

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Diana Filipa Brito Martins

**Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos
presentes no ambiente aquático ao nível das
alterações tecidulares reportadas em peixes por
vários estudos de toxicologia ambiental**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, Setembro de 2015

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Discente:

Diana Filipa Brito Martins

(assinatura)

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia

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

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Agradecimentos

Devo os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Doutor Alberto Correia, pela total disponibilidade, apoio e por não desistir de mim no decorrer desta longa caminhada.

À instituição Universidade Fernando Pessoa, pelo apoio e acolhimento durante a minha formação académica.

Obrigada à minha Família, os meus pilares, que nunca me deixaram desistir deste projeto. Agradeço o apoio e tudo o que me ensinaram e proporcionaram ao longo da vida, sempre com amor.

Obrigado!

Resumo

Atualmente a poluição e contaminação do meio aquático devido à crescente descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas, intencionais ou acidentais, é um assunto relevante de Saúde Pública, sendo alvo de vários estudos e debates na comunidade científica e civil. Os fármacos, em função do seu elevado consumo e ineficaz remoção pelas estações de tratamento de águas residuais, são continuamente libertados para o compartimento aquático sob a sua forma original ou de metabolito secundário. Os fármacos utilizados na saúde humana, prática veterinária e aquacultura, possuem características físico-químicas que lhes conferem elevada persistência ambiental exercendo, frequentemente, toxicidade em organismos não-alvo ao nível de vários níveis tróficos. A sua acumulação no ambiente aquático tem demonstrado ser capaz de induzir mudanças patológicas nos peixes, a mais numerosa classe de vertebrados deste compartimento. Assim, o estudo dos efeitos toxicológicos na saúde do ecossistema reveste-se de uma importância primordial, pelo que a caracterização e quantificação deste risco é fundamental. Os peixes são o alvo deste trabalho pois são considerados espécies sentinelas, sendo utilizados como indicadores primários da qualidade da água, permitindo uma avaliação dos efeitos causados pela exposição continuada e concentrações sub-letais de xenobióticos, em particular aos fármacos. A histologia é considerada uma ferramenta sensível e útil para a determinação do estado de saúde dos peixes, registando os efeitos da exposição aguda ou crónica destes organismos aos xenobióticos aquáticos. Neste trabalho fez-se uma revisão bibliográfica sobre os efeitos histopatológicos de alguns fármacos ao nível dos principais órgãos afetados nos peixes (e.g. fígado, rim e gónadas).

Palavras-chave: Meio ambiente; poluentes emergentes; organismos aquáticos; histopatologia

Abstract

Nowadays, pollution and contamination of the aquatic environment as a consequence of human activities is a major concern in what regards public health, as shown by the increasing number of scientific studies and debate within the scientific community.

Several drugs used in human health, in light of their intensive use and deficient treatment, are continuously discharged to the environment, ultimately ending in aquatic compartments, either in their native form or as metabolites. A relevant number of drugs used in human health, veterinarian medicine or aquaculture display physical and chemical characteristics that confer them high environmental persistence, which frequently results in toxicity phenomena in non-target organisms across several trophic levels. Their accumulation in aquatic environments has been increasingly associated with pathological alterations in fish, the most representative class of vertebrates in the aquatic environment. Thus, the toxicological impact of these molecules in aquatic and human health are of pivotal importance, with the characterization and quantification of these risks being essential. In this work the organisms under study will be fish, as they are used as early markers of water quality, hence allowing the evaluation of the effects triggered by xenobiotics, in particular pharmaceuticals. Histopathology is a sensitive and useful tool for determining the health status of fish, being used for following the effects of acute or chronic exposition of fish to aquatic xenobiotics. In this work, a literature review focusing on the histopathological effects of some drugs on fish will be presented, with particular emphasis on the most relevant organs affected (e.g. liver, kidney and gonads), with special emphasis on gills.

Keywords: Environment; emerging pollutants; aquatic organisms; histopathology

Índice de Figuras

Figura 1 – Diferentes colorações de contraste de fase frequentemente usadas em histopatologia: **A** – hematoxilina/eosina. **B** – Giemsa. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 2 – Levantamento epitelial (**a**) e edema intraepitelial (**b**). Coloração H/E. Extraído de Cengiz et al. (2003).

Figura 3 – Secções de brânquias de *Solea senegalensis*. (**a**) – Estrutura normal das brânquias no grupo controlo; (**b**) Brânquias de grupos expostos a sulfonato de dodecilbenzeno, evidenciando levantamento e fusão das lamelas secundárias. Coloração H/E. Extraído de Alvarez-Muños (2009).

Figura 4 – **A** – Brânquias normais; **B** Brânquias com edema. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 5 – Fusão de lamelas secundárias (**a**), hiperplasia epitelial (**b**) e hemorragia nas lamelas primárias (**c**). Coloração H/E. Extraído de Cengiz et al. (2003).

Figura 6 – Hipertrofia de células epiteliais (**a**). Coloração H/E, Extraído de Cengiz et al. (2003).

Figura 7 – Brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. (**a**) Grupo controlo; (**b**) Tratamento com triclorfon 0.05 mg/L, exposição de 24 horas. **P**: lamela primária; **S**: lamela secundária; **t**: telangiectasia; **h** hiperplasia da lamela secundária. Coloração H/E. Extraído de Mataquero, (2009).

Figura 8 – Secções de tecido branquial de *Lepomis cyanellus*. **Imagem superior**: Grupo controlo evidenciando lamelas secundárias uniformes e bem definidas; **Imagem inferior**: Grupo exposto a selénio: telangiectasias. Adaptado de Lemly et al. (2002).

Figura 9– Alterações histopatológicas registadas nas brânquias de *Acanthopagrus latus* expostas a HgCl₂. Levantamento epitelial e edema das lamelas com espaços sub-epiteliais evidentes (setas pretas), hiperplasia das células epiteliais (* branco) com fusão parcial das lamelas (ponta de seta preta), alteração morfológicas das lamelas (seta cinzenta), lamelas com o canal marginal dilatado (círculo preto), congestão sanguínea (ponta de seta cinzenta), aneurisma lamelar (* preto), desorganização lamelar (seta branca), hipertrofia do epitélio lamelar (ponta de seta branca), infiltração leucocitária (seta não-preenchida), aumento das células mucosas (seta picotada), rutura epitelial (círculo branco). **a-c**, tratamento com HgCl₂ 10g/L; **d-f** tratamento com HgCl₂ 20 g/L; **g-h** tratamento com 35 g/L; **j-k** tratados com HgCl₂ 50 g/L. **a-c, f e k**: coloração H/E, x2900; **e, g e i**: coloração H/E, x725; **d e h**: coloração ácido periódico-Schiff, x725. Extraído de Hassaninezhad et al. (2009).

Figura 10 – Histologia clássica do rim. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 11 – Necrose renal. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 12 – **A** – Fígado normal; **B** – Fígado com edema. **C** - esteatose moderada; **D** - esteatose severa. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 13 – Cortes histológicos de testículos e ovários. Extraído de Mumford et al. (2007).

Figura 14 – Estrutura química do diclofenac. Extraído de Pubmed Compound (17-8-2015)

Figura 15 - Deteção imuno-histológica de granulócitos em tecido renal de *S. trutta* exposto a diclofenac nas doses indicadas durante 21 dias. As imagens em causa são representativas da média dos indivíduos estudados. Extraído de Hoeger et al. (2005).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Figura 16 - Detecção imuno-histológica de granulócitos em brânquias de *S. trutta* exposto a diclofenac nas doses indicadas durante 21 dias. A exposição a este fármaco levou a um aumento de granulócitos, o qual foi máximo para a concentração mais baixa testada, 0.5 µg/L. Extraído de Hoeger et al. (2005).

Figura 17. Coloração H/E de cortes histológicos de tecido renal da truta arco-íris. Controlo (A); Exposição a 100 µg/L de diclofenac na ampliação x250 (B) e x400 (C). Extraído de Schwaiger et al. (2004).

Figura 18 - Coloração H/E de cortes histológicos de tecido brânquial da truta arco-íris. Controlo (A); Exposição a 100 µg/L de diclofenac na ampliação x400 (B). Extraído de Schwaiger et al., (2004).

Figura 19 – Estrutura química do paracetamol. Extraído de Pubmed Compound (17-8-2015).

Figura 20 – (A) Brânquias controlo, apresentando morfologia normal. L lamela; F filamento, CC célula de cloreto, SL lamela secundária. (B) Brânquias tratadas com paracetamol, 500 mg/kg. Extraído de Kavitha et al. (2011).

Fígura 21 – Cortes histológicos de A – Fígado controlo. He hepatócito; Pa pancreas; Bv vaso sanguíneo; V vacuolização; BC congestão sanguínea. B - Amostra de fígado de animais tratados com paracetamol. Extraído de Kavitha et al. (2011).

Figura 22 –A - Morfologia normal do músculo. (a) Feixes de fibras; (b) tecido conjuntivo. B Músculo de indivíduos tratados com paracetamol. (c) disposição anormal das fibras musculares; (d) músculo de diâmetro elevado (atípico). Extraído de Kavitha et al. (2011).

Figura 23 – Estrutura química do ácido salicílico. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 24- Morfologia normal das brânquias de *S. trutta fario* após 28 dias de exposição ao ácido salicílico. (a); aneurisma (b), proliferação epitelial [lamelar] (c): levantamento

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental epitelial (**d**); necrose lamelar [lamela secundária] (**e**); fusão lamelar (**f**). Extraído de Nunes et al. (2015b).

Figura 25 – Estrutura normal (**a**) do fígado de *Salmo trutta fario* e alterações patológicas após exposição a ácido salicílico durante 28 dias: dilatação dos vasos sinusoides (**b**); hemorragia (**c**); infiltração de células inflamatórias (**d**); vacuolização hepatocelular (**e**) e processo necrótico (**f**). Extraído de Nunes et al. (2015b).

Figura 26 – Estrutura química do ibuprofeno. Extraído de Pubmed Compound (17-8-2015).

Figura 27 – Efeito do ibuprofeno no desenvolvimento do peixe zebra (fases de blastulação e segmentação). Embriões controlo (**A**) e aos 14-somitos (estruturas epiteliais transitórias que se formam nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário dos vertebrados) (**B**) evidenciando blastómeros intactos (**bm**) e a formação de vesículas ópticas (**ov**), cérebro (**b**), somitos (**so**) e extremidade caudal (**tb**). Extrusão dos blastómeros para o espaço coriônico após exposição a ibuprofeno 100 µg/L (**C**). Perda de organização de **ov**, **b**, **so**, e **tb** após exposição a 50 µg/L. Embriões marcados com laranja acridina (**E** e **F**), correspondentes aos estádios **C** e **D**. Ampliação 40x. Extraído de Anuradha et al. (2009).

Figura 28. Impacto do ibuprofeno na formação do coração em larvas de *D. rerio*. Pericárdio normal (**A**); edema pericárdico após exposição a 10 µg/L (**B**). Edema pericárdico severo com rutura coriônica após exposição a 50 µg/ (**C**) e 100 µg/L. Ampliação x40. Extraído de Anuradha et al. (2009).

Figura 29 – Estrutura química do etinilestradiol (esquerda) e nonilfenol (direita). Extraído de Pubmed Compound (17-8-2015).

Figura 30 - Micrografias das gónadas de indivíduos adultos da espécie *Gobiocypris rarus*, coloração com hematoxilina/eosina. **A** – Tecido ovárico maduro (controlo, x100); **B** – Tecido testicular maduro (controlo, x400); **C** – Degeneração do ovário, 25 ng/L etinilestradiol; **D** – Testículos-óvulos dos grupos tratados com as doses mais elevadas

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

de etinilestradiol e nonifenol: A seta assinala oócitos perinucleares (x400). Imagem extraída de Zha et al. (2007).

Figura 31 – Estrutura química do dutasterida. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 32 - Secções de ovários de *P. promelas*. Controlo (**A**); Ovários de animais expostos a dutasterida (**B e C**) na concentração 100 µg/L durante 21 dias. Extraído de Margiotta-Casaluci et al. (2013).

Figura 33 – Estrutura química da tetraciclina. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 34 - Alterações patológicas observadas nas brânquias de *G. holbrooki* exposto a várias concentrações de tetraciclina. **a** Hipertrofia das lamelas primárias e secundárias; **b** levantamento epitelial; **c** Aneurisma; **d** Fusão lamelar; **e** Proliferação celular do epitélio primário; **f** Necrose. Tempo de exposição: 96 horas. Extraído de Nunes et al. (2015a).

Figura 35 - Histologia normal (**a**) e observações patológicas (**b-d**) no fígado de *G. holbrooki* após 86 horas de exposição a várias concentrações de tetraciclina. (**b**) aumento dos vasos sinusóides (**c**) congestão vascular e (**d**) vacuolização hepatocelular. Extraído de Nunes et al. (2015a).

Figura 36 – Estrutura química da tobramicina. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 37 – Estrutura química da gentamicina. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 38 - Análise histológica dos túbulos renais do peixe-zebra. (**A**) Animais injetados apenas com uma solução de NaCl, 96 horas após a fertilização, onde se podem observar apenas alguns lisossomas (estruturas redondas escuras) e núcleos com 2-3 nucléolos. (**B**) Efeito da gentamicina. Fosfolipidose lisossomal marcada e distensão do lumen tubular, bem como do espaço de Bowman (**BS**). **GL** – glomérulo; **CV**: Veia

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental
cardinal; **PT**: Túbulos pronéfricos proximais. Escala: 50 μ m. Extraído de Hentschel et al. (2005).

Figura 39 – Estrutura química da lovastatina. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 40 - (A) Imagem representativa de tecido de peixe-zebra controlo. (B) Imagem de tecido de peixe-zebra tratado com estatina (50 μ M) durante 12 horas. Extraído de Huang et al. (2011).

Figura 41 – Estrutura química do gemfibrozil. Extraído e Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 42 – Estrutura química do clofibrato. Extraído de Pubmed Compound (10-9-2015).

Figura 43 - Reversibilidade do síndrome da má-absorção induzido pelo clofibrato. (A–D) Coloração de azul de Alcian. Larvas controlo 3 daf (A) e 4 daf (B). Larvas tratadas com clofibrato (0.75 mg/L) 3 daf (C) e 4 (daf) (D). A reversibilidade da síndrome de má-nutrição induzido pelo clofibrato é evidenciada nos animais que, após exposição inicial, prosseguiram o seu ciclo de vida na ausência do composto. Larvas controlo aos 3 daf (E), 4 daf (G), 5 daf (I) e 7 daf (K). Larvas tratadas com clofibrato (0.75 mg/l) aos 3 daf (F), 4 daf (H) e 5 daf (J). Larvas 5 daf, expostas ao clofibrato dos 2 daf até 3 daf., incubadas em água nos restantes dias (J); Larvas 7 daf, expostas ao clofibrato do dia 2 ao dia 3, com incubação em água nos restantes 4 dias (L). **ai**: intestino anterior; **cb**: arcos cérebro-branquiais; **ch**: ceratohial; **e**: olho; **l**: fígado; **n**, notocorda; **m**: cartilagem de Meckel; **sb**: bexiga natatória; **ys**: saco vitelino. Escala: 100 μ m. daf – dias após fertilização. Extraído de Raldúa et al. (2008).

Figura 44 – Coloração de material lipídico com o corante Oil Red O em larvas de peixe-zebra. Larvas controlo 3 daf (A) e 4 daf (B,D); Larvas tratadas com clofibrato 0.75 mg/L 3 daf (C); Larvas tratadas com 0.5 mg/L de clofibrato 4 daf (F,E); Os painéis B e E constituem ampliações do torax. (e) olho; (da) aorta dorsal; vaso dorsal (longitudinal anastomático) (dlav); (h) coração; (i) intestino; (isv) vaso intersegmental;

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

(**pcv**) veia carninal posterior; (**sb**) bexiga natatória; (**ys**) saco vitelino; Escala: 100 µm nos painéis **A, C, D, F** e 50 µm nos painéis **B** e **E**. Extraído de Raldúa et al. (2008).

Figura 45 – Imagem de imunofluorescência direcionada ao T4 de larvas 5 daf (**A**) e tratadas com 0.75 mg/L de clofibrato (**B**). As setas brancas evidenciam os folículos tiroideus (**ft**). As estruturas circulares a preto correspondem aos olhos. Extraído de Raldúa et al. (2008).

Figura 46 – Estrutura química da L-carnitina. Extraído de Pubmed Compound (17-8-2015).

Figure 47 – Microfotografias de secções de fígado coradas com H/E após 56 dias de dieta livre de carnitina (**A**) ou com suplementação com L-carnitina (**B**, 530 mg L-carnitina / kg de alimento). O núcleo dos hepatócitos está marcado com uma seta, enquanto o vacúolo citoplasmático é assinalado pelo asterisco. Extraído de Nunes et al. (2014).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados toxicológicos referentes a AINES em peixes. (Corcoran et al. 2010).

Tabela 2 - Dados toxicológicos referentes a fibratos e antibióticos em peixes. (Corcoran et al. 2010).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Abreviaturas

AINE	Anti-inflamatório não esteroide
CAT	Catalase
COX	Ciclooxigenase
EROD	Etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase
GST	Glutathiona- <i>S</i> -transferase
H/E	Hematoxilina/eosina
HMGR	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IHS	Índice hepatossomático
IGS	Índice gonadossomático
INS	Índice nefrossomático
n.v.	Nome vulgar
PPAR	Recetores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas-alfa
ROS	Espécies reativas oxigénio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido desmutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Índice geral

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract	VI
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas.....	XIV
Abreviaturas	XV
Índice da dissertação	XVII

Índice

1. Introdução	1
2. Histologia e histopatologia em peixes	5
2.1. Brânquias.....	6
2.2. Rim.....	13
2.3. Fígado.....	15
2.4. Sistema reprodutor	16
3. Fármacos	18
3.1. Anti-inflamatórios não-esteroides (AINES).....	18
3.2. Esteróides sexuais	29
3.3. Antibióticos	33
3.4. Anti-dislipidémicos	38
3.5. Outras moléculas	44
4. Conclusão	46
5. Bibliografia	47

1. Introdução

A presença de resíduos de produtos farmacêuticos no compartimento aquático tem sido crescentemente referida como um exemplo de poluentes antropogénicos emergentes em estudos de monitorização ambiental (Zuccato et al. 2000; Corcoran et al. 2010). A sua elevada taxa de utilização diária é uma das causas da contaminação antropogénica do meio aquático.

A par da sua utilização intensiva, as características físico-químicas de vários fármacos, tais como elevada lipofilia, fenómenos de biomagnificação e bioacumulação, resultam frequentemente em elevada persistência ambiental (Bernet et al. 1999b; Elahee et al. 2007). A isto acresce o facto de, além dos fármacos nativos, serem encontrados frequentemente os seus metabolitos e/ou produtos de degradação (Kostich et al. 2008).

Os efluentes domésticos e hospitalares estão entre as fontes mais relevantes destas moléculas, sendo igualmente de referir o contributo das explorações pecuárias (Bester et al. 2008; Strauch et al. 2008; Fatta-Kassinos et al. 2010).

A relação entre a acumulação de produtos xenobióticos – compostos tóxicos naturais ou antropogénicos – em águas e nos organismos aquáticos e conseqüentemente o aparecimento de problemas de saúde tanto em peixes como em seres humanos tem vindo a ser demonstrada (Elahee et al. 2007). Estes efeitos nefastos têm mostrado ser problemáticos não só a curto prazo, mas também a nível crónico, na medida em que podem comprometer a pureza hidrológica de bacias hidrográficas e reservatórios subterrâneos, em função da sua elevada persistência ambiental (Bernet et al. 1999a).

A toxicidade destes xenobióticos pode estar relacionada com fatores químicos como a sua lipofilia (aumento da absorção e distribuição do xenobiótico, diminuindo a sua excreção), tamanho, estrutura química, pK_a , entre outros. Por outro lado existem fatores biológicos a ter em conta, como a espécie do peixe em estudo, o sexo, fatores genéticos, dieta, idade, possíveis estados patológicos, entre outros (Braunbeck et al. 1998).

Entre as classes de fármacos já encontradas em concentrações toxicologicamente relevantes em águas superficiais e subterrâneas podem destacar-se os analgésicos, as hormonas, os anti-inflamatórios e os anticonvulsivantes, entre outros (Zuccato et al. 2000; Buerge et al. 2006; Huerta-Fontela et al. 2007).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Os peixes são, frequentemente, vulneráveis à toxicidade causada por estes xenobióticos como consequência do contacto constante e próximo da pele e brânquias com o veículo hídrico circundante, assim como com sedimentos e material particulado. Este fenómeno é aumentado em locais com baixa taxa de diluição da água, sendo considerado por muitos autores como um indicador relevante e apropriado para a o nível de poluição ambiental (Bernet et al. 1999a; Breseghelo et al. 2004; Figueiredo-Fernandes et al. 2006; Ayas et al. 2007). Além do contacto direto já referido, o efeito nocivo dos xenobióticos pode, também, ser desencadeado por via trófica através da ingestão de presas contaminadas (Van Der Oost et al. 2003).

Ao nível dos peixes, as consequências deste tipo de poluição podem ser diversificadas, variando entre pequenas alterações bioquímicas, danos a nível celular e/ou mudanças a nível populacional, de acordo com o mecanismo de ação e severidade do efeito toxicológico (Bernet et al. 1999a). Em todos os casos, porém, é importante conhecer o mecanismo de ação dos xenobióticos, os quais induzem alterações ao nível da biologia celular e/ou molecular e que frequentemente se manifestam em níveis de organização superior à célula, nomeadamente a nível tecidular ou dos órgãos. Estas disfunções levantam problemas que se podem manifestar a vários níveis, quer em termos do seu crescimento, quer a nível da reprodução. Nos peixes os órgãos mais afetados são o fígado, rim, brânquias e a pele, sendo como tal considerados indicadores diretos do estado de saúde dos peixes (Adams 1990; Bernet et al. 1999a).

Embora escassos, existem já alguns estudos de revisão sobre a toxicidade de vários fármacos a nível dos peixes (Tabelas 1 e 2) (Corcoran et al. 2010).

A avaliação histológica de uma lesão pode fornecer informações relativamente à duração e intensidade da exposição ao xenobiótico, bem como a eventual capacidade de resolução e adaptação por parte dos organismos. A análise histológica assume-se, assim, como um parâmetro essencial para determinar alterações celulares que podem ocorrer nos órgãos-alvo referidos sendo, como tal, uma ferramenta útil e sensível para avaliar os efeitos sub-letais e crónicos dos xenobióticos nestes organismos (Bernet et al. 1999b; Short et al. 2001; Cengiz et al. 2003), podendo inclusivamente elucidar os mecanismos de ação envolvidos (Adams 1990).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Tabela 1 – Dados toxicológicos referentes a AINES em peixes. Extraído de Corcoran et al. (2010).

Pharmaceutical	Measured environmental concentration		Toxic effect concentration		Endpoint measured	Species	Reference
	STP effluent	surface water	µg/L	mg/L			
NSAIDs							
Diclofenac	0.81-33.9 µg/L	6.2 ng/L-1.8 µg/L	0.50-50.00	0.0005-0.0500	Hinders prosta glandin synthesis	Brown trout	Hoeger et al., 2005
			0.50-50.00	0.0005-0.0500	Damage to gill, liver, and kidney	Brown trout	Hoeger et al., 2005
			5	0.005	Histological alterations kidney	Rainbow trout	Schwaiger et al., 2004
			5	0.005	Histological alterations gills	Rainbow trout	Schwaiger et al., 2004
			1	0.001	Cytological alterations; liver, kidney, gills	Rainbow trout	Triebkorn et al., 2004
Ibuprofen	0.37-85 µg/L	70 ng/L-2.7 µg/L	296150	296.1500 (1 mM)	Inhibition of CYP2M	Carp	Thibaut et al., 2006
			1.00-100.00	0.0010-0.1000	Change to reproduction pattern	Medaka	Flippin et al., 2007
			1000	1	Impairment of ion regulation	Rainbow trout	Gravel et al., 2009
			> 10.00	>0.0100	Cardio abnormalities	Zebrafish	David and Pancharatna, 2009
			206280	206.2800 (1 mM)	Inhibition of CYP2M	Carp	Thibaut et al., 2006
Indomethacin			100000	100	Disruption of oocyte maturation/ovulation	Zebrafish	Lister and van der Kraak, 2008
Naproxen	80 ng/L-0.52 µg/L	70 ng/L-0.39 µg/L	230260	230.2600 (1 mM)	Inhibition of CYP2M	Carp	Thibaut et al., 2006
Ketoprofen	0.20-0.32 µg/L	120 ng/L	254280	254.2800 (1 mM)	Inhibition of	Carp	Thibaut et al., 2006

Existe um número crescente de alterações histológicas em peixes que tem vindo a ser utilizadas como biomarcadores para monitorização da poluição aquática, uma vez que constituem as respostas biológicas aos poluentes sendo assim uma ferramenta de trabalho fundamental na área da ecotoxicologia (Giari et al. 2007; Costa et al. 2009).

O objetivo do presente trabalho foi elaborar uma de revisão bibliográfica sobre os efeitos histopatológicos em organismos no meio aquático, nomeadamente nos peixes, e avaliar o significado funcional destas alterações tecidulares, para a espécie em contato com os agentes xenobióticos. Em função da elevada quantidade de informação disponível, e tendo em conta as limitações de espaço, o critério de seleção foi a escolha dos fármacos mais utilizados em cada grupo farmacoterapêutico e, dentro destes, os trabalhos que incluíram avaliação histológica, em particular das brânquias.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Tabela 2 - Dados toxicológicos referentes a fibratos e antibióticos em peixes. Extraído de Corcoran et al. (2010)

Pharmaceutical	Measured environmental concentration		Toxic effect concentration		Endpoint measured	Species	Reference
	STP effluent	surface water	µg/L	mg/L			
Fibrates							
Clofibrate	0.36-2 µg/L	6 ng/L-7 µg/L	7700.00-39700.00 (LC ₅₀)	7.7000-39.7000 (LC ₅₀)	Acutely toxic	Mosquitofish	Nunes et al., 2004
			242700	242.7000 (1000 µM)	Induce oxidative stress	Rainbow trout	Laville et al., 2004
			32,279.10 (133 µM) (EC ₅₀)	32.2791 (EC ₅₀)	Cytotoxic	Rainbow trout	Laville et al., 2004
			10.00-1000.00	0.0100-1.0000	Lowered sperm count	Fathead minnow	Runnells et al., 2007
			10.00-1000.00	0.0100-1.0000	Lower plasma androgen concentration	Fathead minnow	Runnells et al., 2007
			23,299.20 (96 µM) (EC ₅₀)	23.2992	Inhibition of EROD activity (CYP1a)	Rainbow trout	Laville et al., 2004
Fenofibrate	0.03-1.2 µg/L	0.045 µg/L	1893.06-7281.00	1.8930 (7.8-30 µM)	Induce oxidative stress	Rainbow trout	Laville et al., 2004
			19,124.52 (53 µM) (EC ₅₀)	19.1245 (EC ₅₀)	Cytotoxic	Rainbow trout	Laville et al., 2004
			9021.00 (25 µM) (EC ₅₀)	9.0210 (EC ₅₀)	Inhibition of EROD activity (CYP1a)	Rainbow trout	Laville et al., 2004
Gemfibrozil	0.07-1.5 µg/L	0.048-0.052 µg/L	1500	1.5	Reduced testosterone levels	Goldfish	Nimeault et al., 2005
			250340	250.3400 (1 mM)	Inhibition of CYP2M	Carp	Thibaut et al., 2006
Antibiotics							
Sulphonamides (Oxy)	0.05-1.7 µg/L	0.03-6 µg/L	>100000.00	>100.0000	Acute toxicity	Medaka	Kim et al., 2007
	0.40 µg/L	0.11-0.34 µg/L	0.10-50.00	0.0001-0.0500	Suppressed immune system	Rainbow trout	Grondel et al., 1985
tetracyclines							

2. Histologia e histopatologia em peixes

Vários estudos apresentam diferentes métodos para a avaliação das alterações tecidulares ao nível dos diversos órgãos dos peixes resultantes da exposição a poluentes aquáticos. Estas lesões normalmente revelam uma relação causa-efeito (Bernet et al. 1999a). Atualmente, não existe ainda uma metodologia padronizada e de uso ubíquo para descrever, avaliar e quantificar estas lesões em peixes, no entanto têm sido empreendidos esforços nesse sentido. A título de exemplo, Bernet et al. (1999) sugere e apresenta uma ferramenta de trabalho através da qual é possível quantificar as lesões na pele, brânquias, fígado e rim e, através de ferramentas estatísticas assentes em índices de ponderação e fatores de importância das lesões, tentando reduzir a subjetividade da análise.

A microscopia é uma técnica por excelência para estudos de histopatologia, em função da elevada quantidade de informação que permite obter. Das várias técnicas de microscopia, a microscopia de campo claro, de fluorescência e de contraste de fase estão entre as mais utilizadas. Em ambos os casos, porém, a preparação das amostras é fundamental, requerendo muitas vezes a utilização de corantes/agentes de contraste adequados. No caso da microscopia ótica de campo claro existem várias colorações disponíveis, as quais devem ser escolhidas de acordo com a informação que se pretende obter. Assim, a coloração de hematoxilina-eosina (H/E) é útil para a observação de vários componentes tecidulares e celulares, como núcleos, estruturas mitóticas, mitocôndrias, entre outras (Fig. 1A). No caso da coloração de Giemsa, é possível evidenciar bactérias e parasitas (Fig. 1B).

Como não poderia deixar de ser, a qualidade e estado de conservação das amostras são um dos fatores fundamentais para a correta interpretação destas informações. Vários fatores podem afetar um estudo histopatológico, nomeadamente o tamanho das amostras (deverá ser representativo da população/alteração em estudo), espécie de peixe em estudo, idade, sexo e grau de maturação sexual (Bernet et al. 1999a).

De seguida serão abordados em maior pormenor os órgãos mais relevantes no contexto da análise histológica de peixes expostos a xenobióticos, nomeadamente as brânquias.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

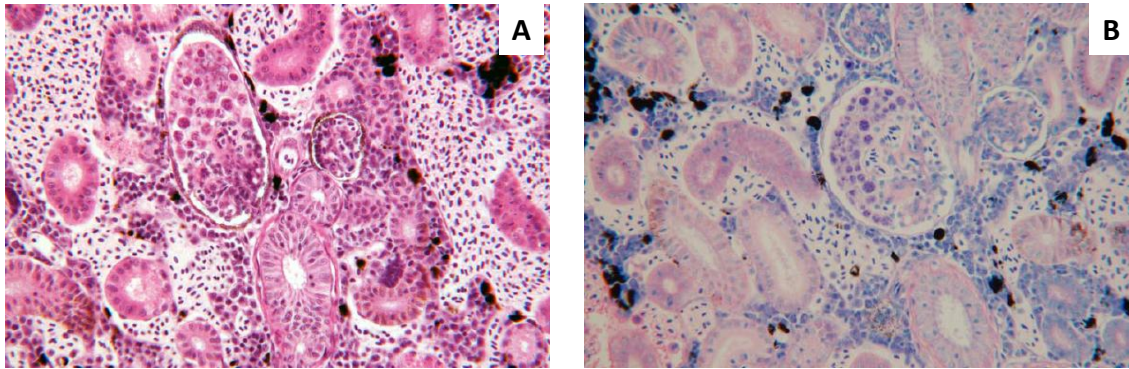


Figura 1 – Diferentes colorações do rim em microscopia óptica frequentemente usadas em histopatologia: A – hematoxilina/eosina. B – Giemsa. Extraído de Mumford et al. (2007).

2.1. Brânquias

Do ponto vista anatómico, os peixes teleósteos apresentam cinco pares de arcos branquiais constituídos por numerosos filamentos branquiais, nos quais se inserem as lamelas secundárias, as quais constituem a superfície funcional respiratória (Garcia-Santos et al. 2007; Leonardo et al. 2008).

As lamelas primárias são sustentadas por tecido cartilaginoso e possuem irrigação sanguínea abundante, enquanto as lamelas secundárias são constituídas por três camadas de células, duas de células pavimentosas e uma camada de células pilares. Os prolongamentos das células pilares formam posteriormente os capilares sanguíneos através dos quais ocorrem as trocas gasosas (Rossi 2008).

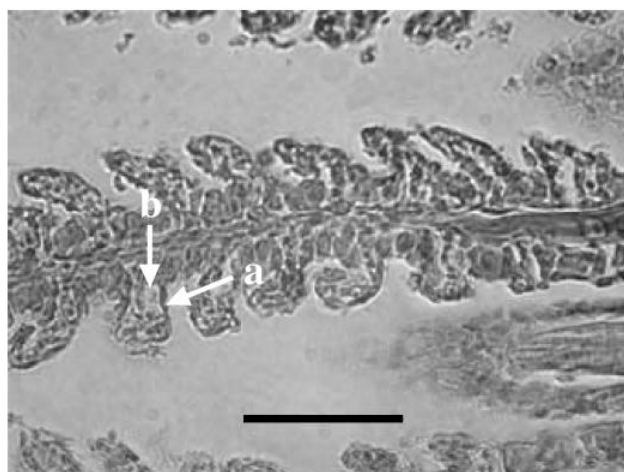


Figura 2 – Levantamento epitelial (a) e edema intraepitelial (b). Coloração H/E. Exposição a malatião, 0.01 mg/L durante 20 dias. Extraído de Cengiz et al. (2003).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Muitos agentes químicos (incluindo xenobióticos), físicos e biológicos podem produzir alterações histológicas no tecido branquial, tais como levantamento epitelial (Fig. 2 e 3) e edema (Fig. 2 e 4), hiperplasia epitelial das lamelas secundárias e fusão lamelar (Fig. 5), hipertrofia (Fig. 6), telangiectasias (Fig. 7 e 8), entre outros. No caso do insecticida malatião, a generalidade destas lesões foram descritas (Cengiz et al. 2003).

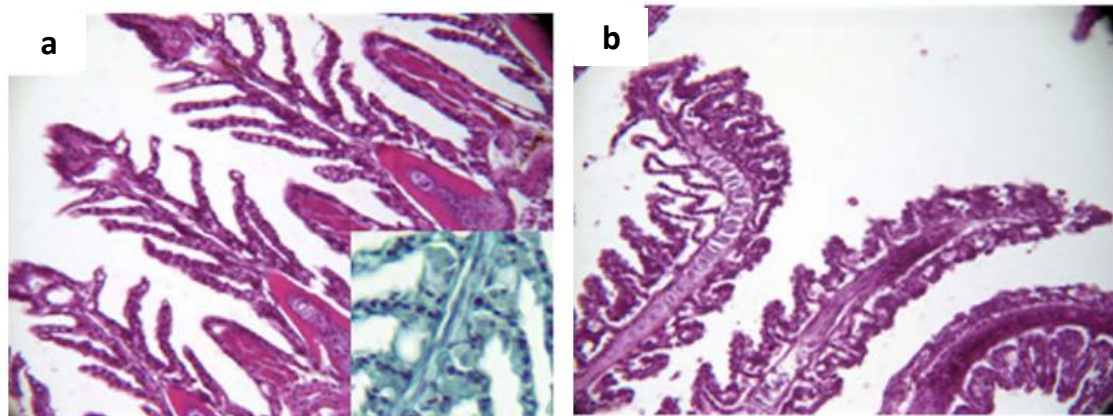


Figura 3 – Secções de brânquias de *Solea senegalensis*. (a) – Estrutura normal das brânquias no grupo controlo; (b) Brânquias de grupos expostos a sulfonato de dodecilbenzeno, evidenciando levantamento e fusão das lamelas secundárias. Coloração H/E. Extraído de Alvarez-Muños. (2009).

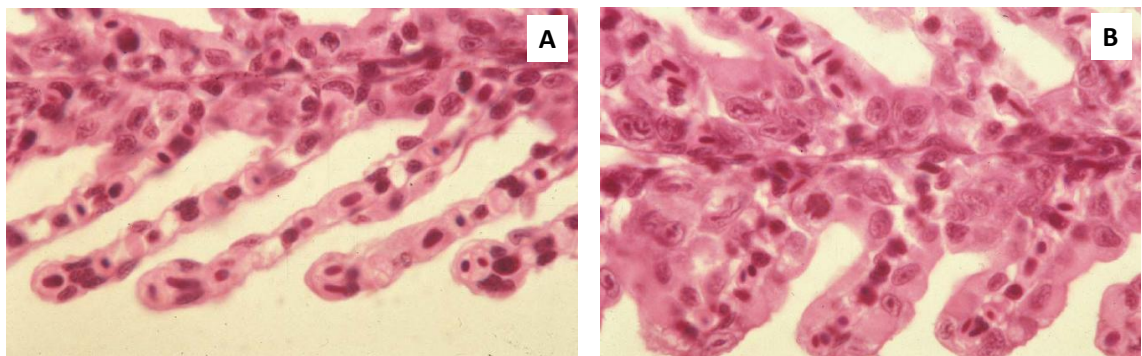


Figura 4 – A- – Brânquias normais; B Brânquias com edema. Extraído de Mumford et al. (2007).

Num outro estudo, desta vez com o detergente sulfonato de dodecilbenzeno, descreve-se o levantamento epitelial ao nível das brânquias de *Solea senegalensis* (Álvarez-Muñoz et al. 2009).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

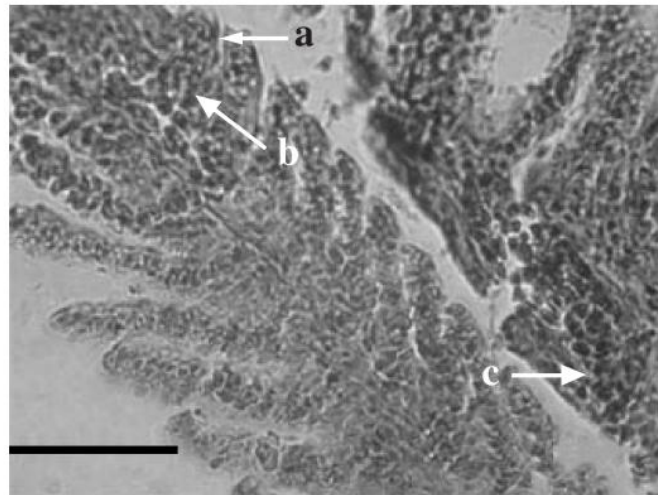


Figura 5 – Fusão de lamelas secundárias (a), hiperplasia epitelial (b) e hemorragia nas lamelas primárias (c). Coloração H/E. Exposição a malatião 0.01mg/L durante 30 dias. Extraído de Cengiz et al. (2003).

Outros trabalhos descreveram as alterações histopatológicas como consequência de exposição ao efluente de estações de tratamento de águas residuais (Coutinho et al. 2000), petróleo (Engelhardt et al. 1981) e outros contaminantes orgânicos (Camargo et al. 2007). Também no caso dos minerais e metais existem vários estudos que abordam os danos histopatológicos resultantes da sua exposição, nomeadamente a selénio (Lemly 2002) e mercúrio (Hassaninezhad et al. 2014). Este último constitui um bom exemplo na medida em que podem ser encontradas todas as lesões histopatológicas já referidas (Fig. 9).

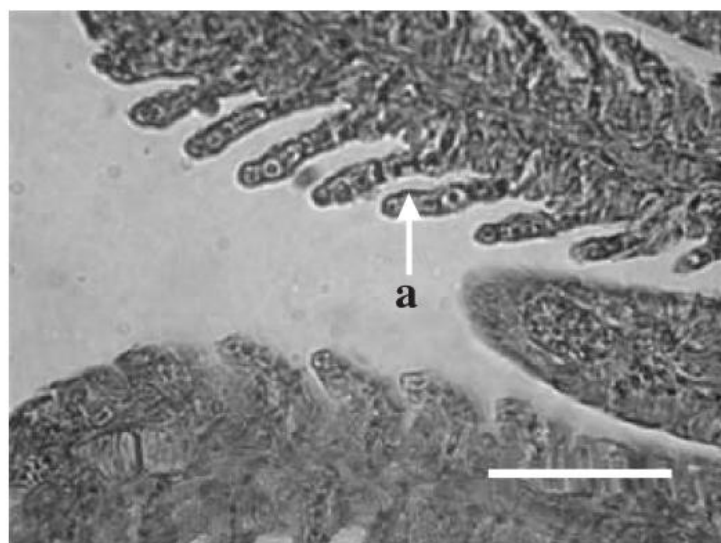


Figura 6 – Hipertrofia de células epiteliais (a). Coloração H/E. Exposição a malatião 0.02 mg/L durante 10 dias. Extraído de Cengiz et al. (2003).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

As várias lesões referidas podem frequentemente ser classificadas de acordo com a sua fisiopatologia, nomeadamente distúrbios circulatórios (tal como aneurismas e telangiectasias), alterações regressivas (levantamento epitelial; descamação; fusão lamelar) e alterações progressivas (hiperplasia) (Bernet et al. 1999).

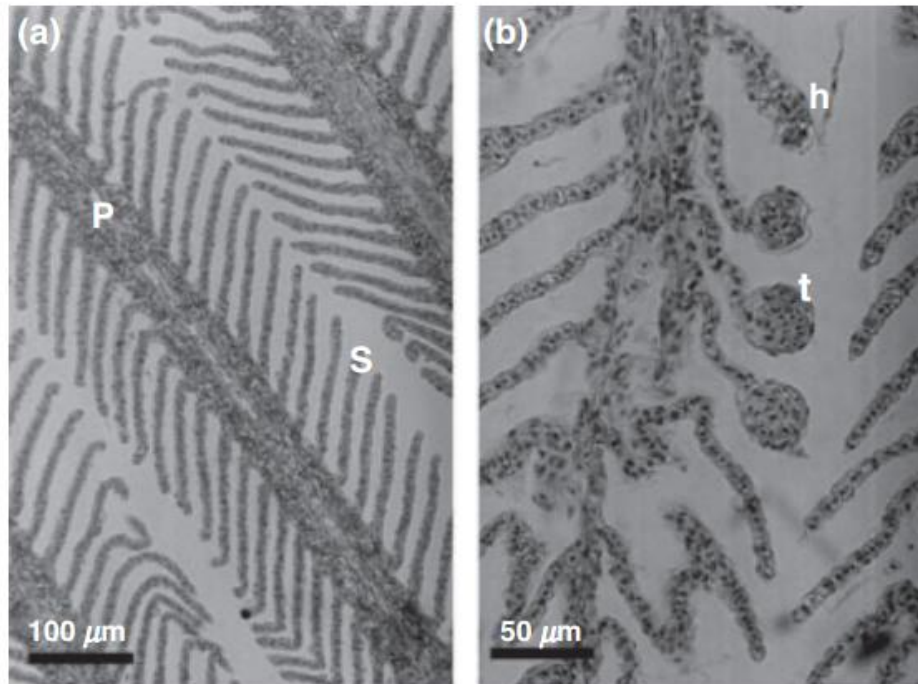


Figura 7 – Brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. (a) Grupo controlo; (b) Tratamento com triclorfon 0.05 mg/L, exposição de 24 horas. **P**: lamela primária; **S**: lamela secundária; **t**: telangiectasia; **h** hiperplasia da lamela secundária. Coloração H/E. Extraído de Mataquerio, (2009).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

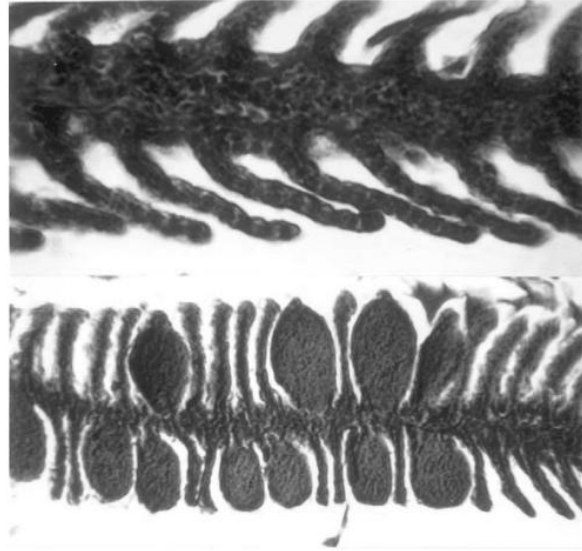


Figura 8 – Secções de tecido branquial de *Lepomis cyanellus*. **Imagem superior:** Grupo controlo evidenciando lamelas secundárias uniformes e bem definidas; **Imagem inferior:** Grupo exposto a selénio: telangiectasias. Extraído de Lemly et al. (2002).

Em termos do significado funcional destas alterações vários estudos demonstraram que as brânquias são órgãos chave na monitorização da poluição aquática nos peixes, podendo o seu comprometimento colocar a saúde destes em risco (Cengiz et al. 2003; de Goiás et al. 2004; Elahee et al. 2007).

Estes órgãos são importantes em vários processos fisiológicos, incluindo respiração, regulação osmótica e iónica, excreção de resíduos azotados e equilíbrio ácido-base nos peixes (Fernandes 2007). Uma vez que apresentam uma área de superfície elevada, em contacto constante com a água, são fortemente suscetíveis a quaisquer alterações ambientais (Abdel-Moneim et al. 2012; Nascimento et al. 2012).

Vários dos achados histopatológicos já descritos anteriormente constituem mecanismos de defesa crónica e que pretendem debelar a agressão a que o organismo está a ser sujeito (de Goiás et al. 2004; Leonardo et al. 2008).

Assim, alterações como o levantamento epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais resultam na diminuição da área de contacto com a água, funcionando como uma barreira para a entrada de agentes agressores resultando, no entanto, em prejuízo para a função respiratória. Essas alterações são geralmente inespecíficas e podem ser induzidas por diferentes xenobióticos (Mallat 1985).

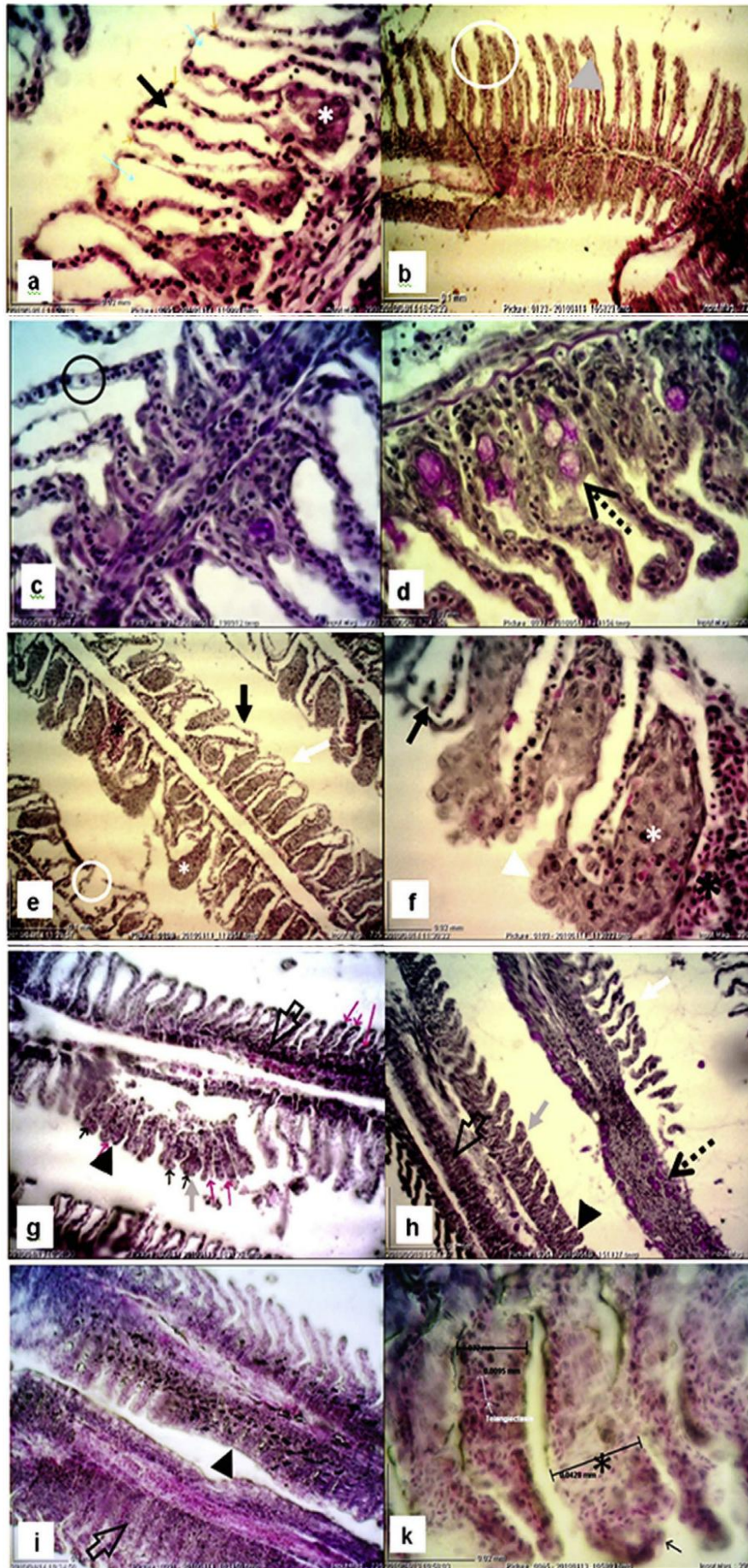
Em função do comprometimento que ocorre em termos de consumo de oxigénio, os peixes respondem aumentando a sua taxa de ventilação, compensando assim o

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental consumo deficiente de oxigénio (Camargo et al. 2007), ocorrendo também alterações compensatórias no hematócrito e nos valores médios de hemoglobina celulares no sangue. Além destes distúrbios respiratórios, as alterações histológicas na estrutura das brânquias podem levar a alterações na manutenção do balanço hidro-electrolítico, comprometimento do balanço iónico e ácido-base (Yasser et al. 2011), resultando na fragilidade do organismo e aumento da suscetibilidade a infeções secundárias e podendo inclusivamente resultar na morte.

A maior parte das lesões branquiais são efeitos subletais causados por exposições crónicas. No caso dos vasos sanguíneos, o dano às células pilar pode resultar num aumento do fluxo sanguíneo no interior das lamelas, provocando assim a dilatação do canal marginal, congestão de sangue ou eventualmente um aneurisma. Este tipo de dano é mais grave que as anteriores lesões epiteliais, no entanto é possível recuperar, embora seja mais difícil (Camargo et al. 2007).

No caso da necrose, esta é frequentemente irreversível em função do elevado grau de degeneração, pelo que a sua persistência ou progressão podem levar a perda parcial ou total da função do órgão em causa (Mumford et al. 2007).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental



Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Figura 9 – Alterações histopatológicas registadas nas brânquias de *Acanthopagrus latus* expostas a HgCl₂. Levantamento epitelial e edema das lamelas com espaços sub-epiteliais evidentes (setas pretas), hiperplasia das células epiteliais (* branco) com fusão parcial das lamelas (ponta de seta preta), alteração morfológicas das lamelas (seta cinzenta), lamelas com o canal marginal dilatado (círculo preto), congestão sanguínea (ponta de seta cinzenta), aneurisma lamelar (* preto), desorganização lamelar (seta branca), hipertrofia do epitélio lamelar (ponta de seta branca), infiltração leucocitária (seta não-preenchida), aumento das células mucosas (seta picotada), rutura epitelial (círculo branco). **a-c**, tratamento com HgCl₂ 10g/L; **d-f** tratamento com HgCl₂ 20 g/L; **g-h** tratamento com 35 g/L; **j-k** tratados com HgCl₂ 50 g/L. **a-c, f e k**: coloração H/E, x2900; **e, g e i**: coloração H/E, x725; **d e h**: coloração ácido periódico-Schiff, x725. Extraído de Hassaninezhad et al. (2009).

2.2. Rim

O rim tem como função principal a excreção da urina (de concentração variável de acordo tratar-se de um peixe marinho, dulçaquícola ou anfidrómico), sendo também uma das vias principais vias de excreção de xenobióticos e seus metabolitos. Por este motivo, trata-se de um órgão-chave enquanto alvo dos poluentes e, portanto, uma fonte de informação ecotoxicológica (Braunbeck et al. 1998; Cameron 1998; Corcoran et al. 2010). Lesões nos tecidos renais podem ser consideradas indicações de um poluente tornando-o um órgão útil para monitorização da poluição aquática (Bernet et al. 1999a).

Em termos anatómicos e funcionais, o rim dos teleósteos está dividido em rim anterior e rim posterior. O primeiro integra o sistema endócrino, sendo relevante para as respostas ao *stress*. No que se refere ao rim posterior, este está envolvido na excreção e manutenção da homeostasia dos fluidos corporais, em conjunto com outros órgãos como o intestino e brânquias. Em particular, a produção de urina fornece uma via de excreção para os metabolitos de vários xenobióticos. Em termos hemodinâmicos, em função do grande volume de sangue que flui através do rim, lesões encontrada nesse órgão podem ser úteis como indicadores de poluição (Silva et al. 2007). Vários estudos mostram que os efeitos dos xenobióticos sobre os rins variam com as espécies de peixes devido à sua sensibilidade para certas substâncias (Hinton et al., 1992). Os efeitos dos agentes nefrotóxicos são, assim, variáveis, podendo desencadear necrose tubular, falência renal aguda ou crónica e danos glomerulares (Cameron 1998). Nas Figuras 10 e

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

11 são apresentados achados histológicos clássicos do tecido renal normal (Fig. 10) e necrótico (Fig. 11).

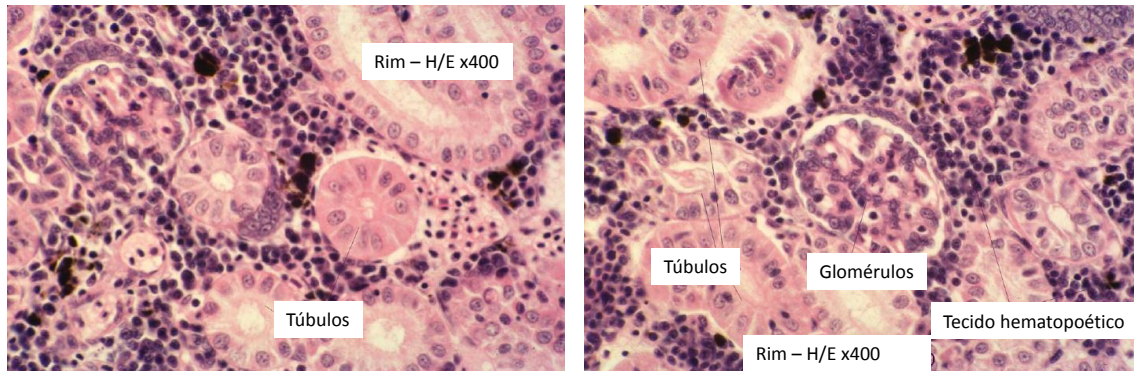


Figura 10 – Histologia clássica do rim. Extraído de Mumford et al. (2007).

As células interrenais secretam corticosteroides, principalmente cortisol, também conhecido como a hormona do *stress*. Um aumento na dose de cortisol, em resposta a um estímulo de *stress*, implica um aumento na atividade celular interrenal, a qual pode ser avaliada medindo as áreas destas células e diâmetro dos seus núcleos (Donaldson, 1981). Em situações de *stress* crónico pode ocorrer hipertrofia do tecido interrenal, tal como já foi demonstrado para espécies como *Salmo trutta* (n.v. truta castanha/marisca) (Norris et al. 1997) e ainda *Oncorhynchus mykiss* e *Oreochromis mossambicus*, (n.v. truta arco-íris e tilápia, respetivamente) (Quabius et al. 2000).

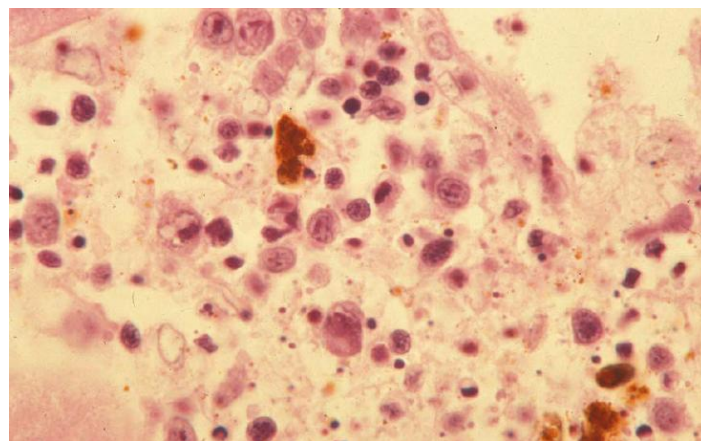


Figura 11 – Necrose renal. Extraído de Mumford et al. (2007).

2.3. Fígado

O fígado tem um papel fundamental no metabolismo dos xenobióticos e é o órgão de destoxificação por excelência sofrendo, por isso, alterações estruturais e funcionais quando em contacto com xenobióticos que nele se acumulam (Fontaínhas-Fernandes 2005; Figueiredo-Fernandes et al. 2006; Fernandes et al. 2007; Carrola et al. 2009).

Para além da sua importância para o metabolismo de xenobióticos, o fígado é também o local de síntese da vitelogenina, uma proteína cuja produção é induzida pelos estrogénios endógenos e que, normalmente, é detetada apenas em fêmeas, sendo particularmente importante na reprodução (Kime et al. 1999). No entanto, têm sido descritos vários casos de indução de vitelogenina em machos como consequência da exposição a xenobióticos capazes de mimetizar o efeito dos estrogénios (Matozzo et al. 2008).

Em função da importância do fígado na homeostasia corporal dos peixes, a histopatologia hepática é um método versátil e robusto de monitorização dos efeitos negativos causados por atividades antropogénicas em peixes, sendo um dos indicadores mais confiáveis acerca do comprometimento da saúde dos peixes (Bernet et al. 1999b; Carrola et al. 2009).

Existem vários tipos de danos hepáticos (Boyer et al. 2011), incluindo, mas não limitado a: a) *esteatose* - resulta da acumulação de moléculas como os triglicérides ou glicogénio nos hepatócitos, o que leva à formação de vacúolos e gotículas de gordura; b) *Dano colestático* - pela acumulação de sais biliares nos ductos e canículos biliares e mais tarde hepatócitos; c) *cirrose* - dano hepático de natureza crónica e irreversível; lesões vasculares decorrente de danos ao nível das células endoteliais dos sinusoides; d) *tumores hepáticos* - com danificação do DNA dos hepatócitos, células dos ductos biliares ou células endoteliais; e) *Hemocromatose* - pela acumulação de ferro sob a forma de hemossiderina; f) *Doença de Wilson* - anomalia autossómica recessiva na excreção de cobre; e g) *núcleos picnóticos* - frequentemente indicativos de células em processo de apoptose.

Em qualquer uma destas situações, pode ocorrer morte celular, a qual pode ter lugar por apoptose ou necrose, de acordo com a extensão do dano e mecanismo de toxicidade desencadeado.

Na Fig. 12 são apresentadas imagens histológicas de fígado normal e com alguns tipos de dano histopatológico.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

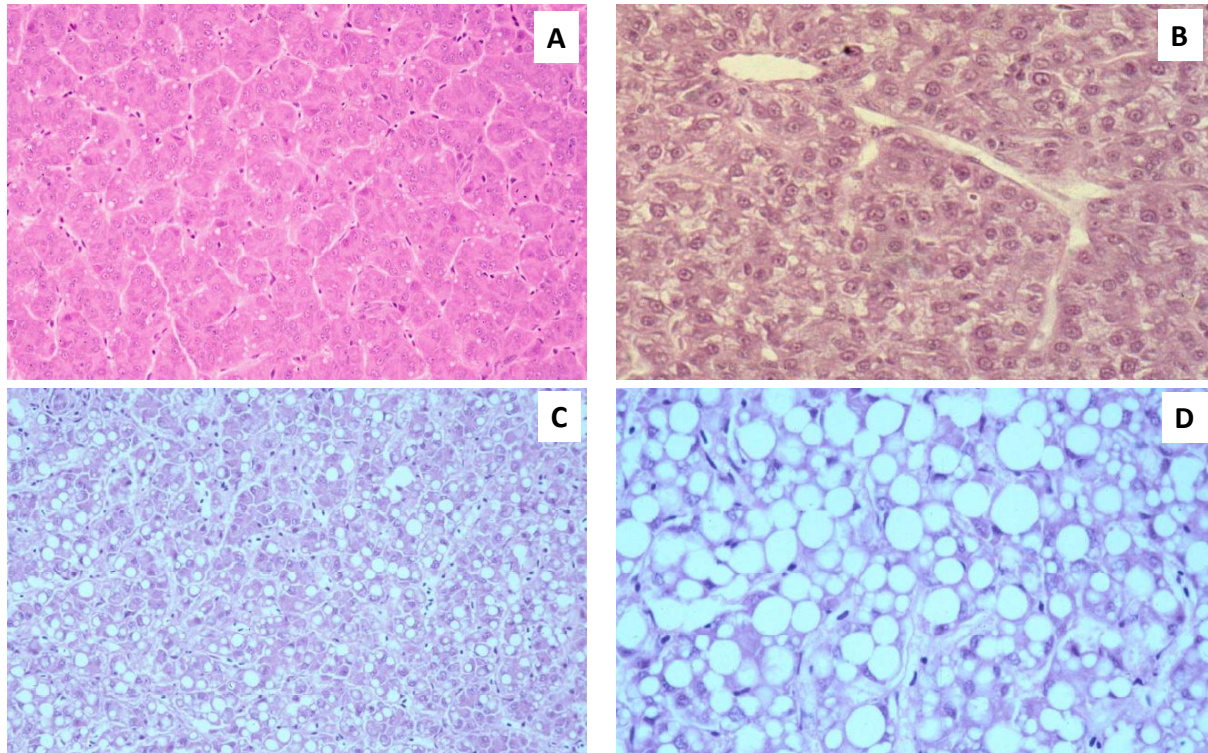


Figura 12 – **A** – Fígado normal; **B** – Fígado com edema. **C** - esteatose moderada; **D** esteatose severa. Extraído de Mumford et al. (2007).

A detecção de danos hepáticas podem ser feitas por métodos invasivos como o índice hepatossomático (IHS, relação peso fígado/peso corpo), microscopia eletrónica e/ou ótica de seções do fígado e através de biopsias ou por métodos não invasivos pela determinação de enzimas séricas, tomografias computadorizadas, ressonâncias magnéticas, entre outros (Boyer et al. 2011).

2.4. Sistema reprodutor

O sistema reprodutor dos peixes segue um modelo de organização muito semelhante ao encontrado em outros animais vertebrados.

Testículos

Os testículos (Fig. 13) são órgãos que surgem aos pares, suspensos pelos vasos mesentéricos a partir da parede abdominal, ao longo ou por baixo da bexiga natatória. São órgãos constituídos por uma série de túbulos ou sacos, os túbulos seminíferos, os quais compreendem epitélio espermatogénico. O processo de maturação dos gâmetas

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

masculinos envolve a multiplicação de espermatogónias, os quais se desenvolvem a partir do epitélio espermatogénico para formar espermatozoides. Os espermatozoides permanecem à superfície das células de Sertoli até ao momento da libertação.

Ovários

O folículo ovárico é um agregado de óvulos e células epiteliais (Fig. 13). Estes folículos começam como oogónios, os quais são produzidos periodicamente pelo epitélio germinativo. Os oogónios são células em início do processo de maturação e que originarão, posteriormente, oócitos. À volta destas células primitivas encontramos uma fina camada de células de epiteliais. As células epiteliais crescem com o oócito e são gradualmente separadas deste como consequência do crescimento da cápsula hialina, sendo também responsáveis pela nutrição por secreção da albumina.

Como será apresentado posteriormente, muitos xenobióticos exercem o seu efeito ao nível dos órgãos reprodutores por interferência com as hormonas, o que acarreta consequências ao nível da histologia destes órgãos. Entre as principais consequências de toxicidade ao nível destes órgãos encontram-se a diminuição da fertilidade, esterilidade e feminização dos machos.

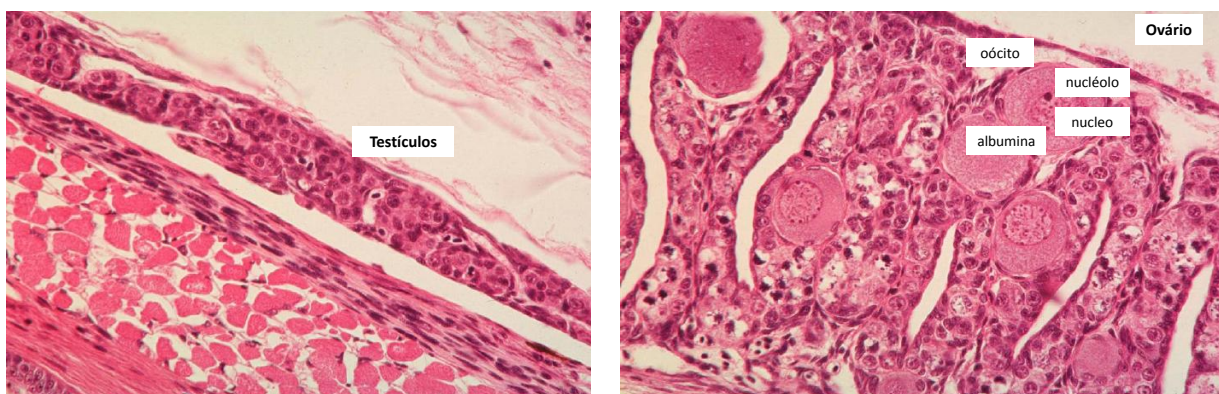


Figura 13 – Cortes histológicos de testículos e ovários. Extraído de Mumford et al., (2007).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

3. Fármacos

3.1. Anti-inflamatórios não-esteroides (AINES)

Diclofenac

O diclofenac (Fig. 14) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) com um uso muito extensivo como analgésico e anti-reumático.

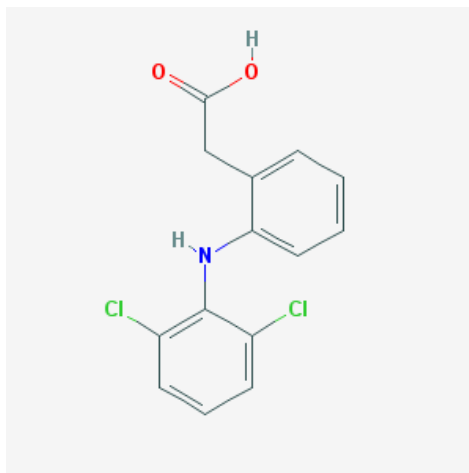


Figura 14 – Estrutura química do diclofenac . Extraído de Pubmed Compound.

Em função da sua utilização disseminada, trata-se de um produto farmacêutico encontrado águas de superfície e, conseqüentemente, potencialmente perigoso para os organismos aquáticos. O estudo do efeito da sua exposição em vários peixes já foi descrito (Cuklev et al. 2011; Memmert et al. 2013), destacando-se aqui o estudo efetuado no salmonídeo *Salmo trutta f. fario* em função do grau de informação histopatológica fornecido (Hoeger et al. 2005).

Os autores concluíram que o efeito toxicológico causado por este fármaco a nível dos peixes é consequência do mesmo mecanismo de ação responsável pelo seu efeito farmacológico nos seres humanos, isto é, inibição de enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) e subsequente perturbação da síntese das prostaglandinas. Após 7 dias de exposição os níveis do hematócrito reduziram significativamente com a dose mais baixa testada, 0.5 µg/L, e após 21 dias de exposição observou-se um aumento de infiltrações de monócitos no fígado, telangiectasia nas brânquias, ocorrência de gotas hialinas intersticiais e necrose tubular no rim.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Também foi possível a observação de um aumento do número de granulócitos no tecido renal (Fig.15) e nos filamentos das brânquias (Fig. 16). De uma forma geral, estes resultados sugerem que o diclofenac causa, paradoxalmente, uma resposta inflamatória e que, no caso das guelras, poderá afetar o aporte de oxigénio (Hoeger et al. 2005).

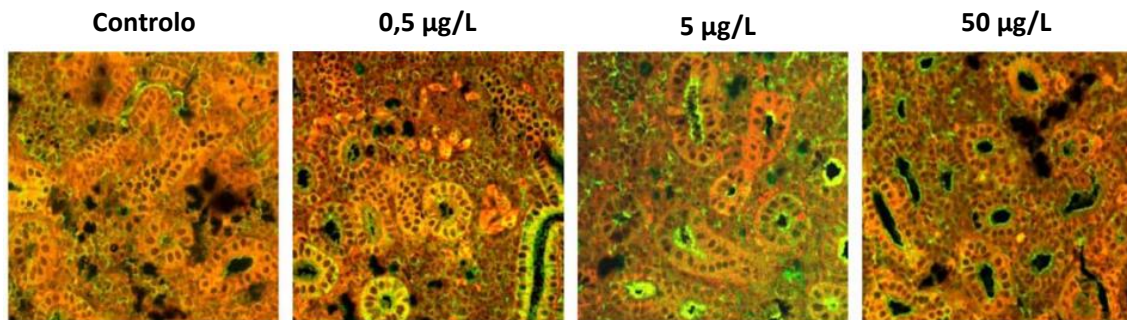


Figura 15 - Detecção imuno-histológica de granulócitos em tecido renal de *S. trutta* exposto a diclofenac nas doses indicadas durante 21 dias. Imagem adaptada de Hoeger et al., (2005).

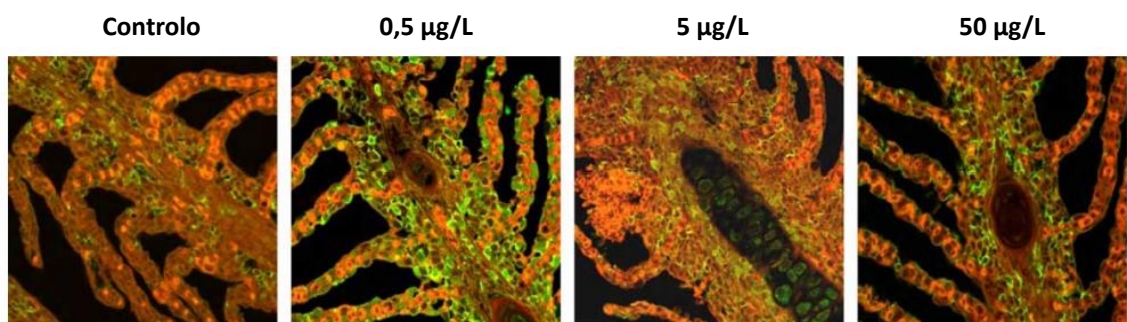


Figura 16 - Detecção imuno-histológica de granulócitos em brânquias de *S. trutta* exposto a diclofenac nas doses indicadas durante 21 dias. A exposição a este fármaco levou a um aumento de granulócitos, o qual foi máximo para a concentração mais baixa testada, 0,5 µg/L.. Imagem adaptada de Hoeger et al. (2005).

Num outro trabalho, este mesmo fármaco foi testado noutra espécie, nomeadamente na truta arco-íris, na gama de concentrações 1-500 µg/L e ao longo de 28 dias (Schwaiger et al. 2004).

Tal como já tinha sido encontrado com a truta castanha, também neste trabalho foi encontrado dano renal, embora de natureza histopatológica diferente. Com efeito,

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

enquanto no trabalho apresentado anteriormente foi encontrado um aumento dos granulócitos, no caso da truta arco-íris foi descrita degeneração do epitélio tubular e nefrite intersticial (Fig.17).

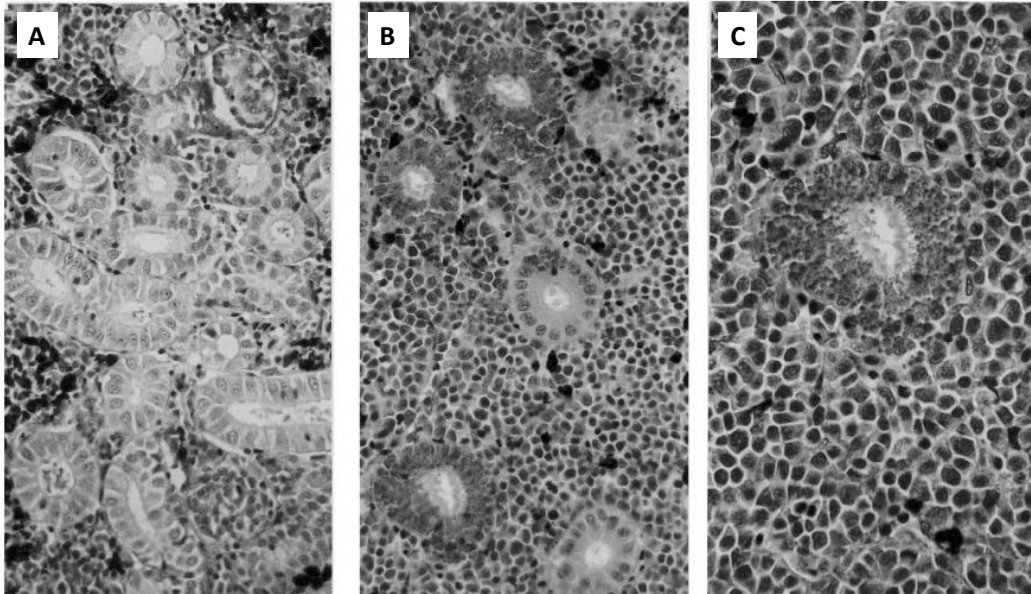


Figura 17. Coloração H/E de cortes histológicos de tecido renal da truta arco-íris. Controlo (A); Exposição a 100 µg/L de diclofenac na ampliação x250 (B) e x400 (C). Extraído de Schwaiger et al. (2004).

Em relação às brânquias, foi encontrado tecido necrótico ao nível das células pilares, o que se traduz em danos ao nível da lamela secundária (Fig. 18). Em ambos os tecidos, a concentração mínima necessária para despoletarem lesões foi de 5 µg/L. Os autores pesquisaram, também, a presença de processos histopatológicos ao nível do fígado, trato gastrointestinal e baço, não tendo encontrado alterações significativas (Schwaiger et al. 2004).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

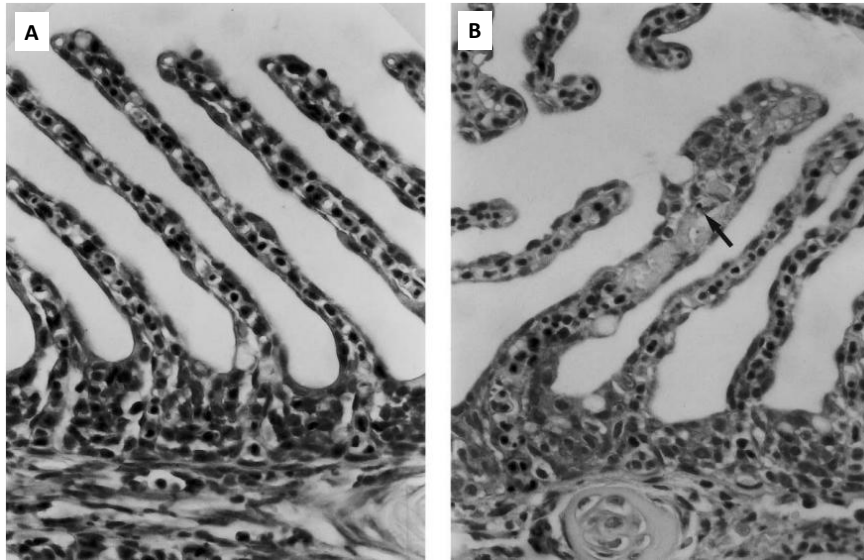


Figura 18 - Coloração H/E de cortes histológicos de tecido branquial da truta arco-íris. Controlo (A); Exposição a 100 µg/L de diclofenac na ampliação x400 (B). Extraído de Schwaiger et al. (2004).

Paracetamol

O acetaminofeno (Fig.19), frequentemente chamado paracetamol, é um dos fármacos mais utilizados a nível mundial, sendo largamente consumido em função das suas propriedades de analgesia e antipirexia. É importante referir que este fármaco foi colocado na secção dos AINEs em função do seu mecanismo de ação equivalente (inibição enzimática), no entanto a sua atividade anti-inflamatória é muito baixa, pelo que é frequentemente separado deste grupo farmacoterapêutico.

Existem numerosos estudos que versam o estudo toxicológico do paracetamol em peixes, sendo que apenas uma parte inclui estudos histopatológicos.

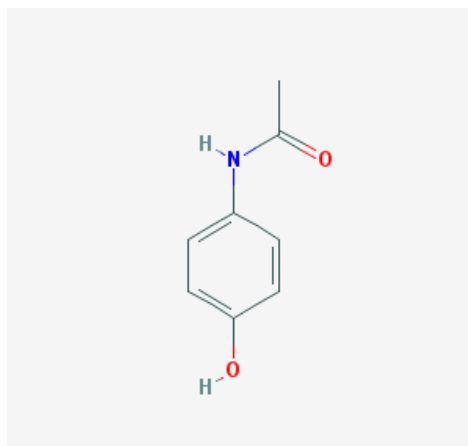


Figura 19 – Estrutura química do paracetamol. Extraído de Pubmed Compound.

O mecanismo de toxicidade do paracetamol na espécie estudada parece ser idêntico ao verificado em humanos, onde o metabolismo do paracetamol leva a um aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) via produção do intermediário reativo *n*-acetil-*p*-aminofenol (Graham et al. 2013). Estas ROS resultam em efeitos tóxicos de base oxidativa, como por exemplo oxidação dos grupos tiol de proteínas, danos ao nível dos ácidos nucleicos e peroxidação lipídica, o que poderá desencadear fenómenos de apoptose ou necrose, de acordo com a extensão do dano (Graham et al. 2013).

Kavitha et al (2011), estudou o efeito de uma dose única de paracetamol, 500 mg/Kg, após 24 horas de exposição ao nível das brânquias, fígado e tecido muscular de *Oreochromis mossambicus*, também conhecido como tilápia Moçambique (Kavitha et al. 2011).

Como pode ser visto na Fig. 20, as brânquias tratadas com paracetamol evidenciam proliferação das células de cloreto, o que resulta em fusão lamelar e congestão vascular (Kavitha et al. 2011).

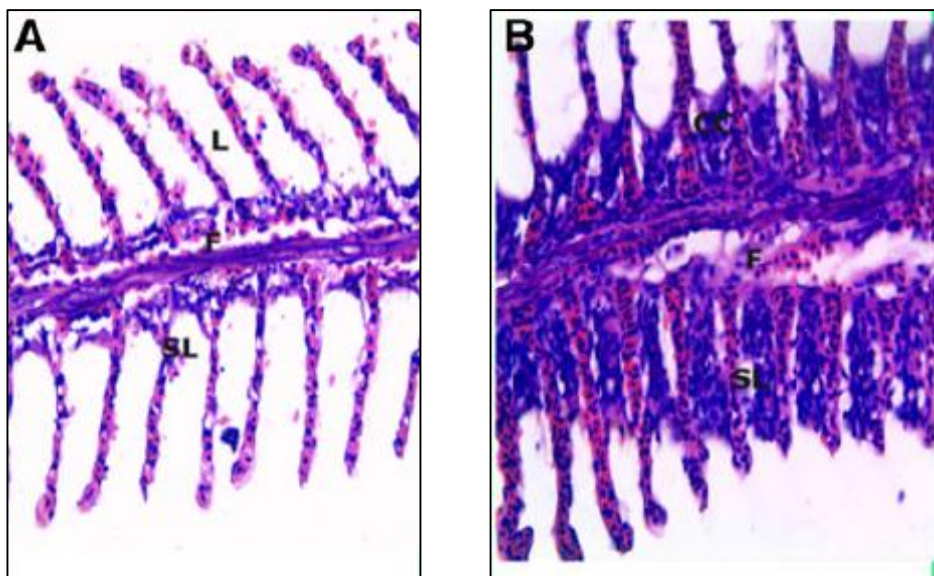


Figura 20 – (A) Brânquias controlo, apresentando morfologia normal. (B) Brânquias tratadas com paracetamol, 500 mg/kg. L lamela; F filamento, CC célula de cloreto, SL lamela secundária. Imagem extraída de Kavitha et al. (2011).

Ao nível do fígado (Fig. 21), a amostra controlo (Fig. 21A) evidencia a morfologia normal, com os hepatócitos dispostos em volta da veia central.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Contrariamente, nas amostras dos animais tratados com paracetamol é evidente a vacuolização do fígado e congestão dos vasos sanguíneos (Fig. 21B).

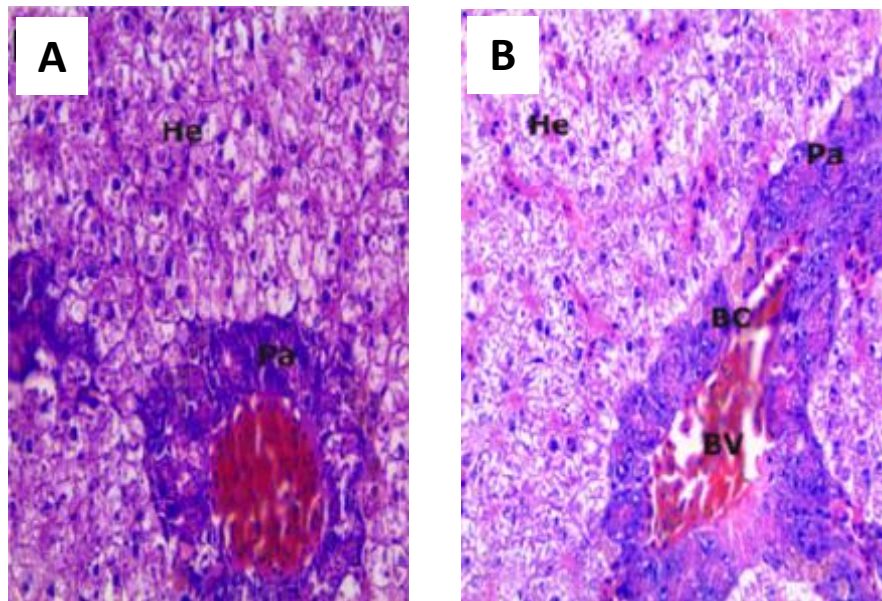


Figura 21 – Cortes histológicos de (A) fígado controlo e (B) amostra de fígado de animais tratados com paracetamol. **He** hepatócito; **Pa** pancreas; **Bv** vaso sanguíneo; **V** vacuolização; **BC** congestão sanguínea. Imagem extraída de Kavitha et al. (2011).

Ao nível do tecido muscular (Fig. 22), o tratamento com paracetamol resultou num arranjo irregular das fibras e aumento da distância entre as mesmas.

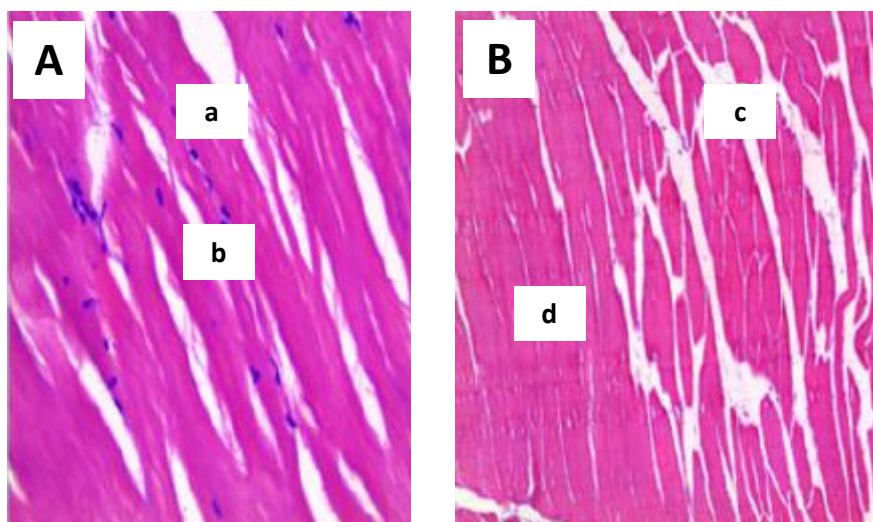


Figura 22 –A - Morfologia normal do músculo. **B** Músculo de indivíduos tratados com paracetamol. (a) feixes de fibras; (b) tecido conjuntivo; (c) disposição anormal das fibras musculares; (d) músculo de diâmetro elevado (atípico). Imagem extraída de Kavitha et al. (2011).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Salicilatos

Os salicilatos constituem a classe de AINE mais utilizada a nível mundial, constituindo o ácido salicílico e o seu derivado ácido acetilsalicílico as moléculas mais representativas. Tal como os restantes membros da classe dos AINEs, estes fármacos atuam por inibição enzimática, com ênfase nas ciclooxigenases. Embora a COX-2 seja a isoforma mais relevante para o efeito anti-inflamatório (Sunshine 2000), a capacidade destes fármacos em inibir também a COX-1 justificam a sua utilização em outras patologias, tal como distúrbios de coagulação (Mitchell et al. 1993; Warner et al. 1999). Em função da sua utilização intensiva, o estudo do seu impacto ecotoxicológico é de grande importância.

Num trabalho recente foi avaliado o efeito de várias doses de ácido salicílico (Fig. 23, 25, 50 e 100 µg/L) na histologia e atividade de várias enzimas da truta castanha (n.v.) (Nunes et al. 2015b).

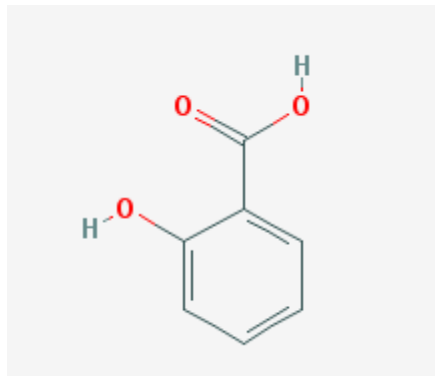


Figura 23 – Estrutura química do ácido salicílico. Extraído de Pubmed Compound.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

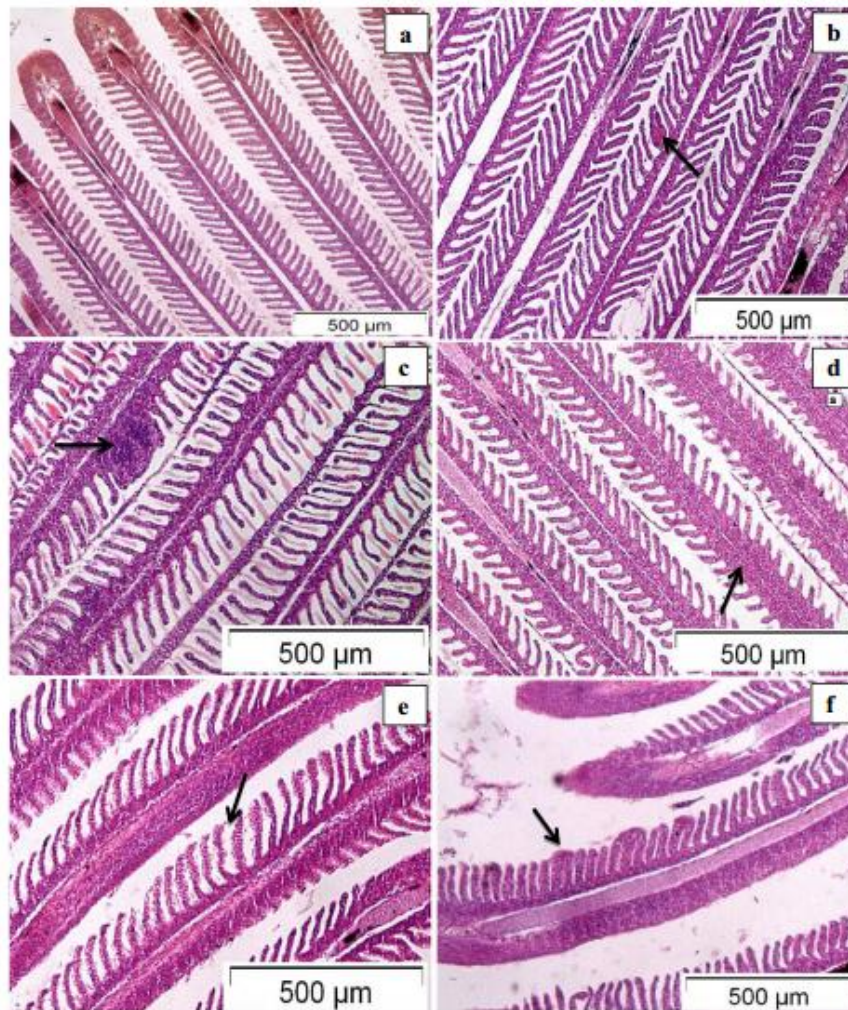


Figura 24- Morfologia normal das brânquias de *S. trutta fario* após 28 dias de exposição ao ácido salicílico. (a); aneurisma (b), proliferação epitelial [lamelar] (c); levantamento epitelial (d); necrose lamelar [lamela secundária] (e); fusão lamelar (f). Extraído de Nunes et al. (2015b).

Os animais tratados com o ácido salicílico evidenciaram dano histológico cuja prevalência, severidade e extensão foram superiores nas doses mais elevadas. Ao nível das brânquias foram encontradas algumas lesões estruturais inespecíficas, como fusão lamelar e hipertrofia, e ainda alterações de natureza inflamatória, como o levantamento epitelial (Fig. 24). Várias alterações, como levantamento epitelial, fusão e hipertrofia, apesar de nefastas, consideram-se uma resposta adaptativa reversível, ou seja, são um mecanismo de defesa desenvolvido por parte do organismo aos agressores externos, pois no geral estas alterações resultam num aumento da distância entre o meio externo e o sangue servindo assim como uma barreira à entrada de contaminantes (Fernandes et al. 2003).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

A análise histológica do fígado dos animais expostos revelou, principalmente, o aumento dos vasos capilares sinusóides, hemorragia, inflamação, vacuolização e tecido necrótico (Fig. 25). No entanto, estas alterações não se traduziram em alterações do IHS.

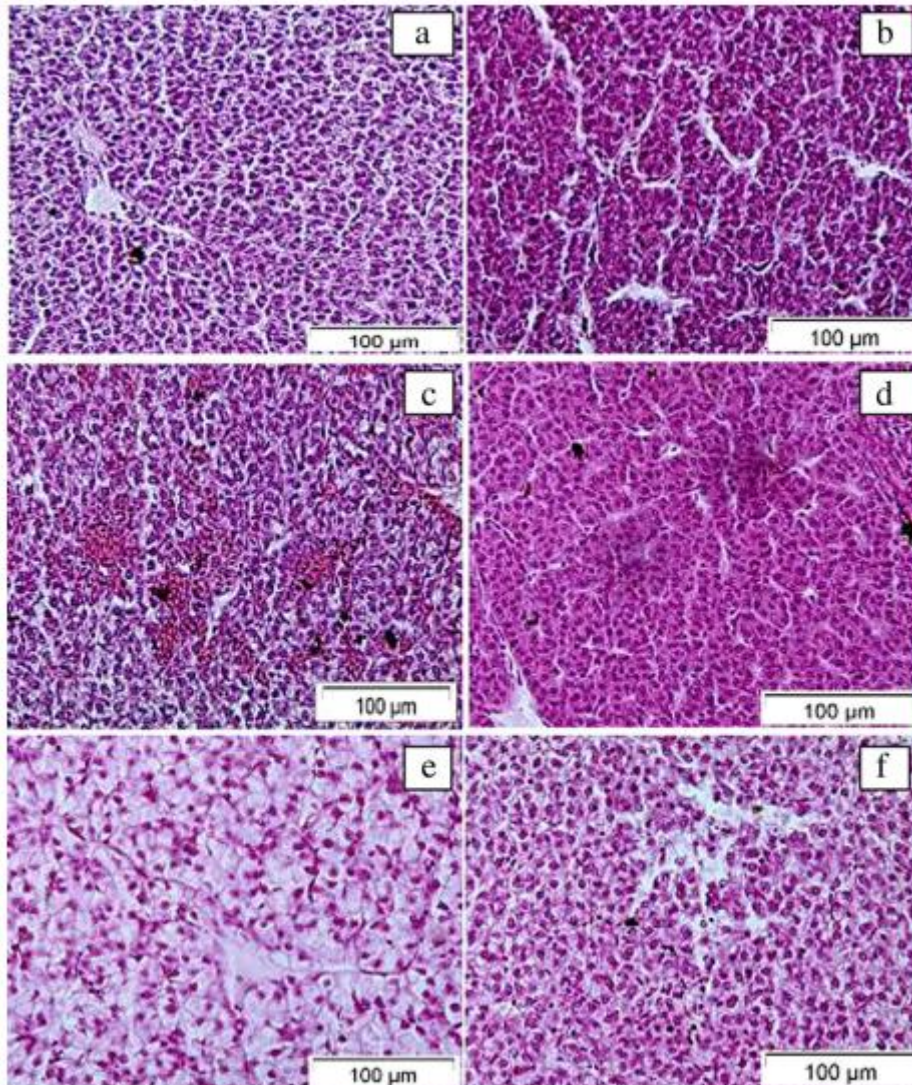


Figura 25 – Estrutura normal (a) do fígado de *Salmo trutta* fario e alterações patológicas após exposição a ácido salicílico durante 28 dias: dilatação dos vasos sinusóides (b); hemorragia (c); infiltração de células inflamatórias (d); vacuolização hepatocelular (e) e processo necrótico (f). Extraído de Nunes et al. (2015b).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Ibuprofeno

O ibuprofeno é um derivado do ácido propiônico (Fig. 26) largamente utilizado pelas suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. É utilizado em situações de febre, osteoartrite, dismenorreia primária, alívio de dor aguda, entre outros.

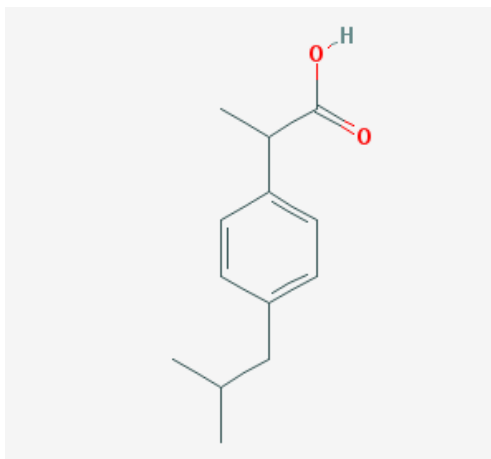


Figura 26 – Estrutura química do ibuprofeno. Extraído de Pubmed Compound.

O efeito do ibuprofeno (1-100 $\mu\text{g/L}$) foi estudado ao nível do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*) (Anuradha et al. 2009), o qual tem vindo a ser cada vez mais usados em estudos embriológicos (Teraoka et al. 2003).

Os ovos controlo, expostos apenas a água, apresentaram um desenvolvimento normal, com a eclosão a começar no terceiro dia após a fertilização e sendo completada no quarto. Os resultados apresentados pelos autores mostram que os embriões toleraram as doses mais baixas de fármaco (1 and 5 $\mu\text{g/L}$), no entanto doses mais elevadas (superiores a 10 $\mu\text{g/L}$) despoletaram atrasos no desenvolvimento, ritmo de eclosão diminuído, anomalias cardíacas, má-formação das barbatanas peitorais, entre outros (Fig. 27 e 28).

O ibuprofeno exerce o seu efeito por inibição das enzimas COX-1 e COX-2. Enquanto a primeira é expressa constitutivamente, a segunda está normalmente associada a processos inflamatórios. Em ambos os casos, estas enzimas são muito importantes na síntese de vários mediadores, nomeadamente as prostaglandinas. Tendo em conta que a importância das prostaglandinas para o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra já foi demonstrada anteriormente (Grosser et al. 2002; Cha et al. 2005), os autores sugerem que os níveis anormalmente baixos de prostaglandinas após exposição ao ibuprofeno será um dos mecanismos de toxicidade despoletado por este fármaco.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

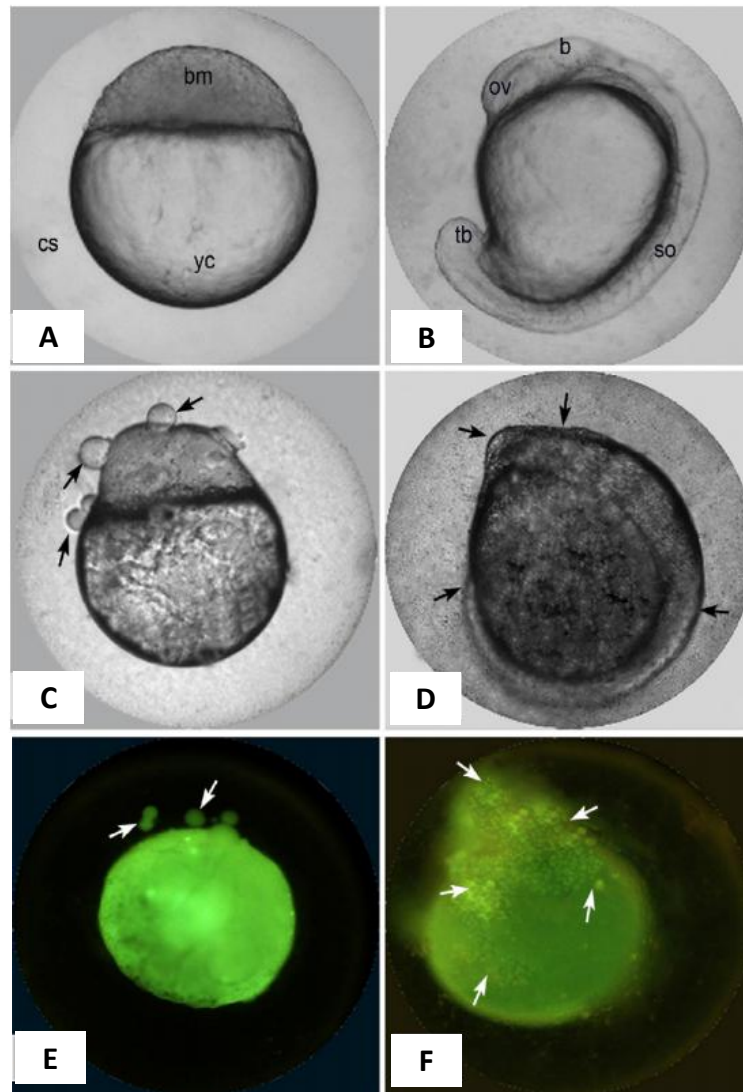


Figura 27 – Efeito do ibuprofeno no desenvolvimento do peixe zebra (fases de blastulação e segmentação). Embriões controlo (A) e aos 14-somitos (estruturas epiteliais transitórias que se formam nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário dos vertebrados) (B) evidenciando blastómeros intactos (**bm**) e a formação de vesículas ópticas (**ov**), cérebro (**b**), somitos (**so**) e extremidade caudal (**tb**). Extrusão dos blastómeros para o espaço coriônico após exposição a ibuprofeno 100 µg/L (C). Perda de organização de **ov**, **b**, **so**, e **tb** após exposição a 50 µg/L. Embriões marcados com laranja acridina (E e F), correspondentes aos estádios C e D 40x. Extraído de Anuradha et al. (2009).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

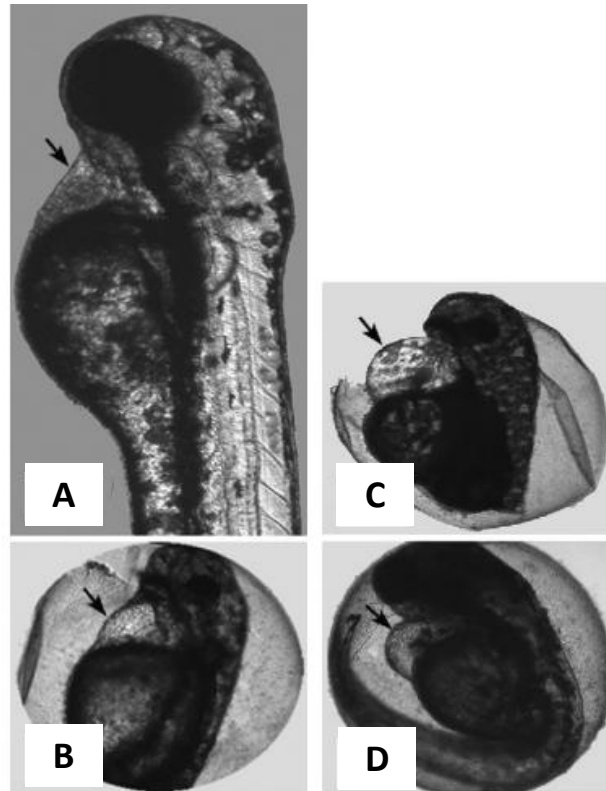


Figura 28. Impacto do ibuprofeno na formação do coração em larvas de *D. rerio*. Pericárdio normal (A); edema pericárdico após exposição a 10 µg/L (B). Edema pericárdico severo com rutura coriônica após exposição a 50 µg/ (C) e 100 µg/L. Ampliado x40. Extraído de Anuradha et al. (2009).

3.2. Esteróides sexuais

Etinilestradiol e Nonilfenol

O etinilestradiol (Fig. 29) é um dos principais análogos do estradiol, o estrogénio endógeno nos seres humanos, onde desempenha funções muito relevantes em vários sistemas orgânicos, com o destaque no sistema reprodutor feminino. Esta molécula tem vindo a ser usada de forma extensiva em várias formulações de medicamentos anticoncepcionais orais e também na terapia de reposição hormonal, o que levanta questões relativas ao perigo de perturbação endócrina das populações aquáticas.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

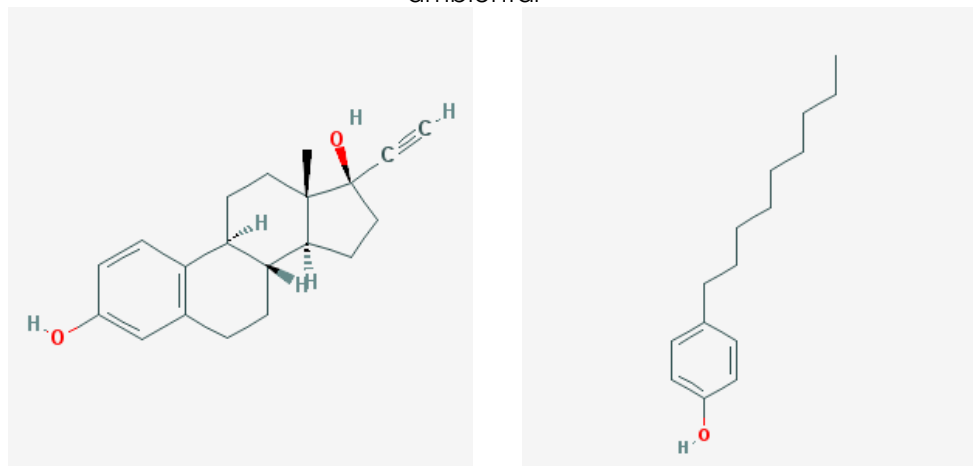


Figura 29 – Estrutura química do etinilestradiol e nonilfenol, respetivamente. Extraído de Pubmed Compound.

Vários estudos com espécies como *Danio rerio* (n.v. peixe zebra), *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes* (n.v. peixe arroz) demonstraram que o etinilestradiol mesmo em pequenas concentrações causa desregulação endócrina, o que leva à indução da vitelogenina, aparecimento de testículos-óvulos e reversão sexual em machos (Rose et al. 2002).

Num trabalho conduzido por Zha et al., o peixe *Rare minnow* foi exposto a etinilestradiol (1; 5; 25 ng/L) e nonilfenol (3; 10; 30 ng/L) (Zha et al. 2007). A concentração mais baixa de etinilestradiol (1 ng/L) e a concentração intermédia de nonilfenol (10 ng/L) causaram um aumento significativo no índice gonadossomático (IGS) e índice nefrossomático (INS) dos peixes macho, um efeito que nas fêmeas foi registado apenas para concentrações superiores.

Com este trabalho os autores conseguiram também demonstrar que o tratamento com várias concentrações dos fármacos em questão levaram à indução dos níveis plasmáticos de vitelogenina nos peixes machos, um efeito que nas fêmeas foi observado apenas nas concentrações mais elevadas testadas.

Em doses superiores a 5 ng/l de etinilestradiol ou 30 ng/l de nonilfenol, foi encontrada disfunção ao nível do tecido hepático e renal dos machos. No caso do fígado masculino foi descrita hipertrofia dos hepatócitos e danos na estrutura celular, um resultado possivelmente explicado pela acumulação excessiva de vitelogenina. A nível renal os danos incluíram acumulação de eosinófilos, hemorragias ao nível dos túbulos renais e hipertrofia do epitélio tubular. Ao nível das fêmeas também foram encontradas perturbações endócrinas, principalmente degeneração dos ovários (Fig. 30C). Nas

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

mesmas doses, foi encontrada feminização dos machos, com incidência de testículos-óvulos (Fig. 30D).

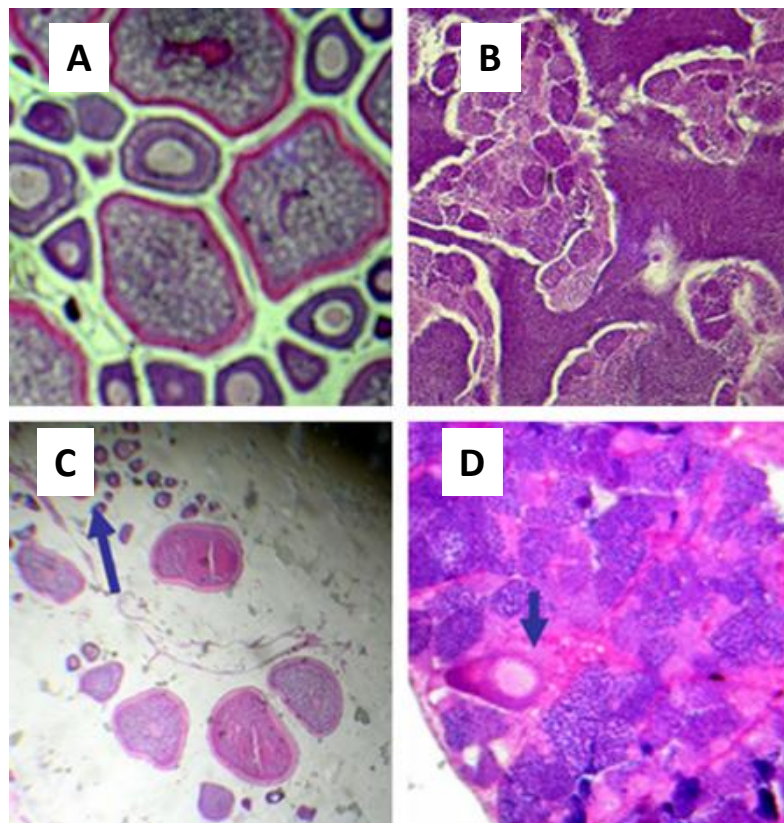


Figura 30 - Micrografias das gónadas de indivíduos adultos da espécie *Gobiocypris rarus*, coloração com H/E. **A** – Tecido ovárico maduro (controlo, x100); **B** – Tecido testicular maduro (controlo, x400); **C** – Degeneração do ovário, 25 ng/L etinilestradiol; **D** – Testículos-óvulos dos grupos tratados com as doses mais elevadas de etinilestradiol e nonifenol: A seta assinala oócitos perinucleares (x400). Extraído de Zha et al. (2007).

Dutasterida

A dutasterida (Fig. 31) é um inibidor da enzima 5-alfa-redutase, a qual é responsável pela síntese da dihidrotestosterona, uma das moléculas endógenas envolvidas na hiperplasia da próstata. Por este motivo, este fármaco é utilizado em situações em que pretende reduzir os sintomas daquela patologia, reduzindo o risco de bloqueio urinário e a necessidade de intervenção cirúrgica (Roehrborn et al. 2002).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

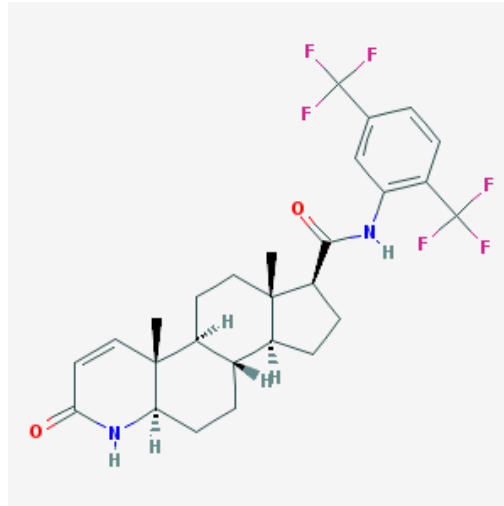


Figura 31 – Estrutura química do dutasterida. Extraído de Pubmed Compound.

O impacto deste fármaco no desenvolvimento reprodutivo de fêmeas da espécie *P. promelas* foi estudado num modelo de exposição crónica envolvendo 21 dias de exposição a uma concentração de 100 µg/L. Tal como pode ser visto na Fig. 32, os ovários dos animais-controlo contêm essencialmente oócitos vitelogénicos maduros. No caso do tratamento com o fármaco na concentração de 100 µg/L durante 21 dias, a proporção de oócitos diminuiu (Margiotta-Casaluci et al. 2013). Os autores estudaram igualmente o efeito deste fármaco ao nível do sistema reprodutor masculino não tendo, no entanto, encontrado quaisquer alterações histopatológicas, confirmando assim que a toxicidade despoletada por este fármaco é dependente do sexo do animal (Margiotta-Casaluci et al. 2013).

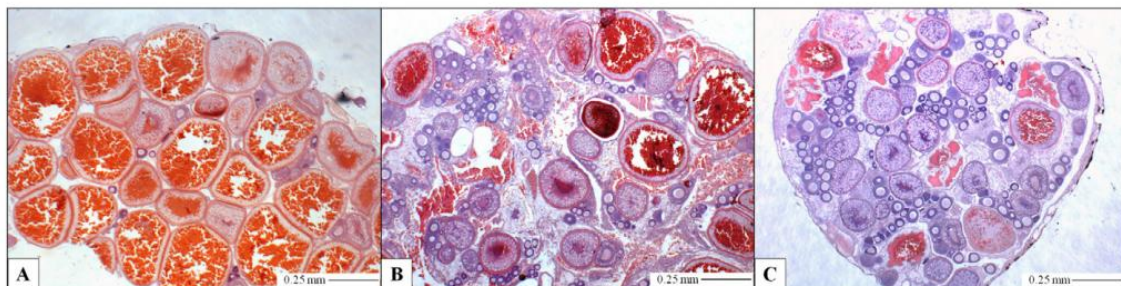


Figura 32 - Secções de ovários de *P. promelas*. Controlo (A); Ovários de animais expostos a dutasterida (B e C) na concentração 100 µg/L durante 21 dias. Extraído de Margiotta-Casaluci et al. (2013).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

3.3. Antibióticos

Os antibióticos constituem uma das classes de fármacos mais utilizadas a nível mundial, motivo pelo qual são frequentemente encontrados em águas de distintas proveniências, podendo em última análise despoletar toxicidade nos organismos aquáticos.

Uma parte significativa dos trabalhos centrados no estudo do impacto ecotoxicológico dos antibióticos emprega sistemas *in vitro*, não fornecendo portanto informação relativamente ao impacto histopatológico destas moléculas. A título de exemplo, Lundén et al. apresenta o impacto de 5 antibióticos na proliferação de células renais de truta arco-íris, nomeadamente ácido oxolínico, oxitetraciclina, clorfenicol e trimetoprim + sulfadiazina na proporção 1:5, tendo sido encontrada diminuição de resposta ao agente mitogénico em todos os casos, exceto na experiência envolvendo a combinação trimetoprim+sulfadiazina (Lundén et al. 2000).

Alguns trabalhos mais antigos descrevem a toxicidade de alguns antibióticos em peixes, tal como eritromicina (Piper 1961; McBride et al. 1975; Marking et al. 1988) e oxitetraciclina (Marking et al. 1988). Os principais parâmetros avaliados são as doses letais e farmacocinética, não sendo de uma forma geral referidos estudos histológicos.

No entanto, existem alguns estudos em que é possível obter informação sobre o impacto de antibióticos a nível histológico, nomeadamente:

Tetraciclina

A tetraciclina (Fig. 33) é um antibiótico de largo espectro, utilizado contra várias bactérias. Do ponto de vista mecanístico, este antibiótico atua por inibição da síntese proteica procariota, levando assim à morte do organismo (Connell et al. 2003).

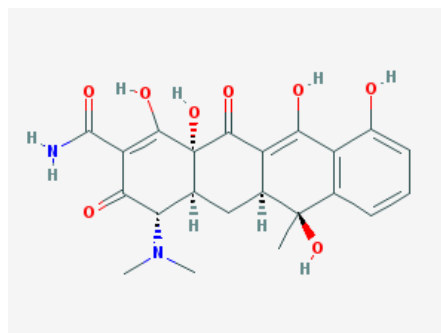


Figura 33 – Estrutura química da tetraciclina. Extraído de Pubmed Compound.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Nunes et al (2015) avaliou a toxicidade aguda da tetraciclina no peixe de água doce *Gambusia holbrooki* por determinação das alterações histológicas das brânquias e fígado, e ainda pelas alterações nas defesas antioxidantes, nomeadamente glutathione-S – transferase (GST), catalase (CAT) e peroxidação lipídica (Nunes et al. 2015a).

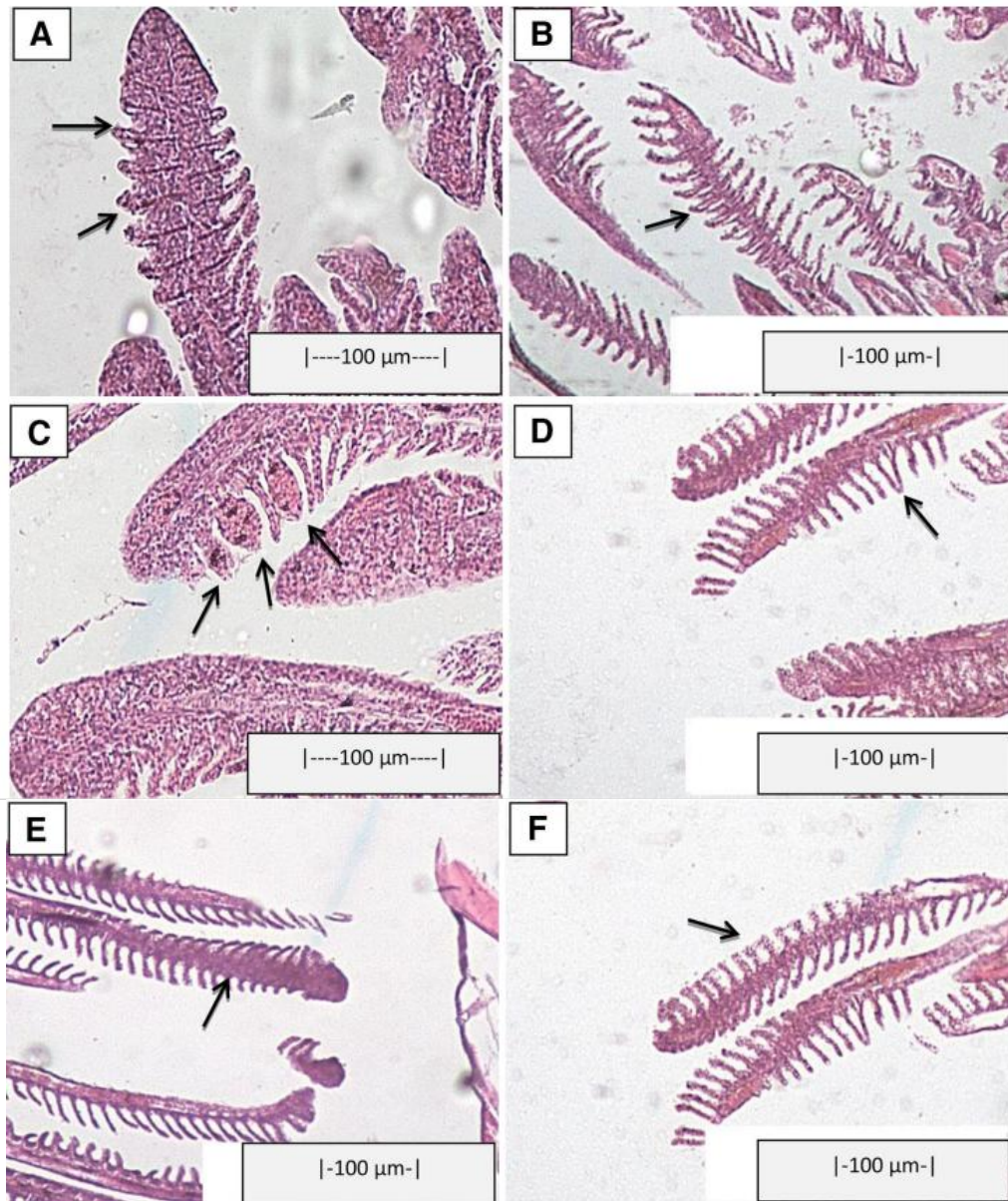


Figura 34 Alterações patológicas observadas nas brânquias de *G. holbrooki* exposto a várias concentrações de tetraciclina. **a** Hipertrofia das lamelas primárias e secundárias; **b** levantamento epitelial; **c** Aneurisma; **d** Fusão lamelar; **e** Proliferação celular do epitélio primário; **f** Necrose. Tempo de exposição: 96 horas. Extraído de Nunes et al. (2015a).

Tal como pode ser visto na Fig. 34, a exposição à tetraciclina despoletou várias alterações histológicas ao nível das brânquias, incluindo hipertrofia das lamelas,

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

aneurisma, fusão lamelar e proliferação celular do epitélio. A nível hepático, foram também encontradas alterações, nomeadamente congestão vascular e vacuolização hepatocelular (Fig. 35).

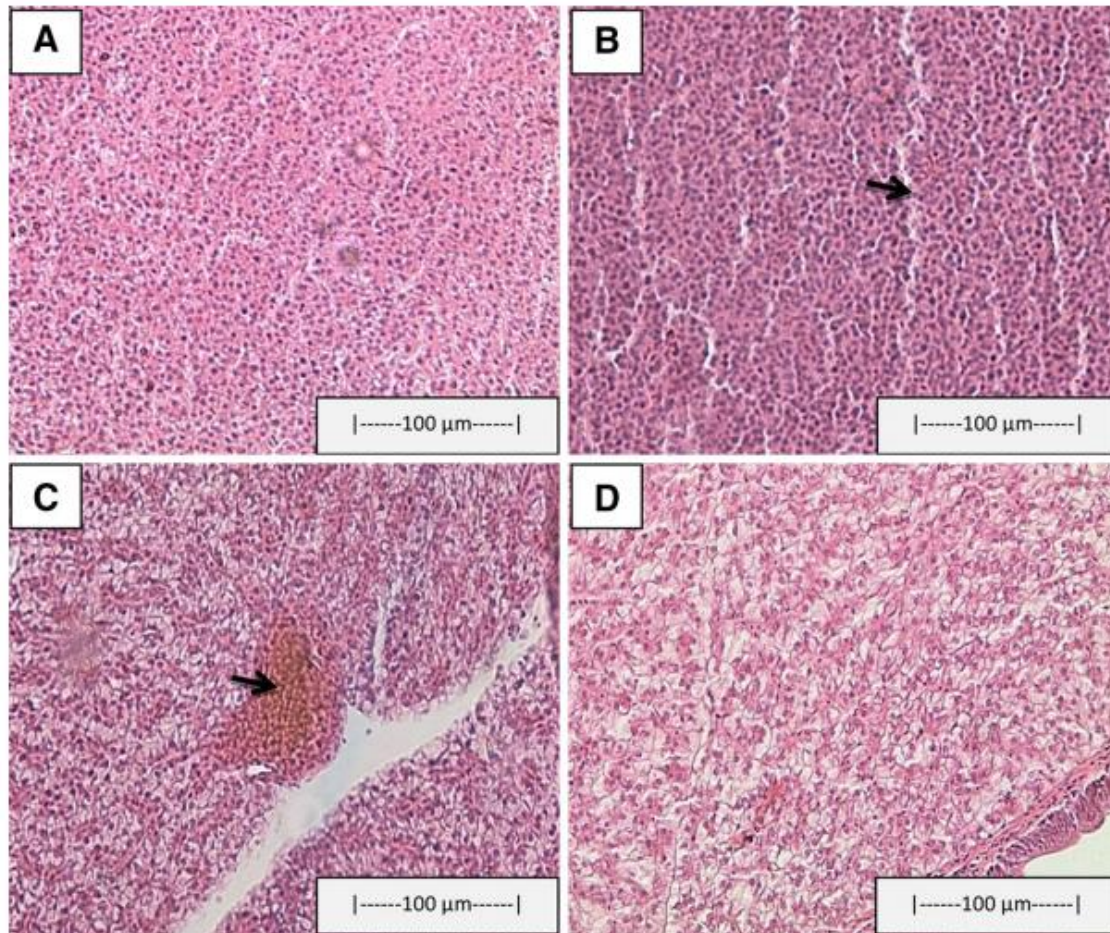


Figura 35 - Histologia normal (a) e observações patológicas (b-d) no fígado de *G. holbrooki* após 86 horas de exposição a várias concentrações de tetraciclina. (b) aumento dos vasos sinusóides (c) congestão vascular e (d) vacuolização hepatocelular. Extraído de Nunes et al. (2015a).

Os resultados encontrados no estudo das defesas antioxidante, nomeadamente GST e CAT, permitem tirar algumas conclusões sobre a etiologia do dano histológico encontrado. Com efeito, foi encontrado um aumento das atividades destas enzimas, com ênfase da CAT a nível hepático e GST a nível das branquias. Em função destes resultados, é possível deduzir que o dano histológico decorre do dano oxidativo despoletado pela tetraciclina, uma vez que o estudo das defesas antioxidantes sugere que está instalado um estado pro-oxidante.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Hentschel et al. estudaram os efeitos deste antibiótico nos rins do peixe zebra, num trabalho cujo objetivo era desenvolver um modelo animal para o estudo da toxicidade renal aguda. É importante referir que, contrariamente a outros trabalhos, neste estudo o fármaco foi injetado no animal, não tendo ocorrido exposição através da água. Apesar desta abordagem experimental não possuir totalmente as condições normais de exposição aos fármacos, pode ser útil na medida em que pode fornecer informações para o estudo dos mecanismos de toxicidade.

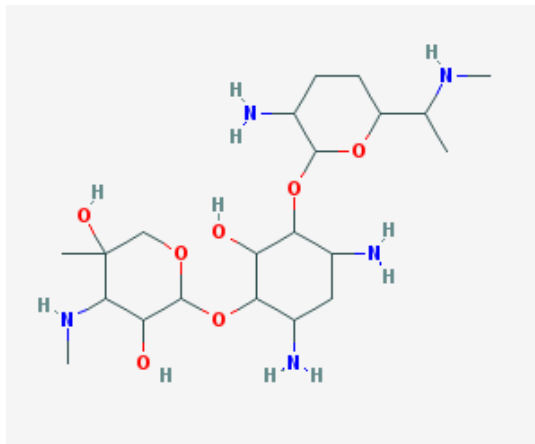


Figura 37 – Estrutura química da gentamicina. Extraído de Pubmed Compound.

A análise histológica de embriões injetados com gentamicina 96 horas após a fertilização evidenciou a presença de fosfolipidose lisossomal (Fig. 38), um distúrbio que se caracteriza pela acumulação de fosfolípidos nos tecidos como consequência de disfunção lisossomal (Shayman et al. 2013). Foi igualmente encontrada distensão do lúmen tubular, bem como distensão ao nível glomerular (Fig. 38) (Hentschel et al. 2005).

Do ponto de vista fisiológico, o dano histopatológico descrito tem consequências ao nível da capacidade de filtração e excreção de fluídos, um efeito que também pode ocorrer em humanos a fazerem terapêutica com esta classe de antibióticos (Kaloyanides et al. 1980).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

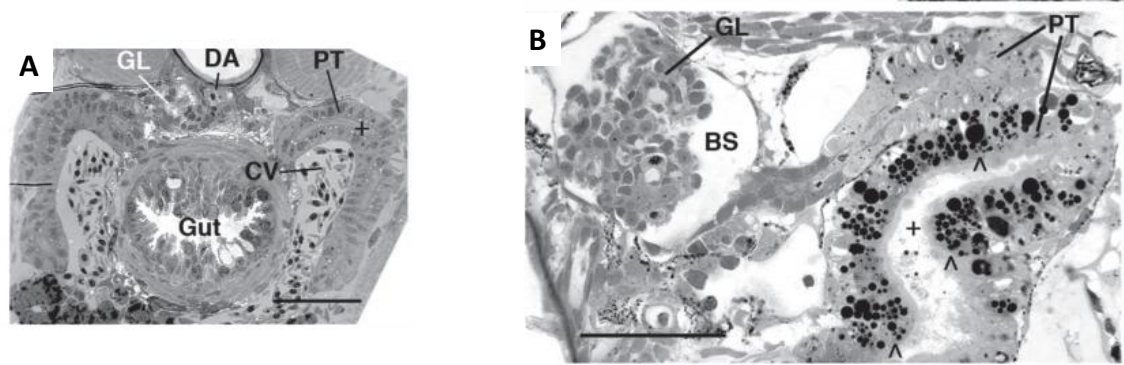


Figura 38 - Análise histológica dos túbulos renais do peixe-zebra. (A) Animais injetados apenas com uma solução de NaCl, 96 horas após a fertilização, onde se podem observar apenas alguns lisossomas e núcleos com 2-3 nucléolos. (B) Efeito da gentamicina: Fosfolipidose lisossomal marcada e distensão do lúmen tubular, bem como do espaço de Bowman (BS). GL – glomérulo; CV: Veia cardinal; PT: Túbulos pronéfricos proximais. Extraído de Hentschel et al. (2005).

3.4. Anti-dislipidémicos

Estatinas

As estatinas encontram-se entre os fármacos mais prescritos nos países desenvolvidos, em função dos seus efeitos ao nível da diminuição do colesterol, o que tem consequência benéfica ao nível cardiovascular de vários doentes (Maron et al. 2000; Unit 2005).

Do ponto de vista farmacológico, este grupo farmacoterapêutico atua por inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGR), a qual é fundamental na biossíntese do colesterol endógeno. Apesar da sua toxicidade relativamente baixa estão, no entanto, descritos vários problemas relacionados com o desenvolvimento de miopatias (Maron et al. 2000; Unit 2005).

Apesar de vários trabalhos não envolverem a componente histológica em peixes, parece haver unanimidade em classificar os seus efeitos como nefastos. Assim, alguns estudos apontam para os efeitos negativos destes fármacos nos peixes, incluindo atrofia muscular (Hanai et al. 2007) e inibição da migração das células germinais (Thorpe et al. 2004). Em ambos os casos, o mecanismo de ação envolvido é o mesmo responsável pelo efeito terapêutico a nível humano, isto é, inibição de enzima HMGR.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Num dos trabalhos que avalia as alterações histopatológicas desta classe de fármacos a nível dos peixes, estudou-se o impacto da exposição a lovastatina (Fig. 39) no desenvolvimento de miopatia no peixe zebra (Huang et al. 2011). A técnica de microscopia utilizada, second-harmonic generation, permite o estudo dos sarcómeros a nível micro estrutural, sendo portanto ideal para o tipo de informação que se pretendia obter.

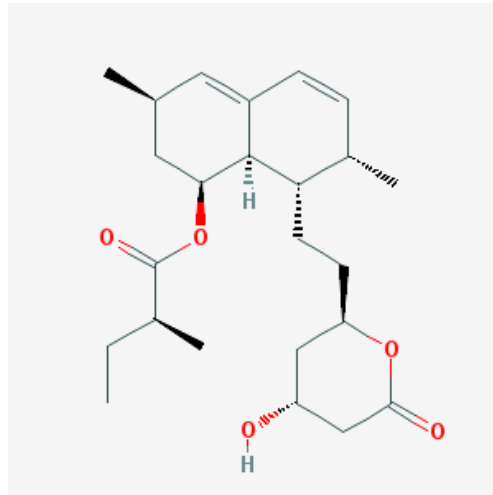


Figura 39 – Estrutura química da lovastatina. Extraído de Pubmed Compound.

O tratamento com lovastatina resultou em sarcómeros significativamente mais curtos quando comparados com os controlos (Fig. 40), no entanto a integridade morfológica das fibras musculares foi mantida. Do ponto de vista mecânico, os autores demonstraram que esta alteração estrutural era consequência de disfunção ao nível da via biossintética do colesterol, efeito despoletado pela lovastatina (Huang et al. 2011).

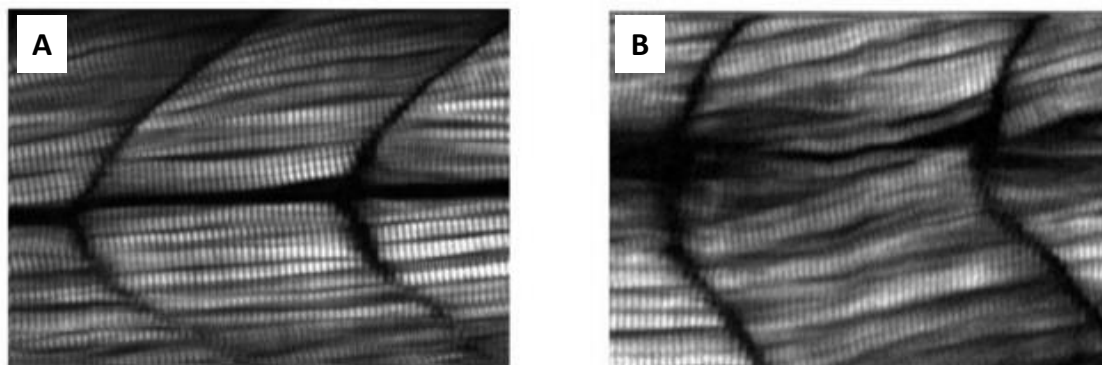


Figura 40 - (A) Imagem representativa de tecido de peixe-zebra controlo. (B) Imagem de tecido de peixe-zebra tratado com lovastatina (50 μ M) durante 12 horas. Extraído de Huang et al. (2011).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Fibratos

Os fibratos são um grupo de medicamentos muito utilizado na redução dos níveis de lípidos no sangue (tais como os triglicéridos e o colesterol). Do ponto de vista farmacológico distinguem-se das estatinas uma vez que atuam por estimulação dos recetores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas-alfa (PPAR α). Esse estímulo aumenta a produção e a ação da lipase lipoproteica, a qual é responsável pela hidrólise intravascular dos triglicéridos (Staels et al. 1998; Jun et al. 2010).

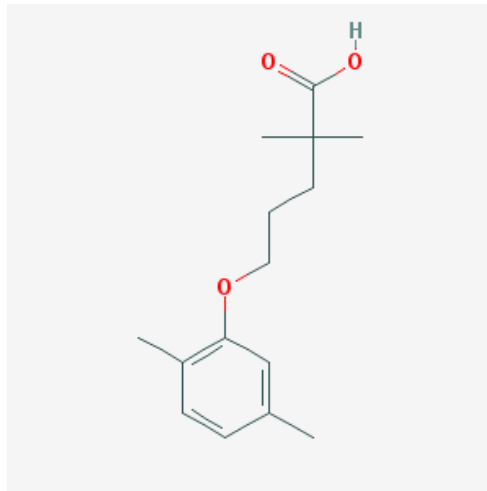


Figura 41 – Estrutura química do gemfibrozil. Extraído de Pubmed Compound.

Estão disponíveis vários estudos que versam sobre os efeitos nefastos causados por estes fármacos ao nível de várias espécies de peixes.

Um exemplo é o gemfibrozil (Fig. 41) que leva à disrupção do metabolismo lipoproteico na truta arco-íris (Prindiville et al. 2011). No caso da espécie *P. promelas*, o fármaco causa alteração ao nível da expressão de alguns genes relevantes para o metabolismo lipídico, no entanto os autores não encontraram um efeito toxicológico assinalável nas concentrações testadas (1.5 $\mu\text{g/ml}$) (Skolness et al. 2012). Já no caso da espécie *Carassius auratus*, Mimeau et al (2006) descreve que o composto sofre um processo de bioacumulação e que afeta negativamente os níveis plasmáticos de testosterona em mais de 50%. Infelizmente, em nenhum dos casos referidos foram conduzidos estudos histológicos.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Clofibrato

A toxicidade do fibrato clofibrato (Fig. 42) foi avaliada no peixe zebra em concentrações na ordem dos micromolar (Raldúa et al. 2008).

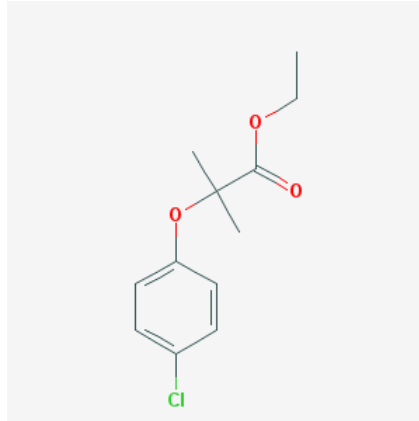


Figura 42 – Estrutura química do clofibrato. Extraído de Pubmed Compound

O tratamento dos embriões com este fármaco levou ao desenvolvimento da síndrome de má-absorção embrionária, o que resultou em larvas de dimensões reduzidas (Fig. 43). Excluindo os fatores genéticos, a disponibilidade de nutrientes é o principal fator que determina o crescimento larval e tamanho fetal/larvar. No entanto, os autores conseguiram demonstrar que este efeito é reversível por quanto o fármaco for removido. Previsivelmente, esta síndrome resultou no menor uptake de lípidos por parte do organismo, tal como é demonstrado pelos autores ao utilizar o corante lipofílico Oil Red O, o qual é usado em preparações histológicas nas quais se pretende evidenciar corpos estruturais de natureza lipídica (Fig. 44).

Além deste efeito ao nível dos lípidos, o tratamento com o fármaco resultou, também, em maiores tempos de desenvolvimento, adiando a eclosão da larva. Os autores referem também o aparecimento de junções neuro-musculares de forma arredondada e em maior densidade, tal como fibras musculares desorganizadas e com menos estrias. Da mesma forma, foram encontrados distúrbios ao nível da morfogénese da tiroide (Fig. 45).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

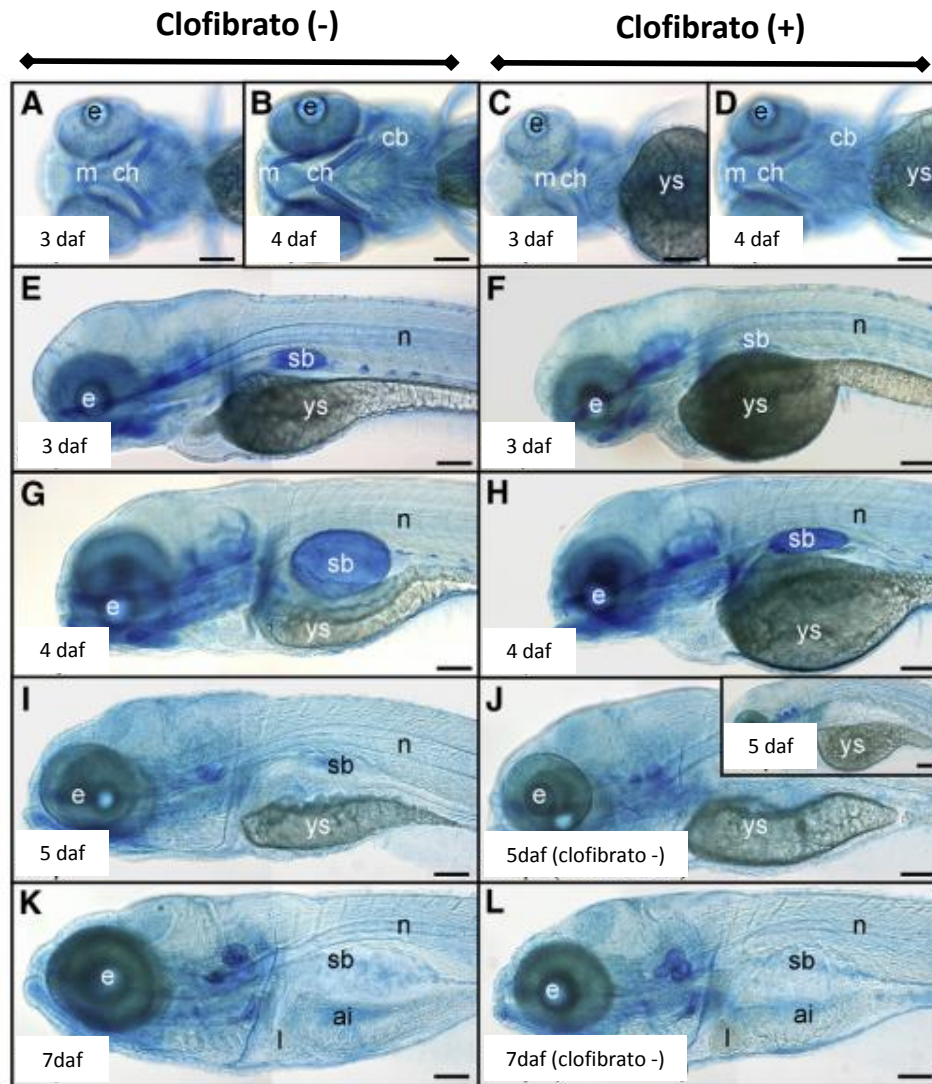


Figura 43 - Reversibilidade do síndrome da má-absorção induzido pelo clofibrato. (A–D) Coloração de azul de Alcian. Larvas controlo 3 daf (A) e 4 daf (B). Larvas tratadas com clofibrato (0.75 mg/L) 3 daf (C) e 4 (daf) (D). A reversibilidade do síndrome de má-nutrição induzido pelo clofibrato é evidenciada nos animais que, após exposição inicial, prosseguiram o seu ciclo de vida na ausência do composto. Larvas controlo aos 3 daf (E), 4 daf (G), 5 daf (I) e 7 daf (K). Larvas tratadas com clofibrato (0.75 mg/l) aos 3 daf (F), 4 daf (H) e 5 daf (J). Larvas 5 daf, expostas ao clofibrato dos 2 daf até 3 daf., incubadas em água nos restantes dias (J); Larvas 7 daf, expostas ao clofibrato do dia 2 ao dia 3, com incubação em água nos restantes 4 dias (L). **ai**: intestino anterior; **cb**: arcos cérebro-branquiais; **ch**: ceratohial; **e**: olho; **l**: fígado; **n**, notocorda; **m**: cartilagem de Meckel; **sb**: bexiga natatória; **ys**: saco vitelino. Escala: 100 µm. daf – dias após fertilização. Extraído de Raldúa et al. (2008).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

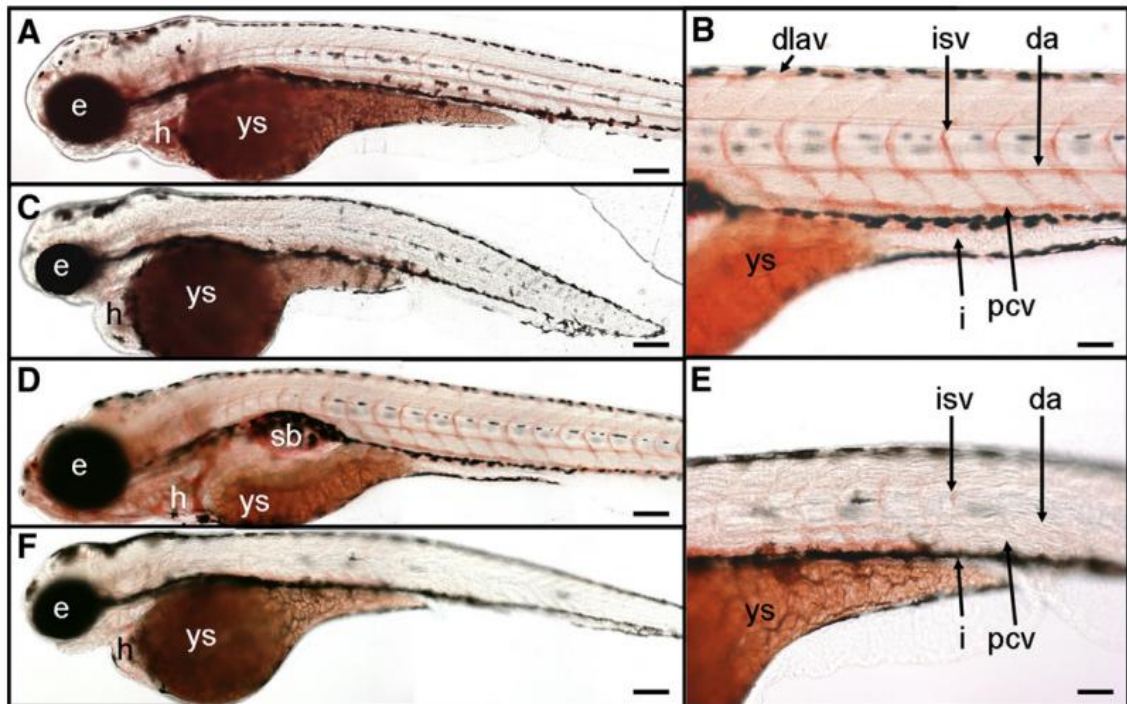


Figura 44 – Coloração de material lipídico com o corante Oil Red O em larvas de peixe-zebra. Larvas controlo 3 daf (**A**) e 4 daf (**B,D**); Larvas tratadas com clofibrato 0.75 mg/L 3 daf (**C**); Larvas tratadas com 0.5 mg/L de clofibrato 4 daf (**F,E**); Os painéis **B** e **E** constituem ampliações do torax. (**e**) olho; (**da**) aorta dorsal; vaso dorsal (longitudinal anastomático) (**dlav**); (**h**) coração; (**i**) intestino; (**isv**) vaso intersegmental; (**pcv**) veia carninal posterior; (**sb**) bexiga natatória; (**ys**) saco vitelino; Escala: 100 µm nos painéis **A, C, D, F** e 50 µm nos painéis **B** e **E**. Extraído de Raldúa et al. (2008).

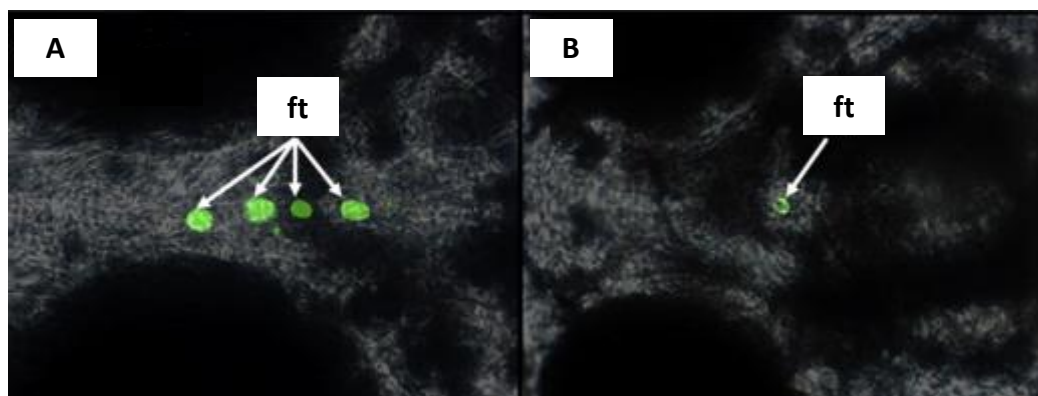


Figura 45 – Imagem de imunofluorescência direcionada ao T4 de larvas 5 daf (**A**) e tratadas com 0.75 mg/L de clofibrato (**B**). As setas brancas evidenciam os folículos tiroideus (**ft**). As estruturas circulares a preto correspondem aos olhos. Extraído de Raldúa et al. (2008).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

3.5. Outras moléculas

A carnitina (Fig. 46) distingue-se das moléculas apresentadas anteriormente na medida em que não é um medicamento, mas sim um suplemento alimentar, exercendo efeitos ao nível do metabolismo dos lípidos e transporte de ácidos gordos para a mitocôndria.

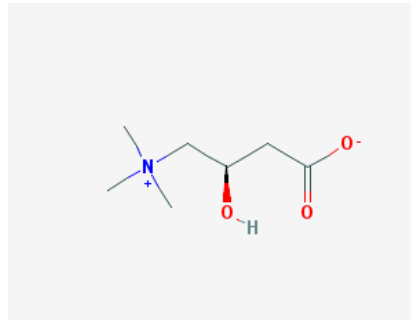


Figura 46– Estrutura química da L-carnitina. Extraído de Pubmed Compound.

Esta molécula tem vindo igualmente a ser utilizada ao nível da alimentação de peixes em função do seu efeito potenciador de crescimento, protetor contra níveis tóxicos de amónia, redutor do *stress* associado a variações de temperatura. Está igualmente descrito que esta suplementação exerce um efeito antioxidante a nível do sistema nervoso central (SNC) podendo ter um papel de proteção ao nível neuronal devido à estabilização das membranas mitocondriais, aumento da energia celular e da co-enzima Q-10 e aumento os níveis de GABA (Castorina et al. 1994; Nunes et al. 2014).

O efeito da L-carnitina enquanto potenciador do crescimento em peixes envolve o aumento de atividade metabólica, com conseqüente diminuição dos níveis de glicogénio e lípidos a nível hepático. No entanto, este acréscimo da atividade metabólica acarreta um aumento nos níveis de ROS, o que por sua vez leva ao aumento dos níveis de catalase, uma das enzimas destoxificadoras das ROS.

Do ponto de vista toxicológico o efeito da L-carnitina ao nível do metabolismo e transporte dos lípidos pode desencadear fenómenos de hepatotoxicidade e interferir no metabolismo dos ácidos gordos nos peroxissomas.

O efeito da L-carnitina ao nível do metabolismo hepático em trutas arco-íris diploides e triploides (*Oncorhynchus mykiss*) foi estudado, recorrendo a dietas com diferentes quantidades de L-carnitina ao longo de diferentes períodos de tempo (Nunes et al. 2014).

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

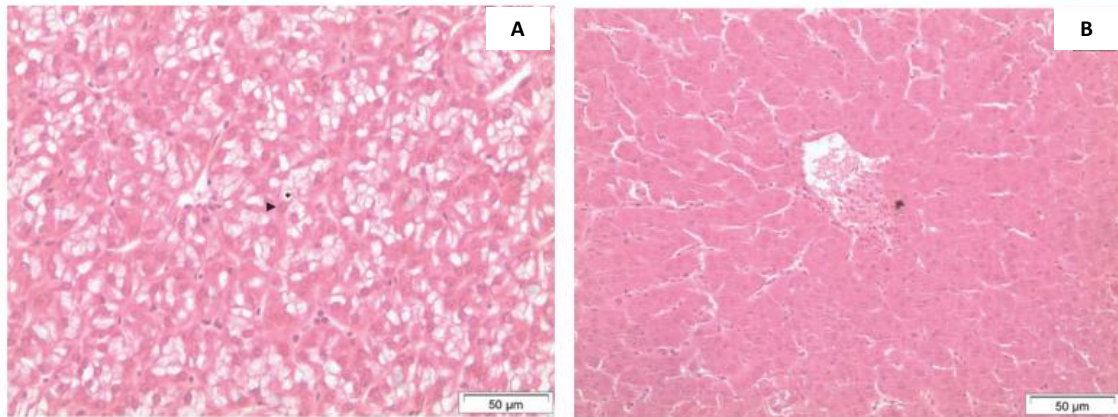


Figure 47 – Microfotografias de secções de fígado coradas com H/E após 56 dias de dieta livre de carnitina (A) ou com suplementação com L-carnitina (B, 530 mg L-carnitina / kg de alimento). O núcleo dos hepatócitos está marcado com uma seta, enquanto o vacúolo citoplasmático é assinalado pelo asterisco. Ampliação: 400x. Extraído de Nunes et al. (2014).

A nível da função hepática, foram encontradas várias alterações. Os hepatócitos evidenciaram um elevado grau de vacuolização (Fig. 47), um efeito que parece ser mais pronunciado nos organismos triploides quando comparados com os diploides. A morfologia celular foi também marcadamente alterada, em particular o tamanho dos núcleos, os quais aumentaram significativamente com o aumento da dose de L-carnitina e também com o tempo de exposição (Nunes et al. 2014). Este efeito é corroborado por estudos anteriores que descreveram um aumento do IHS em peixes expostos a xenobióticos capazes de ativar a enzima etoxirresorufina-*O*-desetilase (EROD) (Muir et al. 1992), como é o caso da L-carnitina.

O aumento verificado na área dos hepatócitos poderá estar, também, relacionado com o efeito promotor da proliferação dos peroxissomas por parte da L-carnitina, fenómeno descrito por (Li et al. 2012).

4. Conclusão

O consumo de elevadas quantidades de fármacos é hoje em dia uma realidade. No entanto, é igualmente sabido que não existe, ainda, um sistema de tratamento de resíduos adequado, o que leva a que grande parte das moléculas cheguem ao meio ambiente em concentração suficiente para poderem desencadear toxicidade ambiental. Embora não se trate de um efeito transversal a todas as classes farmacoterapêuticas, alguns fármacos sofrem fenómenos de bioacumulação e/ou biomagnificação ao longo da cadeia trófica.

O uso de biomarcadores histopatológicos, para o estudo do efeito de fármacos no ambiente aquático constitui uma mais-valia e regista-se um aumento do seu uso nos últimos anos na monitorização da qualidade ambiental mas também na saúde dos organismos presentes em ambientes poluídos. São considerados uma ferramenta vantajosa uma vez que permitem o estudo do impacto dos fármacos em órgãos-alvo como o fígado, brânquias e rins, avaliando a saúde animal.

Para além disso, as alterações observadas nos estudos com uso dos biomarcadores histopatológicos aparecem como uma resposta aos efeitos sub-letais, detetando-se rapidamente efeitos irritantes crónicos nos tecidos e órgãos. Algumas desvantagens são a pouca especificidade de algumas lesões e a eventual subjetividade inerente à quantificações deste tipo de lesões. No entanto, a função do seu uso crescente em vários trabalhos científicos, espera-se que venha a ser, cada vez mais, um marcador de poluição ambiental de uso incontornável.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

5. Bibliografia

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

Adams, S. M. (1990). Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. Biomarkers of environmental contamination. J. F. McCarthy and L. R. Shugart. Boca Raton, Lewis Publisher: 333-353.

Álvarez-Muñoz, D., A. Gómez-Parra, J. Blasco, C. Sarasquete and E. González-Mazo (2009). "Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese sole." Chemosphere **74**(9): 1216-1223.

Anuradha, D. and K. Pancharatna (2009). "Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental toxicology and pharmacology **27**(3): 390-395.

Ayas, Z., G. Ekmekci, M. Ozmen and S. V. Yerli (2007). "Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey." Environmental Toxicology and Pharmacology **23**: 242-249.

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

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

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Bester, K., L. Scholes, C. Wahlberg and C. McArdell (2008). "Sources and mass flows of xenobiotics in urban water cycles—an overview on current knowledge and data gaps." Water, Air, & Soil Pollution: Focus **8**(5-6): 407-423.

Boyer, T. D., T. L. Wright and M. P. Manns (2011). Zakim and Boyer's hepatology: a textbook of liver disease, Elsevier Health Sciences.

Braunbeck, T., D. E. Hinton and B. Streit (1998). Fish ecotoxicology, Springer Science & Business Media.

Breseghele, L., M. P. Cardoso, R. Borges-de-Oliveira, M. F. Costa, J. C. B. Barreto, S. M. T. Sabóia-Morais and A. T. Yamada (2004). "Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*)."
Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science **41**: 274-280.

Buerge, I. J., H.-R. Buser, T. Poiger and M. D. Müller (2006). "Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters." Environmental science & technology **40**(23): 7242-7250.

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

Cameron, J. S. (1998). Oxford textbook of clinical nephrology, ERA-EDTA.

Carrola, J., A. Fontainhas-Fernandes, P. Matos and E. Rocha (2009). "Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) from the Tinhela River, subjected to mine drainage from the abandoned Jales Mine (Portugal)." Bulletin of environmental contamination and toxicology **83**(1): 35-41.

Castorina, M. and L. Ferraris (1994). "Acetyl-L-carnitine affects aged brain receptorial system in rodents." Life sciences **54**(17): 1205-1214.

Cengiz, E. and E. Ünlü (2003). "Histopathology of gills in mosquitofish, *Gambusia affinis* after long-term exposure to sublethal concentrations of malathion." Journal of Environmental Science and Health, Part B **38**(5): 581-589.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Cha, Y. I., S.-H. Kim, L. Solnica-Krezel and R. N. DuBois (2005). "Cyclooxygenase-1 signaling is required for vascular tube formation during development." Developmental biology **282**(1): 274-283.

Connell, S. R., D. M. Tracz, K. H. Nierhaus and D. E. Taylor (2003). "Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(12): 3675-3681.

Corcoran, J., M. J. Winter and C. R. Tyler (2010). "Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish." Critical reviews in toxicology **40**(4): 287-304.

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

Coutinho, C. and K. Gokhale (2000). "Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent." Water Research **34**(11): 2997-3004.

Cuklev, F., E. Kristiansson, J. Fick, N. Asker, L. Förlin and D. Larsson (2011). "Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(9): 2126-2134.

de Goiás, G.-G., L. Breseghelo, M. P. Cardoso, M. F. da Costa, J. C. Bezerra and Á. T. Yamada (2004). "Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*)." Braz J Vet Res Anim Sci **41**: 4.

Elahee, K. and S. Bhagwant (2007). "Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius." Ecotoxicology and environmental safety **68**(3): 361-371.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Engelhardt, F., M. P. Wong and M. Duey (1981). "Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water. As affected by petroleum exposure." *Aquatic Toxicology* **1**(3): 175-186.

Fatta-Kassinos, D., K. Bester and K. Kümmerer (2010). *Xenobiotics in the urban water cycle: mass flows, environmental processes, mitigation and treatment strategies*, Springer Science & Business Media.

Fernandes, C., A. Fontainhas-Fernandes, S. M. Monteiro and M. A. Salgado (2007). "Changes in plasma electrolytes and gill histopathology in wild *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **79**(3): 301-305.

Fernandes, M. N. (2007). *Fish respiration and environment*, CRC Press.

Fernandes, M. N. and A. d. F. Mazon (2003). "Environmental pollution and fish gill morphology." *Fish adaptation*. Science Publishers, Enfield: 203-231.

Figueiredo-Fernandes, A., A. Fontainhas-Fernandes, R. Monteiro, M. Reis-Henriques and E. Rocha (2006). "Effects of the fungicide mancozeb on liver structure of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: assessment and quantification of induced cytological changes using qualitative histopathology and the stereological point-sampled intercept method." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **76**(2): 249-255.

Flippin, J. L., D. Huggett and C. M. Foran (2007). "Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*." *Aquatic Toxicology* **81**(1): 73-78.

Fontainhas-Fernandes, A. (2005). "The use of biomarkers in aquatic toxicology studies." *Revista Portuguesa de Zootecnia*: 67-86.

Garcia-Santos, S., S. Monteiro, J. Carrola and A. Fontainhas-Fernandes (2007). "Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio." *Arq. bras. med. vet. zootec* **59**(2): 376-381.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Giari, L., M. Manera, E. Simoni and B. S. Dezfuli (2007). "Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium." Chemosphere **67**(6): 1171-1181.

Graham, G. G., M. J. Davies, R. O. Day, A. Mohamudally and K. F. Scott (2013). "The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings." Inflammopharmacology **21**(3): 201-232.

Gravel, A., J. M. Wilson, D. F. Pedro and M. M. Vijayan (2009). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **149**(4): 481-490.

Grondel, J., A. Gloudemans and W. Van Muiswinkel (1985). "The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture." Veterinary immunology and immunopathology **9**(3): 251-260.

Grosser, T., S. Yusuff, E. Cheskis, M. A. Pack and G. A. FitzGerald (2002). "Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(12): 8418-8423.

Hanai, J.-i., P. Cao, P. Tanksale, S. Imamura, E. Koshimizu, J. Zhao, S. Kishi, M. Yamashita, P. S. Phillips and V. P. Sukhatme (2007). "The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity." The Journal of clinical investigation **117**(12): 3940.

Hassaninezhad, L., A. Safahieh, N. Salamat, A. Savari and N. E. Majd (2014). "Assessment of gill pathological responses in the tropical fish yellowfin seabream of Persian Gulf under mercury exposure." Toxicology Reports **1**: 621-628.

Hentschel, D. M., K. M. Park, L. Cilenti, A. S. Zervos, I. Drummond and J. V. Bonventre (2005). "Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease." American Journal of Physiology-Renal Physiology **288**(5): F923-F929.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Hoeger, B., B. Köllner, D. R. Dietrich and B. Hitzfeld (2005). "Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*)." *Aquatic Toxicology* **75**(1): 53-64.

Huang, S.-H., C.-D. Hsiao, D.-S. Lin, C.-Y. Chow, C.-J. Chang and I. Liao (2011). "Imaging of zebrafish in vivo with second-harmonic generation reveals shortened sarcomeres associated with myopathy induced by statin." *PloS one* **6**(9): e24764.

Huerta-Fontela, M., M. T. Galceran and F. Ventura (2007). "Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters." *Analytical chemistry* **79**(10): 3821-3829.

Jun, M., C. Foote, J. Lv, B. Neal, A. Patel, S. J. Nicholls, D. E. Grobbee, A. Cass, J. Chalmers and V. Perkovic (2010). "Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis." *The Lancet* **375**(9729): 1875-1884.

Kaloyanides, G. J. and E. Pastoriza-Munoz (1980). "Aminoglycoside nephrotoxicity." *Kidney Int* **18**(5): 571-582.

Kavitha, P., R. Ramesh, G. Bupesh, A. Stalin and P. Subramanian (2011). "Hepatoprotective activity of Tribulus terrestris extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*)." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **47**(10): 698-706.

Kim, Y., K. Choi, J. Jung, S. Park, P.-G. Kim and J. Park (2007). "Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea." *Environment International* **33**(3): 370-375.

Kime, D., J. Nash and A. Scott (1999). "Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics." *Aquaculture* **177**(1): 345-352.

Kostich, M. S. and J. M. Lazorchak (2008). "Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use." *Science of the total environment* **389**(2): 329-339.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Laville, N., S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas and J. Porcher (2004). "Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes." Toxicology **196**(1): 41-55.

Lemly, A. D. (2002). "Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example." Aquatic Toxicology **57**(1): 39-49.

Leonardo, J. M. L. O., L. Vargas, R. P. Ribeiro, H. L. M. Moreira, M. R. M. Natali, T. Volski and F. Cavichiolo (2008). "Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C." Acta Scientiarum. Animal Sciences **23**: 863-870.

Li, J.-L., Q.-Y. Wang, H.-Y. Luan, Z.-C. Kang and C.-B. Wang (2012). "Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha." J Biomed Sci **19**(1): 32.

Lister, A. and G. Van Der Kraak (2008). "An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation." General and comparative endocrinology **159**(1): 46-57.

Lundén, T. and G. Bylund (2000). "The influence of in vitro and in vivo exposure to antibiotics on mitogen-induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Fish & shellfish immunology **10**(5): 395-404.

Margiotta-Casaluci, L., R. E. Hannah and J. P. Sumpter (2013). "Mode of action of human pharmaceuticals in fish: The effects of the 5-alpha-reductase inhibitor, dutasteride, on reproduction as a case study." Aquatic toxicology **128**: 113-123.

Marking, L. L., G. E. Howe and J. R. Crowther (1988). "Toxicity of erythromycin, oxytetracycline, and tetracycline administered to lake trout in water baths, by injection, or by feeding." The Progressive Fish-Culturist **50**(4): 197-201.

Maron, D. J., S. Fazio and M. F. Linton (2000). "Current perspectives on statins." Circulation **101**(2): 207-213.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Mataqueiro, M., L. Satiko Okada Nakaghi, J. De Souza, C. Da Cruz, G. De Oliveira and E. C. Urbinati (2009). "Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon." Journal of Applied Ichthyology **25**(1): 124-127.

Matozzo, V., F. Gagné, M. G. Marin, F. Ricciardi and C. Blaise (2008). "Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review." Environment International **34**(4): 531-545.

McBride, J., G. Strasdine and U. Fagerlund (1975). "Acute toxicity of kanamycin to steelhead trout (*Salmo gairdneri*)." Journal of the Fisheries Board of Canada **32**(4): 554-558.

Memmert, U., A. Peither, R. Burri, K. Weber, T. Schmidt, J. P. Sumpter and A. Hartmann (2013). "Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish." Environmental Toxicology and Chemistry **32**(2): 442-452.

Mimeault, C., V. Trudeau and T. Moon (2006). "Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPAR β) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*)." Toxicology **228**(2): 140-150.

Mitchell, J. A., P. Akarasereenont, C. Thiemermann, R. J. Flower and J. R. Vane (1993). "Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(24): 11693-11697.

Muir, D. C., A. L. Yarechewski, D. A. Metner and W. L. Lockhart (1992). "Dietary 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in rainbow trout: accumulation, disposition, and hepatic mixed-function oxidase enzyme induction." Toxicology and applied pharmacology **117**(1): 65-74.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Nascimento, A., F. Araújo, I. Gomes, R. Mendes and A. Sales (2012). "Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil." Anatomia, histologia, embryologia **41**(3): 209-216.

Norris, D. O., S. B. Felt, J. D. Woodling and R. M. Does (1997). "Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters." General and comparative endocrinology **108**(3): 343-351.

Nunes, B., S. Antunes, R. Gomes, J. Campos, M. Braga, A. Ramos and A. Correia (2015a). "Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations." Archives of environmental contamination and toxicology **68**(2): 371-381.

Nunes, B., J. Campos, R. Gomes, M. Braga, A. Ramos, S. Antunes and A. Correia (2015b). "Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations." Environmental Science and Pollution Research **22**(1): 667-678.

Nunes, B., F. Carvalho and L. Guilhermino (2004). "Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*." Chemosphere **57**(11): 1581-1589.

Nunes, B., A. Miranda, R. Ozório, F. Gonçalves, J. Gonçalves and A. Correia (2014). "Modulation of neuronal activity and hepatic metabolism by ploidy and l-carnitine supplement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquaculture Nutrition **20**(3): 242-252.

Piper, R. G. (1961). "Toxic effects of erythromycin thiocyanate on rainbow trout." The Progressive Fish-Culturist **23**(3): 134-135.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Prindiville, J. S., J. A. Mennigen, J. M. Zamora, T. W. Moon and J.-M. Weber (2011). "The fibrate drug gemfibrozil disrupts lipoprotein metabolism in rainbow trout." Toxicology and applied pharmacology **251**(3): 201-208.

Quabius, E. S., D. T. Nolan, C. J. Allin and S. E. W. Bonga (2000). "Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Environmental toxicology and chemistry **19**(12): 2892-2899.

Raldúa, D., M. André and P. J. Babin (2008). "Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish." Toxicology and applied pharmacology **228**(3): 301-314.

Roehrborn, C. G., P. Boyle, J. C. Nickel, K. Hoefner and G. Andriole (2002). "Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia." Urology **60**(3): 434-441.

Rose, J., H. Holbech, C. Lindholst, U. Nørum, A. Povlsen, B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2002). "Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **131**(4): 531-539.

Rossi, S. (2008). "Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp.(Pisces, Teleostei)."

Runnalls, T. J., D. N. Hala and J. P. Sumpter (2007). "Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical Clofibric acid on sperm parameters in adult Fathead minnow." Aquatic toxicology **84**(1): 111-118.

Schneider, S., J. Hendricks, G. Constantine and R. Larson (1980). "Tobramycin nephrotoxicity and lethality in coho salmon." Toxicology and applied pharmacology **54**(3): 399-404.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Schwaiger, J., H. Ferling, U. Mallow, H. Wintermayr and R. Negele (2004). "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout." Aquatic Toxicology **68**(2): 141-150.

Shayman, J. A. and A. Abe (2013). "Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1831**(3): 602-611.

Short, S. and T. R. Meyers (2001). "Histology for finfish." Alaska Fish and Game CF Division, Juneau and Anchorage: 1-10.

Silva, A. G. and C. B. Martinez (2007). "Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream." Environmental Toxicology and Pharmacology **23**(2): 185-192.

Skolness, S. Y., E. J. Durhan, K. M. Jensen, M. D. Kahl, E. A. Makynen, D. L. Villeneuve and G. T. Ankley (2012). "Effects of gemfibrozil on lipid metabolism, steroidogenesis, and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Environmental Toxicology and Chemistry **31**(11): 2615-2624.

Staels, B., J. Dallongeville, J. Auwerx, K. Schoonjans, E. Leitersdorf and J.-C. Fruchart (1998). "Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism." Circulation **98**(19): 2088-2093.

Strauch, G., M. Möder, R. Wennrich, K. Osenbrück, H.-R. Gläser, T. Schladitz, C. Müller, K. Schirmer, F. Reinstorf and M. Schirmer (2008). "Indicators for assessing anthropogenic impact on urban surface and groundwater." Journal of Soils and Sediments **8**(1): 23-33.

Sunshine, A. (2000). "A comparison of the newer COX-2 drugs and older nonnarcotic oral analgesics." The Journal of Pain **1**(3): 10-13.

Teraoka, H., W. Dong and T. Hiraga (2003). "Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology." Congenital anomalies **43**(2): 123-132.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Thibaut, R., S. Schnell and C. Porte (2006). "The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an in-vitro study." Environmental science & technology **40**(16): 5154-5160.

Thorpe, J. L., M. Doitsidou, S.-Y. Ho, E. Raz and S. A. Farber (2004). "Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGC_oA reductase activity and prenylation." Developmental cell **6**(2): 295-302.

Triebkorn, R., H. Casper, A. Heyd, R. Eikemper, H.-R. Köhler and J. Schwaiger (2004). "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic toxicology **68**(2): 151-166.

Unit, E. S. (2005). "Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins." Lancet **366**(9493): 1267-1278.

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

Warner, T. D., F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell and J. R. Vane (1999). "Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(13): 7563-7568.

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

Zha, J., Z. Wang, N. Wang and C. Ingersoll (2007). "Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol." Chemosphere **66**(3): 488-495.

Efeitos dos fármacos enquanto xenobióticos presentes no ambiente aquático ao nível das alterações tecidulares reportadas em peixes por vários estudos de toxicologia ambiental

Zuccato, E., D. Calamari, M. Natangelo and R. Fanelli (2000). "Presence of therapeutic drugs in the environment." The lancet **355**(9217): 1789-1790.