

Marta Filipa Peniche da Costa

Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes
de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada
em biomarcadores

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Marta Filipa Peniche da Costa

Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes
de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada
em biomarcadores

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Marta Filipa Peniche da Costa

Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada em biomarcadores

(Marta Filipa Peniche da Costa)

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia
(UFP/CIIMAR)

Co-Orientador:

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes
(UA/CESAM)

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

Sumário

Omeprazol é um fármaco inibidor da bomba de prótons (ATPase H⁺, K⁺) amplamente utilizado na terapêutica humana. É utilizado para tratar os sintomas da doença de refluxo gastroesofágico e outras patologias causadas pelo excesso de ácido gástrico. O omeprazol e os seus principais metabólitos, tais como o omeprazol sulfito, são excretados principalmente pela urina humana e chegam às estações de tratamento de águas residuais onde não são tratados convenientemente, sendo posteriormente lançados no compartimento aquático. Os efeitos ecotoxicológicos de uma exposição crónica (28 dias) a concentrações realistas de omeprazol sulfito (0,03, 0,3 e 3,0 µg/L) foram avaliados em *Sparus aurata*. As atividades das enzimas etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), catalase (CAT) e glutathione S-transferases (GSTs) foram avaliadas. Os danos tecidulares em alguns órgãos chave, em particular nas brânquias e no fígado dos peixes, foram também devidamente analisados. Embora nenhuma alteração significativa tenha sido detetada na atividade da EROD, foi registada uma diminuição na atividade da CAT no fígado para duas concentrações mais altas. A atividade das GSTs também mostrou uma diminuição para ambos os órgãos (fígado e brânquias) para alguns grupos de exposição, nomeadamente na concentração mais elevada a nível hepático, e nas duas concentrações mais baixas no tecido branquial. Além disso, a avaliação histopatológica revelou uma clara relação dose-efeito em ambos os órgãos, resultando principalmente de lesões circulatórias, regressivas e progressivas para os indivíduos expostos nas duas maiores concentrações comparativamente ao tratamento controlo. Os presentes dados sugerem que a exposição crónica ao omeprazol sulfito pode exercer efeitos tóxicos sub-letais em dois órgãos-chave do peixe. Mais pesquisas são no entanto necessárias para entender completamente os efeitos do omeprazol em termos de alteração dos mecanismos de defesa antioxidante.

Palavras-chave

Fármaco; exposição crónica; peixe; catalase; EROD; GSTs; biomarcadores histopatológicos

Abstract

Omeprazole is a proton pump inhibitor drug (ATPase H⁺, K⁺) widely used in human therapy. It is used to treat the symptoms of gastroesophageal reflux disease and other conditions caused by excess gastric acid. Omeprazole and its major metabolites, such as omeprazole sulphite, are excreted primarily by human urine and arrive to the wastewater treatment plants where they are not properly treated, being released into the aquatic compartment. The ecotoxicological effects of chronic exposures (28 days) at realistic concentrations of omeprazole sulphite (0.03, 0.3 and 3.0 µg / L) were evaluated in *Sparus aurata*. Ethoxysorufin-O-deethylase (EROD), Catalase (CAT), glutathione S-transferases (GSTs) activities were assessed. Tissue disorders, particularly in fish gills and liver were also properly evaluated. Although no significant change was detected in EROD activity, there was a decrease in CAT activity in the liver at the two higher concentrations. The activity of GSTs also showed a decrease for both organs (liver and gills) for some groups of exposure, namely in the highest concentration in the liver, and for the two lowest concentrations in the gill tissue. In addition, histopathological evaluation revealed a clear dose-effect relationship in both organs, resulting mainly from circulatory, regressive and progressive lesions for the individuals exposed in the two highest concentrations compared to the control treatment. The present data suggest that the chronic exposure to omeprazole sulphite may exert sub-lethal toxic effects on two key organs of the fish. Further research, however, is needed to fully understand the effects of omeprazole in terms of altering antioxidant defence mechanisms

Key words

Drug; chronic exposure; fish; catalase; EROD; GSTs; histopathological biomarkers

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia, pela oportunidade e privilégio que foi ter feito parte deste projeto num centro investigação de referência nesta área - o CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental) e contactado com uma equipa dotada de excelentes profissionais que me acolheu desde o primeiro dia. Obrigado pela orientação, apoio, rigor, amizade e boa disposição em todos os momentos, assim como pela confiança, sentido crítico e responsabilidade que sempre depositou em mim! Foram fundamentais para trabalhar sempre mais e com gosto pelo que fazia.

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes pela sua disponibilidade, acompanhamento, dedicação e bom humor em todas as viagens realizadas até Aveiro. Agradeço o acolhimento e a oportunidade de contactar com um importante centro de estudos como o CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), disponibilizando todo o espaço e material necessário.

Deixo também um agradecimento especial à Prof. Doutora Céu Costa pela sua disponibilidade e acompanhamento nas rotinas de histologia numa fase importante deste trabalho.

Um agradecimento e reconhecimento sincero à Universidade Fernando Pessoa e a todos os meus professores que ao longo destes 5 anos foram determinantes para a minha formação, pela sabedoria, conhecimento e experiências transmitidas! Obrigado pela disponibilidade e dedicação sempre demonstradas.

À minha Família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, que sempre foram os meus pilares! Obrigada pelo apoio e amor incondicional, obrigada pelas “discussões filosóficas” à mesa, e por todas as conversas e debates familiares que me fizeram desenvolver o espírito crítico e a minha visão do mundo. Obrigada por todas as brincadeiras, todos os sorrisos e “puxões de orelhas” que me fizeram crescer. À minha cunhada, Carina, que além de amiga e confidente trouxe para as nossas vidas o meu pequeno sol – a Beatriz.

A todos um enorme e sincero obrigado!

Índice

1. Introdução	1
2. Importância da ecotoxicologia de fármacos	3
2.1. Os fármacos no ambiente: fontes, processos de remoção, (bio)acumulação, efeitos tóxicos, disseminação	3
2.2. Estações de tratamento de águas residuais – remoção de fármacos e dos seus metabolitos	6
2.3. Estudos já realizados: classes fármaco-terapêuticas encontradas no ambiente	7
3. IBPs e Omeprazol	9
3.1 Estimulação da célula parietal	9
3.2 Funcionamento da Bomba de Protões - ATPase H ⁺ , K ⁺ gástrica	10
3.3 Mecanismo farmacológico do omeprazol.....	12
3.4 Metabolização do omeprazol.....	12
4. Biomarcadores	14
4.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	14
4.2. Catalase (CAT).....	15
4.3. Glutaciona-S-transferases.....	17
4.4. Biomarcadores histopatológicos.....	18
5. A importância dos peixes enquanto organismos teste em bioensaios	20
6. Objetivos	21
7. Material e Métodos	22

7.1. Proveniência e acondicionamento dos peixes	22
7.2. Exposição ao omeprazol sulfito.....	22
7.3. Amostragem e preparação dos tecidos	23
7.4. Ensaio enzimáticos.....	24
7.4.1. Determinação da atividade da enzima etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	24
7.4.2. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT).....	25
7.4.3. Determinação da atividade das isoenzimas GSTs	25
7.4.4. Quantificação da proteína total.....	26
7.5. Técnica histológica	26
7.5.1. Procedimento experimental	26
7.5.2. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos órgãos/tecidos.....	27
7.6. Análise estatística	28
8. Resultados	29
8.1. Biomarcadores enzimáticos.....	29
8.1.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	29
8.1.2. Catalase.....	29
8.1.3. Glutathione-S-transferases.....	30
8.2. Histopatologia das brânquias.....	32
8.2.1. Avaliação qualitativa	32
8.2.2. Avaliação semi-quantitativa	34

8.3. Histopatologia do fígado	35
8.3.1. Avaliação qualitativa	35
8.3.2. Avaliação semi-quantitativa	37
9. Discussão	38
9.1. Resposta enzimática	38
9.1.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	38
9.1.2. Catalase.....	39
9.1.3. Glutaciona-S-transferases.....	41
9.2. Análise histopatológica	42
10. Conclusão	50
11. Bibliografia.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 - Classes terapêuticas detetadas no meio ambiente, expresso em percentagem relativa. <i>Adaptado a partir de Santos et al. (2010)</i>	9
Figura 2 - Localização da célula parietal no corpo gástrico. <i>Adaptado a partir de Gartner e Hiatt (2007)</i>	10
Figura 3 - Produção de ácido clorídrico (HCl). Com a letra P estão assinaladas as bombas de transporte ativo, a azul a ATPase H ⁺ , K ⁺ gástrica; as setas tracejadas indicam osmose e difusão passiva. <i>Adaptado a partir de Guyton e Hall (2011)</i>	11
Figura 4 - Estrutura química dos isómeros óticos do omeprazol	13
Figura 5 – Fórmula estrutural dos principais metabolitos do omeprazol	14
Figura 6 - Esquema da atividade catalítica da catálase. <i>Adaptado de Aebi (1984)</i>	16
Figura 7 - Filamento branquial do organismo <i>Pimephales promelas</i> , secção sagital através do seio venoso (formalina, HE, barra = 16,7 µm); 1. lamela primária; 2. lamela secundária; 3. célula epitelial; 4. célula mucosa; 5. célula pilar; 6. lacuna (lúmen capilar); 7. eritrócito no lúmen capilar; 8. célula basal indiferenciada; 9. seio venoso central. <i>Adaptado a partir de Yonkos et al. (2000)</i>	19
Figura 8 – Fígado e hepatopâncreas do organismo <i>Cyprinus carpio</i> : parênquima hepático (1), bem como um tracto veno-pancreático consistindo de um aferente da veia porta (2 - eritrócitos laranja) rodeado por células pancreáticas exócrinas (3 - castanho avermelhado). Estes conjuntos, que podem ser acompanhados por arteríolas ou ductos biliares, são disseminados por todo o fígado. <i>Adaptado a partir de Genten et al. (2009)</i>	20
Figura 9 – Atividade enzimática da EROD em fígado de <i>S. aurata</i> . Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento ± desvio padrão. Não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas entre grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $p > 0,05$).	29

Figura 10 – Atividades enzimáticas da catalase em brânquias e fígado (A e B, respetivamente) e das isoenzimas GSTs em brânquias e fígado (C e D, respetivamente). Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*). 31

Figura 11 – Cortes histológicos de brânquias de *S. aurata* expostas a omeprazol sulfito (coloração HE (A, B, C, D e F) e coloração AB-PAS (E)). Microfotografias de: grupo controlo (A) com arquitetura normal, grupo exposto a 0,03 $\mu\text{g/l}$ (B), 0,3 $\mu\text{g/l}$ (C) e 3,0 $\mu\text{g/l}$ (D, E e F). Hiperplasia de células epiteliais (asterisco branco). Fusão lamelar (circulo tracejado). Levantamento epitelial (asterisco preto). Hiperplasia de células mucosas (estrela). Hemorragia (quadrado branco). Hiperemia (triangulo branco). Edema (circulo sólido). Infiltração de leucócitos (setas pretas). 33

Figura 12 – Índices patológicos completos e categóricos (circulatórios, regressivos, progressivos e inflamatórios) da dourada para brânquias, após exposição ao omeprazol sulfito. Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*). 34

Figura 13 – Cortes histológicos de fígado de douradas expostas a omeprazol sulfito (coloração HE). Microfotografias de: grupo controlo (A) com arquitetura normal do hepatopâncreas e do parênquima hepático, grupo exposto a 0,03 $\mu\text{g/l}$ (B), 0,3 $\mu\text{g/l}$ (C e D) e 3,0 $\mu\text{g/l}$ (E e F). Hemorragia (asterisco branco). Dilatação dos sinusóides (estrela). Infiltração leucocitária (circulo tracejado). Núcleos picnóticos (seta preta). Vacuolização (quadrado). Melanomacrófagos entre um canal biliar e o hepatopâncreas (B) melanomacrófagos associados ao hepatopâncreas (F) (triangulo branco). 36

Figura 14 – Índices patológicos completos e categóricos (circulatórios, regressivos e inflamatórios) de indivíduos de *S. aurata* para fígado, após exposição ao omeprazol sulfito. Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*). 37

Abreviaturas

AB-PAS-	Coloração com e azul de alcian - ácido periódico-Schiff
ADP -	Adenosina difosfato
AINES-	Anti-inflamatórios não esteroides
ATP -	Adenosina trifosfato
ATPase H⁺, K⁺ -	Bomba de prótons
Ca²⁺ -	Cálcio
cAMP -	3'5'-AMP cíclico
CAT -	Catalase
CIIMAR-	Centro interdisciplinar de investigação marinha e ambiental
CO₂ -	Dióxido de carbono
CYP -	Sistema citocromo P450
CYP1A1-	Citocromo P450 1A1
EC₅₀ -	Concentração de fármaco que induz 50% da sua resposta máxima (potência de um fármaco)
EROD-	Etoxiresorufina-O-deetilase
ETAR-	Estação de tratamento de águas residuais
EUA -	Estados Unidos da América
GSH -	Glutathiona na forma reduzida

Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada em biomarcadores

GSTs	-	Glutationa S-transferases
H⁺	-	Ião hidrogénio
HCl	-	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	-	Bicarbonato/iões bicarbonato
H₂CO₃	-	Ácido carbónico
HE	-	Coloração com hematoxilina-eosina
K⁺	-	Potássio
KCl	-	Cloreto de potássio
NaCl	-	Cloreto de sódio
IBP	-	Inibidores da bomba de protões
ERO	-	Espécies reativas de oxigénio
SOD	-	Superóxido dismutase

1. Introdução

Na última década, os compostos farmacêuticos começaram a ser considerados os novos poluentes ambientais emergentes, devido à sua disseminação nos sistemas hídricos e ao seu potencial risco para a biocenose (Parolini e Binelli, 2012). Além disso são particularmente resistentes à biodegradação ambiental pois essa estabilidade metabólica é necessária para a ação farmacológica (Li *et al.*, 2011). Devido ao seu uso generalizado, os fármacos, quer na sua forma original, quer como metabolitos, atingem o ambiente aquático principalmente através de efluentes de esgoto, pois os processos de eliminação nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) revelam-se ineficazes (Rosal *et al.*, 2010, Pal *et al.*, 2010). Estudos recentes revelaram a presença de concentrações mensuráveis de uma centena de fármacos na gama dos ng/L e dos µg/L tanto em águas de superfície, como de esgoto tratado (Santos *et al.*, 2010, Ortiz de García *et al.*, 2013, Veiga-Gomez *et al.*, 2017).

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) surgiram na década de 1980 (sendo o omeprazol o primeiro a surgir) e são os inibidores mais potentes da secreção ácida gástrica atualmente disponíveis no mercado, com eficácia superior aos antagonistas dos recetores da histamina (Sheen e Triadafilopoulos, 2011). Os IBP tornaram-se a base do tratamento médico da doença do refluxo gastroesofágico e da úlcera péptica (Seeley *et al.*, 2005, Guyton e Hall, 2011). Como os IBP têm poucos efeitos adversos, são bem tolerados e relativamente eficazes, tornaram-se uma das classes fármaco-terapêuticas mais comumente prescrita, com mais de 26 biliões de dólares gastos anualmente em todo o mundo (Reimer, 2013). O mecanismo de ação dos compostos desta classe fármaco-terapêutica envolve a inibição da enzima ATPase H⁺, K⁺ presente nas células parietais da mucosa gástrica, promovendo a diminuição da acidez gástrica (Wallmark, 1986). No fígado, o omeprazol é amplamente metabolizado pelo sistema citocromo P450 (CYP) resultando em três metabolitos primários principais: omeprazol sulfona, hidroxioimeprazol e omeprazol sulfito, que são excretados principalmente pela urina (Kosma *et al.*, 2016). O omeprazol sulfito é o metabolito encontrado em maior concentração em amostras de efluentes (águas residuais tratadas) e águas superficiais (Boix *et al.*, 2013, Boix *et al.*, 2014, Gracia-Lor *et al.*, 2014).

Como consequência de um ambiente aquático poluído, os organismos aquáticos podem sofrer uma grande variedade de alterações subletais de cariz molecular, enzimático, celular, tecidual ou individual, incluindo situações de stress oxidativo consequência da produção de espécies reativas de oxigénio (ERO). A fim de evitar os efeitos perniciosos das ERO e de outros radicais livres, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) (Davies, 1995, Modesto e Martinez, 2010). A variação da atividade de enzimas específicas pode servir desta forma como biomarcadores de stresse oxidativo através da análise dos perfis de indução ou inibição das suas atividades. Destacam-se a catalase (CAT) e as glutathiona-S-transferases (GSTs) responsáveis pela atividade preventiva do dano oxidativo provocado por ERO (Van der Oost *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2011). No entanto, a exposição a xenobióticos pode aumentar a produção de ERO e superar as defesas antioxidantes. Nesta perspetiva, a análise do estado antioxidante dos organismos vivos em estudos ecotoxicológicos, quer recorrendo a espécies teste em bioensaios, quer por via de espécies sentinela em estudos de biomonitorização torna-se altamente relevante (Nunes *et al.*, 2015b). Biomarcadores de stresse oxidativo têm sido amplamente utilizados na monitorização da contaminação ambiental, permitindo a deteção precoce de exposição a baixas concentrações de contaminantes numa ampla gama de espécies (Oliveira *et al.*, 2010, Ramesh *et al.*, 2018).

Alguns poluentes ambientais são indutores potentes de enzimas que metabolizam xenobióticos, como enzimas do CYP, nomeadamente a citocromo P450 1A1 (CYP1A1). A atividade catalisada pela etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) resulta da indução mediada pelo recetor da CYP1A1 é, por isso, um dos principais parâmetros utilizados para monitorizar os ambientes aquáticos potencialmente poluídos (Kirby *et al.*, 2004, Ferreira *et al.*, 2004).

A par dos biomarcadores enzimáticos, os biomarcadores histopatológicos são um método de avaliação ecotoxicológica rápido para detetar os efeitos de contaminantes aquáticos, nomeadamente, lesões que ocorrem em órgãos-chave selecionados de peixes expostos (Nero *et al.*, 2006). As brânquias e o fígado são órgãos adequados para o exame histológico, a fim de determinar os efeitos da poluição, uma vez que respondem facilmente à exposição a xenobióticos (Bernet *et al.*, 1999, Nero *et al.*, 2006).

2. Importância da ecotoxicologia de fármacos

2.1. Os fármacos no ambiente: fontes, processos de remoção, (bio)acumulação, efeitos tóxicos, disseminação

Os produtos farmacêuticos no ambiente podem ser provenientes de diferentes fontes, sejam elas difusas ou pontuais (Kümmerer, 2009, Li, 2014). Apesar do lançamento destas substâncias poder ocorrer no compartimento terrestre, a tendência final dos compostos de uso farmacêutico é chegarem ao ecossistema aquático (Santos *et al.*, 2010). As seis fontes principais de contaminação do compartimento aquático são: aterros sanitários, resíduos animais, resíduos de aquicultura de água doce, resíduos hospitalares, resíduos provenientes do descarte intencional e não intencional da indústria farmacêutica e resíduos domésticos (Petrović *et al.*, 2003, Pal *et al.*, 2010, Kosma *et al.*, 2016).

Apesar das diversas fontes acima identificadas, a maior parte dos resíduos de medicamentos provém da excreção, via urina e fezes, dos mesmos após a toma por humanos ou animais. Os processos de eliminação dos fármacos a partir do organismo dão-se normalmente após a sua biotransformação, que resulta (quase sempre) num aumento da sua hidrossolubilidade (Ritter *et al.*, 2011). Assim, o destino mais comum dos fármacos e dos seus metabolitos é o envio para o ambiente aquático. Vários estudos têm demonstrado a presença de elevados níveis de contaminação por resíduos farmacêuticos em efluentes domésticos, águas superficiais (tais como rios, lagos, estuários), águas subterrâneas e oceanos (Weigel *et al.*, 2002, Vieno *et al.*, 2006, Pal *et al.*, 2010, Santos *et al.*, 2010, Ortiz de García *et al.*, 2013).

Assim sendo, a contaminação por fármacos e resíduos farmacêuticos é transversal ao compartimento aquático e ao solo. Uma das principais fontes de contaminação - as atividades agrícolas - utilizam “lamas de esgoto” (resíduo do tratamento de águas residuais), que contém alguns contaminantes inalterados ou incompletamente removidos pelas ETARs (ver ponto 2.2), como fertilizante é uma importante fonte de resíduos farmacêuticos que passam para os solos e para recursos de água doce (Santos *et al.*, 2010); os medicamentos veterinários, que também são excretados na urina e nas fezes pelos animais antes de serem espalhados pela terra através da aplicação de estrume como

fertilizantes (Lin *et al.*, 2008, Arikan *et al.*, 2008); a utilização de águas residuais contaminadas através da irrigação agrícola em zonas de escassez. Além desta contaminação direta do solo, existe também o risco de escoamento com chuva forte, que pode contaminar tanto a superfície circundante como a água subterrânea (Li, 2014).

O uso de fármacos na pecuária faz com que resíduos destes compostos sejam excretados e estejam presentes em águas superficiais levando a perturbações endócrinas (Pal *et al.*, 2010). Assim como, na aquicultura, cujos fármacos utilizados, bem como os seus metabolitos e produtos de degradação, são descarregados diretamente nas águas superficiais (Santos *et al.*, 2010). Atualmente muitos países fazem recargas artificiais dos aquíferos, com água retirada de lagos, rios ou outras águas superficiais, de modo a aumentar os recursos de água doce para produção de água potável. Esta prática poderá levar a uma potencial contaminação por fármacos a longo prazo das águas subterrâneas, caso as águas superficiais utilizadas estejam contaminadas (Li, 2014).

Outra forma de disseminação relaciona-se com os aterros municipais. Estes podem gerar lixiviados que contêm quantidades significativas de matéria orgânica dissolvida, metais pesados e outros contaminantes (Amor *et al.*, 2015). A água infiltra-se interagindo com fluidos, sólidos e gases do lixo enterrado e dá origem à água residual. De acordo com o estudo realizado por Buszka *et al.* (2009), vários tipos de contaminantes, como hormonas e produtos farmacêuticos, estão localizados nos estratos de solo abaixo do aterro analisado. Barnes *et al.* (2004) após a recolha e análise de água subterrânea coletada no aterro Norman (Oklahoma, EUA) evidenciaram a presença de uma elevada concentração de fármacos nas águas subterrâneas, chegando à conclusão de que o aterro gera a água residual orgânica e lixiviado que se infiltra nas águas subterrâneas e passa para a água superficial. Assim, nos locais mais próximos do aterro, as concentrações dos compostos detetados eram superiores às detetadas em locais mais distantes; além disso chamaram atenção para a persistência destes compostos, uma vez que o aterro foi fechado em 1985 e ainda foram detetados contaminantes nas amostras recolhidas (entre 2003 e 2004).

Esta constante introdução de fármacos no ecossistema já se faz sentir através de alterações fisiológicas, comportamentais, endócrinas e, sobretudo, reprodutivas em organismos não-

alvo (Corcoran *et al.*, 2010, Selmoni *et al.*, 2017). Tendo em conta as concentrações relativas das classes farmacêuticas no ambiente (ver ponto 2.3), foram realizados diversos estudos acerca dos possíveis efeitos nos organismos aquáticos. Em *Oncorhynchus mykiss* (n.v. truta arco-íris) após exposição a diclofenac foram observados efeitos nocivos em dois órgãos-chave: rins e brânquias, nomeadamente, necrose de células endoteliais e degeneração hialina de gotículas, no rim; e necrose de células pilar, elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia em brânquias (Schwaiger *et al.*, 2004). Vários investigadores como Santos *et al.* (2010), Corcoran *et al.* (2010) e Guo *et al.* (2016) fizeram uma revisão dos dados atuais sobre a presença e efeitos biológicos do estrogénio sintético em peixes: a feminização, indução de intersexo (presença de oócitos nos testículos), alteração da função mitocondrial, do metabolismo energético e do controlo do ciclo celular e expressão génica foram relatados nos vários estudos analisados. No que diz respeito aos antibióticos, a maior parte dos estudos referem que têm um efeito mais marcado em microorganismos e algas do que em peixes (Santos *et al.*, 2010, Corcoran *et al.*, 2010, Li, 2014). Por exemplo, Yamashita *et al.* (2006) avaliaram a inibição do crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e de um crustáceo *Daphnia magna* por levofloxacin e claritromicina, mostrando efeito tóxico pronunciado com uma EC₅₀ de 11 µg/L (relativo à claritromicina), apenas na alga; a grande quantidade de algas mortas leva a outro risco: a eutrofização e a interrupção da cadeia alimentar afetando todo o equilíbrio do ecossistema aquático. Por outro lado, estão relatados efeitos de stresse oxidativo em brânquias e alterações do ciclo celular com anormalidades segregacionais em *Oncorhynchus mykiss* após exposição a eritromicina (Rodrigues *et al.*, 2016).

Foram observadas alterações comportamentais em *Thalassoma bifasciatum* (n.v. gudião azul) após o aumento experimental da neurotransmissão serotoninérgica usando o inibidor seletivo da recaptção da serotonina - fluoxetina. Ficou demonstrado que o tratamento com fluoxetina diminui o comportamento territorial agressivo em indivíduos do género masculino, tanto no laboratório como no campo (Semsar *et al.*, 2004, Brooks, 2014).

Apesar dos fármacos e dos seus resíduos serem submetidos a processos de tratamento, as águas residuais são uma forma de entrada de resíduos de medicamentos nos ecossistemas

aquáticos (Petrović *et al.*, 2003). Apesar deste problema as concentrações de produtos farmacêuticos geralmente diminuem dos efluentes das ETARs para os corpos de água doce (Pal *et al.*, 2010).

As ETARs assumem um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do ecossistema, na medida em que devem ser capazes de evitar a introdução de fármacos e resíduos farmacêuticos no compartimento aquático. Nas ETARs, as águas residuais (afluente), são sujeitas, normalmente, a processos convencionais de tratamento, para depois serem devolvidas ao meio ambiente (efluente). Na remoção da matéria orgânica são usualmente utilizados microrganismos aeróbios, que de acordo com a quantidade e espécie, condicionarão a eficácia da remoção dos fármacos e resíduos farmacêuticos; por outro lado a estrutura e características físico-químicas da molécula farmacêutica também influenciam a eficácia da remoção (Kümmerer, 2009, Pal *et al.*, 2010).

2.2. Estações de tratamento de águas residuais – remoção de fármacos e dos seus metabolitos

Atualmente, e apesar dos esforços crescentes para aumentar a eficácia da remoção destes compostos (fármacos) nas ETARs, os processos a que as águas residuais são submetidas, baseados na degradação biológica dos contaminantes/poluentes, não são totalmente eficientes na remoção dos resíduos farmacêuticos (Melo *et al.*, 2009). A eficiência de remoção, utilizando o tratamento biológico, é tanto mais elevada quanto maior a hidrofobia dos compostos, tal como demonstra Rosal *et al.* (2010).

Existe um grande número de estudos que relacionam a presença de resíduos de substâncias farmacêuticas nas águas residuais e a sua conseqüente presença no ambiente (Melo *et al.*, 2009, Rosal *et al.*, 2010, Pal *et al.*, 2010) (Tabela 1). Desta forma, torna-se evidente a necessidade de implementar medidas para melhorar a eficácia das estações de tratamento (Ortiz de García *et al.*, 2013). No presente, o ciclo do medicamento envolve vários passos, desde o desenvolvimento da molécula passando pelas fases de testes clínicos, distribuição no mercado até à administração ao paciente e farmacovigilância. No

entanto, este ciclo não inclui uma avaliação da toxicidade ambiental inerente ao princípio ativo e aos seus metabolitos, nem uma avaliação relativamente ao seu destino final, nomeadamente se ocorre uma eliminação eficaz ao nível das ETARs.

Tabela 1 - Eficiência de remoção de algumas classes fármaco-terapêuticas nas ETARs. *Adaptado a partir de Rosal et al. (2010) e de (Pal et al., 2010)*

Classes fármaco-terapêuticas	Eficiências de remoção nas ETARs
IBP (inibidores da bomba de prótons) e os metabolitos	Abaixo de 20% sendo apenas parcialmente eliminados (usando processos biológicos para remoção de compostos)
β -bloqueadores (atenolol, metoprolol e propanolol)	
Regulador lipídico (bezafibrato)	
Antibióticos (eritromicina, sulfametoxazol e trimetoprim)	
Anti-inflamatórios (diclofenac, indometacina, cetoprofeno)	
Antiepiléticos (carbamazepina)	
Contracetivos orais (17 α -etinilestradiol)	Inconclusivo (encontrados com maior frequência em águas superficiais e efluentes de ETARs)

2.3. Estudos já realizados: classes fármaco-terapêuticas encontradas no ambiente

Um grande número de produtos farmacêuticos têm sido reportados em ecossistemas aquáticos, tanto marinhos como dulçaquícolas, bem como em efluentes de estações de tratamento de águas residuais (Li *et al.*, 2010, Boix *et al.*, 2013, Oliveira *et al.*, 2015). Estas substâncias são particularmente importantes do ponto de vista ecotoxicológico pois podem interferir com alguns aspetos-chaves de organismos aquáticos expostos, uma vez que são projetados para exercer atividade biológica, são lipofílicos o que lhes permite atravessar rapidamente as membranas biológicas e são resistentes à biotransformação

podendo ser considerados como persistentes no ambiente, pois são também resistentes aos processos de degradação naturais que existem no meio (Santos *et al.*, 2010, Nunes *et al.*, 2015a). A sua ação potencial pode ocorrer sobre estruturas biológicas, vias bioquímicas e processos de regulação, que podem resultar em efeitos tóxicos e dano irreversível a vários níveis.

A média mundial de consumo *per capita* de produtos farmacêuticos por ano é estimada em cerca de 15 g, mas nos países industrializados, o valor encontra-se entre 50 e 150 g (Pal *et al.*, 2010). Dados do INFARMED (2016) indicam que o grupo farmacoterapêutico de fármacos que atuam no aparelho digestivo está entre os mais prescritos, sendo que o omeprazol está entre os 10 fármacos mais vendidos (Rodrigues, 2013), acompanhando a tendência dos países industrializados (Ortiz de García *et al.*, 2013), razão pela qual os seus metabolitos tenham sido detetados em águas residuais urbanas e águas superficiais (Boix *et al.*, 2013, Boix *et al.*, 2014, Gracia-Lor *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, com os avanços nas técnicas analíticas, nomeadamente com a redução dos limites de deteção dos equipamentos, a pesquisa e deteção de fármacos em matrizes ambientais aumentou consideravelmente. Foram detetados uma infinidade de produtos farmacêuticos no meio aquático (Santos *et al.*, 2010, Ortiz de García *et al.*, 2013, Brooks, 2014, Guo *et al.*, 2016). As classes farmacológicas detetadas em maior quantidade no compartimento aquático, segundo Santos *et al.* (2010), são os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), seguidos dos antibióticos e dos antilipídicos (Figura 1), justificando, desta forma, o maior número de estudos publicados sobre a presença e efeitos ambientais destas três classes farmacológicas (Brooks, 2014, Oliveira *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2015).

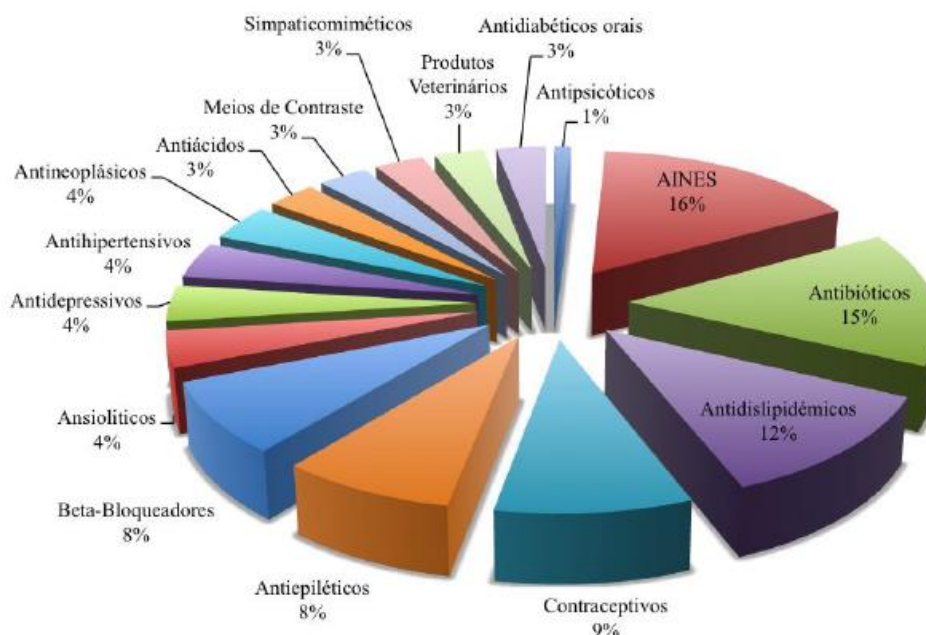


Figura 1 - Classes terapêuticas detetadas no meio ambiente, expresso em percentagem relativa. *Adaptado a partir de Santos et al. (2010)*

3. IBPs e Omeprazol

3.1 Estimulação da célula parietal

As células parietais são células da mucosa gástrica (Seeley *et al.*, 2005), que possuem na sua membrana a ATPase H^+ , K^+ (bomba de prótons - ATPase H^+ , K^+ gástrica), responsável pela secreção de íon hidrogénio (H^+) usado para a síntese de ácido clorídrico (HCl) (Forte *et al.*, 1989) (Figura 2). A ativação da secreção de ácido depende de um aumento na concentração de dois mensageiros intracelulares, nomeadamente o 3'5'-AMP cíclico (cAMP) e o cálcio livre citosólico, $[Ca^{2+}]$. Por sua vez, o aumento destes mensageiros está condicionado pelas concentrações de três estimuladores da célula parietal, a histamina, a acetilcolina e a gastrina. Os três fazem aumentar os níveis de $[Ca^{2+}]$; no entanto só a histamina faz aumentar os níveis de cAMP. A acetilcolina e a gastrina estimulam a secreção de histamina de células parácrinas localizadas perto da célula parietal, por conseguinte aumenta o cAMP (Sachs e Wallmark, 1989).

O resultado da estimulação da célula parietal é a ativação da ATPase H^+ , K^+ gástrica. No estado “não estimulado” estas bombas estão inativas em vesículas. A estimulação da secreção de ácido envolve, então, uma elevação inicial do $[Ca^{2+}]$ e cAMP intracelular, seguida da ativação das cascatas da proteína quinase, que desencadeiam a translocação e a inserção da ATPase H^+ , K^+ na membrana plasmática apical da célula parietal (Yao e Forte, 2003).

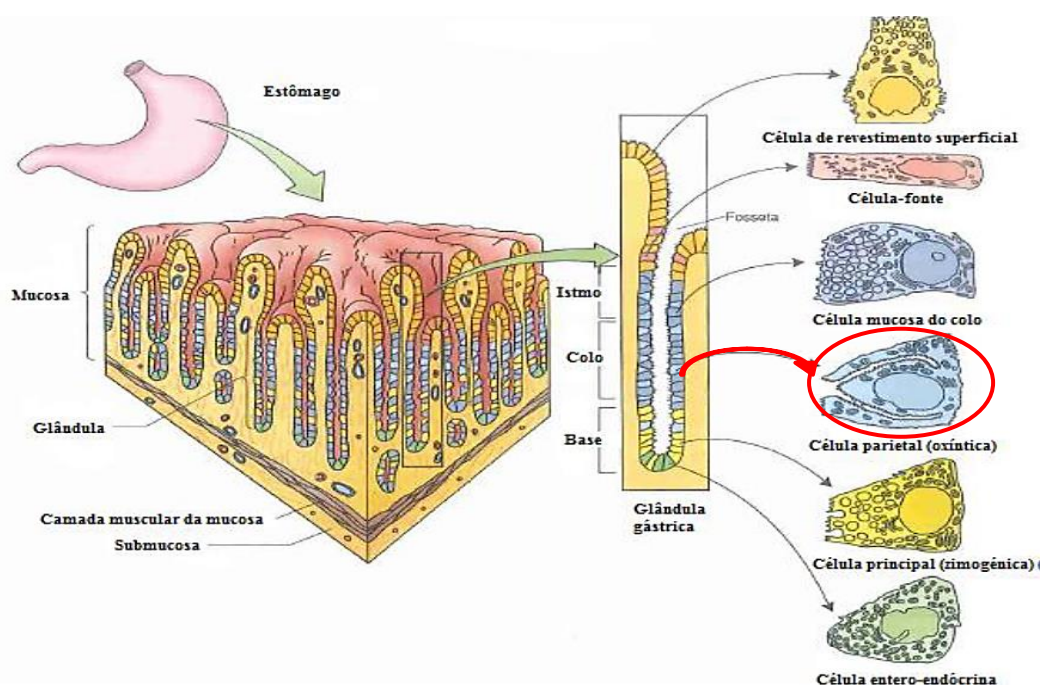


Figura 2 - Localização da célula parietal no corpo gástrico. Adaptado a partir de Gartner e Hiatt (2007).

3.2 Funcionamento da Bomba de Protões - ATPase H^+ , K^+ gástrica

A bomba de protões usa a energia que resulta da hidrólise do ATP (adenosina trifosfato) em ADP (adenosina difosfato) e fosfato para fazer o transporte de iões hidrogénio (H^+) através da superfície apical da célula parietal para o lúmen do estômago; simultaneamente alguns iões potássio (K^+) entram na célula por permuta com H^+ (Ritter *et al.*, 2011).

O ião H^+ provém da reação catalisada pela anidrase carbónica, entre o dióxido de carbono (CO_2) e a água (subprodutos do metabolismo da célula parietal), que resulta em ácido

carbónico (H_2CO_3) (Figura 3). O ácido carbónico ioniza-se dando origem ao bicarbonato (HCO_3^-) e ao ião hidrogénio (H^+) (Sachs e Wallmark, 1989).

Os iões bicarbonato (HCO_3^-) deslocam-se a favor do gradiente de concentração, da célula parietal para o fluido extracelular, utilizando um transportador antiporte fazendo entrar na célula iões cloreto (Cl^-). O Cl^- é secretado da célula, através de canais de cloro para os canalículos (por um processo de difusão facilitada). Por sua vez, os iões H^+ são também secretados para o espaço canalicular através da ATPase H^+ , K^+ que faz entrar na célula iões K^+ por transporte ativo (Guyton e Hall, 2011). Tanto o Cl^- como o K^+ voltam a sair da célula, para o espaço canalicular. O K^+ apenas entra na célula para o H^+ poder manter a homeostase (Sachs e Wallmark, 1989).

Assim sendo, temos na zona canalicular da célula parietal Cl^- e H^+ que darão origem a ácido clorídrico (HCl), que é posteriormente secretado pela extremidade aberta do canalículo no lúmen da glândula. A secreção final no canalículo tem ainda cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e água que passa por osmose (Seeley *et al.*, 2005, Guyton e Hall, 2011).

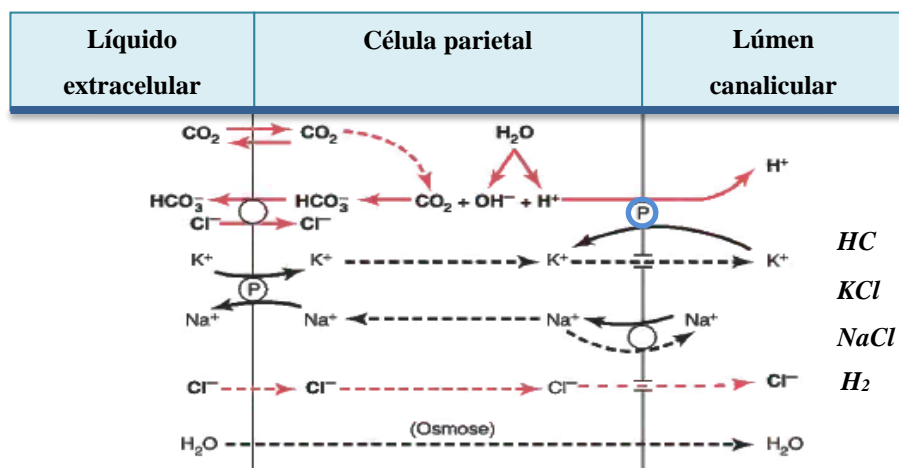


Figura 3 - Produção de ácido clorídrico (HCl). Com a letra P estão assinaladas as bombas de transporte ativo, a azul a ATPase H^+ , K^+ gástrica; as setas tracejadas indicam osmose e difusão passiva. Adaptado a partir de Guyton e Hall (2011)

3.3 Mecanismo farmacológico do omeprazol

O omeprazol é um inibidor irreversível da ATPase H⁺, K⁺ (a bomba de prótons). Tal como todos os inibidores da bomba de prótons, o omeprazol é administrado na forma de pró-fármaco inativo. Sendo uma base fraca lipofílica (pK_a de 4 a 5) (Katzung *et al.*, 2012) desagrega-se no intestino a pH básico, é absorvido, e do sangue, entra nas células parietais (Ritter *et al.*, 2011). No citoplasma da célula parietal, onde o pH é neutro, está inativo. No entanto, quando passa para o canalículo secretor (onde o pH pode chegar a 1,0) é protonado, ou seja, é neste local que sofre uma rápida conversão molecular na forma ativa tornando-se uma sulfonamida (Wallmark, 1986) (Katzung *et al.*, 2012).

Concentra-se nesta zona canalicular, uma vez que se liga covalentemente ao grupo sulfidrilo das cisteínas localizadas no lúmen da subunidade α da ATPase H⁺, K⁺. Como consequência desse acoplamento irreversível, os canais iónicos envolvidos na expulsão de H⁺ da célula e na absorção de K⁺ são bloqueados (Puscas *et al.*, 1999).

3.4 Metabolização do omeprazol

No fígado, o omeprazol é amplamente metabolizado pelo sistema citocromo P450 (CYP) (Shin e Sachs, 2008). A metabolização do omeprazol resulta em três metabolitos primários principais: omeprazol sulfona, hidroxiomeprazol (5-hidroxi-omeprazol e 3-hidroxi-omeprazol) e omeprazol sulfito (Howden, 1991, Andersson *et al.*, 1993, Karam *et al.*, 1996, Nevado *et al.*, 2014) (Figura 5).

O hidroxiomeprazol e o seu correspondente ácido carboxílico [*in vivo*, parte do hidroxiomeprazol é convertido em carboxiomeprazol (Andersson *et al.*, 1993)] assim como omeprazol sulfona e omeprazol sulfito foram os principais metabolitos detetados na urina de humanos que receberam omeprazol (Petsalo *et al.*, 2008, Nevado *et al.*, 2014).

Estudos mostram que existem diferenças quantitativas no metabolismo estereosseletivo dos isómeros óticos do omeprazol (S-omeprazol e R-omeprazol) (Figura 4), sendo mediado principalmente pela CYP2C19, responsável pela formação da maior parte de

hidroxiomeprazol, e CYP3A4, que forma a sulfona (Äbelö *et al.*, 2000, Karam *et al.*, 1996), até à data não se conhece a enzima do CYP responsável pela formação do omeprazol sulfito.

Considerando a estrutura do omeprazol, o substituinte piridina é o alvo preferido do metabolismo. Segundo estudos realizados por Äbelö *et al.* (2000), a enzima CYP2C19 é responsável por cerca de 70% do metabolismo do S-omeprazol e cerca de 90% do isómero R. O omeprazol sofre 5-hidroxilação no grupo benzimidazol pela CYP2C19 ou 3-hidroxilação pela CYP3A4, assim ambas catalisam a hidroxilação embora a CYP2C19 seja a principal enzima com esta capacidade. A CYP3A4 é a única responsável pela sulfoxidação, ou seja, a formação do omeprazol sulfona é exclusivamente da responsabilidade desta enzima (Karam *et al.*, 1996). Sabendo que a CYP2C19 é a principal enzima responsável pela hidroxilação em concentrações terapêuticamente relevantes (Andersson *et al.*, 1993), é de ter em conta que as enzimas CYP2C8 e CYP2C18 também contribuem para a hidroxilação, ainda que residual (Karam *et al.*, 1996). Äbelö *et al.* (2000) evidenciaram ainda que enzimas como a CYP2C9 e CYP2D6 são de menor importância para a formação dos três metabolitos dos isómeros óticos do omeprazol, no entanto, estão também envolvidas na depuração metabólica global do fármaco.

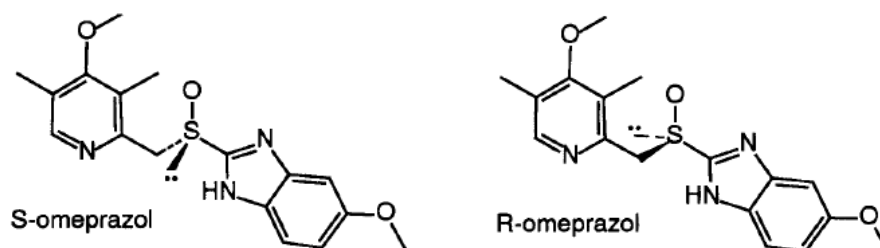


Figura 4 - Estrutura química dos isómeros óticos do omeprazol

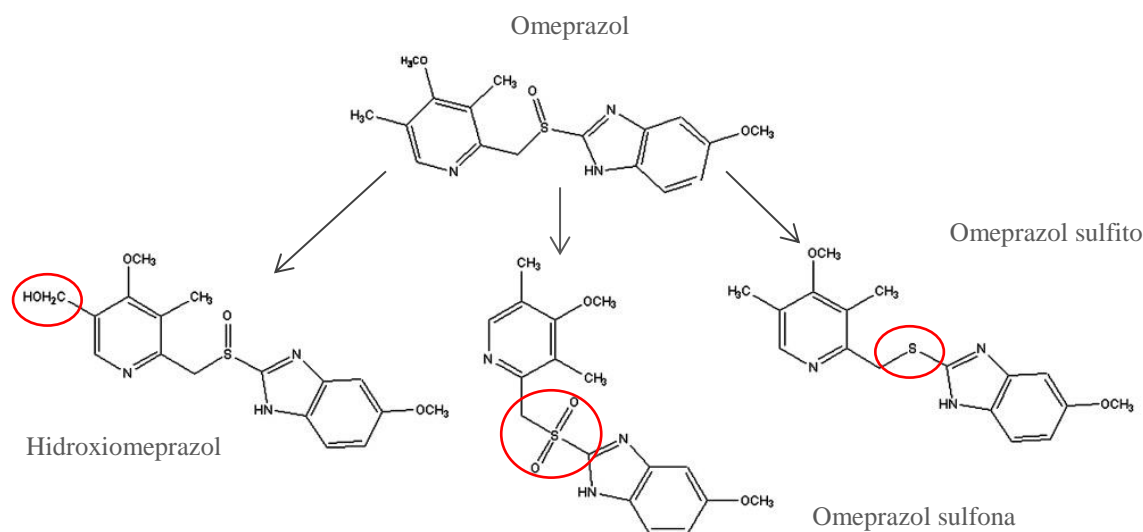


Figura 5 – Fórmula estrutural dos principais metabolitos do omeprazol

4. Biomarcadores

4.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

Entre as características mais relevantes dos contaminantes aquáticos estão a lipofília e a persistência ambiental, o que facilita a captação e acumulação nos organismos. A metabolização destes xenobióticos é essencial para a sua eliminação. Nos processos de desintoxicação, participam algumas enzimas do citocromo P450 (CYP) (Beijer, 2007). Os níveis mais elevados das enzimas CYP são encontrados ao nível do fígado, no entanto podem ser encontradas na maioria dos tecidos de grande parte dos organismos (Whyte *et al.*, 2000).

Entre as várias enzimas do complexo citocromo P450, está o citocromo P450 1A1 (CYP1A1), uma enzima que catalisa reações de fase I, com o objetivo de aumentar a solubilidade em água para eliminação de xenobióticos (Whyte *et al.*, 2000), tais como fármacos e outros poluentes ambientais (hidrocarbonetos poliaromáticos, compostos semelhantes a dioxinas, bifenilos policlorados) bem como a ativação metabólica desses compostos (Novotna *et al.*, 2014).

O recetor de hidrocarboneto de arilo (AHR) é um fator de transcrição dependente de ligante. Entre os genes alvo do AHR, estão os genes que codificam enzimas do metabolismo de fármacos, incluindo os citocromos P450 (CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1) (Ghafarian-Bahraman *et al.*, 2017). A atividade da etoxiresorufina O-desetilase (EROD) é um indicador altamente sensível da presença de contaminantes em peixes, fornecendo evidência de indução mediada pelo recetor de monoxigenases dependentes do citocromo P450, especificamente, da CYP1A1 (Kirby *et al.*, 2004, Ferreira *et al.*, 2004). Na presença destes compostos (hidrocarbonetos aromáticos halogenados / policíclicos), podemos verificar o aumento da expressão dos genes CYP1A1 em peixes (Pacheco e Santos, 1998, Whyte *et al.*, 2000, Ferreira *et al.*, 2010, Novotna *et al.*, 2014). Por outro lado, a atividade da EROD pode ser dificultada por produtos químicos que se podem ligar competitivamente ou alterar alostericamente a estrutura do AHR ou CYP1A (Arukwe *et al.*, 1997, Wall e Crivello, 1998); ou ainda atuar como inibidores da atividade enzimática, tal como relatado por Monosson e Stegeman (1991) e DiGiulio *et al.* (1993) ao utilizarem peixes de regiões altamente poluídas que não exibiram atividade elevada da EROD.

Omeprazol é metabolizado no fígado principalmente pelo CYP2C19 e pela CYP3A4 (Äbelö *et al.*, 2000, Karam *et al.*, 1996). Além disso, Curi-Pedrosa *et al.* (1994) e Shih *et al.* (1999) demonstraram que o omeprazol tem capacidade de induzir genes de CYP1A em células, sendo ainda ativador do recetor de hidrocarboneto de arilo (Diaz *et al.*, 1990).

4.2. Catalase (CAT)

Muitos xenobióticos promovem stresse oxidativo em organismos aquáticos (Oliveira *et al.*, 2015, Nunes *et al.*, 2015a, Rodrigues *et al.*, 2016), devido à capacidade de induzir uma hiperprodução de ERO, que consequentemente podem exercer danos oxidativos nos componentes celulares (Valavanidis *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2016). As ERO são intermediários de vida curta, altamente instáveis e quimicamente reativos, que tendem a reagir com componentes subcelulares, perturbando, assim, as funcionalidades da célula (Nunes *et al.*, 2014).

O equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigénio (que ocorre naturalmente) é fundamental para a homeostase do animal. Quando existe uma hiperprodução de ERO existe um desequilíbrio que poderá levar à interferência no transporte de eletrões na membrana mitocondrial (com conseqüente acumulação de intermediários reativos), inativação de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos, peroxidação lipídica da membrana, comprometimento irreversível do DNA e até a morte celular (Valavanidis *et al.*, 2006, Modesto e Martinez, 2010). Para lidar com o dano oxidativo, os organismos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante (enzimática e não-enzimática). A atividade de intermediários enzimáticos específicos pode servir como biomarcadores de stresse oxidativo (Davies, 1995), indicando o estado redox geral do organismo que pode ser inferido a partir de perfis de indução ou inibição das suas atividades. A partir deste conjunto de enzimas, é possível destacar a catalase (CAT) e as glutathione-S-transferases (GSTs) que são conhecidas pela atividade preventiva do dano oxidativo provocado pelas espécies reativas de oxigénio (Van der Oost *et al.*, 2003, Ramos *et al.*, 2014, Nunes *et al.*, 2015c). Apesar da eficácia deste sistema de defesa, a exposição a poluentes químicos tóxicos pode causar um desequilíbrio permanente neste estado de equilíbrio, induzindo uma diminuição na sua eficiência (Nunes *et al.*, 2014).

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante, que pertence a uma família de enzimas que está presente principalmente nos peroxissomas (Modesto e Martinez, 2010), é uma enzima antioxidante com função dupla: atividade catalítica - decomposição de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), resultante da degradação do anião superóxido pela superóxido dismutase, em H₂O e O₂; e atividade peroxidativa - oxidação de doadores de hidrogénio, por exemplo, metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de peróxido (Aebi, 1984, Ramos *et al.*, 2014) .

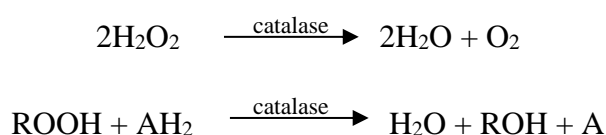


Figura 6 - Esquema da atividade catalítica da catálase. *Adaptado de Aebi (1984)*

A atividade da catalase pode ser aumentada ou diminuída em ambientes contaminados ou após a exposição a poluentes, dependendo do agente químico em questão (Modesto e Martinez, 2010). Um aumento da atividade da CAT pode ser resultado da geração de maiores quantidades de peróxido de hidrogênio, que por sua vez é consequência de um aumento de espécies reativas de oxigênio (Ramos *et al.*, 2014). Por outro lado, os radicais de oxigênio têm a capacidade de oxidar sistemas antioxidantes não enzimáticos (como os tocoferóis e o ascorbato), catecolaminas e tióis e inativar diversas enzimas antioxidantes, como o caso da própria catalase (Valavanidis *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2016).

Têm sido realizados vários estudos recorrendo à análise da variação da atividade da catalase para perceber o impacto que contaminantes químicos, nomeadamente fármacos, podem exercer sobre organismos aquáticos (Li *et al.*, 2011, Ramos *et al.*, 2014, Rodrigues *et al.*, 2016).

4.3. Glutathione-S-transferases

As glutathione S-transferases (GSTs) pertencem a uma família de isoenzimas metabólicas de fase II (Van der Oost *et al.*, 2003) cujas funções essenciais passam pelo transporte intracelular (heme, bilirrubina e ácidos biliares) e pela biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas (George e Buchanan, 1990). Além disso, desempenham um papel fisiológico no início da desintoxicação de agentes alquilantes potenciais, incluindo compostos farmacologicamente ativos: são responsáveis pela conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I) com o grupo tiol (SH) da glutathione (GSH) neutralizando os locais eletrofílicos e tornando os produtos mais hidrossolúveis (Habig *et al.*, 1974). Assim, um papel crítico para as GSTs é, obviamente, a defesa contra danos oxidativos e produtos peroxidativos de DNA e lipídicos (Malins, 2018).

Em peixes, a quantidade de GSTs, a sua atividade ligante, a capacidade de ligar aniões orgânicos, sais biliares e bilirrubina parece diferir da dos mamíferos (George e Buchanan, 1990). No entanto, vários estudos demonstram que a atividade das glutathione S-transferases dos organismos aquáticos é afetada (tanto induzida quanto inibida) quando

existe uma exposição a alguns xenobióticos (Oikari e Jimenez, 1992, Boon *et al.*, 1992, Pedrajas *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2010).

4.4. Biomarcadores histopatológicos

A histopatologia é uma ferramenta adequada entre os métodos ecotoxicológicos pois apresenta-se como uma resposta evidente a médio prazo a stressores ambientais em doses subletais. Fornecendo um método rápido para detetar os efeitos de contaminantes aquáticos, especialmente crónicos, permitindo localizar, descrever e quantificar lesões que ocorrem em órgãos-chave selecionados de peixes expostos (Bernet *et al.*, 1999, Nero *et al.*, 2006, Barišić *et al.*, 2015). O fígado e as brânquias são órgãos adequados para exame histológico, visto que através das suas possíveis alterações histológicas se reflete a saúde geral da população de peixes no ecossistema (Bernet *et al.*, 1999, Ayadi *et al.*, 2015).

Nos peixes ósseos as brânquias estão inseridas na cavidade opercular, e encontram-se divididas em arcos. A partir de cada arco divergem filamentos branquiais, nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias. Estas lamelas são extensamente vascularizadas, revestidas por epitélio simples pavimentoso sustentado por células pilares (Evans *et al.*, 2005, Genten *et al.*, 2009) (Figura 6). As brânquias são órgãos envolvidos na respiração, equilíbrio osmótico e iónico, regulação ácido-base, excreção de resíduos nitrogenados e modulação de neurotransmissão em peixes (Evans *et al.*, 2005). Além disso, exibem uma grande superfície que está em contato direto e permanente com possíveis contaminantes (Nunes *et al.*, 2015c).

As alterações histológicas em brânquias são, normalmente inespecíficas, dependendo da dose e duração da exposição, especialmente nos casos de níveis subletais de poluentes aquáticos (Nero *et al.*, 2006). Para demonstrar o impacto que os fármacos enquanto contaminantes aquáticos podem exercer foram realizados alguns estudos recorrendo à análise histológica das brânquias de diversos peixes (Nunes *et al.*, 2015c, Rodrigues *et al.*, 2017).

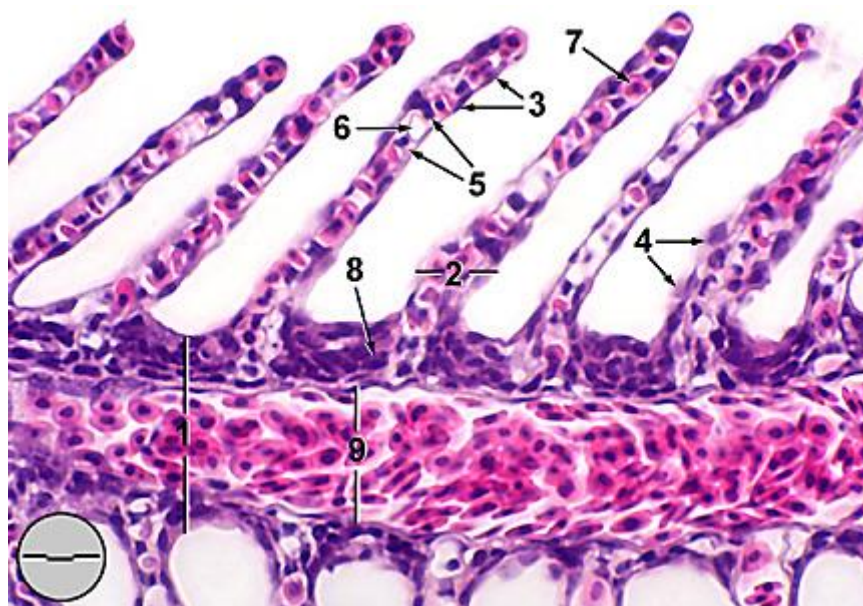


Figura 7 - Filamento branquial do organismo *Pimephales promelas*, secção sagital através do seio venoso (formalina, HE, barra = 16,7 μ m); 1. lamela primária; 2. lamela secundária; 3. célula epitelial; 4. célula mucosa; 5. célula pilar; 6. lacuna (lúmen capilar); 7. eritrócito no lúmen capilar; 8. célula basal indiferenciada; 9. seio venoso central. Adaptado a partir de Yonkos *et al.* (2000)

O fígado desempenha um papel importante nas funções vitais do metabolismo básico, realiza funções essenciais como regulação do metabolismo, síntese de proteínas plasmáticas, armazenamento de energia e excreção de xenobióticos (Bernet *et al.*, 1999, Capkin e Altinok, 2013). Representa o órgão principal para a acumulação, a biotransformação e a excreção de contaminantes no peixe (Ayadi *et al.*, 2015). Relativamente à histologia do fígado, nos peixes podem ser destacados dois tipos básicos gerais de fígado: os que contêm tecido pancreático versus os que não contêm. Os que contêm tecido pancreático exócrino são frequentemente chamados de “hepatopâncreas” (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007b) (Figura 8).

Vários estudos relataram alterações do tecido hepático em peixes após exposição a uma ampla gama de poluentes aquáticos (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007a, Pal *et al.*, 2012, Nunes *et al.*, 2015a, Rodrigues *et al.*, 2017).

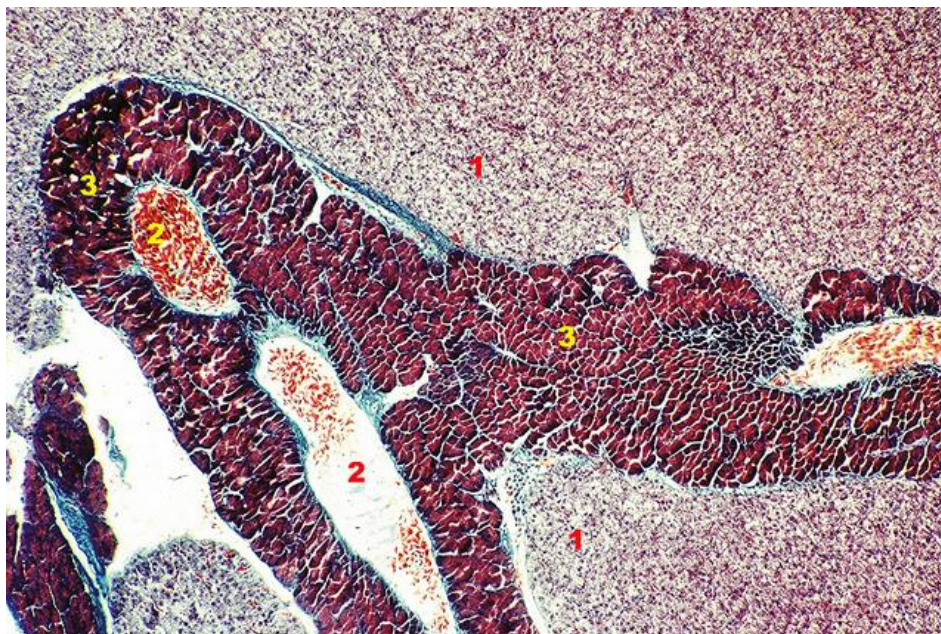


Figura 8 – Fígado e hepatopâncreas do organismo *Cyprinus carpio*: parênquima hepático (1), bem como um tracto veno-pancreático consistindo de um aferente da veia porta (2 - eritrócitos laranja) rodeado por células pancreáticas exócrinas (3 - castanho avermelhado). Estes conjuntos, que podem ser acompanhados por arteríolas ou ductos biliares, são disseminados por todo o fígado. Adaptado a partir de Genten *et al.* (2009)

5. A importância dos peixes enquanto organismos teste em bioensaios

Os organismos aquáticos podem constituir-se como sistemas modelo para a investigação dos efeitos dos xenobióticos, devido às suas funções ecológicas e na rede trófica, propensão à bioacumulação e responsividade a baixas concentrações de substâncias tóxicas em comparação com os organismos terrestres, podendo fornecer dados experimentais para avaliar os efeitos subtis do stresse oxidativo, mutagenicidade e outros efeitos adversos dos poluentes (Van der Oost *et al.*, 2003, Valavanidis *et al.*, 2006, Nunes *et al.*, 2015a). No caso particular dos peixes, vertebrados mais abundantes no compartimento aquático, são possíveis várias vias de exposição, tais como as brânquias, o tegumento (pele) ou o trato gastrointestinal (através da ingestão de água e alimentação). No entanto, as propriedades químicas intrínsecas de cada xenobiótico, a possibilidade do produto químico ser degradado no meio aquático ou biotransformado por organismos de

baixo nível trófico, também influenciam a capacidade deste exercer algum efeito no organismo teste (Malins, 2018).

Sparus aurata (n.v. dourada) é um peixe marinho que habita zonas sublitorais (fundos arenosos e de ervas marinhas, bem como a zona de rebentação) normalmente a profundidades de cerca de 30 m, mas pode ocorrer até aos 150 m de profundidade (em indivíduos adultos). Ocorre naturalmente no Mar Mediterrâneo, no Mar Negro e no Atlântico Oriental, desde as Ilhas Britânicas, Estreito de Gibraltar até Cabo Verde e em torno das Ilhas Canárias. É um peixe principalmente carnívoro alimentando-se principalmente de invertebrados e peixes. A dourada é um hermafrodita sequencial (com uma dicogamia protândrica): é um macho funcional nos primeiros dois anos, e com mais de 30 cm de comprimento torna-se fêmea. Pode atingir os 70 cm e 2,5 Kg, sendo uma das suas principais características possuir um hepatopâncreas (Van der Oost *et al.*, 2003, Genten *et al.*, 2009, Calò *et al.*, 2017, Sola *et al.*, 2018, Malins, 2018). É um peixe de crescente interesse económico que tem sido tradicionalmente cultivado em lagoas costeiras salobras/salgadas do Mediterrâneo e Atlântico (Sola *et al.*, 2018).

6. Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar os efeitos da exposição crónica do omeprazol sulfito no mecanismo biotransformação e de defesas enzimáticas antioxidantes, assim como possíveis alterações histológicas em órgãos chave, nomeadamente, brânquias e fígado de *S. aurata*, em indivíduos expostos a concentrações ecologicamente realistas do composto teste. O cenário stresse oxidativo foi avaliado em brânquias e fígado através da variação da atividade da CAT e das GSTs; a atividade da enzima metabolizadora EROD foi determinada apenas no fígado. Para determinar os efeitos histopatológicos provocados pelo omeprazol sulfito, foram avaliadas as alterações tecidulares no fígado e brânquias.

7. Material e Métodos

7.1. Proveniência e acondicionamento dos peixes

Os organismos teste (72 animais) foram gentilmente cedidos pelo IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera) de Olhão, sul de Portugal, tendo sido transportados para o laboratório em tanques com água salgada devidamente oxigenada. Foram mantidos durante 30 dias em condições laboratoriais controladas (período de quarentena/aclimação), em tanques de 500 L (aproximadamente 7 L de água para cada animal) com recirculação de água. A qualidade da água foi monitorizada ao longo do período de aclimação. As condições abióticas foram: salinidade 36 ± 1 , pH 13 ± 1 , oxigénio dissolvido $8,0 \pm 0,4$ mg/L, temperatura $19 \pm 1^\circ\text{C}$, verificadas com sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS) e fotómetro (YSI, 9300 Photometer). Os organismos foram alimentados a cada dois dias com alimento artificial (Sorgal, Portugal), até à saciedade. Não foram registadas mortes ou sintomas de doença durante o período de quarentena e aclimação.

No final do período de quarentena foram selecionados aleatoriamente 60 indivíduos com tamanhos semelhantes (tamanho e peso médio 16,8 cm e 69,5 g, respetivamente). Os organismos foram divididos em quatro grupos distintos, e depois subdivididos em três réplicas com cinco indivíduos cada. Cada grupo foi depois acondicionado em aquários de 50 L num total de 12 aquários.

7.2. Exposição ao omeprazol sulfito

A exposição crónica foi realizada de acordo com as condições constantes na norma 215 da OECD (2000). Cada aquário foi sujeito a uma concentração sub-letal de omeprazol sulfito diferente, ou seja, $0,03 \mu\text{g/l}$ [concentração baixa (LC)], $0,3 \mu\text{g/l}$ [concentração média (MC)] e $3,0 \mu\text{g/l}$ [concentração alta (HC)]. No grupo controlo (CC), os organismos não foram expostos ao composto teste. A escolha das concentrações de metabolito teve por base o trabalho de Gracia-Lor *et al.* (2014) que reportou concentrações de $0,028 \mu\text{g/l}$ em

amostras de águas superficiais e de 0,06 a 0,29 µg/l em efluentes. A exposição foi conduzida durante 28 dias.

Durante o período de exposição, os animais foram alimentados a cada 48 h com alimento artificial (Sorgal, Portugal), até à saciedade, e o meio de exposição renovado a 80% a cada 2 dias, sendo que as concentrações de omeprazol sulfito foram ajustadas e os parâmetros físico-químicos (temperatura e salinidade da água, pH, concentração de O₂, nitritos, nitratos e amónia) controlados com sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS) e fotómetro (YSI, 9300 Photometer). Como o omeprazol é fotodegradável (DellaGreca *et al.*, 2006), os aquários foram integralmente cobertos com rede sombra e a sala esteve em obscuridade completa de forma a evitar qualquer entrada de luz, de modo a garantir que a concentração de composto se mantinha estável ao longo de todo o ensaio.

O uso dos organismos foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética (ORBEA) da instituição de acolhimento (CIIMAR). Além disso, este trabalho teve em conta os regulamentos portugueses para testes de bem-estar animal (Decreto-Lei 113/2013).

7.3. Amostragem e preparação dos tecidos

Depois do período de exposição, os peixes foram eutanasiados. O método utilizado foi descrito por Wilson *et al.* (2009) e adaptado a *S. aurata*. A eutanásia dos organismos deu-se por arrefecimento rápido, com imersão imediata num recipiente contendo aproximadamente quantidades iguais de gelo e água (≤ 4 °C) até que os animais perderam a capacidade de nadar e o reflexo opercular. Este procedimento provou ser rápido e eficaz, não mostrando evidências de produzir anormalidades histológicas. Para o sacrifício recorreu-se à decapitação dos animais, sobre tampão fosfato 200 mM, pH=7, 0,1 % Triton X-100, imediatamente após o opérculo.

7.4. Ensaio enzimáticos

No que diz respeito à preparação do material biológico, para a determinação da atividade das enzimas catalase e GSTs, porções do fígado e das brânquias foram isolados e colocados num microtubo Eppendorf com 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, com Triton X-100 0,1%, foram homogeneizados com um sonicador (Branson Sonifier 250) a 4 °C. O homogeneizado foi levado a centrifugar a 15000 g (centrífuga Eppendorf 5810R) durante 10 minutos a 4 °C, o *pellet* rejeitado e o sobrenadante foi acondicionado em microtubos de Eppendorf a -80°C para posterior utilização na determinação das atividades enzimáticas.

Para a determinação da atividade enzimática da EROD, uma porção do fígado foi isolada e colocada numa proporção de 1:4 num microtubo Eppendorf com tampão Tris HCl 50 mM, KCl 0.15 M, depois foi homogeneizado com um sonicador a 4 °C. O homogeneizado foi levado a centrifugar a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C, o *pellet* rejeitado e o sobrenadante foi acondicionado em microtubos de Eppendorf a -80 °C para posterior determinação das atividades enzimáticas.

Para todas as determinações enzimáticas, cada amostra foi replicada 4 vezes.

7.4.1. Determinação da atividade da enzima etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade da EROD hepática foi determinada tendo em conta os métodos fluorimétricos descritos por Cheah *et al.* (1995), Ferreira *et al.* (2010) e Pacheco e Santos (1998). Numa primeira fase foram preparados microssomas, através da homogeneização dos tecidos com tampão Tris HCl 50 mM, KCl 0,15 M e posterior centrifugação. Para a obtenção dos microssomas foi usado o método da agregação com cálcio, no qual a amostra foi diluída com uma solução de sucrose 12,5 mM com cloreto de cálcio 8 mM a pH 7,4, e posteriormente centrifugada.

A amostra foi incubada na presença de etoxiresorufina, e a reação iniciada com a adição do co-fator NADPH.

O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido durante 10 min (comprimento de onda de excitação 540 nm, comprimento de onda de emissão 590 nm) a cada 72 segundos; a atividade foi determinada por interpolação numérica com recurso a uma curva padrão de resorufina e expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

7.4.2. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

Para a determinação da atividade da catalase nos tecidos selecionados (brânquias e fígado) foi utilizada uma adaptação do método descrito por Aebi (1984). A atividade da catalase foi determinada com um método espectrofotométrico que monitorizou a decomposição de H_2O_2 a $\lambda = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon_{240} = 0,00394 \pm 0,0002 \text{ litros mmol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$). A diferença das absorvâncias medidas por unidade de tempo indica a atividade da enzima. O ensaio foi avaliado pela diminuição da absorvância a $\lambda = 240 \text{ nm}$ de 20 em 20 segundos durante 5 minutos. A atividade da catalase foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

7.4.3. Determinação da atividade das isoenzimas GSTs

A atividade das isoenzimas GSTs foi determinada com base no método espectrofotométrico descrito por Habig *et al.* (1974). À semelhança do ensaio da atividade da catalase, esta determinação foi feita em brânquias e fígado do organismo teste (*S. aurata*) com uma diluição das amostras de 1/1000 em fígado e de 1/400 em brânquias, com recurso ao mesmo tampão (tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, com Triton X-100 0,1%). Este ensaio tem por base a capacidade das transferases da glutathione catalisarem a conjugação da glutathione na sua forma reduzida (GSH) com compostos com centros eletrofílicos. Assim, catalisam a reação de conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o grupo tiol da glutathione reduzida, formando um tioéter ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que pode ser monitorizado pelo aumento da absorvância a $\lambda = 340 \text{ nm}$.

O ensaio foi avaliado pelo aumento da absorvância a $\lambda = 340 \text{ nm}$ a cada 20 segundos até 5 minutos. A atividade das GSTs foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

7.4.4. Quantificação da proteína total

A quantificação final da proteína total foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Envolve a ligação do corante *coomassie brilliant blue G-250* (presente no reagente de Bradford Biorad®) à proteína total, formando um complexo corado estável que leva à alteração do máximo de absorção do corante de $\lambda = 465$ para 595 nm. A intensidade da coloração formada foi medida a um comprimento de $\lambda = 595$ nm. Os padrões foram preparados com concentração crescente de γ -globulina bovina.

7.5. Técnica histológica

7.5.1. Procedimento experimental

O procedimento experimental da técnica histológica foi baseado nos métodos descritos por Tolosa *et al.* (2003). As amostras de fígado e brânquias (segundo arco branquial) foram quimicamente fixadas em solução de Bouin durante 24 h. As brânquias foram depois sujeitas ao processo de descalcificação, para tal foi utilizada uma solução de descalcificação durante 24 horas.

As amostras foram então desidratadas usando soluções de etanol de concentração crescente (70%, 80%, 90% e 100%). Seguiu-se a diafanização/clareamento das amostras com parafina. Depois foi usada uma solução de xilol durante 2 horas e finalmente, as amostras foram incorporadas em parafina (56-58 °C). Após a incorporação de parafina, os moldes foram seccionados (3 μ m) no plano parasagital usando um micrótomo manual (Reichert-Jung 2030). Antes da coloração foi efetuada a desparafinação com xileno. Depois disso foi efetuada a reidratação em etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70%) e água destilada (5 minutos). As secções foram posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE) e azul de alcian - ácido periódico-Schiff (AB-PAS). A montagem foi realizada com DPX (temperatura ambiente) e a secagem ocorreu durante a noite. As preparações foram analisadas com um microscópio de luz composto (Olympus CX41) acoplado a uma câmara digital USB (Olympus, SC30). Foram tiradas fotomicrografias, de brânquias e fígados, com uma ampliação de 200 X e 400 X.

7.5.2. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos órgãos/tecidos

Foi analisada a histologia normal dos tecidos (brânquias e fígado), tendo como base a obra de Genten *et al.* (2009), para depois ser feita a identificação das alterações histológicas.

Os índices de condição histopatológica (I) para fígado (I_L) e brânquias (I_G) foram adaptados de Bernet *et al.* (1999). Para cada órgão investigado (org), as respectivas alterações (alt) patológicas são classificadas em cinco padrões de reação (rp): distúrbios circulatórios; alterações regressivas/degenerativas; alterações progressivas; alterações inflamatórias e alterações neoplásicas ou tumorais (Bernet *et al.*, 1999).

A importância patológica da alteração observada foi definida com um “*Importance factor*” (w), classificado com 1, 2 ou 3, correspondendo a uma importância patológica mínima (lesões patológicas reversíveis), moderada (lesões que na maioria dos casos retornam após a neutralização da agente stressor) e grave (lesões muitas vezes irreversíveis que causam perda parcial ou total de função do órgão afetado) (Tabela 2).

Cada alteração foi também avaliada usando um “*score value*” (a) variando de 0 a 6 dependendo do grau e extensão da alteração: (0) inalterada; (2) ocorrência leve; (4) ocorrência moderada; e (6) ocorrência grave e difusa (os valores intermediários não foram aplicados).

Usando o “*Importance factor*” e o “*score value*”, foram calculados dois índices: o índice de reação do órgão ($I_{org\ rp}$) e o índice de órgãos (I_{org}), segundo as equações: $I_{org\ rp} = \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$ e $I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$.

Os índices de condição histopatológica representam o significado das lesões e o grau de dano, que permite que a avaliação estatística se torne praticável.

Tabela 2 - Descrição dos padrões de reação e exemplos de alterações específicas atribuídas a cada categoria de brânquias e tecidos hepáticos no presente estudo. Os números correspondem aos fatores de importância dada às alterações específicas das brânquias e do fígado. *Adaptado a partir de Bernet et al. (1999)*

Padrões de reação	Alterações específicas dos tecidos			
	Brânquias	w	Fígado	w
Circulatórias	Hemorragia	1	Hemorragia	1
	Hiperemia	1	Hiperemia	1
	Aneurisma	1	Aneurisma	1
	Edema	1	Edema	1
Regressivas	Levantamento epitelial	1	Depósitos de glicogénio	1
	Fusão lamelar	1	Vacuolização do citoplasma	1
	Necrose	3	Núcleos picnóticos	2
			Necrose	3
Progressivas	Hiperplasia	2	Hiperplasia	2
	Hipertrofia	1	Hipertrofia	1
Inflamatórias	Infiltração de leucócitos	2	Infiltração de leucócitos e melanomacrófagos	2
Neoplásicas	Benigno/ Maligno	2/3	Benigno/ Maligno	2/3

7.6. Análise estatística

Após verificação dos pressupostos de distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados obtidos, estes foram sujeitos a uma análise unifatorial de variância (One-Way ANOVA), seguida, se necessário ($p < 0,05$), de um teste de Dunnett, para verificar se as diferenças obtidas nos grupos expostos eram significativamente diferentes do grupo controlo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão para cada tratamento. A análise estatística foi realizada com o software SigmaPlot 11.0. Foi usado um nível de significância (α) de 0,05.

8. Resultados

8.1. Biomarcadores enzimáticos

8.1.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

Os resultados correspondentes à atividade da EROD são apresentados na Figura 9. As diferenças nos valores médios entre os diferentes grupos de tratamento não são suficientemente grandes para excluir a possibilidade de que a diferença se deve à variabilidade aleatória da amostragem, ou seja, não houve diferenças estatisticamente significativas entre organismos controlo e os expostos às diferentes concentrações de omeprazol sulfito (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 0,606$; $p = 0,614$).

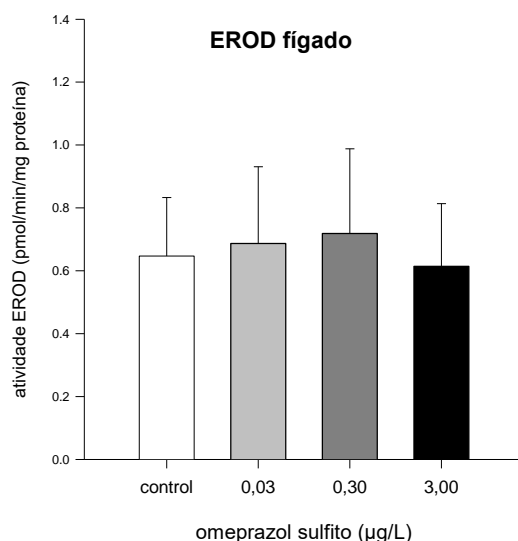


Figura 9 – Atividade enzimática da EROD em fígado de *S. aurata*. Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas entre grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $p > 0,05$).

8.1.2 Catalase

Os valores correspondentes à atividade da catalase em brânquias (Figura 10A) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 2,411$; $p = 0,076$). Pelo

contrário, no fígado (Figura 10B) (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 8,145$; $p < 0,05$), foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais. Recorrendo ao teste de Dunnett, verificou-se que existiram diminuições significativas, das atividades da catalase; entre as concentrações mais elevadas e o grupo controlo (0,30 $\mu\text{g/L}$ e 3,00 $\mu\text{g/L}$) (Teste de Dunnett: $p < 0,05$).

8.1.3. Glutathione-S-transferases

No que diz respeito à atividade das isoenzimas GSTs nas brânquias os organismos expostos ao omeprazol sulfito apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 8,077$; $p < 0,05$), nomeadamente nas concentrações 0,03 $\mu\text{g/L}$ e 0,30 $\mu\text{g/L}$ em comparação com o grupo controlo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$), notando-se uma clara diminuição da atividade destas isoenzimas (Figura 10C). Também foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao nível da atividade das GSTs no tecido hepático (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 5,632$; $p < 0,05$) (Figura 10D). Recorrendo ao teste de Dunnett, verificou-se uma diminuição da atividade das GSTs em animais expostos à concentração mais elevada 3,00 $\mu\text{g/L}$, em comparação com os animais do grupo controlo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada em biomarcadores

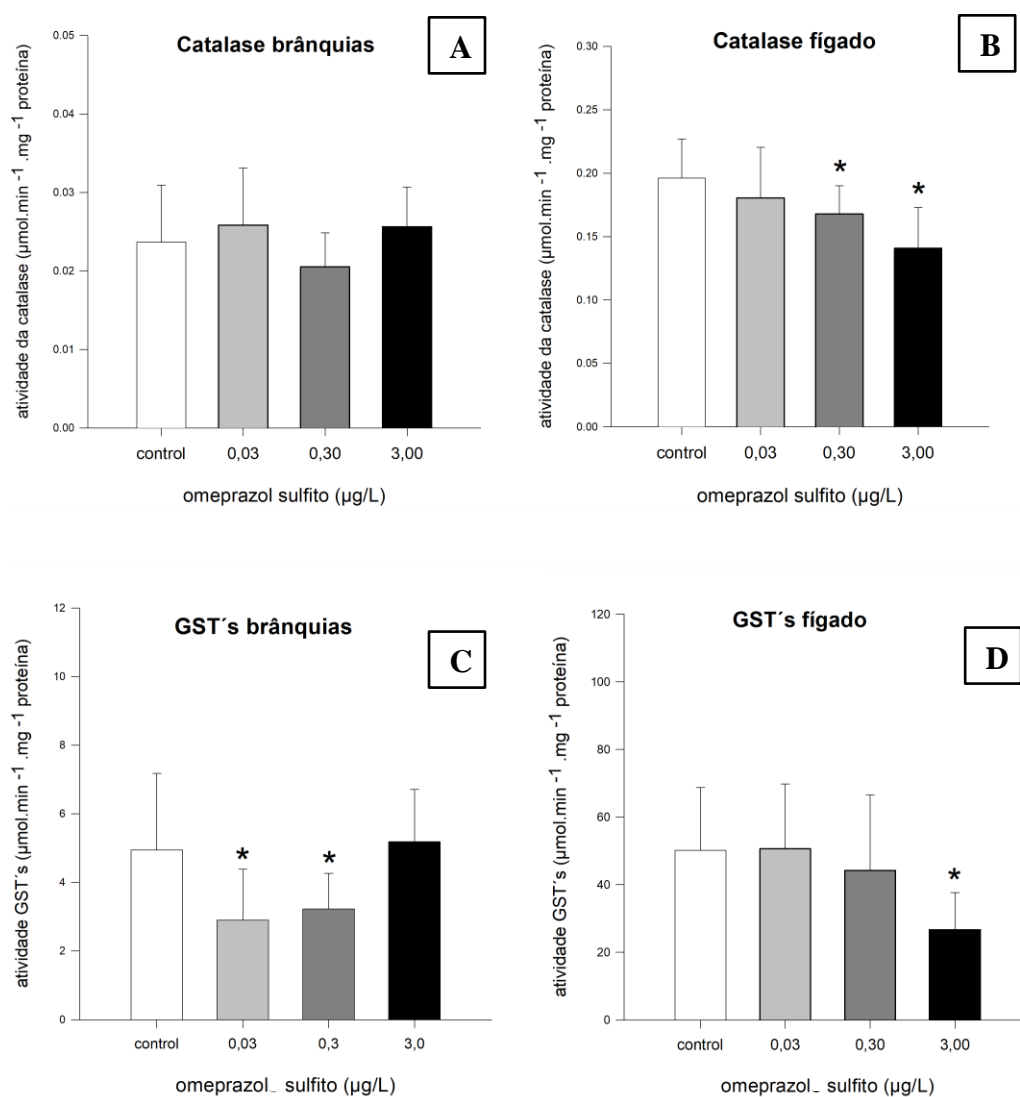


Figura 10 – Atividades enzimáticas da catalase em brânquias e fígado (A e B, respetivamente) e das isoenzimas GSTs em brânquias e fígado (C e D, respetivamente). Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

8.2. Histopatologia das brânquias

8.2.1. Avaliação qualitativa

Indivíduos do grupo de controlo apresentaram filamentos branquiais com arquitetura normal (Figura 11A). No entanto, alguns indivíduos expostos apresentaram lesões regressivas, após o período de exposição, como levantamento epitelial (Figura 11B), fusão lamelar, neste caso resultante da alta severidade das alterações progressivas, levando à fusão total de lamelas secundárias (Figura 11F), e algumas mudanças na arquitetura do tecido como encurtamento e ondulação de lamelas secundárias (“curling”). Foram evidenciadas alterações circulatórias como hemorragias e hiperemia (Figura 11C) e pela presença de aneurismas e edemas (Figura 11D). Alguns indivíduos apresentaram lesões progressivas como hiperplasia de células mucosas (Figura 11E) e hiperplasia de células epiteliais (Figura 11F). Em alguns organismos foram observadas infiltrações de leucócitos (Figura 11F), que se englobam nas alterações inflamatórias. Não foram encontradas alterações neoplásicas.

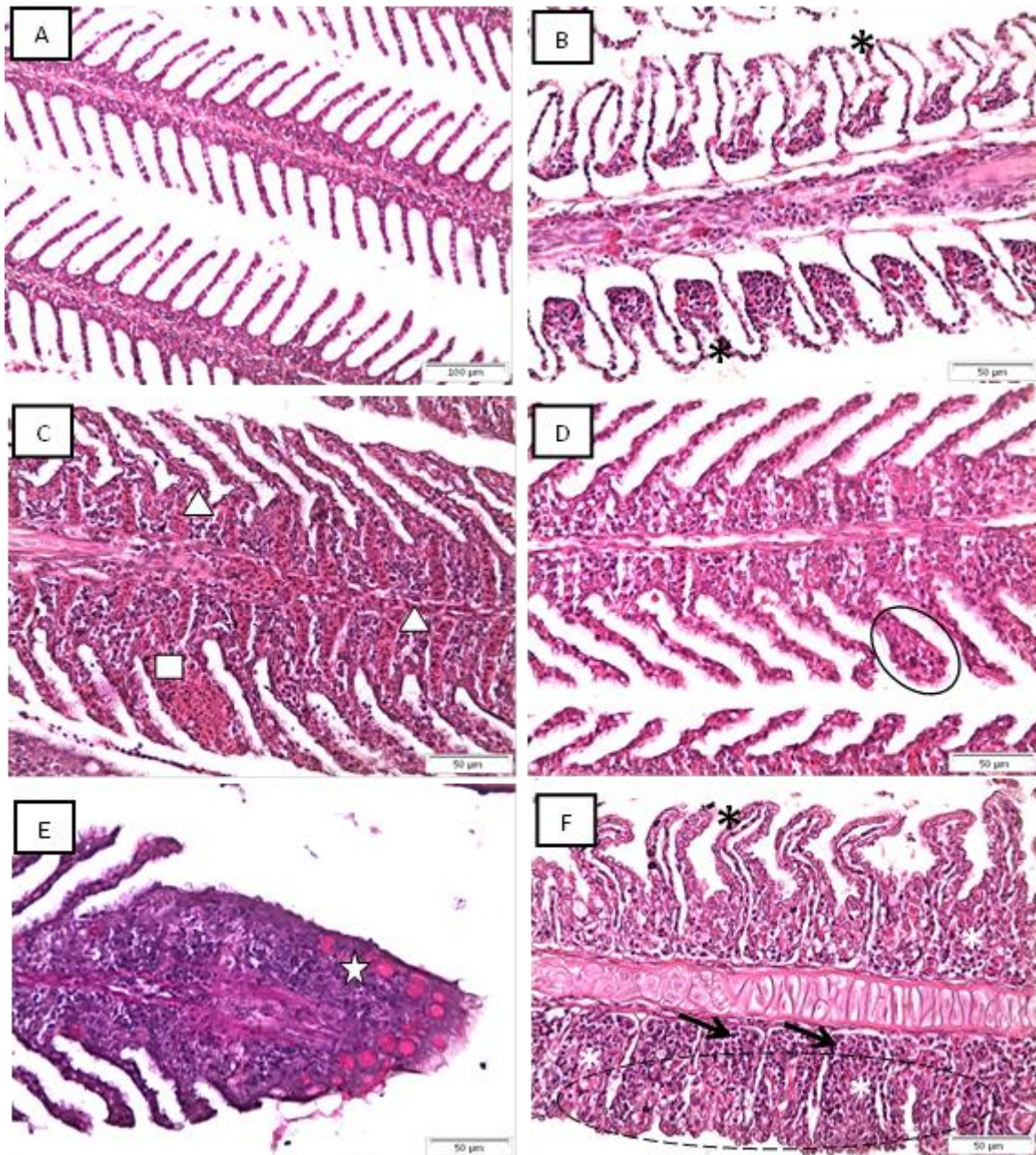


Figura 11 – Cortes histológicos de brânquias de *S. aurata* expostas a omeprazol sulfito (coloração HE (A, B, C, D e F) e coloração AB-PAS (E)). Microfotografias de: grupo controle (A) com arquitetura normal, grupo exposto a 0,03 $\mu\text{g/l}$ (B), 0,3 $\mu\text{g/l}$ (C) e 3,0 $\mu\text{g/l}$ (D, E e F). Hiperplasia de células epiteliais (asterisco branco). Fusão lamelar (circulo tracejado). Levantamento epitelial (asterisco preto). Hiperplasia de células mucosas (estrela). Hemorragia (quadrado branco). Hiperemia (triangulo branco). Edema (circulo sólido). Infiltração de leucócitos (setas pretas).

8.2.2. Avaliação semi-quantitativa

No que se refere ao índice patológico branquial total (I_G), observaram-se diferenças significativas nos grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 14,316$; $p < 0,001$), em particular entre o grupo controlo e as duas maiores concentrações testadas ($0,30 \mu\text{g/L}$ e $3,00 \mu\text{g/L}$) (Teste de Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 12).

Nos indivíduos expostos, as alterações progressivas foram as mais predominantes no tecido branquial evidenciando-se diferenças significativas nos grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 16,074$; $p < 0,05$), em particular com um aumento, observado nas concentrações mais elevadas. No que diz respeito às lesões circulatórias (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 12,933$; $p < 0,05$), também foi observado um aumento significativo nos tecidos expostos a concentrações de $0,30 \mu\text{g/L}$ e $3,00 \mu\text{g/L}$ (Teste de Dunnett, $p < 0,05$). Nas lesões regressivas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 4,960$; $p < 0,05$) para as concentrações mais elevadas (Teste de Dunnett, $p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais nas lesões inflamatórias (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 2,006$; $p = 0,124$) (Figura 12).

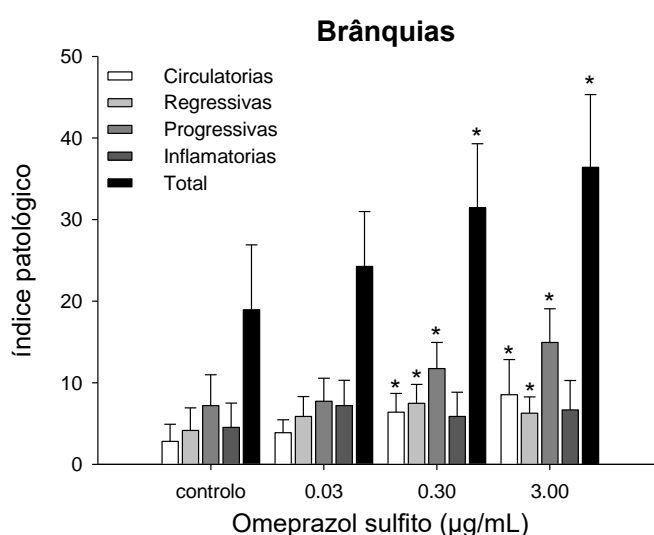


Figura 12 – Índices patológicos completos e categóricos (circulatórios, regressivos, progressivos e inflamatórios) da dourada para brânquias, após exposição ao omeprazol sulfito. Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

8.3. Histopatologia do fígado

8.3.1. Avaliação qualitativa

Indivíduos de *S. aurata* do grupo controlo apresentaram uma arquitetura normal do hepatopâncreas (Figura 13A). Nos grupos expostos, o omeprazol sulfito induziu várias alterações, nomeadamente modificações regressivas, como núcleos picnóticos (Figura 13E) e vacuolização hepática (Figura 13D e E). Foram ainda observadas alterações inflamatórias como são exemplo a infiltração de leucócitos (Figura 13F) e presença de centros de melanomacrófagos, frequentemente associados ao hepatopâncreas (Figura 13B e D). Foram evidenciadas alterações circulatórias pela presença de hemorragias e dilatação dos capilares sinusoides (hiperemia) (Figura 13C). Não foram encontradas alterações neoplásicas.

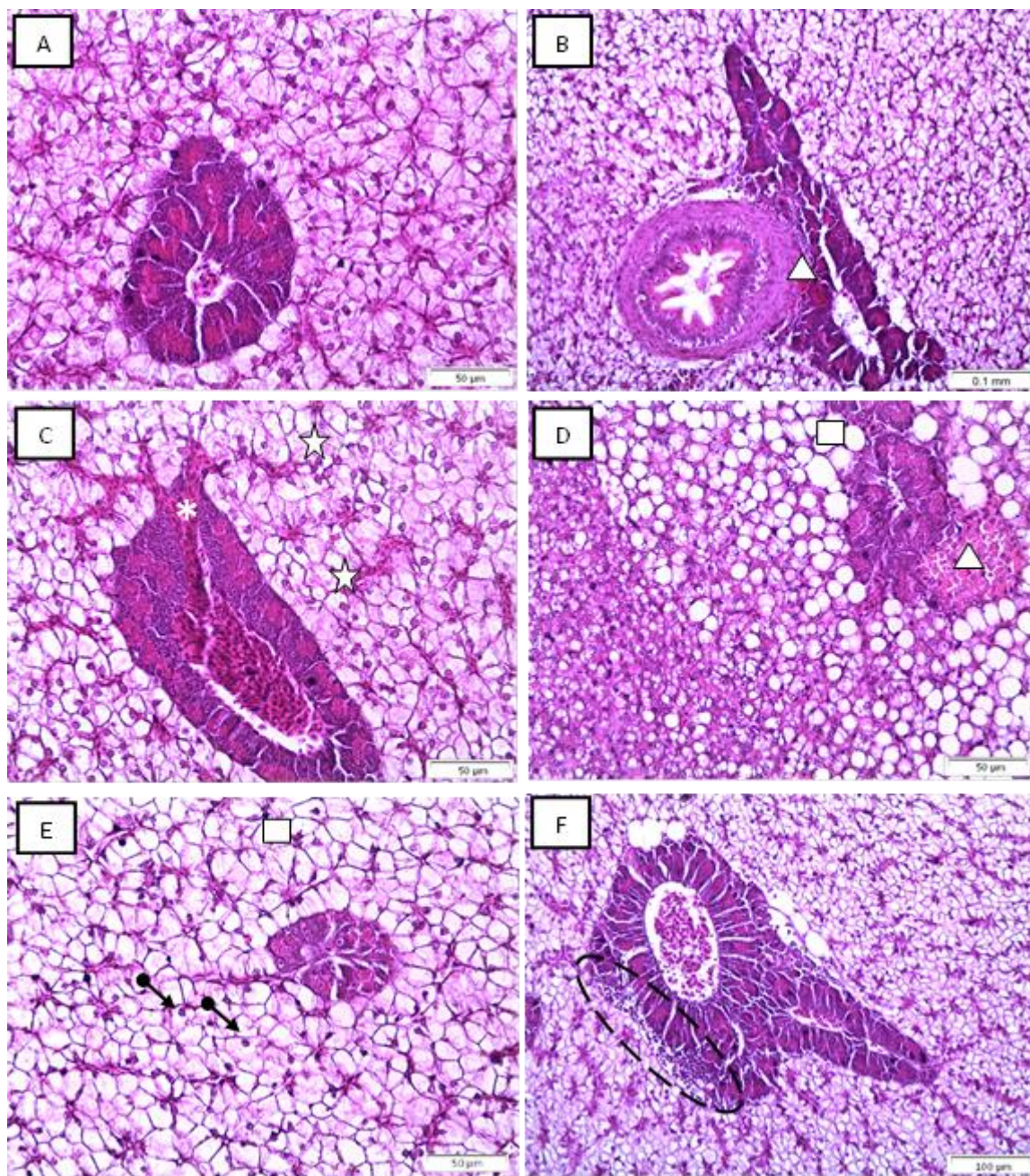


Figura 13 – Cortes histológicas de fígado de douradas expostas a omeprazol sulfito (coloração HE). Microfotografias de: grupo controle (A) com arquitetura normal do hepatopâncreas e do parênquima hepático, grupo exposto a 0,03 µg/l (B), 0,3 µg/l (C e D) e 3,0 µg/l (E e F). Hemorragia (asterisco branco). Dilatação dos sinusóides (estrela). Infiltração leucocitária (circulo tracejado). Núcleos picnóticos (seta preta). Vacuolização (quadrado). Melanomacrófagos entre um canal biliar e o hepatopâncreas (B) melanomacrófagos associados ao hepatopâncreas (F) (triangulo branco).

8.3.2. Avaliação semi-quantitativa

Os organismos expostos apresentaram níveis mais elevados de alterações regressivas em relação ao grupo controlo (Figura 14). Nas lesões regressivas observaram-se diferenças significativas nos grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 7,704$; $p < 0,05$), nomeadamente para as duas concentrações mais elevadas testadas comparando com controlo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais nas lesões inflamatórias (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 0,608$; $p = 0,613$) e nas circulatorias (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 1,399$; $p = 0,253$).

No que se refere ao índice patológico hepático (I_L), observaram-se diferenças significativas nos grupos experimentais (Análise de Variância Unifatorial: $F_{[3,56]} = 3,278$; $p = 0,027$), em particular entre o grupo controlo e a concentração mais elevada testada (3,00 $\mu\text{g/L}$) (Figura 14), onde foi evidente um aumento (Teste de Dunnett, $p < 0,05$).

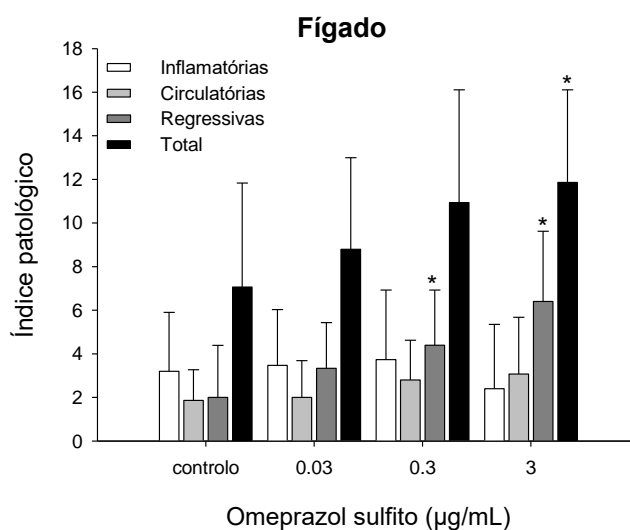


Figura 14 – Índices patológicos completos e categóricos (circulatorios, regressivos e inflamatórios) de indivíduos de *S. aurata* para fígado, após exposição ao omeprazol sulfito. Os dados são expressos como valores médios de cada tratamento \pm desvio padrão. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (teste de Dunnett, $p < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

9. Discussão

9.1. Resposta enzimática

9.1.1. Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

As relações entre as formas do citocromo P450 em mamíferos e outros vertebrados foram revistas extensivamente por Nelson *et al.* (1996). Tendo em conta estudos feitos em mamíferos e aves, a subfamília CYP1A apenas é composta pela CYP1A1 e pela CYP1A2, sendo que ambas podem ser induzidas após exposição a hidrocarbonetos aromáticos halogenados / policíclicos (Whyte *et al.*, 2000). Nos últimos anos, devido a inúmeros estudos, ficou patente a presença desta subfamília de enzimas também em peixes (Stegeman *et al.*, 1997, Kirby *et al.*, 2004, Beijer, 2007, Ferreira *et al.*, 2010). Além disso, a evidência atual suporta uma relação imunoquímica próxima entre as “formas CYP1A” em todos os vertebrados aquáticos e terrestres (Malins, 2018). A medição da atividade da EROD é um excelente biomarcador bioquímico para aferir os efeitos de contaminantes/poluentes aquáticos uma vez que é uma das primeiras respostas quantificáveis detetáveis à exposição a estes compostos (Whyte *et al.*, 2000).

O omeprazol é considerado um “agonista não clássico” do recetor AHR, embora o mecanismo pelo qual atua ainda não seja completamente conhecido (Shih *et al.*, 1999). Num estudo em células de hepatoma humano e de rato, o omeprazol inibiu competitivamente a atividade da enzima CYP1A1 concluindo-se que os efeitos do omeprazol na CYP1A1 envolvem não apenas a indução através da ativação de AHR, mas também a inibição da atividade enzimática (Shiizaki *et al.*, 2008). No entanto, também existem estudos que demonstram a indução da enzima após exposição ao omeprazol. Por isso, Shivanna *et al.* (2011) e Ghafarian-Bahraman *et al.* (2017) sugerem que o fármaco é um indutor de CYP1A1 sem ligação ao local ativo do recetor AHR.

No nosso estudo, não houve quaisquer diferenças significativas na atividade hepática da EROD entre os diferentes grupos experimentais. O que significa que, segundo estes resultados, o omeprazol sulfito, nas concentrações e tempo de exposição utilizado, não foi capaz de induzir a atividade da EROD, contrariamente aos resultados apresentados

por Ghafarian-Bahraman *et al.* (2017) que demonstraram a indução desta enzima em células HepG2 expostas ao mesmo fármaco, na sua fórmula parental.

Sabe-se que o composto teste (omeprazol sulfito) detetado em amostras de águas residuais tratadas (efluentes) e águas superficiais, pode sofrer hidrólise dando origem a outros produtos de degradação – iões com um peso molecular inferior (Boix *et al.*, 2013), que podem não ter a capacidade de ativar o recetor AHR. Outra das hipóteses para explicar a ausência de indução da EROD neste estudo, é a estrutura química do omeprazol sulfito, ser ligeiramente diferente da molécula parental (a estrutura inicial do omeprazol é maioritariamente mantida) pois existe a perda de um átomo de oxigénio na estrutura original (Boix *et al.*, 2014), que pode ser o suficiente para não existir a ativação do recetor AHR e consequentemente a transcrição dos genes CYP1A. Por outro lado, existe ainda a possibilidade desta espécie marinha não ser responsiva ao tóxico ou os níveis de omeprazol sulfito e tempo de exposição não serem suficientes para causar uma resposta mensurável, uma vez que nas espécies de peixes, os padrões de resposta a fármacos são muitos diversos (Li *et al.*, 2011).

9.1.2. Catalase

Biomarcadores e enzimas de defesa antioxidante têm sido amplamente utilizados na monitorização de xenobióticos a nível ambiental, de modo a caracterizar mecanismos de toxicidade ambiental e quantificar a ecotoxicidade em organismos aquáticos expostos a uma variedade de poluentes químicos (Van der Oost *et al.*, 2003, Valavanidis *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2010). A CAT é considerada uma das enzimas mais responsivas às ERO em espécies de vertebrados e invertebrados (Oliveira *et al.*, 2010), pelo que é um dos biomarcadores de stresse oxidativo mais utilizados. É uma enzima, com a capacidade de degradar o peróxido de hidrogénio resultante da degradação do anião superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Van der Oost *et al.*, 2003).

As enzimas antioxidantes, nomeadamente a CAT, podem ser induzidas pelo aumento da produção de ERO atuando como mecanismo de proteção contra o stresse oxidativo, ou seja, é uma resposta adaptativa do organismo à exposição a um tóxico que direta ou indiretamente gera ERO (Valavanidis *et al.*, 2006, He *et al.*, 2012). Por outro lado, estas

enzimas podem ser inibidas quando existe uma deficiência no sistema, tornando os organismos mais suscetíveis a agentes tóxicos.

No presente estudo não foram evidenciadas alterações na atividade da CAT no tecido branquial o que poderá indicar que neste tecido o metabolismo pro-oxidativo do omeprazol ocorreu de forma muito mais suave não evidenciando alterações na atividade da CAT. Por outro lado, verificou-se uma inibição, dependente da dose (Mannervik *et al.*, 1988), da atividade da catalase no tecido hepático de *S. aurata*. A literatura é escassa em termos de estudos metabólicos em peixes expostos a omeprazol, pelo que a sua via de atuação nos mecanismos de defesa antioxidante ainda está por esclarecer.

Convém esclarecer, no entanto, que a inibição aqui observada pode estar relacionada com a produção de um excesso de ERO. Níveis elevados de ERO podem levar à carbonilação de proteínas alterando a sua função (Li *et al.* (2010), tal como refere Bagnyukova *et al.* (2006) após a diminuição da atividade das GSTs em peixes da espécie *Carassius auratus L.* exposto a sulfato de ferro; Podem induzir a oxidação de proteínas e, em seguida, ativar as proteases peroxissômicas que atuam na CAT, tal como sugerem Rodrigues *et al.* (2016) quanto à diminuição da atividade da CAT em *Oncorhynchus mykiss* exposto à eritromicina (antibiótico). Alternativamente, pode ter ocorrido especificamente um aumento do anião superóxido, que não pôde ser convertido posteriormente em H₂O₂ pela SOD, resultando num fluxo de radicais superóxido, que são conhecidos por inibir atividades de CAT (Valavanidis *et al.*, 2006), como verificado por Damásio *et al.* (2007) em peixes expostos a níveis elevados de poluentes, o que levaria a uma inativação da enzima, justificando a diminuição da sua atividade ao nível do tecido hepático. Outra explicação poderia passar por outra ERO, nomeadamente H₂O₂: um excesso de produção de H₂O₂ que não é eliminado pode levar à oxidação das próprias enzimas antioxidantes, desnaturando-as, ou seja, leva a uma diminuição da atividade enzimática (Rodrigues *et al.*, 2016).

Num estudo após a exposição aguda a tetraciclina, a atividade da CAT no fígado de *Gambusia holbrooki* aumentou; tal também aconteceu quando se expuseram indivíduos de *Oncorhynchus mykiss* a carbamazepina (Li *et al.*, 2011, Nunes *et al.*, 2015a). Ramos

et al. (2014) demonstraram um aumento da atividade da CAT em indivíduos de *Oncorhynchus mykiss* depois de uma exposição crónica a paracetamol. Por outro lado, recorrendo ao mesmo organismo-teste (*O. mykiss*), após uma exposição aguda e posterior exposição crónica a eritromicina verificou-se uma diminuição significativa da atividade da catalase (Rodrigues *et al.*, 2016).

9.1.3. Glutathione-S-transferases

As isoenzimas GSTs são enzimas de metabolização de fase II, com capacidade de conjugar compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I) com o grupo tiol (SH) da glutathione (GSH) neutralizando os locais eletrofílicos e tornando os produtos mais hidrossolúveis (Malins, 2018). A excreção, promovida pelas GSTs, destes produtos dos tecidos reduz o nível de ERO e previne a ocorrência de stresse oxidativo e dano celular, pelo que estas isoenzimas são fundamentais na defesa antioxidante (Mannervik *et al.*, 1988).

Neste estudo verificou-se uma diminuição significativa da atividade das GSTs nos dois tecidos analisados (brânquias e fígado). Estes resultados vêm apoiar a hipótese de que o omeprazol sulfito induziu stresse oxidativo nos órgãos em análise. Sustentando a tese de que as ERO produzidas superaram a capacidade de resposta antioxidante destas duas enzimas (CAT e GSTs), provocando danos que resultaram na diminuição da sua atividade. Tal hipótese pode ser sugerida, uma vez que Hermes-Lima e Storey (1993) demonstraram que a atividade das GSTs pode ser inibida pela ação de ERO, nomeadamente H₂O₂ e pelo radical hidroxilo.

A diminuição da atividade destas isoenzimas, também pode estar relacionada com uma depleção de GSH (glutathione na forma reduzida): a GSH é um importante antioxidante não-enzimático (Apel e Hirt, 2004), mas o seu principal papel como composto antioxidante depende da expressão das enzimas metabólicas de fase II, que facilitam a conjugação de GSH com ERO e compostos eletrofílicos – as GSTs (Modesto e Martinez, 2010), assim uma depleção de GSH levará a uma diminuição da atividade destas isoenzimas (Van der Oost *et al.*, 2003, Oliveira *et al.*, 2010). Embora seja uma hipótese mais remota, não podemos descartar o facto do próprio composto teste (omeprazol

sulfito), poder ter uma ação inibitória da atividade das GSTs, uma vez que já foi demonstrado que existem fármacos com essa capacidade, como é o caso do ácido etacrínico (diurético de ansa) que inibiu a atividade de GSTs numa cultura de células epiteliais pulmonares de murino (Awasthi *et al.*, 1993, Fletcher *et al.*, 2015).

Segundo DiGiulio *et al.* (1993) e He *et al.* (2012) as enzimas antioxidantes podem ser induzidas, pelo aumento da produção de ERO como um mecanismo de proteção contra o stresse oxidativo, tal como verificado por Nunes *et al.* (2015a) depois da exposição aguda de *Gambusia holbrooki* à tetraciclina, e por Parolini e Binelli (2012) que submetem *Dreissena polymorpha* a uma mistura de AINES; ou inibidas quando a deficiência do sistema ocorre, sugerindo toxicidade resultante do stresse oxidativo, induzindo um estado precário no organismo (Oliveira *et al.*, 2010): como é exemplo o *Lepomis macrochirus x L. cyanellus* após exposição a dibenzo-p-dioxinas (Oikari e Jimenez, 1992), *Sparus aurata* expostos a pesticidas (Pedrajas *et al.*, 1995), *O. mykiss* expostos a carbamazepina (Li *et al.*, 2011) ou *Daphnia magna* exposta a paracetamol (Oliveira *et al.*, 2015).

9.2. Análise histopatológica

A avaliação histológica dos tecidos de órgãos alvo de organismos aquáticos, é uma importante ferramenta para avaliação ecotoxicológica, uma vez que reflete o comprometimento da saúde dos mesmos em consequência da exposição a xenobióticos presentes na água. A seleção dos principais órgãos a serem avaliados depende de sua função, tipo de poluente e propriedades físico-químicas da água (Bernet *et al.*, 1999).

As brânquias de peixe são vulneráveis a poluentes aquáticos uma vez que exibem uma grande superfície, um contacto direto com a água e uma curta distância de difusão proporcionando uma área significativa de troca dos gases respiratórios com água. Além disso, são órgãos envolvidos em inúmeras funções fisiológicas, que incluem a respiração, equilíbrio osmótico e iônico, regulação ácido-base, excreção de resíduos nitrogenados e modulação de neurotransmissão em peixes (Evans *et al.*, 2005, Genten *et al.*, 2009). As brânquias de peixe são também os principais órgãos-alvo para a ação tóxica de poluentes

químicos respondendo aos stressores ambientais e apresentando alterações estruturais inespecíficas, e usualmente reversíveis, dependendo da dose e duração da exposição, especialmente em exposições prolongadas a níveis subletais de poluentes aquáticos (Nero *et al.*, 2006, Cengiz e Unlu, 2006, Pal *et al.*, 2012). Portanto, o comprometimento funcional das brânquias causado por poluentes pode prejudicar significativamente a saúde dos peixes, sendo estes órgãos apropriados para aferir os níveis de poluição da água (Alazemi *et al.*, 1996). Além disso, várias observações histopatológicas em brânquias foram relatadas para uma grande variedade de xenobióticos aquáticos de diferentes classes, incluindo pesticidas, metais pesados e fármacos onde foram evidenciadas alterações tais como fusão das lamelas secundárias, levantamento epitelial, hiperplasia epitelial, edemas, aneurismas e necrose. (Saravana Bhavan e Geraldine, 2000, Santos *et al.*, 2012, Ahmed *et al.*, 2013, Nunes *et al.*, 2015c),

No presente estudo foram observadas lesões progressivas como hiperplasia de células epiteliais e hiperplasia de células mucosas. Estas alterações histológicas são consideradas lesões não específicas com uma importância patológica moderada, ou seja, na maioria dos casos estas lesões regredem após eliminação do agente stressor (Bernet *et al.*, 1999). A proliferação de células mucosas atua como uma barreira protetora contra a entrada de poluentes. O muco (camada de glicoproteínas e glicolípidos) segregado por estas células é importante para facilitar a regulação iônica, mas também representa um mecanismo de proteção do epitélio e auxilia na prevenção da entrada de tóxicos no epitélio branquial (Pereira *et al.*, 2012, Varadarajan *et al.*, 2014). Neste caso a hiperplasia das células mucosas observadas nas brânquias de *S. aurata* poderá funcionar como mecanismo de prevenção à entrada do composto tóxico (omeprazol sulfito). A exposição crônica a contaminantes pode promover a proliferação celular levando a hiperplasia do epitélio branquial, conduzindo a um aumento da distância entre água e sangue e assim comprometer a função respiratória (Sayed *et al.*, 2012). O espessamento epitelial também pode ser atribuído ao aumento de macrófagos e outros leucócitos integrados em uma resposta compensatória de reparo tecidual (Monteiro *et al.*, 2008).

Dentro das mudanças regressivas foi possível observar fusão lamelar, neste caso resultante da alta severidade das alterações progressivas levando à fusão total de lamelas

secundárias, levantamento epitelial e algumas mudanças na arquitetura do tecido como encurtamento e ondulação de lamelas secundárias. O levantamento epitelial é relatado como sendo induzido pela incidência de edema grave, além disso, indica uma alteração na osmorregulação devido a epitélios danificados (Gröner *et al.*, 2017), levando a um aumento da distância entre o agente tóxico e a corrente sanguínea (Ahmed *et al.*, 2013). Estas alterações juntamente com as lesões progressivas podem ser encaradas como um mecanismo de defesa e adaptação de modo a diminuir significativamente a área de contacto com o xenobiótico (Nero *et al.*, 2006) dificultando o acesso do tóxico ao organismo e protegendo-o das alterações sanguíneas e do influxo de água descontrolado, tal como referem vários estudos (Pereira *et al.*, 2012, Javed *et al.*, 2016, Gröner *et al.*, 2017).

Foram evidenciadas alterações circulatórias tais como aneurismas, edemas, hemorragias e hiperemia. Os aneurismas ocorrem devido a um aumento de sangue nas lamelas, resultando em danos nas células pilar e perda da integridade vascular (Pal *et al.*, 2012, Nunes *et al.*, 2015c). Os edemas são referidos como o primeiro sinal de patologia, uma vez que essas alterações geralmente aparecem imediatamente após exposição (Barišić *et al.*, 2015, Rodrigues *et al.*, 2017). O aumento da permeabilidade das paredes capilares das brânquias após a dilatação do vaso (hiperemia) no local do dano, pode ser responsável pelo edema lamelar observado (Abalaka, 2015), e chegar mesmo à hemorragia por rutura do vaso sanguíneo, tal como sugerem os resultados deste estudo, onde foi possível observar fenómenos hemorrágicos nas brânquias de *S. aurata*. Em alguns organismos foram observadas alterações inflamatórias, nomeadamente, infiltrações de leucócitos, que representa uma primeira linha de resposta imunológica associada, muitas vezes, a processos de degeneração celular (Bernet *et al.*, 1999), que poderá ser recorrente do dano despoletado pelo composto teste. Pode-se argumentar, portanto, que o epitélio branquial se constitui como o principal ponto de entrada do contaminante, que quando exposto a omeprazol sulfito se multiplicaria, causando hiperplasia (observada extensamente em todo o tecido). A limitação de oxigénio ao nível branquial pode levar a uma hipoxia sistémica resultando em danos morfológicos em várias estruturas do organismo tornando os indivíduos mais suscetíveis a infeções quer no órgão alvo quer infeções secundárias, podendo chegar à morte (Al-Bairuty *et al.*, 2013, Javed *et al.*, 2016).

Tendo em conta a avaliação semi-quantitativa, as alterações predominantes no tecido branquial foram as alterações progressivas. Estas, a par das lesões regressivas, podem levar ao aumento da distância entre o agente tóxico e a corrente sanguínea. Estas mudanças estruturais das brânquias geralmente resultam em desequilíbrio iónico, mudanças nos parâmetros sanguíneos e distúrbios na osmoregulação do peixe (Wood e Soivio, 1991, Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994., Javed *et al.*, 2016).

Existem vários estudos que relatam alterações na histologia do tecido branquial após a exposição a fármacos: Gröner *et al.* (2017) descreveram alterações em *Oreochromis niloticus* após exposição a diclofenac (AINES), as brânquias apresentaram alterações regressivas (levantamento epitelial) e progressivas (hiperplasia, proliferação de células mucosas e de células pilar e hipertrofia) e infiltração de leucócitos; Triebkorn *et al.* (2004) depois de exporem *Oncorhynchus mykiss* ao mesmo fármaco descreveram necrose de células pilar, hipertrofia e levantamento epitelial; Rodrigues *et al.* (2017) evidenciaram alterações progressivas (hipertrofia das células mucosas e hiperplasia de células epiteliais), lesões regressivas (fusão lamelar e levantamento epitelial) e alterações circulatórias (aneurismas) nas brânquias de *Oncorhynchus mykiss* após a exposição a tetraciclina; Ramesh *et al.* (2018) descreveram fusão lamelar, edema, hiperplasia, congestão sanguínea, levantamento epitelial e hipertrofia em brânquias de *Cyprinus carpio* depois da exposição ao antifúngico e antimalárico, cloroquina; Por sua vez, Choi *et al.* (2018) expuseram *Oncorhynchus mykiss* a paracetamol (analgésico e antipirético) verificando que o fármaco induziu inflamação das lamelas e dos filamentos branquiais.

Relativamente à histologia do fígado, existem dois tipos básicos gerais de fígado de peixe: aqueles que contêm tecido pancreático versus aqueles que não contêm. Os que contêm tecido pancreático exócrino são frequentemente chamados de “hepatopâncreas” (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007b). *S. aurata* é um peixe com hepatopâncreas: o parênquima hepático está organizado em cordões de hepatócitos (que inclui a rede sinusoidal) que possuem um núcleo esférico e citoplasma eosinófilo; o tecido pancreático exócrino está distribuído de forma difusa e separado do parênquima hepático, sendo que o pâncreas exócrino intra-hepático é composto por células secretoras (citoplasma basófilo, núcleo basal e proenzimas digestivas) organizadas em ácinos e uma região

central composta pela veia porta (Figura 8), além disso podem estar associados ductos biliares com uma parede espessa (Figura 13B) (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007b, Genten *et al.*, 2009, Mekkawy *et al.*, 2012, Zena *et al.*, 2015, Sales *et al.*, 2017).

O fígado de peixe é fisiologicamente semelhante ao dos mamíferos, desempenhando um papel vital em atividades metabólicas básicas como absorção, processamento e armazenamento de nutrientes e substâncias endógenas, síntese de enzimas e cofatores, formação e excreção de biliar, metabolismo de compostos lipofílicos, incluindo xenobióticos e processos de desintoxicação (Genten *et al.*, 2009). O facto dos processos de desintoxicação acontecerem neste único órgão pode levar a lesões hepáticas, uma vez que os xenobióticos tendem a acumular-se aqui, produzindo alterações metabólicas e estruturais deletérias, observáveis através da análise histológica (Jaeschke *et al.*, 2002, Di Giulio e Hinton, 2008, Abalaka, 2015). Tal como referem vários autores que relatam alterações histológicas neste órgão de metabolização, decorrentes da exposição a compostos farmacológicos: Rodrigues *et al.* (2017) descreveram alterações circulatórias (hemorragia), regressivas (núcleos picnóticos, vacuolização) e progressivas (hipertrofia de hepatócitos) após a exposição aguda, e alterações inflamatórias depois da exposição crónica de *Oncorhynchus mykiss* a tetraciclina; Triebkorn *et al.* (2004) utilizaram diclofenac na exposição de *Oncorhynchus mykiss*, relatando colapso da compartimentação celular, bem como a depleção de glicogênio dos hepatócitos do fígado do organismo teste; Por sua vez, Ramesh *et al.* (2018) descreveram degeneração nuclear, vacuolização, edema celular e necrose em *Cyprinus carpio* depois da exposição a cloroquina.

As observações histopatológicas decorrentes da exposição crónica de *S. aurata* ao omeprazol sulfito sugerem que o fígado do organismo-teste pode ser afetado pelo fármaco.

Dentro das mudanças regressivas, foi possível observar vacuolização citoplasmática, núcleos picnóticos e alteração da estrutura e arquitetura do hepatopâncreas. A vacuolização hepática pode ser um processo degenerativo resultante de danos metabólicos relacionados com a exposição a contaminantes, tal como é sustentado por

diversos estudos (Bernet *et al.*, 1999, Camargo e Martinez, 2007, Rodrigues *et al.*, 2017). Mais estudos com *S. aurata* relataram o desenvolvimento desta lesão regressiva, como são exemplo a pesquisa de Calò *et al.* (2012) que após a exposição a bifenilos policlorados observaram degeneração esteatósica (vacuolização) ao nível hepático, e Zena *et al.* (2015) que relataram também vacuolização ao nível do parênquima hepático após exposição a benzo-a-pireno. No entanto deve-se ter em conta que existe uma grande diferença entre o omeprazol sulfito e os compostos testados por estes autores. No entanto, podem ser várias as justificações para o desenvolvimento desta lesão: a vacuolização hepática pode ser consequência da acumulação excessiva de lípidos (esteatose) e/ou glicogénio no citoplasma das células hepáticas expostas a tóxicos (Abalaka, 2015); por outro lado, pode ser associada à inibição da síntese proteica, desagregação de microtúbulos ou desregulações ao nível dos processos de transferência de energia celular necessários para a regulação iónica resultando numa depleção de energia (Di Giulio e Hinton, 2008, Ahmed *et al.*, 2013). A vacuolização foi observada em peixes expostos a outros fármacos, como a tetraciclina (Nunes *et al.*, 2015a, Rodrigues *et al.*, 2017), o ácido salicílico (Nunes *et al.*, 2015c) e o paracetamol (Choi *et al.*, 2018).

O núcleo picnótico refere-se a uma forma condensada da cromatina no núcleo, que geralmente indica danos altamente severos, antecedendo o estado de necrose celular (Stevens, 2001, Seeley *et al.*, 2005, Pal *et al.*, 2012). Segundo Bernet *et al.* (1999) o núcleo picnótico em peixes é considerado uma lesão que na maioria dos casos é reversível após a anulação da agente stressor, sendo por isso considerada de importância patológica moderada. À semelhança do sucedido no presente estudo, recorrendo ao mesmo organismo teste (*S. aurata*), Zena *et al.* (2015) também observaram hepatócitos com núcleo escuro e picnótico após a exposição a benzo-a-pireno.

Alterações da estrutura e arquitetura do hepatopâncreas, nomeadamente ao nível do pâncreas exócrino, foram observadas com uma ocorrência considerada leve. O pâncreas exócrino é constituído por células secretoras (Genten *et al.*, 2009) que são suscetíveis a danos oxidativos nos componentes celulares resultantes, por exemplo, da hiperprodução ERO (Valavanidis *et al.*, 2006) que pode ter sido induzida pela exposição ao omeprazol sulfito. No entanto, apesar de sua presença óbvia em muitas espécies, não existem estudos

aprofundados sobre a relação do tecido pancreático com os diversos tratos estromais que percorrem o fígado de peixe (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007b), portanto não se sabe o que as alterações estruturais e funcionais do pâncreas exócrino podem implicar ao nível da restante estrutura hepática. Existem, no entanto estudos que evidenciam alterações no hepatopâncreas de organismos aquáticos, resultantes da exposição a poluentes orgânicos (Saravana Bhavan e Geraldine, 2000, Agwuocha *et al.*, 2011), a toxinas (Fischer e Dietrich, 2000), metais (Mekkawy *et al.*, 2012, Chiodi Boudet *et al.*, 2015).

Entre as alterações inflamatórias foi observada a infiltração de leucócitos e deposição de aglomerados de melanomacrófagos, que se encontravam frequentemente associados ao hepatopâncreas. A infiltração de leucócitos representa uma primeira linha de resposta imunológica e é categorizada como uma alteração tecidual de severidade moderada (Bernet *et al.*, 1999). Esta pode ser associada a processos de degeneração das células do parênquima hepático e alterações estruturais e funcionais do hepatopâncreas (visto que as infiltrações leucocitárias estavam associadas muitas vezes aos ácinos pancreáticos) (Javed *et al.*, 2016). Assim como referem vários estudos, relatando a existência de infiltrações leucocitárias após a exposição a xenobióticos: fármacos (Rodrigues *et al.*, 2017), pesticidas (Pal *et al.*, 2012) e metais pesados (Javed *et al.*, 2016).

Os centros de melanomacrófagos são um elemento crítico do sistema imunológico dos peixes, que inclui a resposta imune a xenobióticos. A variação do tamanho, cor, número e histologia dos centros de melanomacrófagos está associado à idade, estado nutricional e doença, sabe-se ainda que os peixes acumulam melanomacrófagos em condições adversas, como na exposição a xenobióticos (Hartley *et al.*, 1996, Chiodi Boudet *et al.*, 2015). Assim a deposição de aglomerados de melanomacrófagos pode ser resultado da resposta imunológica do organismo teste ao omeprazol sulfito, que pode causar a deposição de ferro resultante da destruição de glóbulos vermelhos, além da deposição de melanomacrófagos, tal como é relatado por Hartley *et al.* (1996). Larguinho *et al.* (2014) também descreveram efeitos deletérios nos ácinos e a deposição de aglomerados de melanomacrófagos após a exposição de *Carassius auratus* à acrilamida.

Foram também evidenciadas alterações circulatórias pela presença de hemorragias e dilatação dos capilares sinusoides (hiperemia). Dilatações nos capilares hepáticos já foram relatadas como lesões hepáticas não específicas em organismos expostos a concentrações sub-tóxicas de pesticidas (Cengiz e Unlu, 2006), metais pesados (Abalaka, 2015) e fármacos (Nunes *et al.*, 2015a). Assim sendo, a hemorragia pode resultar do congestionamento dos vasos sanguíneos devido ao aumento da pressão arterial como resultado à exposição a substâncias tóxicas (Javed *et al.*, 2016). Rodrigues *et al.* (2017) relataram várias alterações histológicas em fígados de *O. mykiss* expostas a tetraciclina, nomeadamente, hemorragia e hiperemia, sugerindo que a base do dano celular é o aumento do stress oxidativo resultante da acumulação de ERO. Existem outros estudos que referem estas alterações: Maksymiv *et al.* (2015) relataram hiperemia e danos no endotélio vascular com subsequente hemorragia após a exposição de *Carassius auratus* L. a um pesticida “sencor”. Por sua vez, Abalaka (2015) registaram hemorragias no fígado de *Auchenoglanis occidentalis*, resultado da bioacumulação de metais pesados existentes no seu habitat.

Os resultados da avaliação semi-quantitativa referem que as alterações predominantes no tecido hepático foram as regressivas, nomeadamente nas concentrações mais elevadas (0,30 µg/L e 3,00 µg/L). As alterações histológicas observadas no fígado da dourada revelam distúrbios fisiológicos com uma importância patológica mínima a moderada, indicando que as lesões são reversíveis ou retornam na maioria dos casos após a anulação do agente stressor. Pode-se inferir que as alterações hepatocelulares referidas são resultado da exposição ao omeprazol sulfito, uma vez que a maioria das defesas antioxidantes está localizada no fígado, como resultado do papel central deste órgão na desintoxicação de xenobióticos e no processamento de produtos metabólicos para degradação (Di Giulio e Hinton, 2008, Ramos *et al.*, 2014). Assim, as alterações hepáticas sugerem a mobilização de algum tipo de mecanismo defensivo num esforço para desintoxicar o composto teste que resultou em alguns danos teciduais. Tal como sustenta o aumento significativo do índice patológico total do fígado na concentração mais elevada (3,00 µg/L).

10. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho mostram um conjunto abrangente de efeitos em dois órgãos-chave (brânquias e fígado) após a exposição a níveis ecologicamente realistas de omeprazol sulfito. Assim, é possível inferir a ocorrência de efeitos oxidativos que foram acompanhados por alterações tecidulares. A utilização de biomarcadores enzimáticos e de biomarcadores histopatológicos revelou-se essencial para a avaliação dos efeitos de fármacos no ambiente aquático.

Em relação aos biomarcadores enzimáticos, verificou-se uma diminuição significativa da atividade das GSTs nos dois tecidos analisados, tal como na atividade da CAT ao nível hepático. Estes resultados sustentam a tese de que o omeprazol sulfito induziu stresse oxidativo nos órgãos em análise, podendo induzir uma hiperprodução de ERO, que superaram a capacidade de resposta antioxidante destas duas enzimas (CAT e GSTs), provocando danos que resultaram na diminuição da sua atividade. A análise histológica, veio apoiar os resultados das atividades enzimáticas, uma vez que é evidente a ocorrência de danos nos níveis celular e tecidual, ainda que se revelem de importância patológica mínima ou moderada, representando, em alguns casos, alterações adaptativas.

Neste trabalho foram discutidos possíveis mecanismos toxicológicos do omeprazol sulfito que poderiam ser responsáveis pela produção de alguns desequilíbrios enzimáticos e fisiológicos, levando aos distúrbios histológicos e da atividade das enzimas observados. Estes resultados revelam que o omeprazol sulfito pode pôr em risco a saúde dos organismos aquáticos, mesmo em concentrações subletais. Tendo em conta que as concentrações testadas foram de acordo com as encontradas a nível ambiental, é possível prever ocorrência de alterações deletérias na fisiologia de organismos que vivam submetidos em águas poluídas por fármacos.

11. Bibliografia

- Abalaka, S. E. (2015). Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in *Auchenoglanis occidentalis* fish from Tiga dam, Nigeria. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13, 67.
- Äbelö, A., Andersson, T. B., Antonsson, M., Naudot, A. K., Skånberg, I. & Weidolf, L. (2000). Stereoselective Metabolism of Omeprazole by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 966-972.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Agwuocha, S., Kulkarni, B. G. & Pandey, A. K. (2011). Histopathological alterations in hepatopancreas of *Gafarrarium divaricatum* exposed to xylene, benzene and gear oil-WSF. *J Environ Biol*, 32, 35-8.
- Ahmed, M. K., Habibullah-Al-Mamun, M., Parvin, E., Akter, M. S. & Khan, M. S. (2013). Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65, 903-909.
- Al-Bairuty, G. A., Shaw, B. J., Handy, R. D. & Henry, T. B. (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 126, 104-115.
- Alazemi, B. M., Lewis, J. W. & Andrews, E. B. (1996). Gill Damage in the Freshwater Fish *Gnathonemus Petersii* (Family: Mormyridae) Exposed to Selected Pollutants: An Ultrastructural Study. *Environmental Technology*, 17, 225-238.
- Amor, C., Torres-Sociás, E. D., Peres, J. A., Maldonado, M. I., Oller, I., Malato, S. & Lucas, M. S. (2015). Mature landfill leachate treatment by coagulation/flocculation combined with Fenton and solar photo-Fenton processes. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 261-268.

Andersson, T., Miners, J. O., Veronese, M. E., Tassaneeyakul, W., Tassaneeyakul, W., Meyer, U. A. & Birkett, D. J. (1993). Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 36, 521-530.

Apel, K. & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

Arikan, O. A., Rice, C. & Codling, E. (2008). Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, 226, 121-133.

Arukwe, A., Förlin, L. & Anders, G. (1997). Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2576-2583.

Awasthi, S., Srivastava, S. K., Ahmad, F., Ahmad, H. & Ansari, G. A. S. (1993). Interactions of glutathione S-transferase- π with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1164, 173-178.

Ayadi, I., Monteiro, S. M., Regaya, I., Coimbra, A., Fernandes, F., Oliveira, M. M., Peixoto, F. & Mnif, W. (2015). Biochemical and histological changes in the liver and gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to Red 195 dye. *RSC Advances*, 5, 87168-87178.

Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I. & Lushchak, V. I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78, 325-331.

Barišić, J., Dragun, Z., Ramani, S., Filipović Marijić, V., Krasnići, N., Čož-Rakovac, R., Kostov, V., Rebok, K. & Jordanova, M. (2015). Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 158-166.

Barnes, K., Scott, C., Kolpin, D., Focazio, M., Furlong, E., Zaugg, S., Meyer, M. & Barber, L. (2004). Pharmaceuticals and Other Organic Waste Water Contaminants Within

a Leachate Plume Downgradient of a Municipal Landfill. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 24, 119-126.

Beijer, K.(2007). *Induction of Cytochrome P450 1A (CYP1A) in larvae of the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.)*. Degree project in biology, Uppsala University.

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

Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Niessen, W. M. A. & Hernández, F. (2013). Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: degradation experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 48, 1091-1100.

Boix, C., Ibáñez, M., Zamora, T., Sancho, J. V., Niessen, W. M. A. & Hernández, F. (2014). Identification of new omeprazole metabolites in wastewaters and surface waters. *Science of The Total Environment*, 468-469, 706-714.

Boon, J. P., Everaarts, J. M., Hillebrand, M. T. J., Eggens, M. L., Pijnenburg, J. & Goksøyr, A. (1992). Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *Science of The Total Environment*, 114, 113-133.

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

Brooks, B. W. (2014). Fish on Prozac (and Zoloft): Ten years later. *Aquatic Toxicology*, 151, 61-67.

Buszka, P. M., Yeskis, D. J., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D. & Meyer, M. T. (2009). Waste-Indicator and Pharmaceutical Compounds in Landfill-Leachate-Affected

Ground Water near Elkhart, Indiana, 2000–2002. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 653-659.

Calò, M., Casella, S., Panzera, M., Cascio, P. L., Alberghina, D. & Piccione, G. (2012). Activation of the Ahr signalling pathway by polychlorobiphenyls causes a marked induction of cytochrome P450 only after depletion of vitellogenin in *Sparus aurata*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 735-742.

Calò, M., Licata, P., Bitto, A., Lo Cascio, P., Giarratana, F. & Altavilla, D. (2017). Effects of PCB-126 on aryl hydrocarbon receptor, ubiquitin and p53 expression levels in *Sparus aurata*. *Experimental and Toxicologic Pathology*.

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

Capkin, E. & Altinok, I. (2013). Effects of chronic carbosulfan exposure on liver antioxidant enzyme activities in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 80-87.

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

Cheah, D. M. Y., Wright, P. F. A., Holdway, D. A. & Ahokas, J. T. (1995). Octopus pallidus cytochrome P-450: characterisation and induction studies with β -naphthoflavone and Aroclor 1254. *Aquatic Toxicology*, 33, 201-214.

Chiodi Boudet, L. N., Polizzi, P., Romero, M. B., Robles, A., Marcovecchio, J. E. & Gerpe, M. S. (2015). Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 231-240.

Choi, E., Alsop, D. & Wilson, J. Y. (2018). The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 198, 20-29.

Corcoran, J., Winter, M. J. & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 40, 287-304.

Curi-Pedrosa, R., Daujat, M., Pichard, L., Ourlin, J. C., Clair, P., Gervot, L., Lesca, P., Domergue, J., Joyeux, H. & Fourtanier, G. (1994). Omeprazole and lansoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269, 384-392.

Damásio, J. B., Barata, C., Munné, A., Ginebreda, A., Guasch, H., Sabater, S., Caixach, J. & Porte, C. (2007). Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, 66, 1206-1216.

Davies, K. J. A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1-31.

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

DellaGreca, M., Iesce, M. R., Previtiera, L., Rubino, M., Temussi, F. & Brigante, M. (2006). Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. *Chemosphere*, 63, 1087-1093.

Di Giulio, R. T. & Hinton, D. E. (2008). *The Toxicology of Fishes*, Boca Raton, CRC Press.

Diaz, D., Fabrev, I., Daujat, M., Aubert, B. S., Bories, P., Michel, H. & Maurel, P. (1990). Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology*, 99, 737-747.

DiGiulio, R. T., Habig, C. & P.Gallagher, E. (1993). Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 26, 1-22.

Evans, D. H., Piermarini, P. M. & Choe, K. P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85, 97-177.

Ferreira, M., Antunes, P., Gil, O., Vale, C. & Reis-Henriques, M. A. (2004). Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 69, 347-357.

Ferreira, M., Caetano, M., Antunes, P., Costa, J., Gil, O., Bandarra, N., Pousão-Ferreira, P., Vale, C. & Reis-Henriques, M. A. (2010). Assessment of contaminants and biomarkers of exposure in wild and farmed seabass. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73, 579-588.

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

Figueiredo-Fernandes, A. M., Fontaínhas-Fernandes, A. A., Monteiro, R. A. F., Reis-Henriques, M. A. & Rocha, E. (2007b). Spatial relationships of the intrahepatic vascular-biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 189, 17-30.

Fischer, W. J. & Dietrich, D. R. (2000). Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164, 73-81.

Fletcher, M. E., Boshier, P. R., Wakabayashi, K., Keun, H. C., Smolenski, R. T., Kirkham, P. A., Adcock, I. M., Barton, P. J., Takata, M. & Marczin, N. (2015). Influence of glutathione-S-transferase (GST) inhibition on lung epithelial cell injury: role of oxidative stress and metabolism. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308, L1274-L1285.

- Forte, J. G., Hanzel, D. K., Urushidani, T. & Wolosin, J. M. (1989). Pumps and Pathways for Gastric HCl Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 574, 145-158.
- Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2007). *Tratado de Histologia Em Cores*, Elsevier.
- Genten, F., Terwinghe, E. & Danguy, A. (2009). *Atlas of Fish Histology*, Science Publishers.
- George, S. G. & Buchanan, G. (1990). Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8, 437-449.
- Ghafarian-Bahraman, A., Sadeghimanesh, N., Mirzaei, M., Akbarizadeh, A., Omidi, M., Mohammadi, H., Arabnezhad, M., Mobini, K. & Mohammadi Bardbori, A. (2017). *Effects of omeprazol and ketoconazole on aryl hydrocarbon receptor (AHR)*.
- Gracia-Lor, E., Ibanez, M., Zamora, T., Sancho, J. V. & Hernandez, F. (2014). Investigation of pharmaceutical metabolites in environmental waters by LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21, 5496-510.
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W. & Kloas, W. (2017). Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 166, 473-481.
- Guo, J., Sinclair, C. J., Selby, K. & Boxall, A. B. (2016). Toxicological and ecotoxicological risk-based prioritization of pharmaceuticals in the natural environment. *Environ Toxicol Chem*, 35, 1550-9.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2011). *Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica*, Rio de Janeiro, Elsevier.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.

Hartley, W. R., Thiagarajah, A. & Treinies, A. M. (1996). Liver lesions in the gar fish (Lepisosteidae) as biomarkers of exposure. *Marine Environmental Research*, 42, 217-221.

He, X., Nie, X., Yang, Y., Liu, X., Pan, D., Cheng, Z. & Liang, X. (2012). Multi-biomarker responses in fishes from two typical marine aquaculture regions of South China. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 2317-2324.

Hermes-Lima, M. & Storey, K. B. (1993). In vitro oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 124, 149-158.

Howden, C. W. (1991). Clinical Pharmacology of Omeprazole. *Clinical Pharmacokinetics*, 20, 38-49.

INFARMED (2016). Estatística do medicamento e produtos de saúde 2016.

Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D. & Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65, 166-176.

Javed, M., Ahmad, I., Usmani, N. & Ahmad, M. (2016). Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. *Chemosphere*, 151, 210-219.

Karam, W. G., Goldstein, J. A., Lasker, J. M. & Ghanayem, B. I. (1996). Human CYP2C19 is a major omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 24, 1081-1087.

Katzung, B. G., Masters, S. B. & Trevor, A. J. (2012). *Basic & Clinical Pharmacology*, New York, The McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC.

Kirby, M. F., Neall, P., Bateman, T. A. & Thain, J. E. (2004). Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999–2001. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 71-78.

Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A. & Albanis, T. A. (2016). Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, 569-570, 732-750.

Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90, 2354-2366.

Larguinho, M., Costa, P. M., Sousa, G., Costa, M. H., Diniz, M. S. & Baptista, P. V. (2014). Histopathological findings on *Carassius auratus* hepatopancreas upon exposure to acrylamide: correlation with genotoxicity and metabolic alterations. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 1293-1302.

Lee, S., Jung, D., Kho, Y., Ji, K., Kim, P., Ahn, B. & Choi, K. (2015). Ecotoxicological assessment of cimetidine and determination of its potential for endocrine disruption using three test organisms: *Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, and *Danio rerio*. *Chemosphere*, 135, 208-216.

Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187, 193-201.

Li, Z.-H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J. & Randak, T. (2010). Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chemico-Biological Interactions*, 183, 98-104.

Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P. & Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 319-327.

Lin, A. Y.-C., Yu, T.-H. & Lin, C.-F. (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*, 74, 131-141.

Maksymiv, I. V., Husak, V. V., Mosiichuk, N. M., Matviishyn, T. M., Sluchy, I. Y., Storey, J. M., Storey, K. B. & Lushchak, V. I. (2015). Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, 67-75.

Malins, D. C. (2018). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, CRC Press.

Mannervik, B., Helena Danielson, U. & Ketterer, B. (1988). Glutathione Transferases—Structure and Catalytic Activit. *Critical Reviews in Biochemistry*, 23, 283-337.

Mekkawy, I. A. A., Mahmoud U.M. , E.T., W. & M., N. (2012). Protective Roles of Tomato Paste and Vitamin E on Cadmium-induced Histological and Histochemical Changes of Liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7, 240-265.

Melo, S. A. S., Trovó, A. G., Bautitz, I. R. & Nogueira, R. F. P. (2009). Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, 32, 188-197.

Modesto, K. A. & Martinez, C. B. R. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.

Monosson, E. & Stegeman, J. J. (1991). Cytochrome P450E (P450IA) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: Comparison of response in fish from georges bank and narragansett bay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 765-774.

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

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. & Nebert,

D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., MacKinnon, M. D. & Dixon, D. G. (2006). Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 365-377.

Nevado, J. J. B., Peñalvo, G. C., Dorado, R. M. R. & Robledo, V. R. (2014). Simultaneous determination of omeprazole and their main metabolites in human urine samples by capillary electrophoresis using electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 92, 211-219.

Novotna, A., Srovnalova, A., Svecarova, M., Korhonova, M., Bartonkova, I. & Dvorak, Z. (2014). Differential Effects of Omeprazole and Lansoprazole Enantiomers on Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Hepatocytes and Cell Lines. *PLOS ONE*, 9, e98711.

Nunes, B., Antunes, S. C., Gomes, R., Campos, J. C., Braga, M. R., Ramos, A. S. & Correia, A. T. (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, 371-381.

Nunes, B., Braga, M. R., Campos, J. C., Gomes, R., Ramos, A. S., Antunes, S. C. & Correia, A. T. (2015b). Ecotoxicological effect of zinc pyrithione in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology*, 24, 1896-1905.

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

Nunes, B., Capela, R. C., Sérgio, T., Caldeira, C., Gonçalves, F. & Correia, A. T. (2014). Effects of chronic exposure to lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the

European eel, *Anguilla anguilla*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 5689-5700.

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

Oikari, A. & Jimenez, B. (1992). Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activity in sunfish liver by β -naphthoflavone and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23, 89-102.

Oliveira, L. L. D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O. & Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 123-131.

Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V. L., Pacheco, M. & Santos, M. A. (2010). Antioxidant Responses Versus DNA Damage and Lipid Peroxidation in Golden Grey Mullet Liver: A Field Study at Ria de Aveiro (Portugal). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 454-463.

Ortiz de García, S., Pinto Pinto, G., García Encina, P. & Irusta Mata, R. (2013). Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Science of The Total Environment*, 444, 451-465.

Pacheco, M. & Santos, M. A. (1998). Induction of Liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by Cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40, 71-76.

Pal, A., Gin, K. Y.-H., Lin, A. Y.-C. & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment*, 408, 6062-6069.

Pal, S., Kokushi, E., Koyama, J., Uno, S. & Ghosh, A. R. (2012). Histopathological alterations in gill, liver and kidney of common carp exposed to chlorpyrifos. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47, 180-195.

Parolini, M. & Binelli, A. (2012). Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology*, 21, 379-392.

Pedrajas, J. R., Peinado, J. & López-Barea, J. (1995). Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions*, 98, 267-282.

Pereira, B. F., da Silva Alves, R. M., Pitol, D. L., Senhorini, J. A., de Cássia Gimenes de Alcântara Rocha, R. & Caetano, F. H. (2012). Morphological gill analysis of fish species *Prochilodus lineatus* after exposure to pollutants. *J. Environment Analitic Toxicol*, 2, 130–134.

Petrović, M., Gonzalez, S. & Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 685-696.

Petsalo, A., Turpeinen, M., Pelkonen, O. & Tolonen, A. (2008). Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry utilizing sub 2µm particle size column. *Journal of Chromatography A*, 1215, 107-115.

Poleksic, V. & Mitrovic-Tutundzic, V. (1994.). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (ed.) *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Oxford: Fishing New Books.

Puscas, I., Coltau, M., Baican, M. & Domuta, G. (1999). Omeprazole Has a Dual Mechanism of Action: It Inhibits Both H⁺,K⁺ ATPase and Gastric Mucosa Carbonic Anhydrase Enzyme in Humans (In Vitro and In Vivo Experiments). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, 530-534.

Ramesh, M., Anitha, S., Poopal, R. K. & Shobana, C. (2018). Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C₁₈H₂₆ClN₃) on certain enzymological and

histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Toxicology Reports*, 5, 18-27.

Ramos, A. S., Correia, A. T., Antunes, S. C., Gonçalves, F. & Nunes, B. (2014). Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 1221-1228.

Reimer, C. (2013). Safety of long-term PPI therapy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27, 443-454.

Ritter, J., Flower, R., Henderson, G. & Rang, H. (2011). *Rang & Dale's Pharmacology*, Edinburgh, Churchill Livingstone.

Rodrigues, A. R. (2013). *Resíduos farmacêuticos no ambiente*. Mestrado Integrado, INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ.

Rodrigues, S., Antunes, S. C., Correia, A. T. & Nunes, B. (2016). Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Science of The Total Environment*, 545-546, 591-600.

Rodrigues, S., Antunes, S. C., Nunes, B. & Correia, A. T. (2017). Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 53, 164-176.

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A. & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44, 578-588.

Sachs, G. & Wallmark, B. (1989). The Gastric H⁺,K⁺-ATPase: The Site of Action of Omeprazole. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24, 3-11.

Sales, C. F., Silva, R. F., Amaral, M. G. C., Domingos, F. F. T., Ribeiro, R. I. M. A., Thomé, R. G. & Santos, H. B. (2017). Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyology*, 15.

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

Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45-95.

Saravana Bhavan, P. & Geraldine, P. (2000). Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 50, 331-339.

Sayed, A. E. D. H., Mekkawy, I. A. & Mahmoud, U. M. (2012). Histopathological Alterations in Some Body Organs of Adult *Clarias Gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to 4-nonylphenol. In: Garcia, M. D. (ed.) *Zoology*. West Palm Beach: InTech.

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

Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P. (2005). *Anatomia & Fisiologia*, Lisboa, Editora Lusodidacta.

Selmoni, O. M., Maitre, D., Roux, J., Wilkins, L. G. E., Marques da Cunha, L., Vermeirssen, E., Knörr, S., Robinson-Rechavi, M. & Wedekind, C. (2017). Sex-Specific Changes In Gene Expression And Delayed Sex Differentiation In Response To Estrogen Pollution In Grayling (Salmonidae). *bioRxiv*.

Semsar, K., Perreault, H. A. N. & Godwin, J. (2004). Fluoxetine-treated male wrasses exhibit low AVT expression. *Brain Research*, 1029, 141-147.

Sheen, E. & Triadafilopoulos, G. (2011). Adverse Effects of Long-Term Proton Pump Inhibitor Therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 56, 931-950.

Shih, H., Pickwell, G. V., Guenette, D. K., Bilir, B. & Quattrochi, L. C. (1999). Species differences in hepatocyte induction of CYP1A1 and CYP1A2 by omeprazole. *Human & Experimental Toxicology*, 18, 95-105.

Shiizaki, K., Ohsako, S., Kawanishi, M. & Yagi, T. (2008). Omeprazole Alleviates Benzo[a]pyrene Cytotoxicity by Inhibition of CYP1A1 Activity in Human and Mouse Hepatoma Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103, 468-475.

Shin, J. M. & Sachs, G. (2008). Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. *Current gastroenterology reports*, 10, 528-534.

Shivanna, B., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X. I. & Moorthy, B. (2011). Omeprazole Attenuates Hyperoxic Lung Injury in Mice via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Is Associated with Increased Expression of Cytochrome P450A Enzymes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339, 106-114.

Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaiskou, N., Magoulas, A., Rossi, a. r., Rye, M., Triantafyllidis, A. & Tsigenopoulos, C. (2018). *Gilthead seabream -Sparus aurata*.

Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Singh, H., Oleksiak, M. F. & Celander, M. (1997). Cytochromes P450 (CYP) in Tropical Fishes: Catalytic Activities, Expression of Multiple CYP Proteins and High Levels of Microsomal P450 in Liver of Fishes From Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116, 61-75.

Stevens, A. (2001). *Anatomía patológica*, ELSEVIER ESPANHA.

Tolosa, E. M. C., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A. & de Freitas Neto, A. G. (2003). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*, Editora Manole Ltda.

Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H. R. & Schwaiger, J. (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, 151-166.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178-189.

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

Varadarajan, R., Sankar, H. H. S., Jose, J. & Philip, B. (2014). Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4, 1-12.

Veiga-Gomez, M., Nebot, C., Franco, C. M., Miranda, J. M., Vazquez, B. & Cepeda, A. (2017). Identification and quantification of 12 pharmaceuticals in water collected from milking parlors: Food safety implications. *J Dairy Sci*, 100, 3373-3383.

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

Wall, K. L. & Crivello, J. (1998). Chlorzoxazone Metabolism by Winter Flounder Liver Microsomes: Evidence for Existence of a CYP2E1-like Isoform in Teleosts. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151, 98-104.

Wallmark, B. (1986). Mechanism of Action of Omeprazole. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 21, 11-16.

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

Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J. & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30, 347-570.

Wilson, J. M., Bunte, R. M. & Carty, A. J. (2009). Evaluation of Rapid Cooling and Tricaine Methanesulfonate (MS222) as Methods of Euthanasia in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48, 785-789.

Wood, C. M. & Soivio, A. (1991). Environmental Effects on Gill Function: An Introduction. *Physiological Zoology*, 64, 1-3.

Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y. & Tanaka, H. (2006). Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Science and Technology*, 53, 65-72.

Yao, X. & Forte, J. G. (2003). Cell Biology of Acid Secretion by the Parietal Cell. *Annual Review of Physiology*, 65, 103-131.

Yonkos, L. T., Fisher, D. J., Reimschuessel, R. & Kane, A. S. (2000). *Atlas of fathead minnow normal histology*. [Em linha]. Disponível em: <http://aquaticpath.php.ufl.edu/fhm/resp.html> [Consultado em: Date 14/08/2018].

Zena, R., Speciale, A., Calabrò, C., Calò, M., Palombieri, D., Saija, A., Cimino, F., Trombetta, D. & Lo Cascio, P. (2015). Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo[a]pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 116-125.