

João Carlos Costa Campos

**Efeito dos salicilatos em *Salmo trutta fario*:
enzimas antioxidantes e alterações
histopatológicas**



**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

Porto, Setembro 2013

João Carlos Costa Campos

**Efeito dos salicilatos em *Salmo trutta fario*:
enzimas antioxidantes e alterações
histopatológicas**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, Setembro 2013

Efeito dos salicilatos em *Salmo trutta fario*: enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas

Discente:

João Carlos Costa Campos

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia

Co-Orientador:

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

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

Este trabalho foi apresentado sob a forma de painel no 6º Encontro de Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP) que decorreu de 13 a 15 de Fevereiro de 2013 no Porto:

J.C. Campos, R.G. Gomes, A.S. Ramos, S.C. Antunes, B. Nunes, A.T. Correia. 2013. Enzymatic and histological alterations in liver and gills of *Salmo trutta fario* after salicylic acid chronic exposure. IJUP13. Porto, Portugal.

Resumo

A presença de fármacos nos ecossistemas aquáticos tem sido frequentemente reportada. Os organismos aquáticos, principalmente os peixes, na presença de xenobióticos ativam mecanismos de defesa, como alterações das enzimas antioxidantes e modificações tecidulares, que visam minimizar e/ou compensar os danos tóxicos que resultam frequentemente destas interações. O ácido salicílico (AS) é um fármaco usado na medicina humana devido à sua ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética, bem como devido à sua atividade em termos da agregação plaquetária, entre outros usos clínicos e cosméticos. De modo a determinar os potenciais efeitos ecotoxicológicos causados pelo AS, utilizou-se um modelo animal de água doce (truta comum, (*Salmo trutta fario*)) cronicamente expostas (28 dias) a este composto, avaliando as possíveis alterações enzimáticas e histológicas causadas, tanto ao nível do fígado como das brânquias. A exposição foi realizada sobre condições controladas laboratorialmente, testando três concentrações diferentes, e ecologicamente relevantes, de ácido salicílico. No final do ensaio, uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa da arquitetura do tecido hepático e branquial foi realizada, assim como uma avaliação quantitativa das lamelas brânquiais. O *stress* oxidativo foi quantificado através da determinação da atividade das isoenzimas glutathione-S-transferases (GSTs), glutathione reductase (GRed), da glutathione peroxidase total e selênio dependente (GPx) e da catalase (CAT). Uma determinação dos danos lipoperoxidativos foi realizada através da quantificação dos níveis de peroxidação lipídica (ensaio dos TBARS) no fígado. Os dados obtidos demonstraram a ocorrência de *stress* oxidativo, evidenciada através do aumento da atividade da GPx e GRed no fígado, e alterações histopatológicas significativas nas brânquias do organismo-teste, sugerindo uma relação causa-efeito com os níveis de ácido salicílico na água. No fígado, apesar de terem sido observadas algumas lesões tecidulares, a análise semi-quantitativa sugere que as mesmas não modificaram significativamente a capacidade de sobrevivência do organismo.

Palavras-chave: ácido salicílico; enzimas; *stress* oxidativo; histologia; trutas

Abstract

The presence of pharmaceutical drugs in aquatic ecosystems has been widely reported. Aquatic organisms, namely fishes, in the presence of xenobiotics, display specific defense mechanisms, such as antioxidant enzymes and tissue alterations. Salicylic acid (SA) is used in human medicine as an analgesic and antipyretic drug and shows also an activity in terms of platelet aggregation, among other clinical and cosmetic uses. In order to assess the ecotoxicological effects potentially elicited by SA, in a freshwater animal model, brown trout individuals (*Salmo trutta fario*) were chronically exposed (28 days) to this compound, in order to evaluate any enzymatic and histological damage caused by salicylic acid, in gills and liver. The experiment was carried out under laboratory-controlled conditions, with ecologically relevant salicylic acid concentrations. After the exposure period, a qualitative and semi-qualitative evaluation of the gills and liver architecture was performed, and also a quantitative evaluation of various lamellar structures. Oxidative stress was quantified through the determination of glutathione S-transferases (GSTs), glutathione reductase (GRed), total and selenium-dependent glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities. The index of lipid peroxidative damage was also assessed by the quantification of TBARS in the liver. The data obtained showed increasing levels of oxidative stress, evidence by an increased activity of GPx and GRed in the liver, and also histological changes in gills of the test-organism, suggesting a close cause-effect relationship with the levels of salicylic acid in water. In liver, despite certain observable tissue lesions, the semi-quantitative analysis suggests that they do not significantly alter the survival capacity of the organism.

Key words: salicylic acid; enzymes; oxidative stress; histology; trout

Agradecimentos

A conclusão desta tese foi conseguida graças ao esforço de um conjunto de pessoas que me apoiaram e guiaram durante todo o processo, permitindo assim obter no final uma sensação de satisfação e de auto-realização.

Ao Prof. Doutor Alberto Correia pela sua orientação, paciência e dedicação que mostrou durante a realização da exposição animal, das práticas histológicas laboratoriais e análise dos seus resultados, e pelas criteriosas revisões das versões preliminares desta dissertação. Agradeço ainda por ter disponibilizado os recursos do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) para a realização da componente experimental, em particular das exposições e técnica histológica.

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes pela enorme disponibilidade, perseverança e sacrifício que demonstrou no decurso deste trabalho, pela sua orientação durante os procedimentos laboratoriais dos biomarcadores enzimáticos e interpretação dos resultados, assim como por todo o seu auxílio na realização da análise estatística. Agradeço também pelo acolhimento e por proporcionar no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) as condições necessárias à realização da componente enzimática deste estudo.

À Prof^ª. Doutora Sara Antunes pela simpatia e acompanhamento durante a fase laboratorial no CESAM.

À Rita Gomes por ser minha companheira do meu percurso académico, desta dissertação e de muito mais, sem ela nada disto teria sido alcançado.

Finalmente, aos meus pais, António Campos e Palmira Costa, e aos meus irmãos, Luís, Mariana e Ana Campos por todo o sacrifício e paciência que tiveram durante este 5 anos.

Um muito obrigado a todos...

Índice

1. Introdução	14
1.1. Enquadramento geral	14
1.2. Fármacos no ambiente aquático: anti-inflamatórios não esteroides	16
1.2.1. O ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico.....	17
2. Principais órgãos para avaliação dos biomarcadores	19
3. Biomarcadores	22
3.1. Contextualização.....	22
3.2. Classificação	23
3.2.1. Enzimas de biotransformação.....	24
3.2.2. Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo	26
3.2.3. Índices bioquímicos de danos oxidativos (peroxidação lipídica).....	30
3.2.4. Parâmetros fisiológicos e morfológicos	31
4. Peixes como organismos-teste - <i>Salmo trutta fario</i>	33
4.1. <i>Salmo trutta fario</i>	34
5. Objetivos	34
6. Material e Métodos	35
6.1. Aquisição e exposição dos peixes.....	35
6.2. Avaliação histopatológica.....	37
6.2.1. Preparação das amostras	37
6.2.2. Avaliação qualitativa e semi-quantitativa de fígado e brânquias	37
6.2.3. Avaliação quantitativa das brânquias	38
6.3. Avaliação de biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica.....	39
6.3.1. Preparação das amostras	39
6.3.2. Quantificação da atividade da enzima glutationa peroxidase.....	40
6.3.3. Quantificação da atividade da enzima glutationa redutase.....	40
6.3.4. Quantificação da atividade das isoenzimas glutationa-S-transferases	41
6.3.5. Quantificação da atividade enzimática da catalase.....	41
6.3.6. Peroxidação lipídica (TBARS – <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>).....	41

6.3.7	Quantificação da proteína total	42
6.4	Análise estatística	43
7.	Resultados	43
7.1.	Histopatologia	43
7.1.1.	Análise qualitativa e semi-quantitativa das brânquias.....	43
7.1.2.	Análise qualitativa e semi-quantitativa do fígado	46
8.1.3	Análise quantitativa das brânquias	49
7.2.	Biomarcadores enzimáticos	51
7.3.	Peroxidação lipídica (TBARS)	53
8.	Discussão dos resultados	54
9.	Conclusão	60
10.	Bibliografia	63

Índice de figuras

- Figura 1.** Estrutura química do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) [Imagem adaptada de KAVI (2013)].....19
- Figura 2.** Corte transversal de brânquia de *Pimephales promelas* (barra = 16.7 μm ; técnica de H&E): (1) Lamela primária; (2) Lamela secundária; (3) Células epiteliais; (4) Células mucosas; (5) Células Pilar; (6) Lacuna (lúmen capilar); (7) Eritrócitos dentro de lúmen capilar; (8) Células de cloreto; (9) Célula bastonete; (10) Células basais indiferenciadas (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).....20
- Figura 3.** Corte transversal de tecido hepático de *Pimephales promelas* com técnica de hematoxilina-eosina (H&E) (barra = 22.8 μm). (1) Hepatócito com vacúolos de glicogénio e núcleo central; (2) Vias biliares; (3) Secção transversal de um sinusóide composto de seis hepatócitos em torno de um capilar; (4) Secção sagital de um sinusóide; (5) Tecido conjuntivo; (6) Centro de melanomacrófagos; (7) Veia central (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).....21
- Figura 4:** Exemplificação das medições efetuadas a nível do tecido branquial de *Salmo trutta fario* após a exposição crónica (28 dias) a AS. Comprimento da lamela secundária (SLL); espessura da lamela secundária (SLW); distância interlamelar (ID); e a espessura do epitélio basal (BET). Técnica de H&E. Magnificação de 100X39
- Figura 5.** Aparência da arquitetura normal dos filamentos brânquias de *Salmo trutta fario* após a exposição crónica de 28 dias de um indivíduo do grupo controlo. Técnica de H&E. Magnificação de 100X;44
- Figura 6.** Várias alterações histopatológicas observadas nas brânquias de *Salmo trutta fario* após exposição de 28 dias a concentrações crescentes de AS (setas): (A) Aneurisma; (B) Hiperplasia da lamela secundária; (C) Hiperplasia da lamela primária; (D) Levantamento epitelial da lamela secundária; (E) Necrose; (F) Fusão das lamelas secundárias. Técnica de H&E. Magnificação de 100X;45
- Figura 7.** Valores do índice patológico branquial (Ib) em *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Estão representados os valores médios e respetivos erros padrões. Os grupos com alterações

estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett; $P < 0,05$) estão marcados com um asterisco.....46

Figura 8. Aparência da arquitetura normal do fígado de *Salmo trutta fario* (indivíduo do grupo controlo). Técnica de H&E. Magnificação de 400X47

Figura 9. Várias alterações histopatológicas observadas no tecido hepático de *Salmo trutta fario* após exposição de 28 dias a concentrações crescentes de AS (setas): (A) Alargamento dos sinusóides; (B) Diversos pontos hemorrágicos; (C) Hiperplasia generalizada dos hepatócitos; (D) Inflamação tecidual; (E) Necrose; (F) Vacuolização generalizada. Magnificação de 400X; Técnica de H&E.....48

Figura 10: Valores do índice patológico hepático (Ih) em *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Estão representados os valores médios e respetivo erro padrão. Não foram observadas alterações estatisticamente diferentes entre os diferentes grupos experimentais (OneWay Anova, $P > 0,05$).....49

Figura 11. Análise quantitativa das estruturas das brânquias de *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico (média e erro padrão): **A)** Espessura (μm) do epitélio basal (BET); **B)** Distância (μm) interlamelar das brânquias (ID); **C)** Comprimento (μm) da lamela secundária (SLL); **D)** Espessura (μm) da lamela secundária (SLW); **F)** Valor de PAGE - Foram observada alterações estatisticamente diferentes entre o grupo controlo e os grupos de tratamento (OneWay Anova; $P > 0,05$) nos grupos marcados com asterisco(*).....50

Figura 12. Valores da atividade da enzimática nas brânquias e fígado de *Salmo trutta fario* referente a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico (média e erro padrão): **A)** CAT brânquias; **B)** CAT fígado; **C)** GRed; **D)** GRed brânquias; **E)** GSTs; **F)** GSTs; **G)** GPx total; **H)** GPx dependente de selénio. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett; $P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).....53

Figura 13. Valores de concentração de TBARS (média e erro padrão) no fígado de *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Não foram observadas alterações estatisticamente diferentes entre o grupo controlo e os grupos de tratamento (OneWay Anova; $P > 0,05$).....53

1. Introdução

1.1. Enquadramento geral

Na União Europeia são utilizados na medicina humana múltiplos compostos farmacêuticos, atingindo-se valores de aproximadamente 3000 substâncias diferentes, entre as quais se destacam os anti-inflamatórios, os beta-bloqueadores, os contraceptivos orais, os reguladores do metabolismo lipídico, e os antibióticos, entre outros. Paralelamente, estas substâncias são utilizadas na medicina veterinária, principalmente os das classes farmacoterapêuticas dos antibióticos e anti-inflamatórios (Jones *et al.*, 2002; Huschek *et al.*, 2002; Khan e Ongerth, 2004). Inevitavelmente, o uso destes compostos leva a que estes atinjam o meio ambiente, nomeadamente o compartimento aquático, tanto através dos esgotos municipais e hospitalares (no que diz respeito aos fármacos de uso humano), como através de excreção direta no solo de animais medicados, e pelo uso de fertilizantes à base de estrume de animais medicados como prática agrícola, com conseqüente processo de escorrência e lixiviação (Kay *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). No entanto, também na aquicultura são utilizadas substâncias farmacêuticas para potenciar crescimento dos organismos aquáticos (Le e Munekage, 2004; Lalumera *et al.*, 2004), e as descargas industriais e dos resíduos formados nas estações de tratamento de águas (Larsson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Lin e Tsai, 2009), também vão contribuir para o aparecimento destas substâncias no meio aquático. O conjunto de todas estas atividades antrópicas faz com que seja possível detetar estas substâncias a vários níveis, nomeadamente nos influentes (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005; Vieno e Tuhkanen, 2006; Gómez *et al.*, 2007) e efluentes (Koutsouba *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Verenitch *et al.*, 2006) das estações de tratamento de águas residuais, nas águas de superfície, como estuários, rios e lagos (Calamari *et al.*, 2003; Bendz *et al.*, 2005; Moldovan, 2006), assim como em águas subterrâneas (Sacher *et al.*, 2001; Batt *et al.* 2006; Barnes *et al.*, 2008), oceanos (Weigel *et al.*, 2002) e inclusivamente na água destinada ao consumo humano (Loos *et al.*, 2007; Focazio *et al.*, 2008; Benotti *et al.*, 2009).

Apesar do importante papel das estações de tratamento de águas residuais (ETARs) no tratamento e mitigação das descargas antropogénicas, a eficácia da remoção dos fármacos pode não ser conseguida em todos os casos, dependendo fortemente das características físico-químicas destes, como também da tecnologia empregue nas ETARs, pelo que em áreas onde a tecnologia é obsoleta, ou até na ausência de estações

de tratamento, o problema apresenta maior gravidade (Kümmerer *et al.*, 1997; Buser *et al.*, 1998). Esta ineficácia de tratamento leva a um aumento gradual das concentrações de alguns fármacos no compartimento aquático, levando a que sejam detetados normalmente em concentrações que vão dos ng/l aos µg/l. Estes compostos têm sido assinalados no ambiente aquático, essencialmente na última década, graças ao desenvolvimento tecnológico dos métodos de deteção analítica (Jones *et al.*, 2002; Kolpin *et al.*, 2002; Fent *et al.*, 2006). Devido à natureza heterogénea dos fármacos atualmente disponíveis, as suas características físico-químicas são altamente divergentes, levando a diferentes sucessos de depuração nas ETARs, desde uma taxa de remoção de 99%, até ineficiência total, tornando difícil prever a eficácia de um tratamento para um fármaco em particular, assim como a sua prevalência e concentração no meio aquático (Stumpf *et al.*, 1999; Carballa *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006).

Apesar das concentrações encontradas no compartimento aquático serem vestigiais, estes níveis sub-terapêuticos ainda podem apresentar um risco para a saúde humana, principalmente quando os fármacos surgem na água destinada ao consumo humano, assim como para outros organismos não-alvo (Zwiener *et al.*, 2001; Stackelberg *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006). O que torna os fármacos substâncias com elevado interesse como objeto de estudo como poluentes emergentes aquáticos são as suas características físicas e químicas, que fazem com que tenham uma capacidade intrínseca de interação com os diferentes organismos. Os fármacos foram desenhados para terem uma atividade específica no corpo humano ou animal através de interação com uma via metabólica ou molecular específica. Contudo possuem algumas características, nomeadamente a lipofília (adequada para atravessar as barreiras biológicas), e a resistência a transformações metabólicas (para poderem exercer a sua ação durante mais tempo, ou seja, aumentando a sua persistência no organismo), que fazem com que estas substâncias apresentem elevada capacidade de bioacumulação e atividade biológica remanescente nos diferentes organismos (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Christen *et al.*, 2010). Para além deste facto, estes compostos têm a capacidade de se biotransformar em diferentes metabolitos que mantêm ou possuem diferentes atividades toxicológicas, assim como capacidade de interagir, por via de sinergismos, antagonismos ou efeito de adição, com outros fármacos ou seus metabolitos presentes no meio aquático (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Cleuvers, 2003).

Na última década tem havido um aumento dos estudos ecotoxicológicos de forma a tentar evidenciar de uma forma mais concreta a atividade toxicológica dos vários fármacos em diferentes organismos-teste, tendo vários estudos demonstrado os efeitos deletérios de alguns compostos, mesmo nas concentrações residuais normalmente encontradas a nível ambiental. No entanto, ainda existe uma fraca compreensão dos mecanismos toxicológicos envolvidos na atividade biológica destes compostos, assim como as consequências prejudiciais que esta atividade pode trazer a nível dos indivíduos, populações e ecossistemas (Triebkorn *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006).

Deste modo, é necessário aumentar o número de estudos no âmbito ecotoxicológico, de modo a que se possam compilar informações importantes para determinar a segurança e o impacto da forma como são utilizadas e tratadas estas substâncias, sendo reflexo desta preocupação crescente a introdução de diretivas comunitárias, nomeadamente a diretiva 2001/83/EC, e de guias de avaliação do risco ambiental destas substâncias, efetuadas pela Agência Europeia do Medicamento (EMEA, 2006; Fent *et al.*, 2006).

1.2. Fármacos no ambiente aquático: anti-inflamatórios não esteroides

Dentro dos vários grupos de fármacos detetados a nível ambiental, destacam-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), sendo este o grupo de fármacos com maior consumo mundial (Fent *et al.*, 2006). Este grupo de fármacos é encontrado à entrada e à saída das ETARs em concentrações que podem chegar aos $\mu\text{g/l}$, sendo os mais comuns o diclofenac, o ácido acetilsalicílico, o ácido salicílico, o paracetamol, o ibuprofeno e o naproxeno (Santos *et al.*, 2010). Os AINEs destacam-se por ter atividade inibitória (reversível ou irreversível) de uma ou ambas das isoformas das enzimas ciclooxigenases (COX 1 e 2) responsáveis pela biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidónico (Vane e Botting, 1998). A ação destas enzimas e das prostaglandinas em processos bioquímicos de organismos não mamíferos tem sido demonstrada, fazendo com que estes organismos sejam potenciais alvos para estas biomoléculas (Lundholm, 1997; Zou *et al.*, 1999).

Alguns fármacos que pertencem a esta classe farmacoterapêutica têm sido caracterizados em termos da sua ecotoxicidade, como é o caso do diclofenac, tendo sido demonstrado os seus efeitos em estudos com vários organismos-teste em diferentes concentrações (e.g. Hoeger *et al.*, 2005; Schmitt-Jansen *et al.*, 2007; DeLorenzo *et al.*,

2008). Outros fármacos dentro deste grupo também demonstraram ter o potencial para exercer efeitos ecotoxicológicos: o ibuprofeno (e.g. Lange *et al.*, 2006; Flippin *et al.*, 2007; Heckamann *et al.*, 2007), o naproxeno e os seus fotoderivados (Isidori *et al.*, 2005) e o paracetamol (Henschel *et al.*, 1997; Marques *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007).

Em diversas situações, a exposição dos organismos a fármacos conduz a situações de toxicidade que, frequentemente, envolvem o estabelecimento de *stress* oxidativo, nomeadamente devido à produção de diversas espécies reativas, como espécies reativas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), espécies reativas de nitrogénio (RNS – *Reactive Nitrogen Species*), assim como compostos intermédios. Estas espécies são altamente reativas, podendo desta forma levar a graves efeitos deletérios nos organismos expostos, nomeadamente danos ao nível de macromoléculas celulares, por via da peroxidação lipídica, danos na estrutura do DNA e inativação de enzimas (Winston e Di Giulio, 1991) Em certos casos, pode haver um distúrbio no balanço celular redox, envolvendo o rácio glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) e de NADH/NAD⁺, podendo consequentemente levar à morte celular (Valko *et al.*, 2005; Gimbert *et al.*, 2006; Regoli *et al.*, 2006). Contudo, os organismos têm a capacidade de minimizar ou inibir a ação deletéria dos ROS, ao possuírem diversos mecanismos de defesa, tais como os antioxidantes, que mantêm as concentrações destas espécies em níveis diminuídos (Yang *et al.*, 2012). A resposta adaptativa dos organismos perante os ROS pode ser usada como potenciais biomarcadores (Winston e Di Giulio, 1991; Filho, 1996; Antunes, 2010). Estas respostas biológicas podem ser aferidas, por exemplo, através do aumento das atividades das enzimas antioxidantes, e da concentração dos compostos antioxidantes não enzimáticos, ou pela avaliação dos danos provocados por estas espécies reativas, (ex.: oxidação de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, bem como as perturbações no equilíbrio redox).

1.2.1. O ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) é o fármaco mais consumido a nível mundial, sendo que se estima um consumo de aproximadamente 40 mil toneladas por ano (Warner e Mitchell, 2002). O consumo elevado deste fármaco e dos seus derivados deve-se ao seu fácil acesso e aos seus diversos usos na medicina, sendo utilizado vulgarmente como analgésico, antipirético e anti-inflamatório para diversas situações clínicas, como seja protetor cardiovascular (devido às suas propriedades anti-agregantes plaquetárias),

substância anti-comedogénica, bactericida, queratolítico e rubefaciente, com diversas aplicações na área de cosmetologia (Di Salvo, 2002; Vane e Botting, 2003; Medline Plus, 2008). O ácido salicílico (AS), metabolito do AAS (ácido 2-hidroxibenzoico (Fig. 1) é um beta-hidroxiácido, apresentando-se na sua forma pura como cristal branco, com solubilidade moderada em água, e bastante solúvel em álcool, éter e clorofórmio (Balali-Mood e Balali-Mood, 1996; Yates e Harvery, 1999; Ugurlucan *et al.*, 2012).

No organismo o AAS sofre hidrólise por esterases existentes ao nível do plasma, fígado e sistema gastrointestinal, formando o seu principal metabolito, o ácido salicílico, sendo este responsável pela sua ação farmacológica (Davison, 1971). Este composto sofre metabolização hepática em torno dos 80%, onde sofre conjugações com a glicina formando o ácido salicílico, e com o ácido glucurónico formando derivados acetilados e fenólicos glucuronados. Contudo ainda, pequenas quantidades de ácido salicílico são hidroxiladas em ácido gentísico. A sua eliminação (90%) ocorre principalmente através da excreção renal, tanto na sua forma livre, como na sua forma conjugada com o ácido glucurónico e glicina, sendo que a percentagem de forma livre excretada depende do pH da urina, e pode variar entre 10% a 85% (Parke, 1968). Os conjugados eliminados no meio ambiente são facilmente transformados novamente em ácido salicílico através da ação de enzimas, como as beta-glucoronidasas, existentes em bactérias como *Escherichia coli*, e nalguns peixes e moluscos (Schomburg e Salzmann, 1991). Deste modo é importante avaliar o rácio de AAS/AS encontrado nas águas. Os salicilatos têm efeitos conhecidos no Homem como um iniciador de uma resposta de *stress* oxidativo, levando a danos peroxidativos e hepatotoxicidade (Doi e Horie, 2010). Contudo, estes efeitos poderão também ser potencialmente transponíveis para organismos não-alvo, já que os alvos farmacológicos deste composto também se encontram presentes em outros vertebrados e invertebrados, fazendo com que sejam potenciais alvos de estudo de relevância ecotoxicológica (Doi *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999; Doi *et al.*, 2002).

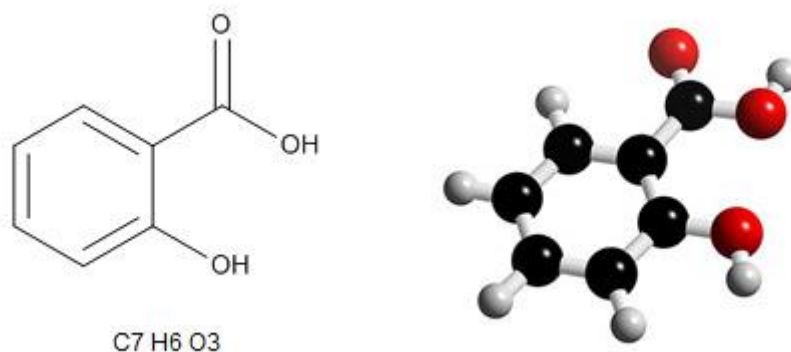


Figura 1. Estrutura química do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) [Imagem adaptada de KAVI (2013)].

2. Principais órgãos para avaliação dos biomarcadores

A escolha dos órgãos usados para avaliação dos biomarcadores depende das suas características e do xenobiótico em causa, sendo esta escolha crucial para obtenção de dados ecotoxicológicos relevantes. Apesar da maioria dos compostos aos quais os peixes estão expostos terem uma distribuição quase ubíqua no seu organismo, alguns órgãos têm uma exposição mais extensa devido a função que desempenham. São por isso órgãos de excelência para a determinação dos vários biomarcadores as brânquias, o fígado, os rins e a pele (Barreto 2007).

As brânquias desempenham como função biológica principal as trocas gasosas que permitem a oxigenação das células dos peixes, manutenção da osmorregulação, excreção de certos compostos, e ainda desempenham um papel importante na biotransformação dos xenobióticos (Hughes, 1984; Wood e Soivio, 1991; Flores-Lopes e Thomaz, 2011). Trata-se de órgãos inseridos na cavidade opercular, estando divididas em vários arcos, dos quais divergem os filamentos branquiais. Destes, derivam as lamelas secundárias, sendo estas constituídas por um epitélio pavimentoso simples, sustentado por células pilares que permitem a inserção dos capilares sanguíneos, formando um tecido altamente vascularizado. Esta vascularização permite o estabelecimento de trocas gasosas, assim como a manutenção do balanço iónico. Ainda se destacam outras células importantes na base dos filamentos branquiais como células imunitárias, nomeadamente macrófagos e linfócitos, células mucosas, melanócitos e

células de cloreto (Fig. 2) (Hibiya, 1982; Ferguson, 1989). Esta arquitetura tecidular promove uma elevada área de superfície, permitindo assim um maior contato entre o meio aquático envolvente e a superfície respiratória dos peixes. Adicionalmente, o facto do epitélio que separa os dois meios apresentar uma espessura de apenas alguns micrómetros (Hughes, 1984; Wood e Soivio, 1991), torna as brânquias um órgão de elevada sensibilidade à presença de poluentes aquáticos, e como tal um órgão-alvo de máxima importância ecotoxicológica (Fernandes e Mazon, 2003; Barreto 2007).

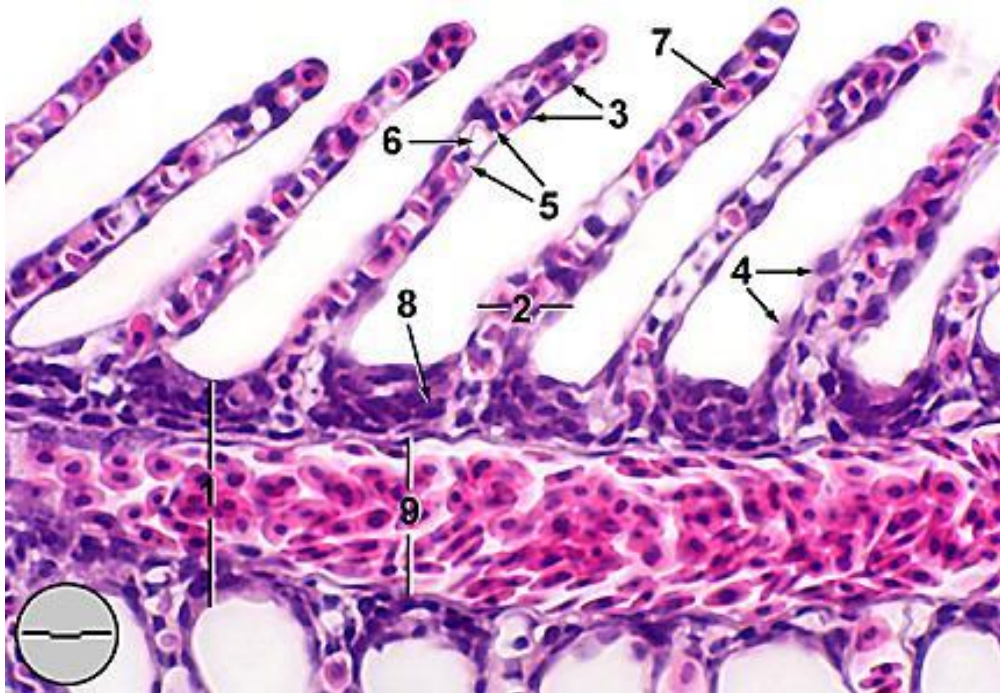


Figura 2. Corte transversal de brânquia de *Pimephales promelas* (barra = 16.7 μm ; técnica de H&E): (1) Lamela primária; (2) Lamela secundária; (3) Células epiteliais; (4) Células mucosas; (5) Células Pilar; (6) Lacuna (lúmen capilar); (7) Eritrócitos dentro de lúmen capilar; (8) Células de cloreto;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

O fígado, por sua vez, é o principal órgão metabolizador dos organismos aquáticos, sendo a sua unidade estrutural e funcional básica o hepatócito. Estas células, uni ou binucleadas e de forma poliédrica, possuem características únicas que aumentam a sua capacidade de metabolização, conferindo a habilidade de biotransformação de várias substâncias endógenas e exógenas, facilitando a sua excreção pelas várias vias disponíveis. Estas células apresentam a importante função fisiológica de

armazenamento de nutrientes e estão diretamente relacionadas com o metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa, que penetra no tecido conjuntivo do parênquima hepático, e por uma cadeia de vasos sanguíneos de grande calibre, sinusóides, ductos biliares, tecido pancreático e centros de melanomacrófagos (Hibiya, 1982; Moon *et al.* 1985; Triebkorn *et al.* 1997). Estes últimos representam um conjunto de células, nomeadamente monócitos, contendo melanossomas entre os lisossomas, assim como uma acumulação de ceróides e lipofuscina, onde são gerados radicais livres que funcionam como microbicidas (Roberts, 1975) (Fig. 3).

O fígado desempenha funções vitais para o normal funcionamento do organismo, como seja a manutenção do metabolismo basal e um importante papel na destoxificação, bioativação, acumulação e excreção de xenobióticos (Moon *et al.*, 1985; Triebkorn *et al.*, 1997). Este conjunto de características tornam o fígado um órgão de elevado interesse no estudo dos diversos potenciais efeitos tóxicos dos contaminantes (Matos *et al.*, 2007; Carola *et al.*, 2009).

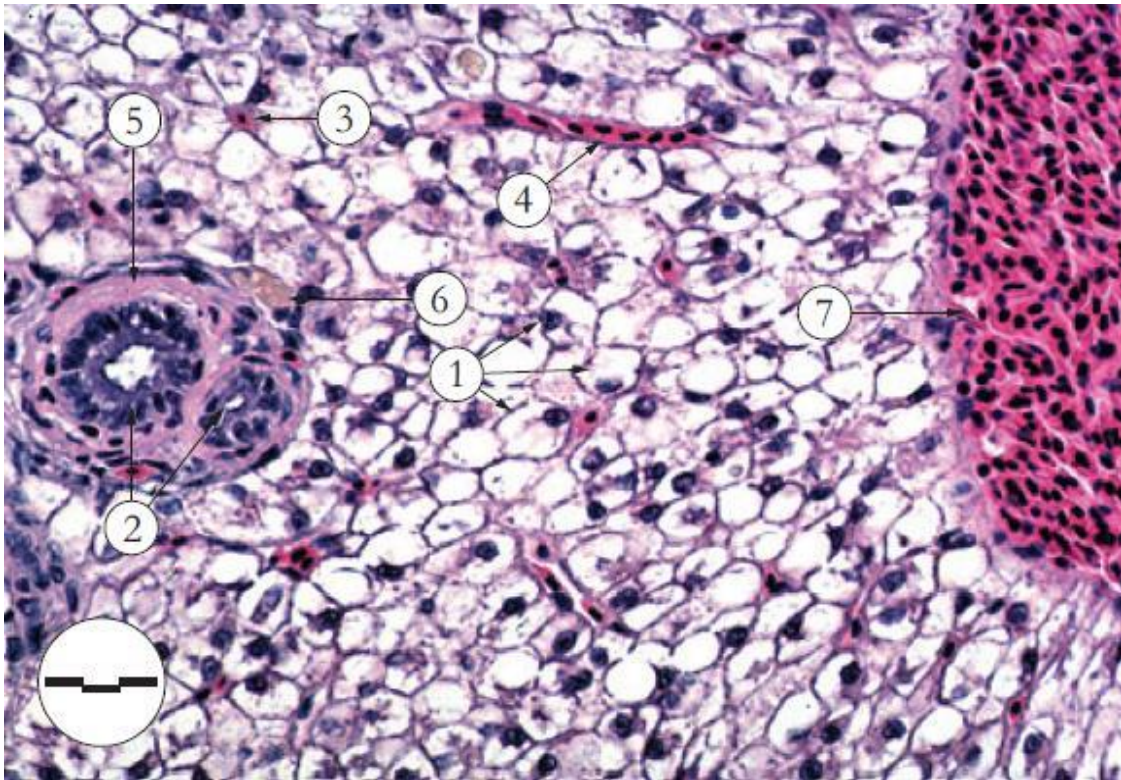


Figura 3. Corte transversal de tecido hepático de *Pimephales promelas* com técnica de hematoxilina-eosina (H&E) (barra = 22.8 μ m). (1) Hepatócito com vacúolos de glicogénio e núcleo central; (2) Vias biliares; (3) Secção transversal de um sinusóide composto de seis

hepatócitos em torno de um capilar; (4) Secção sagital de um sinusóide; (5) Tecido conjuntivo; (6) Centro de melanomacrófagos; (7) Veia central (Adaptado de Yonkos *et al.*, 2000).

3. Biomarcadores

3.1. Contextualização

A presença de fármacos nos vários compartimentos aquáticos pode levar a uma exposição contínua dos organismos residentes a estes compostos, podendo esta interação ser traduzida em diversas alterações dos parâmetros bioquímicos; esta interação pode ser quantificada, fornecendo indicações relativas à severidade e consequência da exposição ao agente tóxico (Timbrell, 1998). Este é o princípio base dos biomarcadores utilizados em Ecotoxicologia, onde através de medições efetuadas ao nível dos fluídos biológicos, células ou tecidos, obtêm-se indicações de alterações no organismo resultantes da ação direta do composto ou como resposta adaptativa do organismo ao mesmo (NRC, 1987).

Um biomarcador pode ser definido como qualquer alteração na resposta biológica do organismo, podendo ser esta ao nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental, a qual pode estar associada com a exposição ou efeito tóxico de um determinado composto ambiental (Peakall, 1994). De uma forma geral, os biomarcadores devem reunir um conjunto de características, nomeadamente possuírem uma boa resposta à substância-teste, baixo custo, serem de fácil execução, aplicáveis sob diversas condições e terem uma elevada sensibilidade a uma ampla gama de substâncias (Nunes *et al.*, 2008).

Na maioria das situações, um único biomarcador não é suficiente para que se possa determinar com precisão a toxicidade de um composto, sendo necessário recorrer a uma bateria de biomarcadores, o que pode levar a incompatibilidades nas respostas obtidas sobre a influência da exposição, tornando imprescindível uma avaliação prévia de quais são os biomarcadores mais adequados para a avaliação em causa. A escolha dos biomarcadores a usar para a avaliação toxicológica da exposição de um organismo a um determinado poluente deve ter em linha de conta o organismo-teste e o tipo de substância em estudo (Bradley, 2012).

3.2. Classificação

Na literatura científica existem diversas classificações e subclassificações de vários autores, não havendo um consenso universal na terminologia aplicada aos biomarcadores existentes (van der Oost *et al.*, 2003). Uma das classificações mais usadas na literatura científica consiste em dividi-los em biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Pertencem ao primeiro grupo as substâncias exógenas, ou os seus metabolitos, ou produtos de interação entre o agente xenobiótico e uma estrutura molecular ou da própria célula-alvo, que possam ser detetados e medidos num dos compartimentos do organismo exposto. Os biomarcadores de efeito representam alterações bioquímicas, fisiológicas ou ainda outras alterações dos tecidos ou fluídos do organismo, que possam ser medidos e associados a um perda na saúde ou doença do organismo. Finalmente, os biomarcadores de suscetibilidade são definidos como alterações adaptativas à exposição ao xenobiótico, adquiridas ou inatas do organismo, incluindo alterações genéticas e alterações dos recetores, geradas como resposta à exposição, que alterem a suscetibilidade destes ao xenobiótico (NRC, 1987; WHO 1993).

Apesar da simplicidade desta classificação, a sua utilização apresenta lacunas pelo facto de poder eventualmente ocorrer a sobreposição de algumas das classificações, podendo haver biomarcadores que se integrem em mais do que uma subdivisão ou ainda que não se insiram completamente em nenhuma. Assim, alguns autores propõem uma classificação diferente, mais abrangente, onde os biomarcadores são distribuídos segundo a sua ação fisiológica ou funcional, dividindo-os em vários grupos restritos e específicos (Peakell, 1992; van der Oost *et al.*, 2003).

Dentro dos biomarcadores mais comumente utilizados nos peixes destacam-se os seguintes: 1) enzimas de biotransformação; 2) parâmetros de *stress* oxidativo; 3) produtos de biotransformação; 4) proteínas de *stress*, metalotioneínas e de resistência a multixenobióticos; 5) parâmetros hematológicos; 6) parâmetros imunológicos; 7) parâmetros reprodutivos e endócrinos; 8) parâmetros neuromusculares; 9) parâmetros genotóxicos; 10) parâmetros fisiológicos e morfológicos; e 11) alterações comportamentais (van der Oost *et al.*, 2003).

3.2.1. Enzimas de biotransformação

Este grupo corresponde aos biomarcadores mais utilizados para a detecção de alterações por exposição a diversos xenobióticos. Este facto deve-se à sua sensibilidade, podendo estas enzimas serem inibidas ou induzidas na presença do xenobiótico ou dos seus metabolitos.

Quando existe o aumento da sua atividade, diz-se que houve indução enzimática, sendo a síntese *de novo* de mais enzima o tipo de indução mais importante (Stegeman e Hahn, 1994; Bucheli e Fent, 1995; van der Oost *et al.*, 2003). Na inibição há um bloqueio da atividade enzimática por múltiplos fatores, como a formação de complexos ou de forte ligações entre a enzima e o composto inibidor (van der Oost *et al.*, 2003). Geralmente, estas enzimas podem ser divididas em dois grupos distintos, nomeadamente as enzimas de fase I e II do metabolismo. As enzimas de fase I são um grupo específico de enzimas envolvidas na primeira etapa do metabolismo dos xenobióticos, responsáveis por tornar o composto mais hidrofílico facilitando a sua excreção (van der Oost *et al.*, 2003). As enzimas de fase II caracterizam-se por catalisar reações entre os xenobióticos ou os seus metabolitos com ligandos endógenos. Estes ligandos são normalmente moléculas grandes de carácter polar, como a glutatona e o ácido glucorónico, ou ainda aminoácidos e açúcares, facilitando assim a excreção do produto final formado (Lech e Vodcnik, 1985; Commandeur *et al.*, 1995).

Algumas das substâncias exógenas possuem na sua estrutura química inicial grupos funcionais-chave para que ocorram estas reações, como grupos carboxilo (COOH), hidroxilo (OH) ou amina (NH₂), sofrendo assim a conjugação direta com estes ligandos endógenos. No entanto, apenas as substâncias capazes alterarem os seus grupos funcionais estão aptas para sofrerem reações de fase II, sendo estas dirigidas pelas enzimas de metabolismo de fase I (Lech e Vodcnik, 1985; Sijm e Opperhuizen, 1989; George, 1994).

Este grupo de enzimas desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia da maioria dos organismos (incluindo dos peixes), assim como na destoxificação de várias substâncias exógenas, sendo a maioria destas substâncias conjugadas com o ácido glucorónico e principalmente com a glutatona (George, 1994). Substâncias com um

caráter eletrofílico elevado têm maior tendência a serem excretadas via conjugação com a glutathiona, enquanto que as substâncias nucleofílicas têm maior afinidade para a conjugação com o ácido glucorónico. Estas duas conjugações são as mais importantes nos peixes, tendo as outras vias de conjugação um papel menor na destoxificação de substâncias, sendo apenas utilizadas para um pequeno número de moléculas. Este facto reflete-se na quantidade de informação existente na literatura científica sobre o funcionamento destas duas vias principais em detrimento das outras vias de conjugação (George, 1994).

O estudo da atividade destas enzimas e dos seus co-fatores como biomarcadores é mais difícil comparativamente com as enzimas de fase I, uma vez que as respetivas alterações são menos pronunciadas e facilmente mascaradas por causas naturais como o sexo, a maturidade sexual, a temperatura e a estação do ano, entre outros. Contudo, pequenas alterações destas enzimas e dos seus co-fatores são de extrema importância, uma vez que podem ter repercussões nocivas para estes organismos, refletindo-se assim a importância do seu estudo como biomarcadores de poluentes aquáticos (Stegeman *et al.*, 1992; George, 1994; van der Oost *et al.*, 1996).

a) Glutathiona-S-transferases

A reação de conjugação da glutathiona reduzida com os diversos compostos eletrofílicos é catalisada pelas glutathiona-S-transferases, sendo este um grupo de isoenzimas solúveis diméricas, multigénicas e multifuncionais. A sua ação no organismo é diversa, estando presentes no transporte intercelular da bilirrubina, sais biliares e do grupo heme, e na síntese de prostaglandinas e de leucotrienos (van der Oost *et al.*, 2003).

No entanto, a sua função principal reside na sua ação destoxicante, defendendo o organismo contra compostos oxidantes, evitando assim danos no DNA e lipoperoxidação celular (George, 1994). Esta ação protetora ocorre através da reação da glutathiona reduzida com os grupos eletrofílicos, substituindo o hidrogénio, o cloro, grupos nitrogenados e outros grupos por este co-fator (Stegeman *et al.*, 1992; Commandeur *et al.*, 1995).

Esta família de enzimas pode ser dividida em quatro classes (a, m, p e q) consoante a sua especificidade para os substratos, sequência proteica e reações imunológicas cruzadas (George, 1994). A sua localização principal é no citosol das células hepáticas, podendo no entanto estar presente em outros órgãos (Sijm e Opperhuizen, 1989).

A atividade desta família enzimática quantificada na maioria dos ensaios laboratoriais é normalmente avaliada em termos do total das atividades das diversas isoenzimas, e não de forma específica para cada classe, sendo esta determinação habitualmente realizada recorrendo a um substrato artificial denominado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). É de notar o facto de este substrato ser conjugado por todas as isoformas das GSTs, com a exceção da isoforma da classe q (George, 1994; van der Aar *et al.*, 1996).

A indução enzimática hepática das GSTs pode ser modulada por diversas substâncias nocivas, tendo este aumento de conjugação hepática sido verificado anteriormente em várias espécies de peixes (George, 1994). Esta indução já foi descrita através de dois mecanismos: via o recetor-Ah, ou através do aumento da transcrição da respetiva subunidade genética antes da metabolização do composto. Deste modo, devido à sensibilidade aos contaminantes ambientais, a determinação da atividade desta enzima em ensaios ecotoxicológicos permite averiguar o impacto causado por um determinado xenobiótico (Pickett e Lu, 1989; Rushmore e Pickett, 1990; George, 1994).

3.2.2. Parâmetros de *stress* oxidativo

São vários os compostos ou os seus respetivos metabolitos que exercem toxicidade no organismo através de um fenómeno de *stress* oxidativo. Este fenómeno ocorre quando existe uma ação citotóxica mediada por ROS, sendo estas espécies derivadas reduzidas de oxigénio com uma elevada capacidade oxidativa (van der Oost *et al.*, 2003).

Destacam-se como espécies reativas mais comuns, o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), alcoxila (RO^{\cdot}) e peroxilo (ROO^{\cdot}) (Barber e Bernheim, 1967; Chance *et al.*, 1979; Winston e Di Giulio, 1991). O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) não é um verdadeiro ROS, pelo facto de não possuir eletrões desemparelhados, sendo por vezes incluído erradamente na definição de radical livre (Halliwell e Gutteridge, 1989;

Pereira, 1994). No entanto, possui muitas das características oxidantes dos ROS e está envolvido no seu metabolismo.

Estas espécies reativas exercem uma ação nociva através da sua potente capacidade reativa com componentes intracelulares, nomeadamente macromoléculas críticas para o funcionamento celular, tais como enzimas (por exemplo, inativação), lípidos membranares (causando o efeito denominado de lipoperoxidação), ácidos nucleicos, podendo em última instância levar à morte celular (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1989; Winzer, 2001).

Existe uma vasta gama de substâncias capazes de produzir ROS, no entanto no que diz respeito aos biomarcadores de interesse ambiental, dá-se especial ênfase àquelas capazes de induzir a produção de ROS através de um ciclo redox, ou seja, estruturas químicas que se tornam espécies reativas através da metabolização endógena do organismo. Estas espécies incluem dióis aromáticos e quinonas, nitroaromáticos e hidroxilaminas aromáticas, biperidilos e certos quelatos de metais de transição (Winston e Di Giulio, 1991).

Num ciclo redox, tipicamente o xenobiótico sofre uma redução enzimática através de uma redutase dependente de NADPH, como o sistema cyt P450 RED, originando um metabolito radicalar. Posteriormente, este radical cede o seu eletrão desemparelhado a uma molécula de oxigénio, formando o radical superóxido e novamente o xenobiótico original, permitindo recomeçar o ciclo. Assim, em cada ciclo ocorrem dois eventos: a oxidação de um redutor endógeno e a formação de um radical livre. Estes eventos têm um caráter nocivo para o organismo e a acumulação destes radicais livres pode levar ao *stress* oxidativo (Winston e Di Giulio, 1991; Goepfert *et al.*, 1995).

Os efeitos da ação oxidante nos organismos podem ser usados como biomarcadores, e incluem alterações a vários níveis, nomeadamente na capacidade de resposta adaptativa, com o aumento da atividade enzimática das enzimas antioxidantes, ou com o aumento da concentração de compostos não-enzimáticos; manifestações de toxicidade mediada pela ação oxidante, como oxidação proteica, lipídica ou dos ácidos nucleicos; ou ainda alterações do *status* redox dos tecidos (Winston e Di Giulio, 1991; Filho, 1996).

Os organismos aquáticos são dotados de defesas endógenas contra estes agentes oxidantes, existindo um gama variada destes compostos capazes de neutralizar a ação nociva dos ROS. Dentro dos mais comuns destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona-peroxidase (GPx) e a glutathiona-reductase (GRed), bem como algumas substâncias não enzimáticas antioxidantes de baixo peso molecular como a glutathiona reduzida, β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol e ubiquinol₁₀ (Stegeman *et al.*, 1992; Lopez-Torres *et al.*, 1993).

a) Catalase

A catalase (CAT) é uma família de enzimas contendo um grupo heme, o qual é responsável pela remoção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) do organismo, metabolizando-o em água (H_2O) e oxigénio (O_2). Contrariamente a algumas peroxidases que têm a capacidade de remover vários peróxidos lipídicos para além do H_2O_2 , a CAT apenas possui a capacidade de reduzir o H_2O_2 . Esta enzima em algumas espécies de seres vivos também desempenha um pequeno papel na metabolização de alguns compostos hidrogenados como metanol, etanol, alguns fenóis e o ácido fórmico (Aebi, 1984).

Esta família enzimática localiza-se primariamente nos peroxissomas da maioria das células, estando envolvida no metabolismo dos ácidos gordos, podendo a interpretação das alterações da sua atividade ser difícil (Stegeman *et al.*, 1992; Filho, 1996). No entanto, devido à sua importância na defesa antioxidante dos organismos e à sensibilidade da sua atividade quando os organismos são expostos a diversos compostos exógenos, esta enzima é um importante biomarcador na avaliação toxicológica de poluentes aquáticos, tendo sido amplamente utilizado em diversos estudos ecotoxicológicos (e.g. Atli e Canli, 2007; Avilez *et al.* 2008; Zanette *et al.*, 2008). A medição da atividade desta enzima é normalmente realizada através da avaliação da degradação do H_2O_2 exógeno por medição espectralométrica (Sazuka, 1989; Stegeman *et al.*, 1992; Filho, 1996).

b) Glutathione peroxidase

As peroxidases são enzimas que possuem a capacidade de metabolizar diversos tipos de peróxidos aos seus álcoois correspondentes, numa reação de oxidação-redução usando diferentes co-fatores, dependendo da peroxidase em questão (van der Oost *et al.*, 2003). Nos peixes a principal peroxidase é a glutathione peroxidase (GPx), enzima que usa como co-fator a glutathione reduzida (GSH).

Tal como a catalase, esta enzima possui a capacidade de metabolizar o H_2O_2 a H_2O e O_2 , reduzindo paralelamente a GSH à sua forma oxidada (GSSG), contrariamente à catalase que usa uma molécula de H_2O_2 como dadora na redução de outra molécula de H_2O_2 (van der Oost *et al.*, 2003).

A GPx é uma enzima citosólica tetramérica, dependente ou não de selénio, sendo a forma dependente de selénio a com maior expressão. Este átomo de selénio está presente no centro reativo da enzima na forma de selenol, num resíduo de aminoácido denominado de selenocisteína, sendo este grupo oxidado na presença de diversos peróxidos, levando à formação de um derivado designado de ácido selénico. Este é convertido novamente a selenol numa reação de oxidação-redução de dois passos por intermédio de duas moléculas de GSH, formando no final duas moléculas de GSSG e a forma ativa da enzima (Berg *et al.*, 2004; Cogo *et al.*, 2009).

Este ciclo permite que esta enzima desempenhe um papel fundamental na proteção antioxidante dos organismos, especialmente na prevenção da peroxidação lipídica por hidroperóxidos lipídicos, por terminação da propagação em cadeia característico da peroxidação lipídica, através da redução rápida de radicais livres formados (Lauterburg *et al.*, 1983; Arthur, 2000).

A atividade destas enzimas como biomarcador tem sido largamente utilizada na deteção precoce de respostas oxidativas em plantas, sendo contudo a sua utilização nos animais mais escassa, apesar de ter havido um aumento crescente da atenção prestada a esta enzima (Stegeman *et al.*, 1992).

c) Glutationa redutase

A glutaciona redutase (GRed) é uma enzima antioxidante que não desempenha um papel direto como uma enzima antioxidante tal como as descritas anteriormente. No entanto, desempenha o importante papel de manter a homeostasia entre a GSH/GSSG durante condições de *stress* oxidativo (Winston e Di Giulio, 1991).

Esta homeostasia é garantida através da catálise da reação de transformação da forma de disulfureto de glutaciona oxidada à sua forma reduzida, GSH, com a oxidação em simultâneo do NADPH a NADP⁺. Esta dependência reacional de NADPH permite a medição espectrofotométrica da sua atividade através do consumo desta substância e diminuição consequente de absorvância (Worthington e Rosemeyer, 1974).

Apesar da pouca atenção recebida até agora, a atividade desta enzima já foi sugerida e utilizada em inúmeros estudos como um potencial biomarcador, e uma vez que o rácio dos níveis de glutaciona reduzida e oxidada é considerado como um potencial biomarcador. O estudo da atividade da GRed neste contexto pode sustentar a sua importância como um importante biomarcador em organismos aquáticos expostos a poluentes aquáticos (van der Oost *et al.*, 2003).

3.2.3. Índices bioquímicos de danos oxidativos (peroxidação lipídica)

Existem descritos na literatura científica vários efeitos bioquímicos e fisiológicos associados ao aumento de radicais livres no organismo, sendo alguns destes utilizados como biomarcadores, destacando-se a peroxidação lipídica, o TOSC (*Total Oxyradical Scavenging*), oxidação do DNA, a metahemoglobinemia, e o *status* redox.

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPOX) é um fenómeno em cadeia devido à reação dos radicais livres com os lípidos poliinsaturados membranares e lipoproteínas, sendo este fenómeno extensamente estudado dada a sua importância biológica no processo de *stress* oxidativo (Stegeman *et al.*, 1992; Hageman *et al.*, 1992; Lima e Abdala, 2001). Este fenómeno consiste fundamentalmente em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No primeiro estágio, ocorre o ataque de um radical livre, tal como o OH[·], RO[·] ou ROO[·], aos lípidos membranares, levando à extração de um átomo

de hidrogénio a partir do grupo metileno (-CH₂-), originando um carbono com um eletrão desemparelhado (-CH·-), e um radical lipídico (L·) com conseqüente rearranjo do ácido gordo polinsaturado formando dienos conjugados (Lima e Abdala, 2001; Catalá, 2009). O radical L· formado por sua vez reage com uma molécula de oxigénio originando um radical peroxilo lipídico (LOO·), o qual é capaz de extrair um átomo de hidrogénio do ácido gordo polinsaturado adjacente levando à formação de um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um segundo L· (Catalá, 2006). Através de uma reação de Fenton, envolvendo a passagem do Fe (II) a Fe (III), ocorre a formação de um radical altamente reativo, o radical alcóxilo lipídico (LO·) a partir da clivagem redutiva do LOOH. Ambos os radicais lipídicos, o alcóxilo e o peroxilo, estimulam a propagação da LPOX por extrair consecutivamente um átomo de hidrogénio dos ácidos gordos adjacentes (Buettner, 1993). A este fenómeno dá-se o nome de propagação.

A fase de terminação pode ocorrer de diversas formas, como a neutralização dos radicais livres por espécies antioxidantes, a formação de produtos não radicalares e o consumo dos radicais livres, entre outros pós este processo de fragmentação, ocorre a formação de diversos compostos tóxicos, nomeadamente hidrocarbonetos, como o etano, aldeídos reativos como hidroxinon-2-enal, e malondialdeído. Deste modo, verifica-se que a LPOX para além de levar à destruição dos lípidos das membranas celulares, contribui para a formação de radicais livres e de compostos eletrofílicos, podendo estas substâncias reagir com moléculas adjacentes, como proteínas e DNA (Gregus, 2008). Estes compostos formados podem ser usados como biomarcadores de *stress* oxidativo.

3.2.4. Parâmetros fisiológicos e morfológicos

Contrariamente aos restantes biomarcadores, os parâmetros fisiológicos e morfológicos são considerados biomarcadores mais tardios, estando já presente uma interação química e celular, resultando na maioria das situações em efeitos irreversíveis nos organismos (Hinton *et al.*, 1992). Os poluentes ambientais podem causar efeitos tóxicos a um nível superior ao celular e tecidual, refletindo-se sobre a forma de alterações morfológicas, aparência, comportamentais, entre outros.

Estes parâmetros podem ser divididos em dois tipos de parâmetros: *gross indices* (índice bruto) e histopatológicos.

a) *Gross índices*

Os poluentes ambientais podem causar efeitos tóxicos a um nível superior ao celular e tecidular, refletindo-se sobre a forma de alterações morfológicas, de aparência e comportamentais, entre outros. Apesar destas alterações serem tardias no ponto de vista ecotoxicológico, a informação adquirida com o seu estudo não deve ser negligenciada, na medida em que estes podem ser usados com um *screening* inicial para a deteção de substâncias potencialmente perigosas, para a deteção de populações mais sensíveis, menor capacidade de tolerância a exposição, entre outros (Mayer *et al.*, 1992). Dentro dos efeitos morfológicos destaca-se, pelo seu uso em peixes na investigação, o índice hepatossomático (LSI – *Liver Somatic Indice*) para a identificação de possíveis doenças e alterações deste órgão, e o fator de condição (CF - *condition factor*) para a avaliação geral da saúde do organismo (van der Oostel *et al.*, 2003).

b) Histopatologia

É de aceitação generalizada o valor elevado como biomarcador que os efeitos histopatológicos assumem no estudo toxicológico em peixes, uma vez que respondem a uma grande variedade de poluentes antropogénicos, e representam diretamente a saúde dos organismos expostos, assim como permitem avaliar pequenas alterações muitas vezes impercetíveis ou difíceis de avaliar através de outros biomarcadores (Hinton *et al.*, 1992).

A histologia é uma ferramenta sensível para o diagnóstico dos efeitos tóxicos dos xenobióticos por ação direta, ou indireta, sob os tecidos dos organismos expostos aos xenobióticos. São avaliados mais frequentemente o fígado, os rins, a pele e as brânquias, uma vez que estes órgãos desempenham importantes funções fisiológicas que os expõem mais facilmente a estas substâncias (Bernet *et al.*, 1999).

Na avaliação histopatológica muitas vezes pode ser difícil estabelecer uma relação direta entre causa-efeito, principalmente quando apenas é realizada uma avaliação

qualitativa, em parte com alguma subjetividade. Deste modo, e de forma a obter dados numéricos para poder estabelecer relações mais assertivas, atualmente vários autores sugerem que seja realizado uma avaliação semi-quantitativa e quantitativa através de índices histopatológicos, permitindo obter avaliações progressivas e padronizadas (Nero *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2008).

4. Peixes como organismos-teste - *Salmo trutta fario*

O biota aquática tem a particularidade de estar constantemente exposto a um elevado número de substâncias antropogênicas, sendo a fonte de contaminação muito diversa, como efluentes industriais e domésticos, drenagem dos solos agrícolas, de aterros sanitários e lixeiras, derrames acidentais ou propositados de substâncias químicas, entre outras causas (Rashed, 2001). Esta exposição traduz-se em diversas alterações nos organismos aquáticos que podem ser monitorizadas ao longo do tempo e avaliadas de forma a determinar a relação de causa-efeito de uma determinada substância no indivíduo.

Os organismos selecionados para o desenvolvimento de testes ecotoxicológicos devem possuir determinadas características genéricas, tais como elevada disponibilidade e abundância, seletividade para os contaminantes, serem geneticamente uniformes e estáveis, representativos do nível trófico no meio ambiente, facilmente devem adaptar-se às condições laboratoriais, amplamente distribuídos, e a sua fisiologia, genética e comportamento devem ser bem estudados e conhecidos para uma interpretação facilitada dos resultados (Costa *et al.*, 2008).

Os organismos do biota aquática podem ser vários, nomeadamente peixes, plantas aquáticas, algas, aves, crustáceos, mamíferos, moluscos e microorganismos, entre outros, desde que se enquadrem nas características desejadas (Akaishi, 2004). Assim, durante as últimas três décadas foi possível assistir à criação de normas internacionais padronizadas que visam definir as condições ótimas para a realização de ensaios ecotoxicológicos, definindo inclusivamente as espécies a utilizar nesses testes.

4.1. *Salmo trutta fario*

Salmo trutta é um peixe que pertence à família *Salmonidae*, podendo ser distinguidas duas variantes diferentes, nomeadamente a *Salmo trutta trutta* e a *Salmo trutta fario*. A primeira variante distingue-se pelo facto de ser uma espécie anádroma, ou seja, durante o seu ciclo de vida migra em diferentes massas de água, vivendo em água salgada, mas reproduzindo-se em água doce. A segunda variante é do tipo potamódroma, ou seja, apenas migra entre diferentes massas de água doce, sendo todo o seu ciclo de vida passado em ambiente limnológico. É uma espécie habitualmente encontrada em rios, ribeiros e lagos, desde que estes apresentem boa oxigenação e temperaturas subtropicais, entre 15,5°C a 18,3°C, sendo mais comum em zonas montanhosas (Hurreau, 2010).

A nível geográfico, esta variante pode ser encontrada no nordeste da Europa e na Ásia, podendo ainda habitar a zona do Mediterrâneo. Demoram cerca de 3 a 4 anos a atingir a maturidade sexual, apresentando um tamanho médio de 40 cm, e alimentando-se essencialmente de insetos aquáticos e terrestres durante a sua vida juvenil, e de moluscos, crustáceos e pequenos peixes durante a vida adulta. A sua época de reprodução normalmente situa-se entre os meses de Setembro a Janeiro (Hurreau, 2010). Apesar de ser considerada como uma espécie que não se encontra em perigo de extinção, sendo classificada pelo IUCN como LC (*Last Concern*) na Península Ibérica (Freyhof, 2013), o efetivo populacional tem diminuído drasticamente, provavelmente, devido a alterações do seu ecossistema, poluição e pesca excessiva (Santos *et al.* 2006).

5. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi determinar experimentalmente, por via de diversos biomarcadores (nomeadamente de stress oxidativo e histopatológicos), os efeitos toxicológicos decorrentes da exposição da espécie de peixe de água doce *Salmo trutta fario* a concentrações sub-letais de ácido salicílico.

Quantificou-se as alterações ocorridas nas atividades das enzimas antioxidantes, nomeadamente na catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferases, ao nível das brânquias e fígado. Adicionalmente avaliou-se a extensão da

peroxidação lípidica ao nível do tecido hepático. Paralelamente registou-se e quantificou-se os efeitos histopatológicos apresentados pelos indivíduos expostos, ao nível do fígado e brânquias.

6. Material e Métodos

6.1. Aquisição e exposição dos peixes

Foram adquiridos 100 exemplares juvenis de *Salmo trutta fario* no Posto Aquícola de Torno-Marão, os quais foram transportados numa arca térmica refrigerada e com oxigenação constante até ao laboratório. Os indivíduos foram posteriormente colocados durante um período de quarentena de 30 dias num tanque de 500 litros com água previamente desclorada, com arejamento, filtração e climatização ($15.35 \pm 0.11^\circ\text{C}$) e fotoperíodo constante (12L:12D). Durante este período foram controlados vários parâmetros físicos-químicos da água, nomeadamente a temperatura, o pH, a concentração de oxigénio dissolvido e a condutividade, utilizando uma sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS). As concentrações de amónia, nitritos e nitratos foram também medidas por reação colorimétrica e leitura num fotómetro (YSI, 9300 Photometer). A renovação parcial (80%) da água do tanque foi feita de 2 em 2 dias. Os peixes foram alimentados *ad libitum* em dias alternados com ração comercial para peixes padronizada. No final, os resíduos alimentares foram aspirados de forma a evitar acumulação e degradação da qualidade da água.

Após o período de quarentena, foram selecionados aleatoriamente 84 exemplares saudáveis, que foram alocados aos grupos controlo (0 µg/l de AS), de baixa concentração (25 µg/l de AS), de concentração média (50 µg/l de AS) e de alta concentração (100 µg/l de AS). Cada grupo teve três réplicas (i.e. 7 indivíduos por réplica).

A escolha das concentrações a usar em cada grupo foi efetuada de acordo com a sua relevância ecológica, designadamente de acordo com os teores ambientais de AS reportados nos efluentes de ETARs (54 µg/L; Besse e Garric, 2008). Assim, foi utilizada uma concentração abaixo desta, de modo a determinar a possibilidade de um limiar de impacto mais baixo; uma concentração semelhante, de modo a ser

ecologicamente relevante; e uma concentração superior, de modo a obter dados relativos a doses superiores às encontradas a nível ecológico.

Cada grupo de peixes foi colocado num aquário de vidro com capacidade de 50 litros, sendo cada aquário disposto numa ordem aleatória permitindo diminuir o impacto de possíveis microclimas e variações abióticas no local de exposição. Após um novo período de quarentena de 5 dias, para habituação dos organismos às novas condições, procedeu-se à exposição crónica destes ao AS durante 28 dias (OECD, 1998).

A concentração desejada em cada aquário foi obtida utilizando diferentes volumes de uma solução *stock* de ácido salicílico (Sigma-Aldrich Ref. W398500, grau de pureza $\geq 99,0$) com uma concentração de 1 g/l previamente preparada. Durante a exposição, foram mantidas as mesmas condições de descloramento da água, filtração, oxigenação e climatização do ambiente, a mesma rotina e técnica de mudança de água e de alimentação. Os parâmetros físicos e químicos anteriormente mencionados foram igualmente determinados. Os valores médios e os respetivos desvios padrões destes parâmetros obtidos durante a exposição foram os seguintes: pH $8,825 \pm 0,175$; O₂ $10,225 \pm 0,339$ mg/l; Temperatura $15,35 \pm 0,10$ °C; Condutividade $247,5 \pm 12,1$ mS/cm; NH₃ $0,38 \pm 0,14$ mg/l; NO₂ $0,07 \pm 0,03$ mg/l; NO₃ $3,55 \pm 0,44$ mg/l). Durante o ensaio a taxa mortalidade do grupo controlo foi inferior a 10%, como estipulado na norma OCDE (1998).

Findo o período de exposição, foram selecionados 60 peixes saudáveis de tamanho e peso similar ($14,5 \pm 1,34$ cm; $26,5 \pm 7,1$ g) (i.e. 15 peixes de cada concentração, ou seja 5 por réplica). Os indivíduos foram anestesiados de forma rápida em gelo, pesados, medidos e eutanaziados, sobre tampão fosfato gelado, retirando-se o fígado e brânquias. Destes órgãos foram retiradas duas amostras: uma para avaliação histológica e outra para avaliação enzimática. Uma das amostras foi armazenada numa arca congeladora a uma temperatura de -80 °C (para a quantificação das atividades enzimáticas/peroxidação lipídica) e outra colocada em solução de Bouin (determinações histológicas).

6.2. Avaliação histopatológica

6.2.1. Preparação das amostras

As amostras de fígado e brânquias foram fixadas quimicamente em solução de Bouin durante 24 horas, seguindo-se a descalcificação (Decalcifying Solution-Lite, Sigma Aldrich Ref. D0818) das mesmas durante 12 horas e posteriormente à sua desidratação através de soluções de etanol de graduação crescente (70%, 80%; 90% e 100%). Seguiu-se a diafanização das amostras com uma solução de xilol (Xylene Substitute, Sigma Aldrich Ref. A5597) durante 2 horas, e finalmente as amostras foram mergulhadas em parafina com grau crescente de pureza (I, II e III) a uma temperatura aproximadamente de 59 °C. Após a inclusão em parafina, os moldes foram seccionados em lâminas delgadas (6-8 µm) com o auxílio de um micrómetro manual rotativo (Reichert-Jung 2030). Os cortes foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina e montados em DPX. As preparações foram visualizadas num microscópio óptico composto (Olympus, CX41) acoplado a uma câmara digital USB (Olympus, SC30). Foram tiradas microfotografias das brânquias e do fígado com uma magnificação de 100 a 400 X.

6.2.2. Avaliação qualitativa e semi-quantitativa de fígado e brânquias

Com o recurso às microfotografias foi realizada uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos tecidos branquiais e hepático. As alterações histopatológicas foram classificadas em 5 categorias diferentes, nomeadamente distúrbios circulatórios (e.g. aneurisma, edema intercelular), degenerativos (e.g. alterações da arquitetura e estruturais, depósitos, necrose, atrofia), proliferativos (e.g. hipertrofia, hiperplasia), inflamatórios (e.g. infiltração, exsudado) e neoplásicos (e.g. tumor malignos ou benignos). A cada categoria foi atribuída uma classificação de importância entre 1 a 3 de acordo com o grau de impacto que tem na saúde do organismo conforme reportado na bibliografia. O valor de 1 foi atribuído a lesões reversíveis de impacto patológico mínimo, o valor 2 foi atribuído a alterações de importância patológica mínima, sendo a lesão reversível na maioria dos casos após a neutralização do agente stressor, e por último, o valor de 3 foi atribuído a lesões de alta importância patológica, sendo estas geralmente irreversíveis e com perda parcial ou total da função do órgão afetado. Além do tipo de lesão observada, também foi considerado o grau de severidade (1 a 7) por

aferição da extensão da área afetada do órgão relativamente a essa patologia (1: 1%-15%; 2: 15%-30%; 3: 30%-45%; 4: 45%-60%; 5: 60%-70%; 6: 70%-90%; 7: 90%-100%).

De acordo com os valores atribuídos aos parâmetros anteriores, obteve-se um índice patológico (IP) para cada órgão (Ib – índice branquial; Ih – índice hepático), sendo o valor deste índice o somatório da multiplicação dos valores atribuídos ao fator de importância e grau de severidade de cada categoria encontrada para cada órgão e indivíduo (Bernet *et al.*, 1999).

6.2.3. Avaliação quantitativa das brânquias

As medições estruturais deste órgão foram realizadas com recurso às microfotografias e a um *software* gratuito (Olympus, *MeasureIT*) segundo o procedimento descrito por Nero *et al.* (2006b). As estruturas utilizadas para esta avaliação foram as seguintes: comprimento da lamela secundária (SLL); espessura da lamela secundária (SLW); distância interlamelar (ID); e espessura do epitélio basal (BET). Para cada filamento branquial foram realizadas três medições de cada uma das estruturas mencionadas (zonas distal, central e proximal do filamento branquial) (Fig. 4). Adicionalmente, a determinação da superfície respiratória disponível para trocas gasosas ao nível das brânquias foi determinada através do valor de PAGE, cuja fórmula é: $\text{PAGE (\%)} = 100 \times [\text{SLL}/(\text{BET} + \text{SLL})]$.

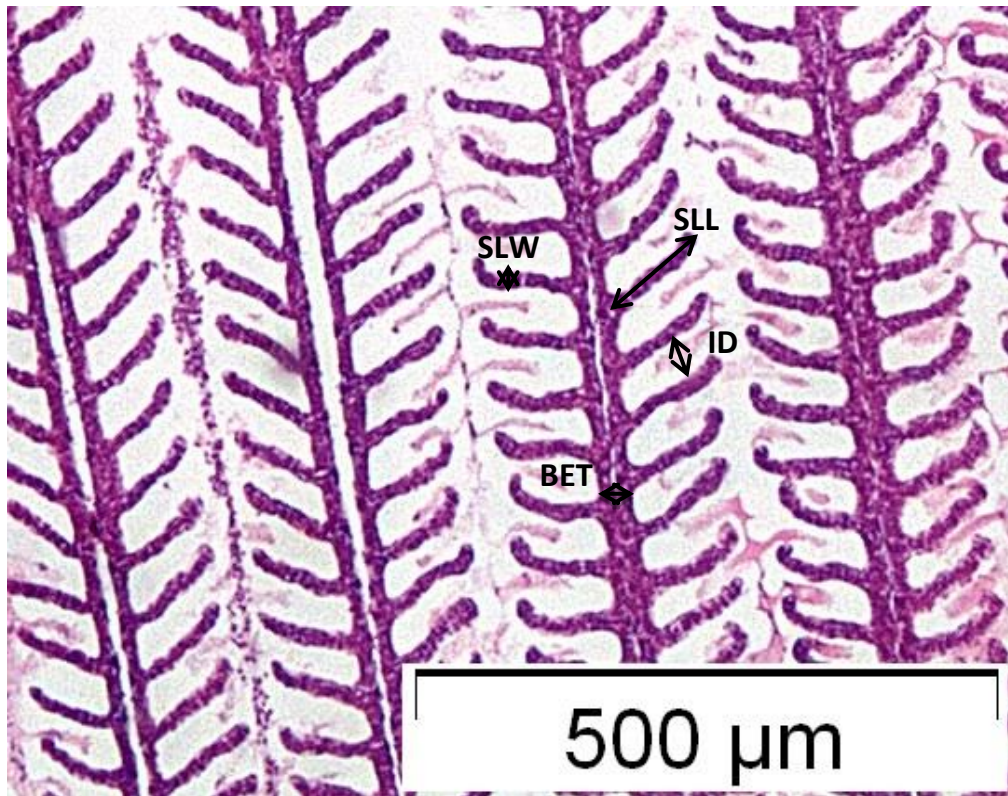


Figura 4: Exemplificação das medições efetuadas a nível do tecido branquial de *Salmo trutta fario* após a exposição crónica (28 dias) a AS. Comprimento da lamela secundária (SLL); espessura da lamela secundária (SLW); distância interlamelar (ID); e a espessura do epitélio basal (BET). Técnica de H&E. Magnificação 100X.

6.3. Avaliação de biomarcadores enzimáticos e peroxidação lipídica

6.3.1. Preparação das amostras

As amostras de fígado e brânquias, previamente congeladas a -80°C , foram homogeneizadas a frio (4°C , em gelo) em tampão fosfato 50 mM, a pH 7,0 com 0,1% de Triton X-100, e com recurso a um homogeneizador mecânico (Ystral). Seguidamente, este homogeneizado foi submetido a uma centrifugação a 15.000 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C . O sobrenadante foi recolhido e dividido em diversos tubos de eppendorf, os quais foram congelados a -80°C para futuras utilizações.

6.3.2. Quantificação da atividade da enzima glutathiona peroxidase

A determinação da atividade da enzima GPx foi efetuada segunda a técnica descrita por Flohé e Günzler (1948). Esta técnica baseia-se na capacidade desta enzima oxidar o NADPH quando a GSSG é reduzida novamente a GSH pela ação da enzima GR, sendo a reação iniciada pela presença de um hidroperóxido que funciona como substrato para a enzima GPx. Uma leitura espectralométrica a 340 nm permite monitorizar a reação e a respetiva atividade da enzima GPx. Uma vez que esta enzima pode ser de dois tipos (dependente ou não dependente de selénio), foi necessário utilizar dois tipos de hidroperóxidos, sendo o peróxido de hidrogénio utilizado para monitorizar a atividade da GPx dependente de selénio, e o cumeno hidroperóxido para monitorizar a atividade da GPx não dependente de selénio.

Após uma diluição adequada para cada um dos homogeneizados dos respetivos órgãos, a atividade da enzima GPx foi determinada através de um leitor espectralométrico de microplacas de 96 poços (Labsystem Multiskan Ex). A leitura foi efetuada a uma temperatura de 25°C, a absorvância lida continuamente a 340 nm durante 5 minutos com intervalos de 10 segundos entre leituras, sendo cada amostra replicada quatro vezes. A atividade enzimática da GPx foi expressa em nmol por minuto por mg de proteína.

6.3.3. Quantificação da atividade da enzima glutathiona reductase

A atividade da enzima GRed foi determinada segundo o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985), sendo este baseado na capacidade desta enzima reduzir a GSSG a GSH através da oxidação do NADPH, monitorizando esta atividade por uma leitura espectralométrica. Assim, após uma diluição conveniente para cada um dos homogeneizados de fígado e brânquias, procedeu-se à sua determinação por leitura espectralométrica em leitor de microplacas de 96 poços (Labsystem Multiskan Ex). A leitura contínua foi realizada no comprimento de onda de 340 nm durante 5 minutos com intervalo de 10 segundos entre cada leitura, a uma temperatura de 25°C, sendo cada amostra replicada quatro vezes. Os resultados obtidos foram expressos em nmol por minuto por mg de proteína.

6.3.4. Quantificação da atividade das isoenzimas glutathione-S-transferases

A determinação da atividade das isoenzimas GSTs foi realizada através de uma determinação espectrofotométrica, segundo a técnica descrita por Habig *et al.* (1974). A determinação baseou-se na capacidade desta enzima conjugar a glutathione com compostos contendo grupos eletrofílicos, nomeadamente o substrato o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Esta reação de conjugação levou à formação de um tioéter, cuja formação pode ser monitorizada através do aumento da sua absorvância no comprimento de onda a 340 nm. Deste modo, tal como nos procedimentos anteriores, após uma diluição prévia dos homogeneizados anteriormente preparados, foi quantificada a atividade das GSTs utilizando um leitor espectrofotométrico de microplacas de 96 poços, sendo cada amostra replicada quatro vezes. A leitura foi realizada a temperatura ambiente de 25°C, com uma leitura contínua de 5 minutos intervalada entre 10 em 10 segundos. Após a determinação da cinética enzimática, os resultados foram expressos em nmol por minuto por mg de proteína.

6.3.5. Quantificação da atividade enzimática da catalase

A quantificação da atividade da CAT foi realizada com base na sua atividade fisiológica, ou seja, decomposição do H₂O₂ em H₂O e oxigénio molecular. Deste modo, foi possível determinar a sua atividade através da monitorização do consumo do H₂O₂ por medição contínua espectrofotométrica no comprimento de onda de absorvância máximo deste composto (240 nm) durante 30 segundos com base no procedimento de Aebi *et al.* (1984). Para a realização desta determinação procedeu-se às diluições necessárias para cada um dos homogeneizados de brânquias e fígado preparados, sendo posteriormente analisada a catálise enzimática num espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu UV-1800). Os resultados da atividade da enzima foram expressos em nmol por minuto por mg de proteína.

6.3.6. Peroxidação lipídica (TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

A determinação da extensão da peroxidação lipídica resultante do *stress* oxidativo, pode ser determinada através da quantificação dos produtos resultantes da peroxidação dos

ácidos gordos por reação com as ROS produzidas durante o cenário de stress oxidativo. A concentração destes produtos naturalmente presentes nos organismos, mas aumentadas em condições oxidantes, é assim proporcional ao *stress* oxidativo existente. Dentro destes produtos formados destaca-se o malondialdeído (MDA), como sendo uma das principais moléculas de baixo peso molecular que se forma durante esta oxidação lipídica. Assim, a determinação da concentração deste produto fornece uma ideia generalista e empírica da extensão dos danos peroxidativos (Janero, 1990). Esta quantificação foi realizada segundo a técnica descrita por Buege e Aust (1978), baseando-se a reação de condensação em meio ácido entre um reagente cromogénico, o ácido tiobarbitúrico, e o MDA, formando um composto cromóforo, com capacidade de absorção a 535 nm, permitindo deste modo a sua quantificação espectrofotométrica. Procedeu-se à leitura das amostras em leitor de microplacas de 96 poços (Labsystem Multiskan Ex), com replicação de quatro vezes para cada amostra. Os resultados obtidos no final foram expressos em mmol de MDA por mg de proteína.

6.3.7 Quantificação da proteína total

De modo a diminuir as variações biológicas dos organismos escolhidos, as atividades das enzimas foram expressas em função da proteína total de cada organismo. A quantificação da proteína total foi realizada individual e simultaneamente para cada uma das determinações enzimáticas e TBARS anteriormente mencionadas, sendo esta quantificação realizada a partir dos mesmos homogeneizados de fígado e brânquias. A técnica utilizada para este ensaio foi descrita por Bradford (1976), baseando-se na alteração da cor de vermelho para azul em meio ácido de um corante (reagente de Bradford), após este se ligar às proteínas existentes no meio. O complexo gerado permanece estável e permite a quantificação da extensão da reação por uma leitura espectrofotométrica, a um comprimento de onda de 595 nm. De modo a relacionar a absorvância obtida com um valor de concentração proteica real, procedeu-se a determinação da absorvância de concentrações crescente de solução padrão de γ -globulina bovina, obtendo-se uma curva de calibração, o que permitiu converter os valores de absorvância das amostras em valores de concentração proteica. A leitura foi realizada em leitor espectrofotométrico de microplacas de 96 poços (Labsystem Multiskan Ex), após as diluições necessárias do reagente e das amostras e após um

tempo de espera de 15 minutos sobre agitação, numa única leitura a 595 nm à temperatura ambiente. Cada amostra foi lida 4 vezes (4 réplicas).

6.4 Análise estatística

Após se ter verificado que os pressupostos relativos à utilização de testes estatísticos paramétricos estavam cumpridos, nomeadamente homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos dados, correu-se uma análise de variância unifatorial (One-Way Anova). Em caso de obtenção de diferenças significativas ($P < 0,05$), fez-se um teste de Dunnett de modo possibilitar a deteção dos grupos de tratamento que apresentassem variações estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo. Não houve diferenças significativas entre réplicas (One-Way Anova; $P > 0,05$). Os valores estão representados como a média e respetivo erro padrão. Foi utilizado um nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram realizadas com recurso a um *software* (Sigmaplot 11).

7. Resultados

7.1. Histopatologia

7.1.1. Análise qualitativa e semi-quantitativa das brânquias

Nas brânquias foi possível observar de uma forma generalizada várias alterações tecidulares, à exceção do grupo controlo que evidenciava uma arquitetura normal das brânquias (Fig. 5). Nos grupos expostos observou-se hiperplasia da lamela primária (Fig. 6C) e secundárias (Fig. 6B), sendo contudo verificada uma maior extensão destas lesões nos grupos submetidos à exposição ao AS. Nestes grupos também foi possível observar fusão das lamelas secundárias (Fig. 6F) e levantamento epitelial da lamela secundária (Fig. 6D) com alguma frequência, e de uma forma mais pontual, situações de aneurismas (Fig. 6A) e de necrose nas concentrações mais elevadas de AS (Fig. 6E).

A análise semi-quantitativa das brânquias (Ib) revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (One-Way Anova: $F = 74,98$, g.l.= 3,55; $P = 0,00$), nomeadamente entre o grupo controlo e os grupos de tratamento de média e alta concentrações (Teste de Dunnett; $P < 0,05$) (Fig. 7).

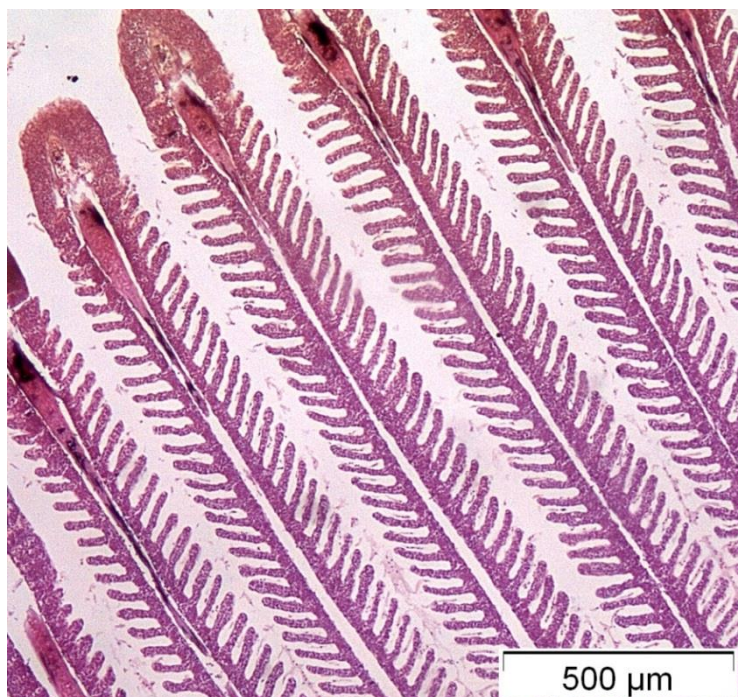


Figura 5. Aparência da arquitetura normal dos filamentos brânquias de *Salmo trutta fario* após a exposição crônica de 28 dias de um indivíduo do grupo controle. Técnica de H&E; Magnificação de 100X

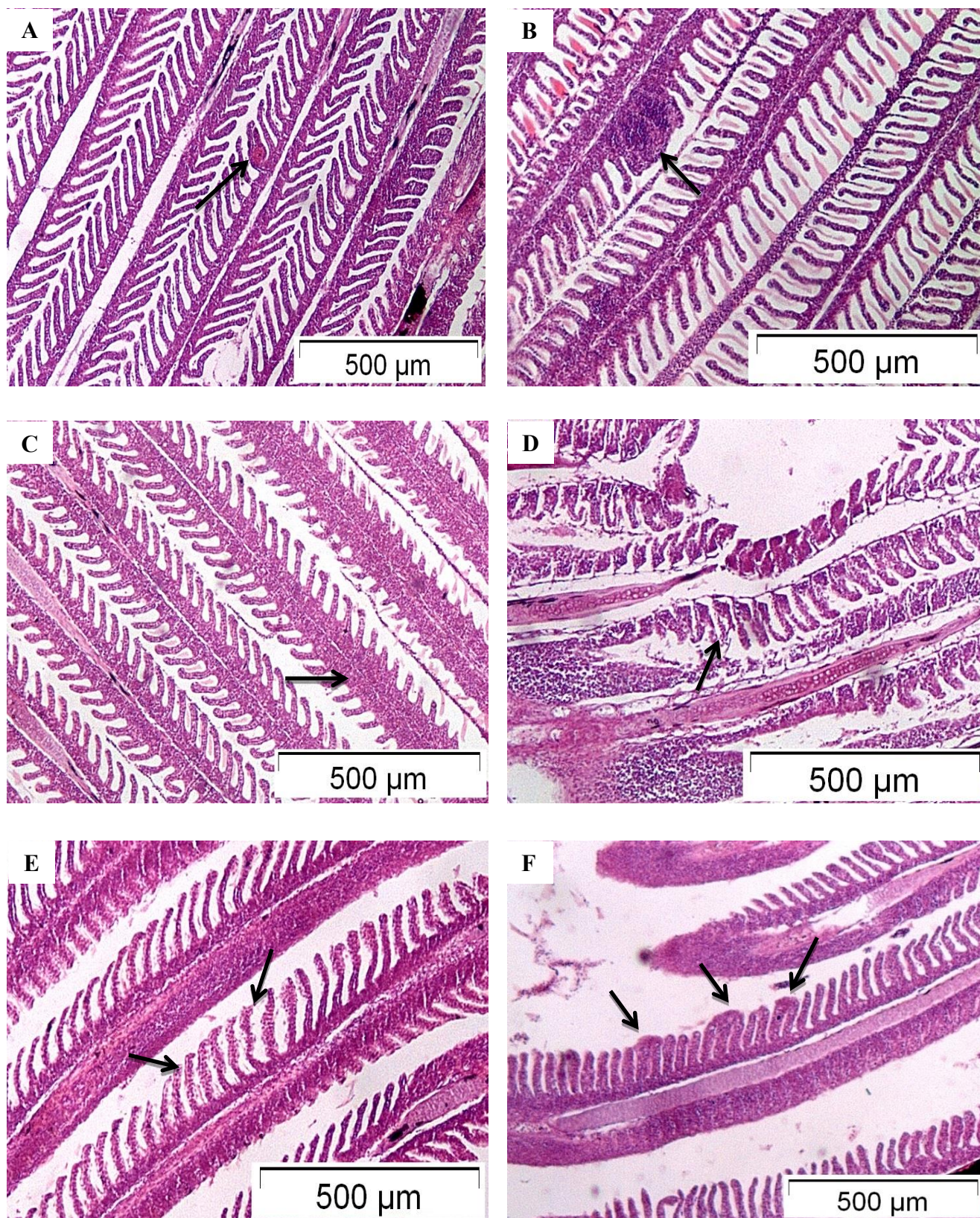


Figura 6. Várias alterações histopatológicas observadas nas brânquias de *Salmo trutta fario* após exposição de 28 dias a concentrações crescentes de AS (setas): (A) Aneurisma; (B) Hiperplasia da lamela secundária; (C) Hiperplasia da lamela primária; (D) Levantamento epitelial da lamela secundária; (E) Necrose; (F) Fusão das lamelas secundárias. Técnica de H&E. Magnificação de 100X

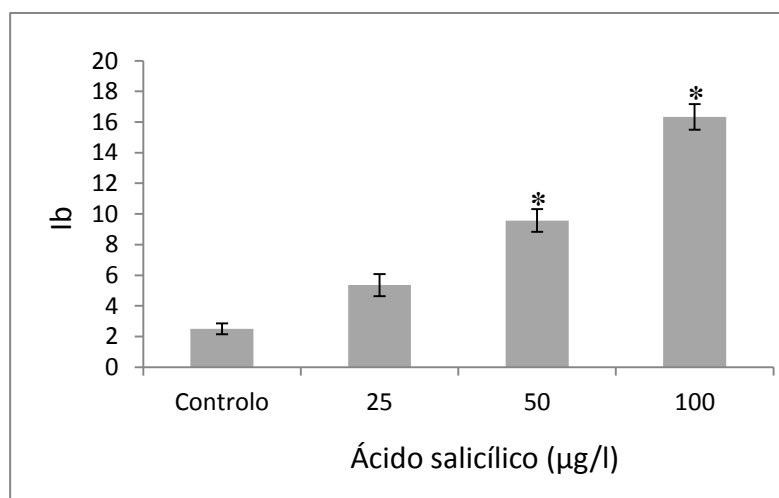


Figura 7. Valores do índice patológico branquial (Ib) em *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Estão representados os valores médios e respetivos erros padrões. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett; $P < 0,05$) estão marcados com um asterisco.

7.1.2. Análise qualitativa e semi-quantitativa do fígado

À exceção do grupo controlo com arquitetura normal do tecido hepático (Fig. 8), verificou-se a presença de algumas alterações histopatológicas do fígado como estados inflamatórios (Fig. 9E), alargamento dos capilares sinusoides (Fig. 9A), pontos hemorrágicos (Fig. 9C), vacuolização (Fig. 9F), hipertrofia dos hepatócitos (Fig. 9D) e necrose (Fig. 9E). Estas alterações tecidulares foram encontradas em todos os grupos expostos, no entanto sem aumento proporcional de gravidade com o aumento da concentração de AS.

O cálculo do índice patológico hepático (Ih) permitiu verificar de uma forma mais viável este cenário, não se verificando alterações estatisticamente significativas dos valores de Ih entre os diferentes grupos experimentais (One-Way Anova: $F=0,04$; g.l.=3,56; $P=0,99$).

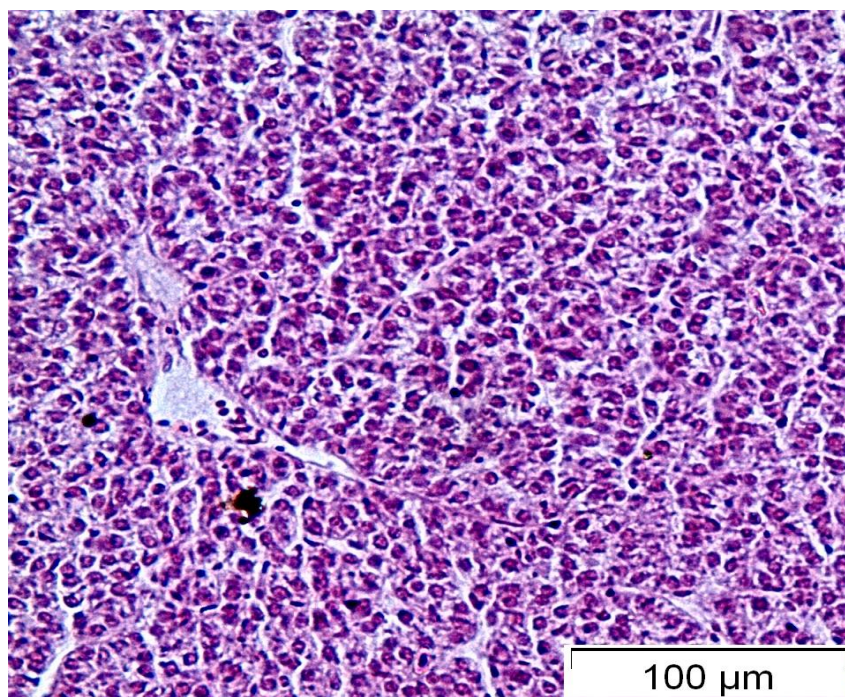


Figura 8. Aparência da arquitetura normal do fígado de *Salmo trutta fario* (indivíduo do grupo controle). Técnica de H&E. Magnificação de 400X

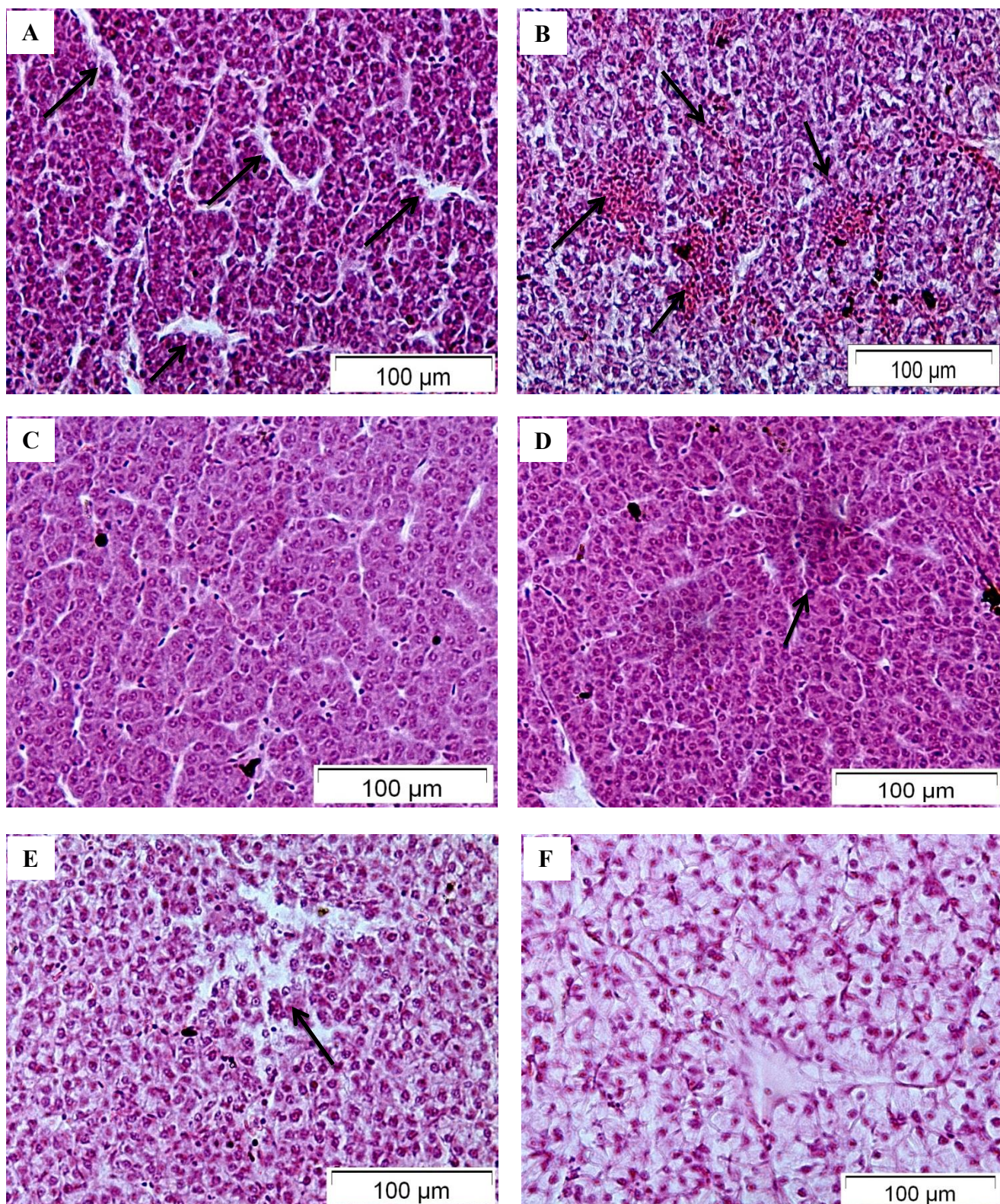


Figura 9. Várias alterações histopatológicas observadas no tecido hepático de *Salmo trutta fario* após exposição de 28 dias a concentrações crescentes de AS (setas): (A) Alargamento dos sinusóides; (B) Diversos pontos hemorrágicos; (C) Hiperplasia generalizada dos hepatócitos; (D) Inflamação tecidual; (E) Necrose; (F) Vacuolização generalizada. Magnificação de 400X; Técnica de H&E.

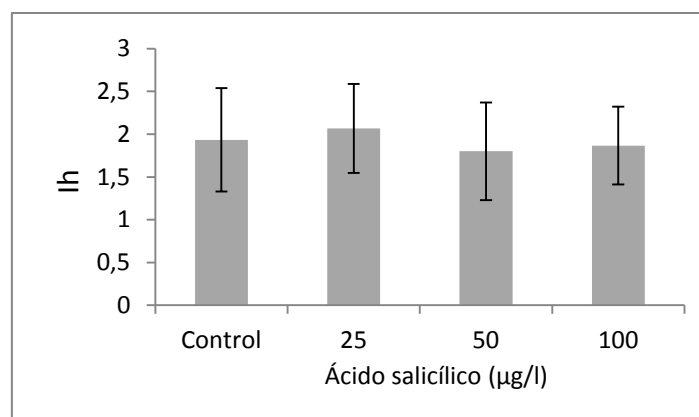


Figura 10: Valores do índice patológico hepático (Ih) em *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Estão representados os valores médios e respetivo erro padrão. Não foram observadas alterações estatisticamente diferentes entre os diferentes grupos experimentais (OneWay Anova, $P > 0,05$).

8.1.3 Análise quantitativa das brânquias

De uma forma geral, através da análise quantitativa das brânquias não se verificaram alterações estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os grupos de tratamento para os vários índices morfométricos.

A espessura do epitélio basal (BET), a distância interlamelar (ID) e o comprimento da lamela secundária (SLL) não sofreram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais (OneWay Anova: BET: $F = 0,21$; g.l.=3,55; $P = 0,11$; ID: $F = 0,39$; g.l.= 3,55; $P = 0,76$; SLL: $F = 1,89$; g.l.=3,55, $P = 0,24$) (Fig. 11A, 11B e 11C). Contudo, o SLL apresenta uma ligeira diminuição com o aumento da concentração de AS, embora não significativa estatisticamente.

Contudo, houve um aumento da espessura da lamela secundária (SLW) com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de média e alta concentração comparativamente ao controlo (Teste de Dunnett, $P < 0,05$; OneWay Anova: $F = 18,68$; g.l.=3,55; $P = 0,00$) (Fig. 11D).

Apesar das alterações verificadas ao nível das brânquias, a capacidade respiratória refletida pelo valor de PAGE não obteve alterações estatisticamente significativas (OneWay Anova: $F=1,99$; $P=0,13$; g.l.=3,56; $P=0,13$) (Fig. 11F).

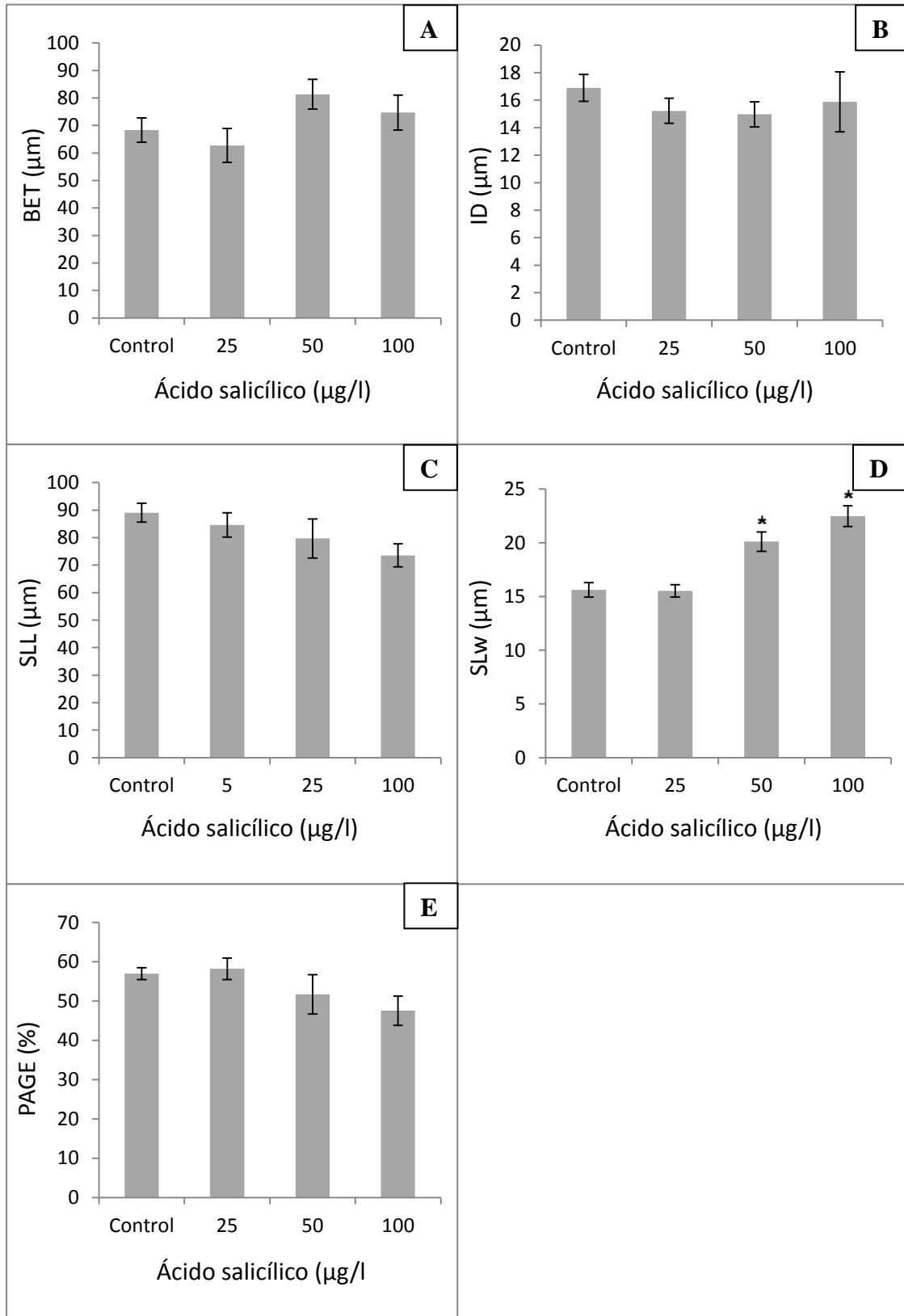


Figura 11. Análise quantitativa das estruturas das brânquias de *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico (média e erro padrão): **A)** Espessura (μm) do epitélio basal (BET); **B)** Distância (μm) interlamelar das brânquias (ID); **C)** Comprimento (μm) da lamela secundária (SLL); **D)** Espessura (μm) da lamela secundária (SLW); **F)** Valor de PAGE - Foram observadas alterações estatisticamente diferentes entre o grupo controlo e os grupos de tratamento (OneWay Anova; $P > 0,05$) nos grupos marcados com asterisco(*)

7.2. Biomarcadores enzimáticos

A determinação da atividade das enzimas estudadas revelou em algumas situações alterações significativas entre o grupo controlo e os grupos de tratamento, em ambos os órgãos (brânquias e fígado).

Relativamente à atividade da enzima catalase, verificou-se uma tendência na diminuição da sua atividade ao nível das brânquias e um aumento a nível do fígado nos grupos de tratamento, comparativamente ao grupo controlo, no entanto estas diferenças não demonstraram ser estatisticamente significativas (OneWay Anova: brânquias: $F=1,01$; g.l.=3,54; $P=0,39$; fígado: $F=0,54$; g.l.=3,54; $P=0,65$) (Figs. 12A e 12B, respetivamente).

A atividade da enzima glutathione redutase ao nível do fígado demonstrou ser sensível à exposição ao AS, uma vez que se verificam alterações estatisticamente revelantes entre os diferentes grupos experimentais (OneWay Anova: $F=3,07$; g.l.=3,55; $P=0,04$). Mais concretamente verificou-se um aumento da sua atividade nas concentrações dos grupos de tratamento de baixa e média concentração, havendo uma diminuição no grupo de tratamento de alta concentração (Teste Dunnett, $P < 0,05$) (Fig. 12C).

A mesma sensibilidade na variação da atividade desta enzima já não se verifica ao nível do tecido branquial, uma vez que a mesma análise estatística não demonstrou variações significativamente distintas entre grupos (OneWay Anova: $F=0,61$; g.l.=3,56; $P=0,61$ Teste Dunnett, $P > 0,05$) (Fig. 12D). Mas tal como no fígado, a atividade aumentou nos grupos de tratamento de baixa e média concentração, diminuindo no grupo de tratamento de alta concentração.

A determinação da atividade das isoenzimas glutathione-S-transferases permitiu verificar que tanto no fígado como nas brânquias a sua atividade não revela ser sensível às concentrações de AS utilizadas, já que o tratamento estatístico utilizado não detetou diferenças estatisticamente relevantes entre os diferentes grupos experimentais (OneWay Anova: fígado: $F=2,84$; g.l.=3,56; $P=0,46$; brânquias: $F=2,86$; g.l.= 3,56; $P=0,06$) (Fig. 12E e 12F, respetivamente).

O estudo da atividade da enzima glutathione peroxidase apenas se efetuou ao nível do fígado. A determinação da atividade da GPx usando como substrato o cumeno hidroperóxido (GPx total), demonstrou não existirem alterações estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os grupos de tratamento (OneWay Anova: $F=0,56$; g.l.=3,55; $P=0,64$) (Fig. 12G). De uma forma geral, a atividade enzimática diminuiu com o aumento da concentração de AS.

Na determinação da atividade da GPx usando como substrato o peróxido de hidrogénio (GPx selénio-dependente), verificou-se um aumento da atividade com o aumento da concentração de AS, no entanto este aumento somente demonstrou diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo no grupo de tratamento de alta concentração (OneWay Anova: $F=10,19$; g.l.=3,51; $P=0,00$) (Fig. 12H).

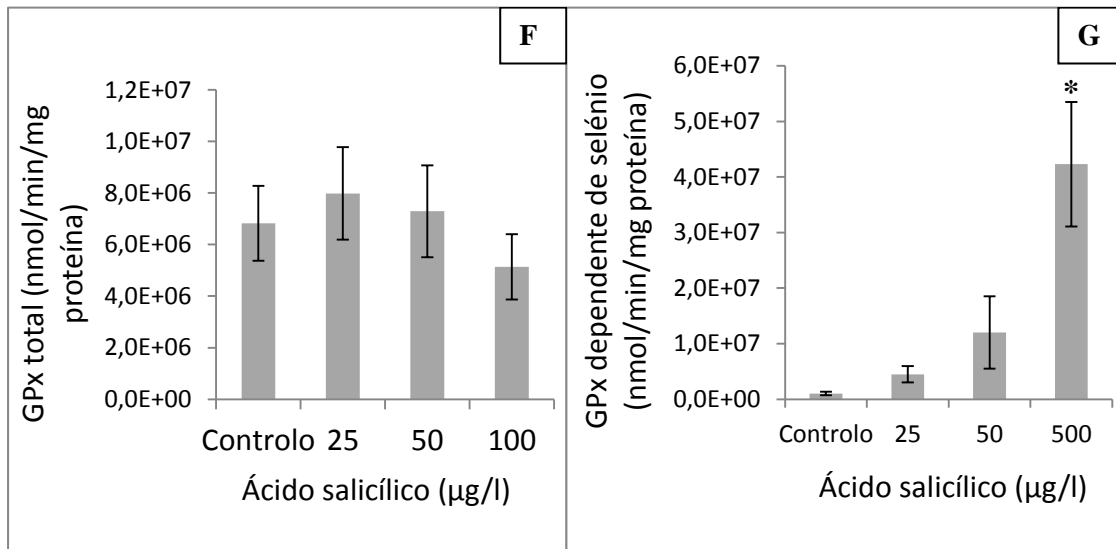


Figura 12. Valores da atividade da enzimática nas brânquias e fígado de *Salmo trutta fario* referente a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico (média e erro padrão): **A)** CAT brânquias; **B)** CAT fígado; **C)** GRed; **D)** GRed brânquias; **E)** GSTs; **F)** GSTs; **G)** GPx total; **H)** GPx dependente de selénio. Os grupos com alterações estatisticamente diferentes do grupo controlo (Teste de Dunnett; $P < 0,05$) estão marcados com um asterisco (*).

7.3. Peroxidação lipídica (TBARS)

A avaliação de TBARS ao nível do fígado demonstrou não haver diferenças estatísticas significativas entre o grupo controlo e os grupos de tratamento, embora tenha havido uma ligeira redução dos seus valores (OneWay Anova: $F=4,27$; $g.l.=3,56$; $P=0,01$) (Fig. 13).

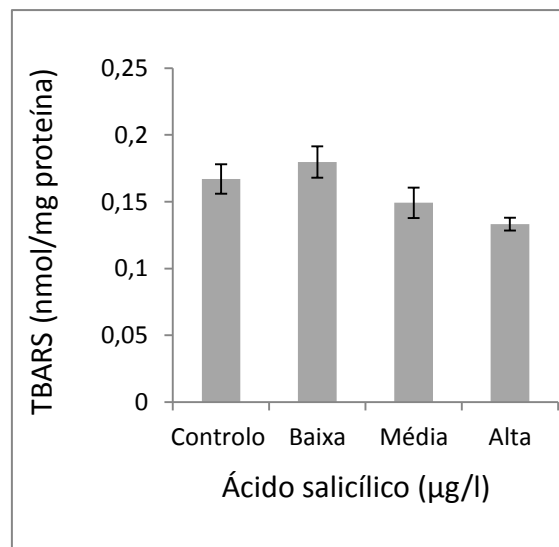


Figura 13. Valores de concentração de TBARS (média e erro padrão) no fígado de *Salmo trutta fario* referentes a uma exposição crónica de 28 dias a concentrações crescentes de ácido salicílico. Não foram observadas alterações estatisticamente diferentes entre o grupo controlo e os grupos de tratamento (OneWay Anova; $P > 0,05$).

8. Discussão dos resultados

As características físicas e químicas inatas dos fármacos ou dos seus metabolitos fazem com que estes compostos sejam potenciais alvos de estudo ecotoxicológicos, mesmo quando encontrados em concentrações residuais e subterapêuticas no compartimento aquático. Ao possuírem capacidade de interação com diversas estruturas dos organismos expostos, os fármacos podem exercer uma interação com uma qualquer via metabólica ou molecular (Stackelberg *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006; Christen *et al.*, 2010).

A ação toxicológica dos salicilatos no Homem é já particularmente conhecida, e passa pela indução de *stress* oxidativo. Contudo a presença dos alvos farmacológicos destes fármacos em outros organismos pode levar à ocorrência de ações tóxicas similares nestes organismos (e.g. Doi *et al.*, 1998, 2002; Doi e Horie, 2010). A exposição destes organismos aos fármacos pode despoletar situações de *stress* oxidativo através da formação de espécies reativas, como ROS e RNS ou outros compostos intermédios capazes de interagir com estruturas submoleculares, e com estruturas lipídicas e proteicas (Antunes *et al.*, 2010). No caso do ácido salicílico, esta formação pode ser proveniente do seu metabolismo oxidativo mediado pelo CYP, nomeadamente na formação do ácido gentísico (2,5-DHB) (Doi e Horie, 2010). O aumento de ROS nos organismos pode levar ao aumento da sua capacidade antioxidativa, refletindo-se no aumento da atividade das várias enzimas protetoras e como tal, este aumento pode ser interpretado como uma ação pro-oxidante do composto em estudo (Antunes *et al.*, 2010). A falta das defesas antioxidantes para destoxificar o excesso de produção de ROS pode levar a danos oxidativos significativos, como inativação enzimática, degradação proteica, danos na estrutura do DNA e peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1989).

O fígado é o principal órgão metabolizador dos peixes, transformando diversas substâncias em compostos menos nocivos e mais facilmente excretados. A ação fisiológica deste órgão torna-o num potencial alvo para estes compostos que tendem

aqui a acumular-se, atingindo concentrações superiores comparativamente a outros órgãos, podendo ocorrer uma desregulação dos mecanismos metabólicos e consequentemente danos hepáticos (Matos *et al.*, 2007; Carola *et al.*, 2009).

As brânquias representam um órgão fundamental para a sobrevivência dos organismos, sendo responsável pelas trocas gasosas entre o meio interno e externo, pela osmoregulação e ainda pela excreção de diversas substâncias (Hughes, 1984; Wood e Soivio, 1991). De modo a exercer estas ações fisiológicas eficazmente, as brânquias possuem uma arquitetura especial, ou seja, possuem uma extensa área de superfície e a distância de difusão entre o meio externo envolvente e o sangue é mínima, permitindo um maior contato entre o meio aquático e a superfície respiratória do peixe (Sayed *et al.*, 2012) São também órgãos extremamente irrigados de modo a facilitar a absorção e excreção dos gases e dos íões, permitindo assim uma respiração e osmoregulação eficiente. Esta elevada área de superfície, a profunda irrigação e o contato íntimo direto que estabelecem com o meio ambiente envolvente torna as brânquias um potencial órgão-alvo primário por parte dos xenobióticos, uma vez que representam a primeira barreira de absorção dos compostos e o primeiro local de ação toxicológica destes, podendo explicar a presença de alterações histológicas neste trabalho nas brânquias, ao contrário do que foi observado no fígado (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003; Barreto 2007).

No presente trabalho a exposição da *S. trutta fario* às várias concentrações de AS conduziu a um aumento da atividade de algumas destas enzimas testadas no fígado, nomeadamente da enzima GPx dependente de selénio, e da GRed. Nas brânquias, as mesmas enzimas não registaram um aumento significativo na sua atividade, sendo provavelmente devido à elevada extensão de metabolização hepática deste composto, em torno dos 80% no Homem (Parke, 1968) Não havendo dados na bibliografia científica sobre a metabolização deste composto nos peixes, pode supor-se que a metabolização do AS ocorra de forma similar.

Apenas a concentração mais elevada testada de AS foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo na atividade da GPx. Esta enzima citosólica é responsável pela metabolização de diversos peróxidos aos seus álcoois correspondentes, sendo esta reação de oxidação-redução dependente de um co-fator, a glutatona reduzida. Este composto permite a renovação da enzima GPx ao seu estado original após a catálise de

uma reação de oxidação-redução, uma vez que durante esta reação o seu centro reativo de selenol presente num resíduo de aminoácidos denominado de selenocisteína é oxidado a ácido selénico, sendo novamente convertido a selenol numa reação de dois passos dependente de duas moléculas de GSH (Lauterburg *et al.*, 1983; Arthur, 2000).

A renovação desta enzima à sua forma ativa leva à formação de duas moléculas de GSSG, aumentando a sua concentração a nível celular. Este aumento leva possivelmente a um aumento da expressão da enzima GRed, uma vez que esta enzima desempenha o papel fundamental de restaurar a GSSH à sua forma reduzida (GSH) através da oxidação simultânea do NADPH a NADP⁺, mantendo a homeostasia entre os dois estados de oxidação-redução da glutatona em condições de *stress* oxidativo (Winston e Di Giulio, 1991). A interdependência entre estas duas enzimas permite ilustrar um possível motivo de ter ocorrido o aumento da expressão da GRed no fígado dos grupos de tratamento com AS comparativamente com o grupo controlo, sendo que, contrariamente à GPx, o aumento da atividade da GRed foi significativo nas três concentrações testadas, sugerindo assim uma maior capacidade da GR em atuar como um biomarcador de resposta mais precoce. A atividade aumentada destas enzimas permite concluir que o ácido salicílico exerceu uma atividade pro-oxidante significativa no organismo testado nas concentrações testadas.

Na literatura científica, sugere-se frequentemente que o AS tem capacidade de aumentar a expressão de outras enzimas antioxidantes e protetoras, como as GSTs, a superóxido dismutase (SOD), a lactato desidrogenase (LHD) e CAT, assim como de aumentar a concentração de TBARS, sugerindo que esta substância possui capacidade de gerar *stress* oxidativo e potencialmente conduzir a danos de peroxidação lipídica (Doi *et al.*, 2002; Doi e Horie, 2010).

Neste trabalho, de todas as enzimas avaliadas, apenas o GPx e GRed apresentaram aumentos de atividade estatisticamente relevantes, e a concentração de TBARS não sofreu alterações estatisticamente significativas. Isto sugere que, apesar do ácido salicílico ter demonstrado uma ação pro-oxidante, esta não foi capaz de gerar um estado de *stress* oxidativo, sendo a resposta adaptativa protetora da *S. trutta fario* suficiente para minimizar e/ou inibir os danos dos ROS gerados da metabolização deste xenobiótico no âmbito das avaliações bioquímicas realizadas e de todas as suas limitações.

A avaliação histopatológica dos tecidos dos organismos assume um papel imprescindível numa avaliação ecotoxicológica, uma vez que representa a saúde direta dos organismos, permitindo avaliar pequenas alterações que muitas vezes não são capazes de ser detetadas através de outros biomarcadores (Hinton *et al.*, 1992).

A análise histopatológica revelou diversas alterações no fígado, nomeadamente estados hemorrágicos e inflamatórios, alargamento dos capilares sinusóides, hipertrofia dos hepatócitos, vacuolização e ainda necrose, sendo estas alterações encontradas de forma geral em todos os grupos expostos de *S. trutta fario*, mas apenas em alguns indivíduos. A maioria das lesões histopatológicas encontradas neste órgão são inespecíficas para os contaminantes (Au, 2004).

Os vacúolos encontrados no citoplasma dos hepatócitos normalmente funcionam como reservas energéticas, armazenando lípidos e glicogénio, o que é considerado um processo metabólico normal do fígado (Gingerich, 1982; Ferguson, 1989; Camargo e Martínez, 2007). No entanto, esta vacuolização pode ser sinal de um processo degenerativo sugerindo danos metabólicos, na maior parte das vezes relacionado com a contaminação do meio aquático ou uma dieta alimentar desajustada (Pacheco e Santos, 2002; Camargo e Martínez, 2007).

As alterações inflamatórias resultam na libertação de mediadores que causam a dilatação dos vasos sanguíneos adjacentes, aumentando a permeabilidade microvascular e induzindo a infiltração de leucócitos (Scallan *et al.*, 2010), o que pode explicar o alargamento dos sinusóides e os pontos hemorrágicos observados. Contudo a determinação semi-quantitativa destas alterações no fígado (Ih) revelou não haver diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os grupos de tratamento. De uma forma geral, este índice indica que as lesões encontradas não alteram significativamente a capacidade funcional do órgão ou a sobrevivência do organismo, como também não apresenta um grau de severidade significativo quanto à sua extensão (Bernet *et al.*, 1999).

Os resultados histopatológicos do fígado vão de encontro ao trabalho de Schwaiger *et al.* (2004), onde outro AINE, o diclofenac, também não produziu alterações tecidulares estatisticamente significativas no fígado de truta arco-íris. Contudo, Triebkron *et al.* (2004) determinou alterações citológicas em hepatócitos da mesma espécie expostos ao mesmo composto e às mesmas concentrações. Isto sugere que as alterações celulares

são resposta adaptativas mais precoces, comparativamente às alterações tecidulares, como seria de esperar.

No presente trabalho, a avaliação histológica qualitativa das brânquias demonstrou a presença de diversas alterações em todos os grupos de *S. trutta fario*, sendo no entanto estas alterações mais graves e de maior extensão nos grupos expostos ao SA, parecendo indicar uma correlação destas alterações com o aumento da concentração deste fármaco.

No grupo controlo apenas foram encontradas essencialmente hiperplasias da lamela primária e da lamela secundária, sendo contudo estas lesões menos extensas do que nos grupos de tratamento. Nos grupos tratamento ainda foi possível observar situações de fusão das lamelas secundárias e levantamento epitelial, e ainda de forma pontual algumas situações de aneurismas e de necrose nas concentrações mais elevadas de AS.

A análise semi-quantitativa deste órgão permitiu verificar com maior certeza esta dependência da concentração de AS, verificando-se que o índice patológico branquial dos grupos de média e alta concentração eram mais elevados comparativamente com o grupo controlo, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Apesar do grupo de baixa concentração apresentar um aumento deste índice comparativamente com o grupo controlo, esta diferença não foi estatisticamente relevante.

Por fim, a análise quantitativa das diversas estruturas das lamelas das brânquias permitiu igualmente verificar um aumento da espessura da lamela secundária para os grupos tratamento de média e alta concentração, sendo esta diferença novamente significativa em termos estatísticos, o que vai de encontro à hiperplasia da lamela secundária encontrada anteriormente. Apesar deste aumento, a superfície disponível para as trocas gasosas não foi afetada suficientemente para produzir alterações estatisticamente significativas sobre o valor de PAGE, o que seria espectável uma vez que todas as outras estruturas mantiveram-se similares às do grupo controlo (Nero *et al.*, 2006).

Alterações semelhantes a nível deste órgão já foram descritas na literatura científica após a exposição a outros AINEs, nomeadamente ao diclofenac em *S. trutta fario* (Hoeger *et al.*, 2005).

O aumento da espessura reduz o fluxo de água e perfusão, o que pode explicar o facto de o fígado não ter apresentado lesões histopatológicas significativas. Ou seja, estas duas consequência do aumento da espessura levam a que ocorra uma menor absorção dos compostos presentes na água, nomeadamente o AS, não atingindo a corrente sanguínea em concentrações significativas e por conseguinte não atinge o fígado (Schmieder e Weber, 1992; Nero *et al.*, 2006).

Algumas das lesões encontradas nas brânquias podem ser descritas como respostas adaptativas à presença do composto, nomeadamente as lesões de hiperplasia da lamela secundária e primária, fusão da lamela secundária e o levantamento epitelial. Estas alterações permitem diminuir o contato das brânquias com o meio externo, uma vez que diminuem a área superficial, e consequentemente ocorre o aumento da distância de difusão. Assim, passa a ocorrer uma menor difusão do xenobiótico, dificultando a sua passagem para a corrente sanguínea, e funcionando como uma barreira à entrada de xenobióticos (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003). No entanto, este fenómeno pode levar a uma diminuição da eficácia do sistema de respiração e da capacidade de manutenção da osmolaridade (Skidmore e Tovell, 1972; Sayed *et al.*, 2012), embora os peixes possam aumentar a sua frequência respiratória como mecanismo compensatório (Fernandes e Mazon, 2003). Contudo, todas as lesões reportadas anteriormente são consideradas reversíveis, pois uma vez retirado o agente causador as alterações tecidulares desaparecem (Mallatt, 1985; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003).

Os aneurismas encontrados em alguns dos exemplares do grupo de média e alta concentração foram provocados possivelmente devido um maior *stress* sobre as brânquias, gerando alterações nos vasos sanguíneos. Lesões sobre as células pilar podem levar à sua rutura provocando um aumento do fluxo sanguíneo lamelar, causando dilatação do canal marginal e consequentemente uma congestão sanguínea e em alguns casos aneurisma. Este tipo de lesão é mais severo quando comparado com as lesões epiteliais descritas anteriormente, sendo a sua recuperação embora possível mais difícil (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Rosety-Rodríguez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2004).

O estado de necrose encontrado principalmente no grupo de alta concentração pode ser descrito como a perda parcial do tecido devido a morte celular induzida, sendo este

processo complexo e de difícil determinação, uma vez que são vários os mecanismos explicativos. Schwaiger *et al.* (2004) demonstrou a capacidade que outro AINE, o diclofenac, possui na formação destes estados necrosados em trutas arco-íris após uma exposição crónica.

Uma vez que os biomarcadores enzimáticos não demonstraram *stress* oxidativo ao nível das brânquias, sugere-se que estas alterações histopatológicas podem ser devido a uma irritação local do ácido salicílico promovido pela sua natureza ácida. Este composto, classificado como um pseudo β -hidroxiácido, é utilizado em humanos em diversas situações dermatológicas como agente queratolítico, sendo o mecanismo de ação ainda não totalmente elucidado. No entanto, uma ação direta sobre o processo de descamação natural e uma alteração da estrutura de coesão das células pode estar relacionado com este fenómeno (Bashir *et al.*, 2005).

Também devido ao seu mecanismo farmacológico, por via da inibição das enzimas cicloxigenases, pode-se especular que estas alterações surgiram do distúrbio da homeostasia regrada por estas enzimas e pelos seus produtos de síntese, as prostaglandinas. A importância do papel destas biomoléculas nos peixes já foi descrita na literatura científica (Norambuena *et al.*, 2012). Hoeger *et al* (2005), por exemplo, sugere que a exposição de *S. trutta fario* a diclofenac levou a alterações da arquitetura normal das brânquias por inibição da síntese de prostaglandinas (PG2), sugerindo que estas substâncias desempenham um importante papel no transporte de iões e na regulação da circulação sanguínea nas brânquias, tal como ocorre nos mamíferos a nível do rim.

Estas alterações no fígado e brânquias causam distúrbios na homeostasia e no funcionamento apropriado dos processos biológicos vitais, como destoxificação, funcionamento endócrino, respiração, osmorregulação, absorção de nutrientes, entre outros (Au, 2004).

9. Conclusão

O uso de compostos farmacêuticos pelo Homem na medicina humana, veterinária e na aquacultura, assim como todos os processos relacionados com a sua produção e eliminação, tem revelado ter um importante impacto ecotoxicológico. Deste modo é

necessário obter mais estudos relacionados com esta área, permitindo assim determinar a extensão das consequências da presença destes fármacos nos ecossistemas para os organismos residentes e para a saúde pública em geral (e.g. Larsson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Lin e Tsai, 2009).

A consciência da existência destes compostos ao nível dos ecossistemas aquáticos levou à pesquisa de técnicas eficazes na sua remoção ao nível das ETARs, de modo a melhorar a qualidade da água, diminuindo consideravelmente a concentração dos contaminantes à saída das estações de tratamento. No entanto, apesar dos esforços, várias são as características físicas e químicas destes compostos que torna esta depuração difícil e muitas vezes ineficaz, resultando inevitavelmente na deteção destes fármacos nos efluentes e compartimento aquático (Larsson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Lin e Tsai, 2009).

As características físico-químicas heterogéneas destes diversos compostos ou dos seus derivados, para além de dificultarem a sua remoção, tornam estas substâncias altamente capazes de atuar a diversos níveis dos organismos que se encontram expostos, tanto pelos mecanismos das ações farmacológicas para os quais foram concebidos, como através de outros mecanismos alternativos, podendo exercer efeitos toxicológicos nestes organismos, mesmo nas concentrações subterapêuticas que são vulgarmente encontrados no meio (Christen *et al.*, 2010).

Apesar de haver um aumento dos estudos ecotoxicológicos que demonstram a inequívoca capacidade nociva destas substâncias, ainda existe uma baixa compreensão dos mecanismos toxicológicos envolvidos e como estas ações podem influenciar os ecossistemas (Cleuvers, 2003; Stackelberg *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006).

Os anti-inflamatórios não esteroides representam o grupo de fármacos com maior consumo mundial, sendo encontrados nos influentes e efluentes das estações de tratamento na gama dos µg/l (Hoeger *et al.*, 2007; Schmitt-Jansen *et al.*, 2007; DeLorenzo *et al.*, 2008). Dentro deste grupo, podemos destacar o ácido acetilsalicílico e o seu principal derivado, o ácido salicílico, como o composto farmacêutico com maior consumo mundial, justificado pela sua eficácia e diversidade na terapêutica clínica e na cosmética. No entanto, apesar da sua elevada utilização, este composto tem mostrado ter diversas ações toxicológicas a nível humano, nomeadamente a sua capacidade de

induzir uma resposta de *stress* oxidativo, podendo estes efeitos ser paralelamente detetados ao nível dos ecossistemas, uma vez que os mesmos alvos farmacológicos deste fármaco foram detetados em diversos vertebrados e invertebrados (Doi *et al.*, 2002; Warner e Mitchell, 2002; Doi e Horie, 2010).

Neste trabalho a exposição crónica (28 dias) da *Salmo trutta fario* a diferentes concentrações de ácido salicílico permitiu verificar a sua capacidade pro-oxidativa e de induzir alterações histopatológicas ao nível do tecido branquial. Assim, foi possível observar um padrão entre a concentração de composto utilizado e a resposta adaptativa dos organismos expostos, verificando-se um aumento da gravidade e extensão das alterações histopatológicas nas brânquias com o aumento da concentração de AS.

A nível do estudo no fígado, as alterações histopatológicas descritas parecem não apresentar relação com o aumento da concentração de ácido salicílico usado, apenas verificando-se neste órgão alterações a nível do estudo enzimático. Assim, verifica-se que a exposição a este composto foi capaz de induzir um aumento da resposta antioxidante dos organismos, representada pelo aumento da atividade da enzima glutatona redutase e da glutatona peroxidase dependente de selénio.

Apesar de não ter ocorrido dano membranar de natureza peroxidativa, verificado pela ausência de danos lipoperoxidativos (TBARS), sugere-se que a atividade pro-oxidativa deste composto pode, em concentrações superiores, induzir uma resposta de *stress* oxidativo em peixes.

A resposta deste organismo ao AS no presente estudo, permitiu mostrar a importância toxicológica que este composto exhibe, sugerindo a necessidade de alargar as pesquisas sobre os seus efeitos nos ecossistemas aquáticos, examinando outras respostas adaptativas a estas exposições, o comportamento de organismos aquáticos de níveis tróficos inferiores e superiores, a sua bioacumulação e o possível sinergismo com outras substâncias ecologicamente relevantes.

10. Bibliografia

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 6, pp. 105–121.
- Akaishi, F.M., de Assis, H.C., Jakobi, S.C, Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A. (2004). Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46 (2), pp. 244-253.
- Antunes, S.C., Marques, S.M., Pereira, R., Gonçalves, F., Nunes, B. (2010). Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution, *Journal of Environmental Monitoring*, 12 (8), pp. 1625-1630.
- Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57 (13-14), pp. 1825-1835.
- Atli, G., Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 145 (2), pp. 282-287.
- Au, D.W.T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review, *Marine Pollution Bulletin*, 48 (9-10), pp. 817-834.
- Avilez, I.M., Hori, T.S., de Almeida, L.C., Hackbarth, A., da Cunha Bastos Neto, J., da Cunha Bastos, V.L., Moraes, G. (2008). Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (*Teleostei; Characidae*), *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 148 (2), pp. 136-142.
- Balali-Mood, M., Balali-Mood, K. (1996). Salicylic acid - "Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals" INCHEM. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/iomc/en/> [Consultado em 30/04/2013].
- Barber, A.A., Bernheim, F. (1967). Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues, *Advances in Gerontology Research*, 2, pp.355-403.

Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater, *Science of The Total Environment*, 402 (2-3), pp. 192–200.

Barreto, T.R. (2007). Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®), Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Bashir, S.J., Dreher, F., Chew, A.L., Zhai, H., Levin, C., Stern, R., Maibach, H.I. (2005). Cutaneous bioassay of salicylic acid as keratolytic, *International Journal of Pharmaceutics*, 269 (1-2), pp. 187-194.

Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S. (2006). Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA, *Chemosphere*, 64 (11), pp. 1963–1971.

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, pp. 248–254.

Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden, *Journal of Hazardous Materials*, 122 (3), pp. 195–204.

Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water, *Environmental Science & Technology*, 43 (3), pp. 597–603.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action, *Nature Medicine*, 7 (8), pp. 947-953.

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, pp. 25-34.

- Besse, J.P., Garric, J. (2008). Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation, *Toxicology Letters*, 176 (2), pp. 104-123.
- Bradley, B.P. (2012). Findings biomarkers is getting easier, *Ecotoxicology*, 21 (3), pp. 631-636.
- Bucheli, T.D., Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25 (3), pp. 201-268.
- Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 52, pp. 302–310.
- Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (2), pp. 535–543.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake, *Environmental Science & Technology*, 32 (22), pp. 3449–3456.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003). Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environmental Science & Technology*, 37 (7), pp. 1241–1248.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream, *Neotropical Ichthyology*, 5 (3), pp. 327–336.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Research*, 38 (12), pp. 2918–2926.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase, *Methods in Enzymology*, 113, pp. 484–490.
- Carola, J., Fontainhas-Fernandes, A., Matos, P., Rocha, E. (2009). Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from the Tinhela river, subjected to mine drainage

from the abandoned Jales mine (Portugal), *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 83 (1), pp. 35-41.

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

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

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

Christen, V., Hickmannb, S., Rechenbergb, B., Fenta, K. (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action, *Aquatic Toxicology*, 96 (3), pp. 167–181.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology Letters*, 142 (3), pp. 185–194.

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

Commandeur, J.N., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P. (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics, *Pharmacological Reviews*, 47 (2), pp. 271-330.

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

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

- Davison, C. (1971). Salicylate metabolism in man, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 179, pp. 249–268.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M. (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 78 (3), pp. 209–216.
- DeLorenzo, M.E., Fleming, J. (2008). Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54 (2), pp. 203–210.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 (12), pp. 1103–1123.
- Di Salvo, R. (2002). Salicylic Acid. In: Schlossman, M.L. (2002). *The Chemistry and Manufacture of cosmetics*. Allured Publishing Corporation.
- Doi, H., Horie, T. (2010). Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress, *Chemico-Biological Interactions*, 183 (3), pp. 363–368.
- Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., Horie, T. (2002). Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes, *Chemico-Biological Interactions*, 140 (2), pp. 109–119.
- Doi, H., Masubuchi, Y., Narimatsu, S., Nishigaki, R., Horie, T. (1998). Salicylic acid-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 100 (3), pp. 265–271.
- EMA (2006). Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for Medicinal Products for Human Use*, EMA/CHMP/SWP/4447/00.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 76 (2), pp. 122–159.
- Ferguson, H.W. (1989). *Systemic pathology on Fish: A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts*. Ames, Iowa State University Press, p. 263.

- Fernandes, M.N., Mazon, A.F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield, Science Publishers, pp. 203-231.
- Filho, D.W. (1996), Fish antioxidant defences a comparative approach, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29 (12), pp. 1735-1742.
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, D. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*, *Aquatic Toxicology*, 81 (1), pp. 73–78.
- Flohé, L., Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, pp. 114–121.
- Flores-Lopes, F., Thomaz, A.T. (2011). Histopathologic alterations observed in fish gills as a toll in environmental monitoring, *Brazilian Journal of Biology*, 71 (1), pp. 179-188.
- Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceutical and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources, *Science of The Total Environment*, 402 (2-3), pp. 201–216.
- Freyhof, J. (2013). *Salmo trutta*. In: IUCN (Ed.). *IUCN Red list of Threatened Species. Version 2013*. Disponível em www.iucnredlist.org. [Consultado em 25/03/2013].
- George, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Ostrander (Ed.). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. New York, Lewis Publishers, pp. 37-85.
- Gimbert, F., de Vaufléury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.M. (2006). Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*, *Environment International*, 32 (7), pp. 866-875.
- Gingerich, W.H. (1982). *Aquatic Toxicology, Hepatic toxicology of fishes*. New York, Raven Press, pp 55–10.
- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage

treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere*, 66 (6), pp. 993–1002.

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

Gregus, Z. (2008). Mechanisms of Toxicity. In: Klaassen, C.D. (2008). *Cassarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons*. USA, The McGraw-Hill Companies.

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

Hageman, J.J., Bast, A., Vermeulen, N.P.E. (1992). Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects, *Chemico-Biological Interactions*, 82 (3), pp. 243-293.

Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H.C., Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review, *Chemosphere*, 36 (2), pp. 357–393.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press.

Heckamann, L.-H., Callaghan, A., Hooper, H.L., Connon, R., Hutchinson, T.H., Maund, S.J., Sibly, R.M. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics, *Toxicology Letters*, 172 (3), pp. 137–145.

Henschel, K.-P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A. (1997). Environmental hazard assessment of pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 25 (3), pp. 220–225.

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

Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihira, M.S. (1992). Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J.,

Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.). *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Chelsea, MI, Lewis Publishers, pp. 155-210.

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

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

Hurreau, J.C. (2010). Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean. [CDROM].

Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Kregel, D., Kayser, A. (2002). Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations, *Environmental Toxicology*, 19 (3), pp. 226-240.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products, *Science of The Total Environment*, 348 (1-3), pp. 93–101.

Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radical Biology & Medicine*, 9 (6), pp. 515-540.

Johnson, A.C., Williams, R.J., Matthiessen, P. (2006). The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study, *The Science of the Total Environment*, 362 (1-3), pp. 166–178.

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

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B. (2005). A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data, *Environmental Pollution*, 134 (2), pp. 333–341.

- Khan, S.J., Ongerth, J.E. (2004). Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations, *Chemosphere*, 54 (3), pp. 355–367.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P., Park, -G.J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environment International*, 33 (3) pp. 275–370.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance, *Environmental Science & Technology*, 36 (6), pp. 1202–1211.
- Koutsouba, V., Heberer, Th, Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A. (2003). Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere*, 51 (2), pp. 69–75.
- Kummerer, K., Steger-Hartmann, T., Meyer, M. (1997). Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage, *Water Research*, 31 (11), pp. 2705–2710.
- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R. (2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy, *Chemosphere*, 54 (5), pp. 661–668.
- Larsson, D.G.J., Pedro, C., Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *Journal of Hazardous Materials*, 148 (3), pp.751–755.
- Lauterburg, B.H., Smith, C.V., Hughes, H., Mitchell, J.R. (1983). Determinants of hepatic glutathione turnover: toxicological significance. In: Lamble, J.W. (Ed.). *Drug Metabolism and Distribution*. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, pp. 166-180.
- Le, T.X., Munekage, Y. (2004). Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam, *Marine Pollution Bulletin*, 49 (11-12), pp. 922–929.

- Lech, J.J., Vodcnik, M.J. (1985). Biotransformation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. New York, Hemisphere Publishing Corporation, pp. 526-557.
- Lee, H.-B., Peart, T.E., Svoboda, M.L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1094 (1-2), pp. 122–129.
- Lima, E.S.L., Abdalla, D.S.P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37 (3), pp. 293-303.
- Lin, A.Y.-C., Tsai, Y.-T. (2009). Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities, *Science of The Total Environment*, 407 (12), pp. 3793–3802.
- Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., Hanke, G. (2007). Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4), pp.1469–1478.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G. (1993). A comparative search for free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 105 (3-4), pp. 757-763.
- Lundholm, C.E. (1997). DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 118 (2), pp. 113–128.
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), pp. 630-648.

- Marques, C.R., Abrantes, N., Goncalves, F. (2004). Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans. I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid, *Environmental Toxicology*, 19 (5), pp. 518–526.
- Martinez, C.B., Nagaе, M.Y., Zaia, C.T., Zaia, D.A. (2004). Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Brazilian Journal of Biology*, 64 (4), pp. 797-807.
- Matos, P., Fontaínhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J., Rocha, E. (2007). Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89 (1), pp. 73-80.
- Medline Plus (2008). Ácido Salicílico Tópico. [Em Linha]. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a607072-es.html> [Consultado em 01/04/2013].
- Moldovan, Z. (2006). Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania, *Chemosphere*, 64 (11), pp. 1808–1817.
- Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42 (11), pp. 1772–1782.
- Nero, V., Farwell, A., Lee, L.E.J., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G. (2006a). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65 (2), pp. 252–264.
- Nero, V., Farwell, A., Listerb, A., Van Der Kraakb, G., Leec, L.E.J., Van Meerd, T., MacKinnone, M.D., Dixona, D.G. (2006b). 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 (3), pp. 365–37.
- Norambuena, F., Mackenzie, S., Bell, J.G., Callol, A., Estévez, A., Duncan, N. (2012). Prostaglandin (F and E, 2- and 3-series) production and cyclooxygenase (COX-2) gene expression of wild and cultured broodstock of senegalese sole (*Solea senegalensis*), *General and Comparative Endocrinology*, 177 (2), pp. 256-262.

- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research (1987). Biological markers in environmental health research, *Environmental Health Perspectives*, 74, pp.3-9.
- Nunes, B., Gaio, A.R., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 (2), pp. 341–354.
- OECD/OCDE (1998). OECD Guideline for testing of chemicals: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.
- Pacheco, M., Santos, M.A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effect of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53 (3), pp. 331-347.
- Parke, D. V. (1968). The Biochemistry of Foreign Compounds, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58 (4), pp. 509-510.
- Peakell, D.B. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall
- Peakall, D.B. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment, *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1, pp. 55-60.
- Pereira, B. (1994). Exercício físico como pro-oxidante, *Revista Paulista de Educação Física*, 8 (2), pp. 77-89.
- Pickett, C.B., Lu, A.Y.H. (1989). Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function, *Annual Review of Biochemistry*, 58, pp. 743-751.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.). *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford, Fishing News Books.
- Rashed, M.N. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International*, 27 (1), pp. 27-33.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F. (2006). Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism

for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach, *Environmental Health Perspectives*, 114 (1), pp. 63-69.

Roberts, R.J. (1975). Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: Ribelin, W.E., Migali, G. (Eds.). *The pathology of fishes*. Madison, University of Wisconsin Press, pp. 399-428.

Rosety-Rodríguez, M., Ordoñez, F.J., Rosety, M., Rosety, J.M., Ribelles, A., Carrasco, C. (2002). Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51 (3), pp. 223-228.

Rushmore, T.H., Pickett, C.B. (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione-S-transferase Ya subunit gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, pp. 14648-14653.

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

Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A.N., Fachinia, A., Pena, A., Delerue-Matosc, 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 (1-3), pp. 45–95.

Santos, N.P., Fontainhas-Fernandes, A.A., Faria, R., Torres-Castro, L.F., Anjos, M.R., Cortes, R.M.V., Alexandrino, P. (2006). Genetic evidence for limited introgression between wild and stocked individuals in Portuguese brown trout, *Salmo trutta* populations, *Folia Zoologica – International Journal of Vertebrate Zoology*, 55 (4), pp. 433-443.

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

Sazuka, Y., Tanizawa, H., Takino, Y. (1989). Effect of Adriamycin on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in tissues of mice, *Japanese Journal of Cancer Research*, 80 (1), pp. 89-94.

Scallan, J., Virginia, Huxley, V.H., Korthuis, R.J. (2010). *Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology*. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences.

Schmieder, P.K., Weber, L.J., 1992. Blood and water flow limitations on gill uptake of organic chemicals in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 24, pp. 103–122.

Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4), pp. 1389–1396.

Schomburg, D., Salzmann, M. (1991). *Enzyme Handbook*. Berlin, Springer-Verlag.

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, pp. 141-150.

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

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

Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant, *Science of The Total Environment*, 329 (1-3), pp. 99–113.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowlwe, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A. (1992). Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: Huggert, R.J.,

Kimerle, R., Mehrle, P., Bergman, H. (Eds.). *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Boca Raton, Lewis Publications.

Stegeman, J.J., Hahn, M.E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.). *Aquatic toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Boca Raton, Lewis Publishers, pp. 87-206.

Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R-D., Rodrigues, S.V., Baumann, W. (1999). Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Science of the Total Environment*, 225 (1-2), pp. 135–141.

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

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

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 (2), pp. 151–166.

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

Ugurlucan, M., Cagçar, M.I., Turhan, F.N., Ziyade, S., Karatepe, Yildiz, Y., Zencirci, E., Ugurlucan, F.G., Arslan, H. A., Korkmaz, S., Filizcan, U., Cicek, S. (2012). Aspirin: from a Historical Perspective, *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 7, pp. 71-76.

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

Van der Aar, E.M., Buikema, D., Commandeur, J.N.M., te Koppele, J.M., van Ommen, B., van Bladeren, P.J., Vermeulen, N.P.E. (1996). Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione S-transferase isoenzymes towards a series of new 2 substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes, *Xenobiotica*, 26, pp. 143-155.

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, pp. 57-149.

Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses, *Aquatic Toxicology*, 36 (3-4), pp. 189-222.

Vane, J.R., Botting, R.M. (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs, *International Journal of Tissue Reactions*, 20 (1), pp. 3–15.

Vane, J.R., Botting, R.M. (2003). The mechanism of action of aspirin, *Thrombosis Research*, 110 (5-6), pp. 255-258.

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

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

Warner, T.D., Mitchell, J.A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward COX continuum?, *Proceedings of the National Academy of Sciences Journal*, 99 (21), pp. 13371–13373.

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 (1-3), pp. 131–141.

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

- Winzer, K. (2001). *Oxidative stress in the marine environment prognostic tools for toxic injury in fish liver cells*. Academic Thesis, University of Amsterdam.
- Wood, C.M., Soivio, A. (1991). Environmental effects on gill function: an introduction, *Physiological Zoology*, 64, pp. 1-3.
- World Health Organization (WHO) (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva.
- Worthington, D.J., Rosemeyer, M.A. (1974). Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes, *European Journal of Biochemistry*, 48 (1), pp. 167-177.
- Yang, D., Li, M., Hu, J., Zhang, Y., Chang, H., Jin, F. (2008). Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river, *Water Research*, 42 (1-2), pp. 307–317.
- Yang, X., Song, Y., Kai, J., Cao, X. (2012). Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene, *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 86 (1), pp. 162-167
- Yates, R.L., Havery, D.C. (1999). Determination of Phenol, Resorcinol, Salicylic Acid and Alpha-Hydroxy Acids in Cosmetic Products and Salon Preparations, *Journal of Cosmetic Science*, 50, pp. 315-325.
- Yonkos, L.T., Fisher, D.J., Reimschuessel, R., Kane, A.S. (2000). Atlas of fathead minnow normal histology. [Em linha]. Disponível em <http://aquaticpath.umd.edu/fhm> [Consultado em 30/04/2013].
- Zanette, J., Nunes, F.F., Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Rodrigues de Melo, C.M., Bainy, A.C.D. (2008). Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges, *Marine Environmental Research*, 66 (1), pp. 196-198.
- Zou, J., Neumann, N.F., Holland, J.W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C.J., Rowley, A.F. (1999). Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation, *The Biochemical Journal*, 340 (p1) 153–159.

Zwiener, C., Gremm, T.J., Frimmel, F.H. (2001). Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production. *In*: K.Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Berlin, Springer, pp. 81–89.