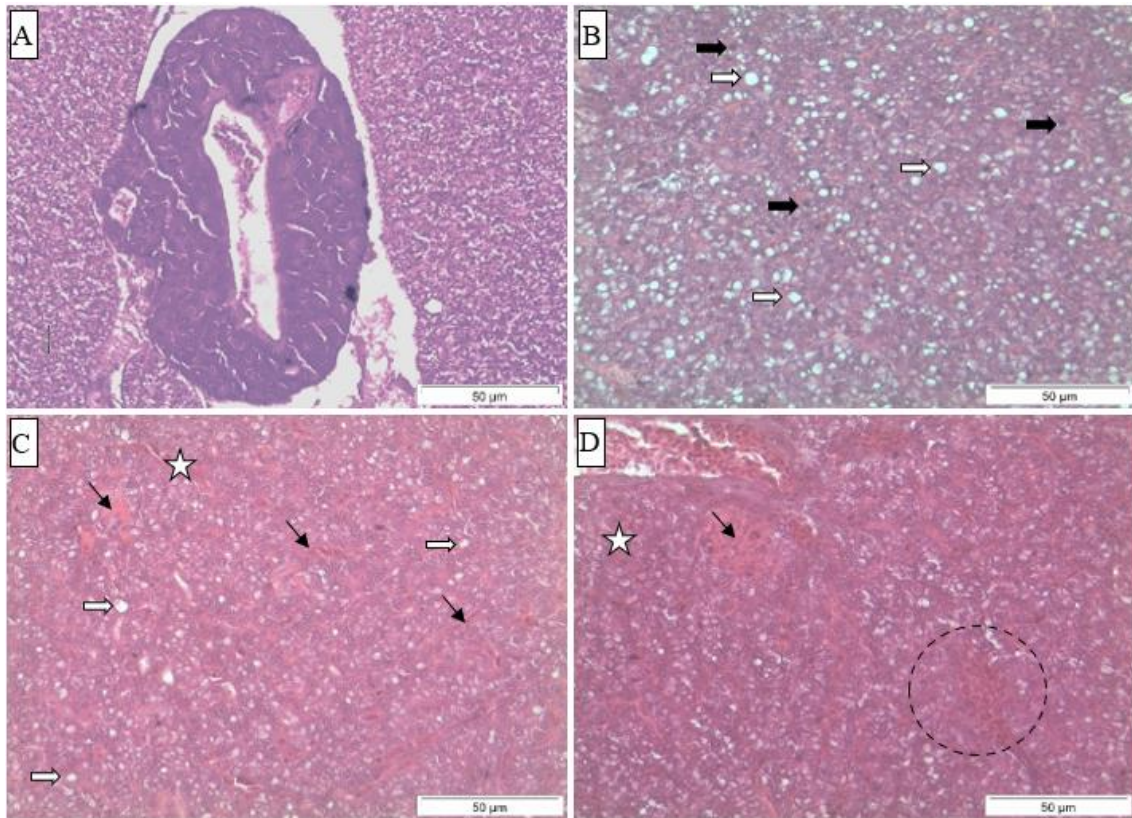


Fig. 3 – Cortes histológicos de fígados de pregados expostos durante 28 dias a concentrações ecologicamente relevantes de chumbo (coloração H&E, ampliação 400 X). Microfotografias de: grupo controlo (A) com arquitetura normal do tecido hepático do grupo controlo, grupo exposto a 300 µg/L (B), 900 µg/L (C) e 2700 µg/L (D). Vacuolização citoplasmática (seta branca), hemorragia (círculo tracejado), núcleos picnóticos (seta preta preenchida), dilatação dos capilares sinusóides (estrela) e hiperemia/congestão (seta preta estreita).

ii. Avaliação semi-quantitativa

Relativamente às alterações circulatórias, observaram-se diferenças significativas entre tratamentos (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 17,057$; $p < 0,05$), nomeadamente entre os indivíduos submetidos às duas concentrações mais elevadas de chumbo testadas, em relação ao grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) (Fig. 4). Não foi observada nenhuma alteração significativa para alterações regressivas, apesar dos grupos expostos terem valores mais elevados (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 2,767$; $p = 0,056$) (Fig. 4).

Não foram encontradas alterações inflamatórias, progressivas e neoplásicas nos peixes expostos a concentrações ecologicamente relevantes de chumbo.

Em geral, os peixes expostos às concentrações mais elevadas de chumbo (900 e 2700 µg/L) apresentaram índices patológicos totais maiores relativamente ao grupo controlo (análise de variância unifatorial: $F [3,36] = 10,628$; $p < 0,05$; seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$), após um período de exposição crónica (28 dias) (Fig. 4).

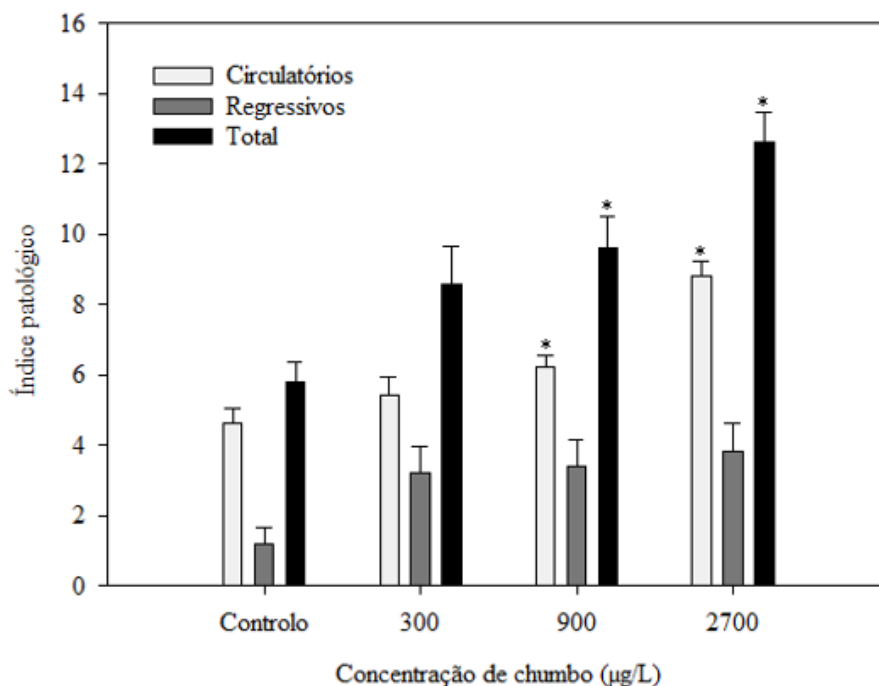


Fig. 4 - Índices patológicos totais e categóricos (circulatórios e regressivos) para os fígados de pregados, após exposição crónica (28 dias) a concentrações ecologicamente relevantes de chumbo. Os dados são expressos como média para cada tratamento \pm erro padrão. O asterisco representa os índices categóricos que possuem alterações significativamente distintas comparativamente com o grupo controlo (análise de variância unifatorial, seguida de teste de Dunnett, $p < 0,05$).

IV. Discussão

A poluição por metais pesados em ambientes aquáticos é provocada essencialmente por atividades antropogénicas (Hermenean *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017; Łuczyńska *et al.*,

2018). Estes elementos representam uma séria ameaça aos ecossistemas aquáticos, principalmente devido à sua persistência ambiental e bioacumulação (Hermenean *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017; Łuczyńska *et al.*, 2018). A propriedade que os metais têm de bioacumular em alguns tecidos e órgãos é usada regularmente em programas de monitorização ambiental (El-Naggar *et al.*, 2009). Além disso, os metais são magnificados ao longo da cadeia trófica, colocando riscos sérios aos predadores de topo, incluindo o Homem (El-Naggar *et al.*, 2009; Fair *et al.*, 2018; Saibu *et al.*, 2018).

A exposição a metais pesados provoca diversas alterações nos organismos aquáticos, incluindo peixes (Khayatzadeh e Abbasi, 2010; Aktar *et al.*, 2011; Afshan *et al.*, 2014). Os efeitos tóxicos manifestam-se quando os mecanismos excretores, metabólicos, de armazenamento e de destoxificação perdem a capacidade de impedir a absorção, originando potenciais alterações histológicas e fisiológicas (Rajeshkumar e Li, 2018). Os metais pesados acumulam-se em diversos órgãos vitais, desencadeando perturbações no crescimento, reprodução, bem como alterações tecidulares na pele, fígado, baço, músculo, brânquias e rins (Zheng *et al.*, 2011; Oğuz e Yeltekin, 2014; Arantes *et al.*, 2016). Por estas razões, a análise dos níveis de metais pesados em peixes é bastante relevante em termos toxicológicos (Kaoud e El-Dahshan, 2010; Jaishankar *et al.*, 2014; Arantes *et al.*, 2016).

O zinco é um micronutriente essencial e indispensável para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos, incluindo os peixes (Kloubert e Rink, 2015; Pouil *et al.*, 2017; Leitemperger *et al.*, 2019). É essencial para a função de muitas classes de enzimas, sendo fundamental para diversas funções celulares básicas, como o metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono e lípidos, estando também envolvido em funções avançadas, nomeadamente ao nível do sistema imunológico e neurológico, e como agente de sinalização intracelular (Hogstrand, 2011; Loro *et al.*, 2014; Kloubert e Rink, 2015). No entanto, quando em excesso, o zinco torna-se tóxico para os organismos, nomeadamente para os peixes, podendo causar distúrbios a nível bioquímico e fisiológico (Santos *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2017; Leitemperger *et al.*, 2019).

O zinco na dieta apresenta baixa toxicidade para os vertebrados, incluindo peixes (Hogstrand, 2011). Contudo, peixes bentónicos podem estar mais suscetíveis a uma maior

absorção do zinco que se encontra nos sedimentos (Giardina *et al.*, 2009). Adicionalmente, os peixes e outros animais aquáticos que respiram o oxigênio dissolvido na água são mais sensíveis a níveis de zinco elevados (Hogstrand, 2011). Parte do zinco dissolvido na água é absorvido por um transportador comum de deslocação de zinco-cálcio, situado nas células de cloro do epitélio branquial em peixes (Giardina *et al.*, 2009). Contudo, é provável que o peixe seja capaz de resistir ao período inicial de exposição a níveis elevados de zinco, pois possui capacidade de efetuar ajustes bioquímicos e fisiológicos, de modo a restaurar a homeostasia, processo designado por aclimação (Hogstrand, 2011). Este equilíbrio é conseguido através de mecanismos de excreção e inibição da absorção gastrointestinal, pois os peixes têm capacidade de modular as concentrações plasmáticas de zinco quando os níveis de zinco na dieta e na água são elevados (Giardina *et al.*, 2009).

Os níveis totais de zinco no organismo ficam mais elevados com o aumento das concentrações de zinco na dieta e na água (Kloubert e Rink, 2015). Deste modo, os peixes predadores, que se encontram no topo da cadeia alimentar aquática, manifestam rapidamente desconfortos fisiológicos quando expostos a altas concentrações de zinco (Ratn *et al.*, 2018). Isto porque, se um ecossistema aquático possuir altos níveis de zinco, os peixes que se encontram no topo da cadeia alimentar estão mais suscetíveis à ingestão aumentada de zinco, uma vez que os peixes menores, de que eles se alimentam, podem possuir uma grande acumulação de zinco nos tecidos (Giardina *et al.*, 2009). Esta situação é prejudicial para os peixes, bem como para os que os consomem, de forma direta ou indireta, através da cadeia alimentar (Ratn *et al.*, 2018).

Tendo em conta estudos anteriores, torna-se evidente que concentrações tóxicas de zinco induzem uma série de efeitos prejudiciais em diferentes espécies de peixes, afetando as brânquias, o fígado e os rins, e o bem-estar geral dos organismos (Zheng *et al.*, 2011; Arantes *et al.*, 2016; Ratn *et al.*, 2018). A dificuldade respiratória, provocada por danos nas brânquias ou pela acumulação exagerada de muco, é um indício manifestado por peixes expostos de forma aguda ao zinco (Ratn *et al.*, 2018). Existem fortes evidências que o principal efeito tóxico é a hipocalcemia, provocada pelo zinco, induzindo alterações na absorção de cálcio nas brânquias (Loro *et al.*, 2014). Além disso, peixes expostos a altas concentrações de zinco apresentam problemas dermatológicos, imunológicos, falta de apetite e mortalidade (Ratn *et al.*, 2018). Perante uma exposição crónica a elevadas

concentrações de zinco, é muito provável que ocorra bioacumulação no fígado e nos rins, órgãos primários de biotransformação em peixes, responsáveis pela destoxificação e excreção, respetivamente (Ratn *et al.*, 2018). A exposição prolongada ao zinco induz *stress* oxidativo nos peixes, através da superprodução de espécies reativas de oxigénio (Nunes *et al.*, 2014a, b; Zheng *et al.*, 2017). Estas substâncias e biomoléculas metabólicas reativas induzem alterações em peixes, como vacuolização, picnose, necrose e hipertrofia inflamatória no fígado, e redução do lúmen no túbulo renal, mudanças degenerativas no glomérulo, vacuolização e necrose nos rins (Ratn *et al.*, 2018).

O chumbo é um metal não essencial para as funções dos organismos e um componente natural da crosta terrestre, que está presente em solos, plantas e água, em quantidades vestigiais (Tchounwou *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019). Apesar do chumbo ser omnipresente em ambientes aquáticos, altos níveis de exposição ao chumbo podem dever-se a várias atividades antrópicas, incluindo a produção de baterias, tintas e cimento, exploração mineira e fundição (Tchounwou *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019). Desde o final do ano de 1970 que a exposição ao chumbo reduziu bastante devido à diminuição dos níveis de chumbo em tintas, latas de comida e bebida, e na canalização, e mais tarde a sua eliminação na gasolina (Tchounwou *et al.*, 2012).

Não existem vias eficazes de metabolização e eliminação de chumbo, sendo frequente a bioacumulação em diferentes tecidos e órgãos de peixes expostos, pois este não é biodegradável e tem capacidade de se ligar facilmente aos átomos de oxigénio e enxofre das proteínas, para originar um complexo estável (Ribeiro *et al.*, 2014). A exposição crónica ao chumbo leva a perturbações que interferem com a homeostasia do cálcio. Nos peixes, o cálcio influencia a toxicidade do chumbo pois regula a sua distribuição nos tecidos (Lee *et al.*, 2019). Deste modo, o cálcio tem um efeito protetor contra o chumbo diminuindo a sua acumulação nos tecidos (Lee *et al.*, 2019).

Os peixes podem acumular chumbo através da água e da dieta (Alsop *et al.*, 2016). Independentemente da via de exposição, o chumbo concentra-se em níveis mais elevados nos músculos, brânquias, rins e fígado (Spry e Wiener, 1991; Al-Balawi *et al.*, 2013). O chumbo é um dos principais contaminantes ambientais que pode induzir toxicidade nos ecossistemas aquáticos, como efeitos prejudiciais hematológicos, renais, reprodutivos, comportamentais e neurológicos nos peixes, que podem levar à morte (Paul *et al.*, 2014;

Dos Santos *et al.*, 2016; Junejo *et al.*, 2019). Existem evidências de alterações histopatológicas induzidas por chumbo no fígado, brânquias, intestino, rins, músculos e baço, em espécies distintas de peixes (Fatima e Usmani, 2013; Macirella *et al.*, 2019; Mahboob *et al.*, 2020).

A técnica histopatológica representa um método apropriado, dentro de todos os procedimentos ecotoxicológicos, pois permite uma rápida avaliação dos efeitos provocados pela exposição a contaminantes em diversos tecidos de organismos aquáticos (Bernet *et al.*, 1999). Esta ferramenta permite situar, descrever e quantificar lesões que ocorrem em órgãos alvo específicos de peixes expostos a xenobióticos presentes na água (Bernet *et al.*, 1999; Nero *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). A escolha dos órgãos a avaliar é dependente da sua função, do poluente em questão e das propriedades físico-químicas da água, como a temperatura, concentração de oxigênio, pH e dureza (Bernet *et al.*, 1999).

O fígado nos peixes tem um papel protetor contra a exposição a metais pois é um local de armazenamento e um órgão vital na regulação dos metais (Ahmad *et al.*, 2015). Deste modo, o fígado é considerado um dos principais órgãos de bioacumulação de metais e de destoxificação em vertebrados, especialmente em peixes (El-Naggar *et al.*, 2009; Mahboob *et al.*, 2020). As lesões histopatológicas do fígado demonstraram ser indicadores fidedignos e confiáveis de exposição a metais (Ptashynski e Klaverkamp, 2002).

Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição a concentrações ecologicamente relevantes de zinco e chumbo provocam efeitos tecidulares adversos no fígado de *S. maximus*. Estes resultados corroboram estudos prévios que relataram várias alterações no tecido hepático decorrentes da exposição a concentrações ecologicamente relevantes de espécies metálicas em organismos aquáticos (Mekkawy *et al.*, 2012; Hermenean *et al.*, 2015; Don Xavier *et al.*, 2019; Mahboob *et al.*, 2020).

As alterações observadas no presente estudo também foram apontadas por outros estudos em que os indivíduos de *S. maximus* foram expostos a óleo de borragem na dieta e óleo de peixe marinho (Bell *et al.*, 1995), metais pesados, como o cádmio, o cobre e o zinco (Alvarado *et al.*, 2005), e a éteres difenílicos polibromados (2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter) (Barja-Fernández *et al.*, 2013).

As alterações circulatórias foram os distúrbios mais comuns para os dois metais, observando-se no fígado de pregado, sinais de hemorragia, hiperemia/congestão e dilatação dos capilares sinusóides, com mais prevalência para o chumbo.

A hemorragia corresponde à saída de sangue do sistema vascular, que ocorre devido a uma lesão do endotélio vascular, que pode ser provocada pelo aumento da pressão arterial, resultante da exposição a substâncias tóxicas (Morrison *et al.*, 2007; Javed *et al.*, 2016).

Por outro lado, a hiperemia corresponde ao aumento da quantidade de sangue no interior dos vasos, num órgão ou tecido, enquanto que a congestão (pouco sangue é removido de um local) indica um entupimento venoso passivo (Morrison *et al.*, 2007). A hiperemia, geralmente, surge acompanhada por sinais de inflamação e está associada à dilatação vascular, devido à libertação de mediadores inflamatórios (Morrison *et al.*, 2007). A congestão passiva está associada à redução de fluxo venoso provocada por circunstâncias não inflamatórias, como insuficiência cardíaca, contração ou obstrução do fluxo vascular, devido a tumores ou outras formas compressivas (Morrison *et al.*, 2007). No entanto, histologicamente é difícil distinguir hiperemia de congestão (Morrison *et al.*, 2007). Uma obstrução do fluxo venoso em qualquer nível entre o coração e os sinusóides origina congestão dos vasos e um aumento da pressão venosa, o que eventualmente resulta na dilatação dos sinusóides, pois o sangue tem dificuldade em passar pelos sinusóides para chegar à veia central, forçando o coração a bombear o sangue com mais força (Bayraktar *et al.*, 2007).

Distúrbios circulatórios similares, englobando hemorragia, hiperemia/congestão e dilatação dos capilares sinusóides, foram já observados em peixes expostos a metais (Kaoud e El-Dahshan, 2010; Abalaka, 2015; Cuevas *et al.*, 2016; Rajeshkumar e Li, 2018; Mahboob *et al.*, 2020; Mustafa, 2020), particularmente ao cobre (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007), ao cádmio (Mekkawy *et al.*, 2012), ao cádmio e ao chumbo (Parvin *et al.*, 2014), a nanopartículas de óxido de ferro (Qualhato *et al.*, 2018) e a nanopartículas de dióxido de cério (Correia *et al.*, 2019, 2020).

No que diz respeito às modificações regressivas, foram observadas vacuolização citoplasmática e núcleos picnóticos nos fígados de peixes expostos aos dois metais, novamente com maior prevalência para o zinco.

A presença de lípidos ou glicogénio no citoplasma dos hepatócitos é normal e está relacionada com a função metabólica normal do fígado (Camargo e Martinez, 2007). Contudo, a sua acumulação excessiva (levando à vacuolização dos hepatócitos) pode dever-se a um desequilíbrio entre a síntese de substâncias nas células parenquimatosas e a sua passagem para a circulação sistémica (Morrison *et al.*, 2007). Esta é descrita como um processo degenerativo, consequência de um dano metabólico, provavelmente relacionado com a exposição a água contaminada (Bernet *et al.*, 1999; Camargo e Martinez, 2007; Alm-Eldeen *et al.*, 2018). Deste modo, a vacuolização citoplasmática é apontada como um mecanismo de defesa celular contra substâncias nocivas aos hepatócitos, pois este mecanismo vai neutralizar os agentes danosos, impedindo-os de interferir com as atividades biológicas dessas células (Shubin *et al.*, 2016). Isto, porque apesar da vacuolização dos hepatócitos ser uma lesão reversível, pode evoluir para situações irreversíveis e originar perturbações graves da função celular (Morrison *et al.*, 2007; Shubin *et al.*, 2016).

O grau de vacuolização visualizado nos fígados de peixe foi maior para as doses mais altas, nos dois metais. No entanto, apesar da vacuolização citoplasmática ser visível nos fígados expostos a ambos os metais, esta era mais acentuada nos fígados expostos às mais altas concentrações de zinco.

Alvarado *et al.* (2005) descreveram um aumento da vacuolização citoplasmática dos hepatócitos em fígado de *S. maximus* após exposição a concentrações de 1 mg/L de metais pesados (cádmio, cobre e zinco) por um período de 7 dias. Da mesma forma, Van Dyk *et al.* (2007) descreveram que a vacuolização hepática pode resultar de uma exposição a produtos químicos. Do mesmo modo, Lukin *et al.* (2011) relataram que a vacuolização de hepatócitos era a patologia mais comum em peixes expostos a contaminantes. No mesmo sentido, Abalaka (2015) referiu que a vacuolização hepática pode dever-se a uma deposição de lípidos e/ou glicogénio, sugerindo distúrbios no metabolismo, como consequência da exposição a substâncias tóxicas.

Por outro lado, a presença de núcleos picnóticos corresponde a alterações visíveis no núcleo e caracteriza-se pela condensação da cromatina e contração do núcleo em resposta a um dano celular (Burgoyne, 1999; Morrison *et al.*, 2007). A lesão celular pode evoluir até um ponto sem retorno, onde a célula é incapaz de se adaptar e a homeostase não é

mais possível, sendo a lesão irreversível pois ocorre morte celular ou necrose (Burgoyne, 1999; Morrison *et al.*, 2007).

Porém, como no presente estudo não se observou necrose nos tecidos hepáticos expostos a zinco e chumbo, a evolução para situações de necrose hepática, provavelmente requer uma exposição mais prolongada ou concentrações mais elevadas no caso do pregado.

De forma similar a este estudo, Abdel-Moneim *et al.* (2012) também visualizaram núcleos picnóticos no fígado de peixes que viviam em três estuários da Arábia Saudita, que continham níveis de cádmio ($> 0,003$ mg/L) e chumbo ($> 0,01$ mg/L) em concentrações acima dos valores de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS). Thophon *et al.* (2003) também observaram núcleos picnóticos no tecido hepático após uma exposição aguda a cádmio. Do mesmo modo, Correia *et al.* (2019, 2020) visualizaram a presença de núcleos picnóticos após exposição a nanopartículas de dióxido de cério.

Em relação às alterações progressivas, estas apenas foram visualizadas na exposição ao zinco. O distúrbio visualizado foi a hipertrofia dos hepatócitos que se caracteriza por um aumento no tamanho dos hepatócitos e é a causa do aumento do peso do fígado (Asaoka *et al.*, 2016). A hipertrofia dos hepatócitos pode ser induzida por produtos químicos e está particularmente ligada à indução de enzimas metabólicas (Morrison *et al.*, 2007; Maronpot *et al.*, 2010). A indução dessas enzimas metabólicas é considerada uma resposta adaptativa à destoxificação de xenobióticos (Asaoka *et al.*, 2016). Porém, pode ocorrer toxicidade quando as respostas do fígado excedem as capacidades adaptativas ou quando as alterações ou enzimas induzidas geram metabólitos tóxicos, sendo as consequências influenciadas pelo tipo e dose do xenobiótico (Maronpot *et al.*, 2010). À semelhança do presente estudo, a hipertrofia dos hepatócitos também foi descrita por Syasina *et al.* (2012) e Macêdo *et al.* (2020) em peixes provenientes de rios contaminados por metais pesados.

Relativamente aos distúrbios inflamatórios, a alteração visualizada, apenas nos fígados de pregado expostos a zinco, foi a presença de centros de melanomacrófagos. Os centros de melanomacrófagos (MMCs), desempenham um papel relevante na resposta imunológica e têm sido usados como biomarcadores para avaliar a saúde dos peixes e a poluição do ambiente aquático (Qualhato *et al.*, 2018). Os MMCs são encontrados sobretudo nos rins e no baço e, eventualmente, no fígado de muitos vertebrados (Steinel

e Bolnick, 2017). Os melanomacrófagos (MMs) são células multifuncionais que efetuam a fagocitose de glóbulos vermelhos, células hematopoiéticas e detritos celulares, promovem a destoxificação de moléculas exógenas e endógenas, causam deposição do ferro, proveniente da eliminação de glóbulos vermelhos e acumulam diferentes pigmentos, tais como melanina, lipofuscina e hemossiderina (Qualhato *et al.*, 2018). Assim, além da sua capacidade de eliminação de resíduos e do armazenamento a longo prazo de xenobióticos, os MMCs estão envolvidos nas funções imunes inatas e adaptativas (Brum *et al.*, 2018). Deste modo, a presença de MMCs nos fígados expostos às mais altas concentrações de zinco, pode dever-se a uma resposta imunológica do organismo teste ao xenobiótico, estando, portanto, envolvida na eliminação/destoxificação de partículas nocivas. Resultados semelhantes foram obtidos por Don Xavier *et al.* (2019) que observou MMCs no fígado de peixes expostos a elevadas concentrações de zinco e cobre, referindo que estes estão envolvidos na neutralização de partículas estranhas ao organismo. Nos fígados de peixe expostos ao chumbo não foram observadas alterações inflamatórias.

As modificações neoplásicas não foram observadas no presente estudo para os dois componentes metálicos.

As alterações observadas no presente estudo foram apontadas por diversos estudos com outras espécies de peixes, submetidas a vários poluentes como metais, (Fatima e Usmani, 2013; Arantes *et al.*, 2016; Alm-Eldeen *et al.*, 2018; Jabeen *et al.*, 2018; Mahboob *et al.*, 2020), particularmente ao mercúrio (Jagoe *et al.*, 1996), cádmio (Thophon *et al.*, 2003), chumbo (Olojo *et al.*, 2005), zinco (Zheng *et al.*, 2011; Ratn *et al.*, 2018), cádmio e chumbo (Abdel-Moneim *et al.*, 2012), cobre (Paruruckumani *et al.*, 2015), zinco e cobre (Don Xavier *et al.*, 2019), a nanopartículas de dióxido de cério (Correia *et al.*, 2019, 2020), a herbicidas, como almix (metsulfuron metil 10.1%+chlorimuron etil 10.1%) (Samanta *et al.*, 2015), à base de glifosato (dos Santos *et al.*, 2017), a toxinas, nomeadamente a aflatoxina (Mwihia *et al.*, 2018), a medicamentos, como o omeprazol (Costa *et al.*, 2018), eritromicina (Rodrigues *et al.*, 2019b), eritromicina e oxitetraciclina (Rodrigues *et al.*, 2019a).

Embora as lesões hepáticas descritas neste estudo não sejam, geralmente, específicas para metais pesados, é possível afirmar que existe uma relação causal entre as concentrações de metais e os distúrbios observados no fígado de peixes.

Tendo em conta a avaliação semi-quantitativa, relativa ao zinco, podemos concluir que as modificações que mais se manifestaram no tecido hepático foram as circulatórias, seguindo-se as regressivas. Estas alterações manifestavam-se com maior gravidade para as mais altas doses testadas (90 e 270 µg/L).

Em relação à avaliação semi-quantitativa, relativa ao chumbo, as alterações mais visualizadas no tecido hepático foram as circulatórias. Estas eram mais acentuadas para as doses mais altas (900 e 2700 µg/L).

Os dados observados no fígado de indivíduos de *S. maximus* expostos aos dois metais apontam para distúrbios fisiológicos com uma importância patológica leve a moderada, o que indica que a maioria das lesões são reversíveis e, portanto, regredem com a eliminação da exposição ao xenobiótico. Isto porque o fígado está envolvido em vários processos fisiológicos, como o metabolismo de macronutrientes, regulação do volume sanguíneo, suporte do sistema imunológico, controlo endócrino das vias de sinalização de crescimento, homeostase de lípidos e colesterol e a quebra de compostos xenobióticos, incluindo metais pesados (Trefts *et al.*, 2017).

Deste modo, pode-se concluir que as alterações observadas no tecido hepático se devem à exposição ao zinco e chumbo, pois o fígado tem um papel fundamental na transformação e subsequente excreção de xenobióticos, e que as modificações observadas no presente estudo são alterações adaptativas, que regredem com a eliminação da exposição ao agente causador de *stress* (Hadi e Alwan, 2012; Dang *et al.*, 2017).

Assim, as mudanças visualizadas nos fígados de peixe expostos a concentrações ecologicamente relevantes de zinco e chumbo indicam que os indivíduos de *S. maximus* têm capacidade de efetuar ajustes fisiológicos, de modo a restaurar a homeostasia, através mecanismos de excreção e inibição da captação gastrointestinal, que constituem um mecanismo de defesa contra níveis elevados de metais pesados. Isto é suportado pelos índices patológicos totais obtidos para as concentrações mais elevadas de zinco e chumbo.

V. Conclusão

O presente estudo utilizou uma análise histopatológica padrão para avaliar os danos no fígado de indivíduos de pregado (*S. maximus*), resultantes da exposição a dois metais pesados (zinco e chumbo), encontrados no compartimento aquático.

Foram observadas diversas alterações histopatológicas no fígado de pregado provocadas pelos dois componentes metálicos. A toxicidade foi maior para as mais altas concentrações testadas, nos dois metais.

A generalidade das alterações foi leve ou moderada, inespecífica e reversível, representando, em alguns casos, modificações adaptativas. Porém, estas modificações teciduais podem significar que os mecanismos excretores, metabólicos, de armazenamento e de destoxificação perderam a capacidade de impedir a absorção destes contaminantes, apontando também para a existência de perturbações bioquímicas nos peixes expostos.

Tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que o zinco e o chumbo acarretam riscos para a saúde dos organismos aquáticos, mesmo em baixas concentrações e por curtos períodos de exposição (comparativamente com a exposição no seu *habitat* natural), que conseqüentemente, podem afetar as suas funções vitais.

Os dados histopatológicos deste estudo sugerem que o fígado ainda mantém o seu funcionamento fisiológico, após a exposição a concentrações ecologicamente relevantes de zinco e chumbo, o que indica que seria necessária uma exposição mais prolongada e/ou concentrações mais elevadas destes metais, para provocar uma perda parcial/total da função do órgão.

Este estudo confirma também que a histopatologia é um biomarcador promissor e bem fundamentado para a deteção de contaminação ambiental aquática, em organismos não alvo, e um método eficiente e complementar para prever efeitos adversos e toxicidade, constituindo uma alternativa a outros processos mais dispendiosos.

Assim, são necessários mais estudos, em organismos aquáticos distintos para alicerçar os resultados obtidos neste estudo e estabelecer os efeitos prejudiciais à saúde dos peixes, resultantes da exposição a concentrações ecologicamente relevantes de zinco e chumbo,

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados

de modo, a constituir um sinal de alerta para o risco da acumulação de metais pesados nos compartimentos aquáticos provenientes de atividades antropogénicas.

VI. Referências Bibliográficas

Abalaka, S. (2015). Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in *Auchenoglanis occidentalis* fish from Tiga dam, Nigeria, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), pp. 67-74.

Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A. e Elmenshawy, O. M. (2012). Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia, *Chemosphere*, 88(8), pp. 1028-1035.

Afshan, S., Ali, S., Ameen, U. S., Farid, M., Bharwana, S. A., Hannan, F. e Ahmad, R. (2014). Effect of different heavy metal pollution on fish, *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 2(1), pp. 74-79.

Ahmad, H., Yousafzai, A. M., Siraj, M., Ahmad, R., Ahmad, I., Nadeem, M. S., Ahmad, W., Akbar, N. e Muhammad, K. (2015). Pollution Problem in River Kabul: Accumulation Estimates of Heavy Metals in Native Fish Species, *Biomedical Research International*, 2015, pp. 537368.

Aktar, M. W., Sengupta, D. e Chowdhury, A. (2011). Occurrence of heavy metals in fish: a study for impact assessment in industry prone aquatic environment around Kolkata in India, *Environmental Monitoring and Assessment*, 181(1-4), pp. 51-61.

Al-Balawi, H. F. A., Al-Akel, A. S., Al-Misned, F., Suliman, E. A. M., Al-Ghanim, K. A., Mahboob, S. e Ahmad, Z. (2013). Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(2), pp. 293-302.

Al Osman, M., Yang, F. e Massey, I. Y. (2019). Exposure routes and health effects of heavy metals on children, *Biometals*, 32(4), pp. 563-573.

Alm-Eldeen, A. A., Donia, T. e Alzahaby, S. (2018). Comparative study on the toxic effects of some heavy metals on the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Middle Delta, Egypt, *Environmental Science Pollution Research International*, 25(15), pp. 14636-14646.

Alsop, D., Ng, T. Y. T., Chowdhury, M. J. e Wood, C. M. (2016). Interactions of waterborne and dietborne Pb in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Bioaccumulation, physiological responses, and chronic toxicity, *Aquatic Toxicology*, 177(8), pp. 343-354.

Alvarado, N. E., Buxens, A., Mazon, L. I., Marigomez, I. e Soto, M. (2005). Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after depuration, *Aquatic Toxicology*, 74(2), pp. 110-125.

Arantes, F. P., Savassi, L. A., Santos, H. B., Gomes, M. V. T. e Bazzoli, N. (2016). Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(1), pp. 137-147.

Asaoka, Y., Togashi, Y., Mutsuga, M., Imura, N., Miyoshi, T. e Miyamoto, Y. (2016). Histopathological image analysis of chemical-induced hepatocellular hypertrophy in mice, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(4), pp. 233-239.

Banihashemi, E. S., Khara, H., Pajand, Z. e Rahnandeh, M. (2016). Histopathological study of gill, kidney and liver of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) and Stellate (*Acipenser stellatus* Pallas, 1811) exposed to sublethal concentration of unionised ammonia UAN, *Journal of Parasitic Diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(4), pp. 1443-1450.

Barja-Fernández, S., Míguez, J. M. e Álvarez-Otero, R. (2013). Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95(9), pp. 60-68.

Bayraktar, U.-D., Seren, S. e Bayraktar, Y. (2007). Hepatic venous outflow obstruction: three similar syndromes, *World Journal of Gastroenterology*, 13(13), pp. 1912-1927.

Behmer, O. A. e Tolosa, E. M. C. D. (2003). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo, Editora Manole Ltda.

Bell, J. G., Tocher, D. R., MacDonald, F. M. e Sargent, J. R. (1995). Effects of dietary borage oil [enriched in γ -linolenic acid, 18:3(n-6)] or marine fish oil [enriched in

eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3)] on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*), *Fish Physiology Biochemistry*, 14(5), pp. 373-383.

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

Bervoets, L., Blust, R. e Verheyen, R. (2001). Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2), pp. 117-127.

Brown, A. R., Gunnarsson, L., Kristiansson, E. e Tyler, C. R. (2014). Assessing variation in the potential susceptibility of fish to pharmaceuticals, considering evolutionary differences in their physiology and ecology, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1656).

Brum, A., Pereira, S. A., Cardoso, L., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P. e Martins, M. L. (2018). Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger, *Fish & Shellfish Immunology*, 74(3), pp. 444-449.

Burgoyne, L. A. (1999). The Mechanisms of Pyknosis: Hypercondensation and Death, *Experimental Cell Research*, 248(1), pp. 214-222.

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

Chen, Q.-L., Gong, Y., Luo, Z., Zheng, J.-L. e Zhu, Q.-L. (2013). Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, *Aquatic Toxicology*, 142-143, pp. 380-386.

Connan, O. e Tack, K. (2010). Metals in marine environment (mollusc *Patella* sp., fish *Labrus bergylta*, crustacean *Cancer pagurus*, beach sand) in a nuclear area, the North Cotentin (France), *Environmental Monitoring and Assessment*, 165(1), pp. 67-86.

Correia, A. T., Rebelo, D., Marques, J. e Nunes, B. (2019). Effects of the chronic exposure to cerium dioxide nanoparticles in *Oncorhynchus mykiss*: Assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68(5), pp. 27-36.

Correia, A. T., Rodrigues, S., Martins, D. F., Nunes, A. C., Ribeiro, M. I. e Antunes, S. C. (2020). Multi-biomarker approach to assess the acute effects of cerium dioxide nanoparticles in gills, liver and kidney of *Oncorhynchus mykiss*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238, pp. 108842.

Costa, M. F. P., Correia, A. T. e Nunes, B. (2018). *Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em Sparus aurata: abordagem baseada em biomarcadores*. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa.

Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. Á. e Costa, M. H. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach, *Aquatic Toxicology*, 92(3), pp. 202-212.

Cuevas, N., Zorita, I., Franco, J., Costa, P. M. e Larreta, J. (2016). Multi-organ histopathology in gobies for estuarine environmental risk assessment: A case study in the Ibaizabal estuary (SE Bay of Biscay), *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 179, pp. 145-154.

Dang, M., Nørregaard, R., Bach, L., Sonne, C., Søndergaard, J., Gustavson, K., Aastrup, P. e Nowak, B. (2017). Metal residues, histopathology and presence of parasites in the liver and gills of fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) near a former lead-zinc mine in East Greenland, *Environmental Research*, 153, pp. 171-180.

Decreto-Lei 113/2013, D. D. a. D. R., Série I Relativo à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. pp. 4709-4739.

Don Xavier, N. D., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P. R., Anu, P. R., Midhun, A. M. e Mohan, D. (2019). Chronic effects of copper and zinc on the fish, *Etroplus suratensis*

(Bloch, 1790) by continuous flow through (CFT) bioassay, *Marine Environmental Research*, 143(2), pp. 141-157.

Dos Santos, A. P. R., Rocha, T. L., Borges, C. L., Bailão, A. M., De Almeida Soares, C. M. e De Sabóia-Morais, S. M. T. (2017). A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*, *Chemosphere*, 168, pp. 933-943.

Dos Santos, C. R., Cavalcante, A. L., Hauser-Davis, R. A., Lopes, R. M. e Mattos Rde, C. (2016). Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nile tilapia, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 129, pp. 250-256.

El-Naggar, A. M., Mahmoud, S. A. e Tayel, S. I. (2009). Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alterations in liver of *Oreochromis niloticus* in relation to water quality at different localities along the River Nile, Egypt, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(2), pp. 105-114.

Fair, P. A., White, N. D., Wolf, B., Arnott, S. A., Kannan, K., Karthikraj, R. e Vena, J. E. (2018). Persistent organic pollutants in fish from Charleston Harbor and tributaries, South Carolina, United States: A risk assessment, *Environmental Research*, 167, pp. 598-613.

FAO. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Em linha]. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i2727e.pdf>. [Consultado em 14/12/2019].

Fatima, M. e Usmani, N. (2013). Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cr, Ni and Pb) in fish (*Channa striatus* and *Heteropneustes fossilis*) tissue: a study for toxicity and ecological impacts, *Pakistany Journal Biology Science*, 16(9), pp. 412-420.

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

Gallego Ríos, S. E., Ramírez Botero, C. M., López Marín, B. E. e Velásquez Rodríguez, C. M. (2018). Evaluation of mercury, lead, and cadmium in the waste material of crevalle jack fish from the Gulf of Urabá, Colombian Caribbean, as a possible raw material in the production of sub-products, *Environmental Monitoring Assessment*, 190(3), pp. 115.

Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E. e Triebkorn, R. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8(3-4), pp. 241-260.

Ghribi, R., Correia, A. T., Elleuch, B. e Nunes, B. (2019). Toxicity Assessment of Impacted Sediments from Southeast Coast of Tunisia Using a Biomarker Approach with the Polychaete *Hediste diversicolor*, *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 76(4), pp. 678-691.

Giardina, A., Larson, S. E., Wisner, B., Wheeler, J. e Chao, M. (2009). Long-term and acute effects of zinc contamination of a stream on fish mortality and physiology, *Environmental Toxicology Chemistry*, 28(2), pp. 287-295.

Golovanova, I. (2008). Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates, *Inland Water Biology*, 1(1), pp. 93.

Hadi, A. e Alwan, S. (2012). Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum, *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(11), pp. 2071-2081.

Henriques, M. A. R. (1998). *Manual de aquacultura : ostra, ameijoia, camarão, truta, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado*. Porto : ICBAS.

Hermenean, A., Damache, G., Albu, P., Ardelean, A., Ardelean, G., Puiu Ardelean, D., Horge, M., Nagy, T., Braun, M., Zsuga, M., Kéki, S., Costache, M. e Dinischiotu, A. (2015). Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, pp. 198-205.

Hogstrand, C. (2011). 3 - Zinc. In: Wood, C. M., Farrell, A. P., Brauner, C. J. (Ed.). *Fish Physiology*. Academic Press, pp 135-200.

- Jabeen, G., Manzoor, F., Javid, A., Azmat, H., Arshad, M. e Fatima, S. (2018). Evaluation of Fish Health Status and Histopathology in Gills and Liver Due to Metal Contaminated Sediments Exposure, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), pp.492-501.
- Jago, C. H., Faivre, A. e Newman, M. C. (1996). Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II), *Aquatic Toxicology*, 34(2), pp. 163-183.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B. e Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals, *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), pp. 60-72.
- Javed, M., Ahmad, I., Usmani, N. e Ahmad, M. (2016). Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal, *Chemosphere*, 151, pp. 210-219.
- Javed, M. e Usmani, N. (2016). Accumulation of heavy metals and human health risk assessment via the consumption of freshwater fish *Mastacembelus armatus* inhabiting, thermal power plant effluent loaded canal, *SpringerPlus*, 5(1), pp. 776.
- Junejo, S. H., Baig, J. A., Kazi, T. G. e Afridi, H. I. (2019). Cadmium and Lead Hazardous Impact Assessment of Pond Fish Species, *Biology Trace Elements Research*, 191(2), pp. 502-511.
- Kaoud, H. e El-Dahshan, A. (2010). Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish, *Nature and Science*, 8(4), pp. 147-156.
- Kargin, F., Dönmez, A. e Çoğun, H. (2001). Distribution of heavy metals in different tissues of the shrimp *Penaeus semiculatus* and *Metapenaeus monocerus* from the Iskenderun Gulf, Turkey: seasonal variations, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(1), pp. 102-109.
- Karri, V., Schuhmacher, M. e Kumar, V. (2016). Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, pp. 203-213.

Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N. e Amara, R. (2012). Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: Effects of metallic and organic compounds, *Aquatic Toxicology*, 108, pp. 130-140.

Khayat-zadeh, J. e Abbasi, E. (2010). The Effects of Heavy Metals on Aquatic Animals. *The 1st International Applied Geological Congress, Department of Geology, Islamic Azad University - Mashad Branch*, pp. 26-28.

Kim, J. J., Kim, Y. S. e Kumar, V. (2019). Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies, *Journal Trace Elements Medical Biology*, 54, pp. 226-231.

Kloubert, V. e Rink, L. (2015). Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells, *Food Functions*, 6(10), pp. 3195-3204.

Koca, Y. B., Koca, S., Yildiz, S., Gürcü, B., Osañç, E., Tunçbaşı, O. e Aksoy, G. (2005). Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Cine stream (Aydın/Turkey) with determination of water pollution, *Environmental Toxicology*, 20(6), pp. 560-571.

Lee, J.-W., Choi, H., Hwang, U.-K., Kang, J.-C., Kang, Y. J., Kim, K. I. e Kim, J.-H. (2019). Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68, pp. 101-108.

Leitemperger, J., Menezes, C., De Oliveira, V. A., Fiuza, T., Barcarolli, I. F., Pereira, M. E., Bianchini, A. e Loro, V. L. (2019). The bioaccumulation of waterborne zinc in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and its effect on biochemical parameters, *Biometals*, 32(2), pp. 241-249.

Li, X., Shen, H., Zhao, Y., Cao, W., Hu, C. e Sun, C. (2019). Distribution and Potential Ecological Risk of Heavy Metals in Water, Sediments, and Aquatic Macrophytes: A Case Study of the Junction of Four Rivers in Linyi City, China, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16), pp. 2861.

Linnaeus. (1758). Cultured Aquatic Species Information Programme. Psetta maxima. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [Em linha]. Disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta_maxima/en. [Consultado em 16/12/2019].

Loro, V. L., Nogueira, L., Nadella, S. R. e Wood, C. M. (2014). Zinc bioaccumulation and ionoregulatory impacts in *Fundulus heteroclitus* exposed to sublethal waterborne zinc at different salinities, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166, pp. 96-104.

Łuczyńska, J., Paszczyk, B. e Łuczyński, M. J. (2018). Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 153, pp. 60-67.

Lukin, A., Sharova, J., Belicheva, L. e Camus, L. (2011). Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), pp. 355-365.

Maccotta, A., Cosentino, C., Coccioni, R., Frontalini, F., Scopelliti, G. e Caruso, A. (2016). Distribution of Cr and Pb in artificial sea water and their sorption in marine sediments: an example from experimental mesocosms, *Environmental Science Pollution Research International*, 23(23), pp. 24068-24080.

Macêdo, A. K. S., Santos, K. P. E. D., Brighenti, L. S., Windmöller, C. C., Barbosa, F. a. R., Ribeiro, R. I. M. D. A., Santos, H. B. D. e Thomé, R. G. (2020). Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil, *Science of The Total Environment*, 735, pp. 139505.

Macirella, R., Sesti, S., Bernabò, I., Tripepi, M., Godbert, N. e Brunelli, E. (2019). Lead toxicity in seawater teleosts: A morphofunctional and ultrastructural study on the gills of the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo* L.), *Aquatic Toxicology*, 211, pp. 193-201.

Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Al-Balawi, H. F., Al-Misned, F. e Ahmed, Z. (2020). Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir, *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), pp. 970-973.

Maronpot, R. R., Yoshizawa, K., Nyska, A., Harada, T., Flake, G., Mueller, G., Singh, B. e Ward, J. M. (2010). Hepatic enzyme induction: histopathology, *Toxicologic Pathology*, 38(5), pp. 776-795.

Mekkawy, I., Mahmoud, U., Wassif, E. e Naguib, M. (2012). Protective roles of tomato paste and vitamin E on cadmium-induced histological and histochemical changes of liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(4), pp. 240.

Monteiro, S., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A. e Sousa, M. (2008). Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure, *Journal of Fish Biology*, 73(6), pp. 1376-1392.

Morrison, J., Smith, C., Heidel, J., Mumford, S., Blazer, V. e Macconnell, E. (2007). *Fish Histology and Histopathology Manual*. West Virginia, National Conservation Training Center.

Mucha, A. P., Vasconcelos, M. T. S. D. e Bordalo, A. A. (2003). Macrobenthic community in the Douro estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics, *Environmental Pollution*, 121(2), pp. 169-180.

Mustafa, S. A. (2020). Histopathology and heavy metal bioaccumulation in some tissues of *Luciobarbus xanthopterus* collected from Tigris River of Baghdad, Iraq, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), pp. 123-129.

Mwihia, E. W., Mbuthia, P. G., Eriksen, G. S., Gathumbi, J. K., Maina, J. G., Mutoloki, S., Waruiru, R. M., Mulei, I. R. e Lyche, J. L. (2018). Occurrence and Levels of Aflatoxins in Fish Feeds and Their Potential Effects on Fish in Nyeri, Kenya, *Toxins*, 10(12), pp. 543.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., MacKinnon, M. D. e Dixon, D. G. (2006). Gill and liver histopathological changes in

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados

yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), pp. 365-377.

Newarman, M. (1998). *Fundamentals of ecotoxicology*. Chelsea, EUA, CRC Press.

Nunes, B., Brandão, F., Sérgio, T., Rodrigues, S., Gonçalves, F. e Correia, A. T. (2014a). Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress and metabolism, *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), pp. 7501-7511.

Nunes, B., Capela, R. C., Sérgio, T., Caldeira, C., Gonçalves, F. e Correia, A. T. (2014b). Effects of chronic exposure to lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*, *Environmental Science Pollution Research International*, 21(8), pp. 5689-5700.

OECD (2000). *Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test*. Paris, OECD Publishing.

Oğuz, A. R. e Yeltekin, A. (2014). Metal levels in the liver, muscle, gill, intestine, and gonad of Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichi*) with abnormal gonad, *Biological Trace Element Research*, 159(1-3), pp. 219-223.

Olojo, E., Olurin, K., Mbaka, G. e Oluwemimo, A. (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.

Paruruckumani, P. S., Maharajan, A., Ganapiriya, V., Narayanaswamy, Y. e Jeyasekar, R. R. (2015). Surface Ultrastructural Changes in the Gill and Liver Tissue of Asian Sea Bass *Lates calcarifer* (Bloch) Exposed to Copper, *Biological Trace Elements Research*, 168(2), pp. 500-507.

Parvin, E., Islam, M., Akter, M., Khan, M. e Al Mamun, M. H. (2014). Lead- and cadmium-induced histopathological changes in gill, kidney and liver tissue of freshwater climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch, 1792), *Chemistry and Ecology*, 30(6), pp. 532-540.

Paul, N., Chakraborty, S. e Sengupta, M. (2014). Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*, *Aquatic Toxicology*, 152, pp. 105-112.

Pouil, S., Oberhänsli, F., Bustamante, P. e Metian, M. (2017). Dietary Zn and the subsequent organotropism in fish: No influence of food quality, frequency of feeding and environmental conditions (pH and temperature), *Chemosphere*, 183, pp. 503-509.

Ptashynski, M. e Klaverkamp, J. (2002). Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*), *Aquatic Toxicology*, 58(3-4), pp. 249-264.

Qualhato, G., De Sabóia-Morais, S. M. T., Silva, L. D. e Rocha, T. L. (2018). Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles, *Aquatic Toxicology*, 198, pp. 63-72.

Rajeshkumar, S. e Li, X. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China, *Toxicology Reports*, 5, pp. 288-295.

Ratn, A., Prasad, R., Awasthi, Y., Kumar, M., Misra, A. e Trivedi, S. P. (2018). Zn(2+) induced molecular responses associated with oxidative stress, DNA damage and histopathological lesions in liver and kidney of the fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793), *Ecotoxicology Environmental Safety*, 151, pp. 10-20.

Ribeiro, A. M., Risso, W. E., Fernandes, M. N. e Martinez, C. B. (2014). Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*, *Fish Physiology Biochemistry*, 40(3), pp. 645-657.

Rodrigues, S., Antunes, S. C., Nunes, B. e Correia, A. T. (2019a). Histopathological effects in gills and liver of *Sparus aurata* following acute and chronic exposures to erythromycin and oxytetracycline, *Environmental Science Pollution Research International*, 26(15), pp. 15481-15495.

Rodrigues, S., Antunes, S. C., Nunes, B. e Correia, A. T. (2019b). Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species *Oncorhynchus mykiss*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, pp. 1-10.

Rose, S. e Shea, J. A. (2007). Environmental geochemistry of trace metal pollution in urban watersheds, *Developments in Environmental Science*, 5, pp. 99-131.

Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A. e Movahedinia, A. (2012). Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream, *Toxicology and Industrial Health*, 28(7), pp. 583-592.

Saibu, Y., Jamwal, A., Feng, R., Peak, D. e Niyogi, S. (2018). Distribution and speciation of zinc in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during acute waterborne zinc exposure: Interactions with cadmium or copper, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 206-207, pp. 23-31.

Samanta, P., Bandyopadhyay, N., Pal, S., Mukherjee, A. K. e Ghosh, A. R. (2015). Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1%+chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, pp. 360-367.

Santos, D. C. M. D., Matta, S. L. P. D., Oliveira, J. A. D. e Santos, J. A. D. D. (2012). Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8), pp. 861-866.

Schlicht, K., Krattenmacher, N., Lugert, V., Schulz, C., Thaller, G. e Tetens, J. (2019). Estimation of genetic parameters for growth and carcass traits in turbot (*Scophthalmus maximus*), *Archives Animal Breeding*, 62(1), pp. 265-273.

Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M. e Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review, *Environmental Research*, 137, pp. 246-255.

Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. e Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival, *Oncotarget*, 7(34), pp. 55863-55889.

Spry, D. J. e Wiener, J. G. (1991). Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review, *Environmental pollution*, 71(2-4), pp. 243-304.

Squadrone, S., Prearo, M., Brizio, P., Gavinelli, S., Pellegrino, M., Scanzio, T., Guarise, S., Benedetto, A. e Abete, M. (2013). Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney

and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers, *Chemosphere*, 90(2), pp. 358-365.

Steinel, N. C. e Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms, *Frontiers in Immunology*, 8, pp. 827.

Stohs, S. J. e Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), pp. 321-336.

Syasin, I. G., Khlopova, A. V. e Chukhlebova, L. M. (2012). Assessment of the state of the gibel carp *Carassius auratus gibelio* in the Amur River Basin: heavy-metal and arsenic concentrations and histopathology of internal organs, *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 62, pp. 465-478.

Tariq, J., Jaffar, M. e Ashraf, M. (1991). Levels of selected heavy metals in commercial fish from five freshwater lakes, Pakistan, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 33(1-2), pp. 133-140.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. e Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment, *Experientia Supplementum*, 101, pp. 133-164.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. e Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure, *Environmental Pollution*, 121(3), pp. 307-320.

Trefts, E., Gannon, M. e Wasserman, D. H. (2017). The liver, *Current Biology: CB*, 27, pp. 1147-1151.

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

Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M. e 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(3), pp. 432-440.

Vandamme, S. G., Maes, G. E., Raeymaekers, J. A., Cottenie, K., Imsland, A. K., Hellemans, B., Lacroix, G., Mac Aoidh, E., Martinsohn, J. T., Martínez, P., Robbens, J., Vilas, R. e Volckaert, F. A. (2014). Regional environmental pressure influences population differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*), *Molecular Ecology*, 23(3), pp. 618-636.

Wilson, J. M., Bunte, R. M. e Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*), *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(6), pp. 785-789.

Xu, X., Cui, Z., Wang, X., Wang, X. e Zhang, S. (2018). Toxicological responses on cytochrome P450 and metabolic transferases in liver of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to lead and paraquat, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 151, pp. 161-169.

Yang, Y., Jin, Q., Fang, J., Liu, F., Li, A., Tandon, P. e Shan, A. (2017). Spatial distribution, ecological risk assessment, and potential sources of heavy metal (loid) s in surface sediments from the Huai River within the Bengbu section, China, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12), pp. 11360-11370.

Yi, Y., Yang, Z. e Zhang, S. (2011). Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin, *Environmental Pollution*, 159(10), pp. 2575-2585.

Yilmaz, A. B., Yanar, A. e Alkan, E. N. (2017). Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: some essential metals, *Reviews on Environmental Health*, 32(1-2), pp. 119-163.

Zhao, X., Gao, B., Xu, D., Gao, L. e Yin, S. (2017). Heavy metal pollution in sediments of the largest reservoir (Three Gorges Reservoir) in China: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(26), pp. 20844-20858.

Zheng, J. L., Luo, Z., Chen, Q. L., Liu, X., Liu, C. X., Zhao, Y. H. e Gong, Y. (2011). Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation, enzymatic activities and

Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados

histology of *Synechogobius hasta*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), pp. 1864-1873.

Zheng, J. L., Zeng, L., Xu, M. Y., Shen, B. e Wu, C. W. (2017). Different effects of low- and high-dose waterborne zinc on Zn accumulation, ROS levels, oxidative damage and antioxidant responses in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, *Fish Physiology Biochemistry*, 43(1), pp.153-163.