

JOANA NOBRE RODRIGUES

EXPOSIÇÃO CRÓNICA DE PEIXES-
ZEBRA JUVENIS AOS QUÍMICOS
IOXINIL E DIETHYLSTILBESTROL LEVA
A ALTERAÇÕES DA MORFOLOGIA
CARDÍACA E DESREGULAÇÃO DA
HOMEOSTASIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-
PITUITÁRIA-TIROIDE



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2020

JOANA NOBRE RODRIGUES

EXPOSIÇÃO CRÓNICA DE PEIXES-
ZEBRA JUVENIS AOS QUÍMICOS
IOXINIL E DIETHYLSTILBESTROL LEVA
A ALTERAÇÕES DA MORFOLOGIA
CARDÍACA E DESREGULAÇÃO DA
HOMEOSTASIA DO EIXO HIPOTÁLAMO-
PITUITÁRIA-TIROIDE

Mestrado em Biotecnologia

Especialização em Toxicologia

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Doutor Marco A. Campinho (CBMR, Universidade do Algarve)

Professora Doutora Deborah M. Power (CCMAR, Universidade do Algarve)



Faculdade de Ciências e Tecnologia

2020

Exposição crónica de peixes-zebra juvenis aos químicos ioxinil e diethylstilbestrol leva a alterações da morfologia cardíaca e desregulação da homeostasia do eixo hipotálamo-pituitária-tiroide

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Assinado por:

(Joana Rodrigues)

©Copyright: Joana Rodrigues

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código de Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Mas que viagem!

Quero agradecer à Professora Doutora Deborah M. Power por me acolher, apoiar e acreditar no meu pequeno eu cientista, e sobretudo pela sua indicação quem viria a ser o meu mentor durante estes dois anos incríveis!

Agradeço ao Doutor Marco Campinho, por ter sido um orientador fantástico, que puxou por mim, ajudando-me a abrir portas aos horizontes científicos e intelectuais, ajudando-me a crescer e a aumentar a minha sede pelo conhecimento.

Agradeço aos meus/minhas colegas de laboratório que me acompanharam nesta montanha-russa, que proporcionaram muitos sorrisos, gargalhadas e guloseimas cheias. Obrigada, Marlene, Nádia, Vilma e Pascolina! São momentos muito queridos que guardarei sempre.

Agradeço à minha família por me ter aturado enquanto falava horas a fim sobre o tema que descrevo tão extensivamente nestas páginas. Obrigada por serem a base e por me terem ajudado a crescer e a ser quem sou hoje!

Resumo

Os estudos sobre os químicos com efeitos de disrupção endócrina (EDCs) têm vindo a aumentar devido aos efeitos nocivos sobre os ecossistemas. O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo animal utilizado nos estudos toxicológicos quer durante o desenvolvimento como na fisiologia adulta.

Em estudos prévios foi demonstrado que os compostos químicos Ioxinil (IOX) e Diethylstilbestrol (DES), em concentração micromolares, e abaixo dos níveis mínimos de segurança, são capazes de alterar a morfologia cardíaca e desregular o eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide (HPT). Neste estudo pretendemos observar se o mesmo ocorre em animais adultos. Tendo em conta que a função cardíaca é fundamental para o desenvolvimento e a homeostasia da glândula da tiroide é inquirido como o subdesenvolvimento da tiroide afeta o eixo HPT.

Foi observado que o composto químico DES em peixes-zebra juvenis não alterou a morfologia cardíaca. No entanto, a análise da expressão génica indicou uma parente alteração nos genes relacionados com a homeostasia do cálcio que poderá encontrar-se afetada. Houve uma alteração ao nível da área e dispersão dos folículos ao longo da aorta, onde foi notório um aparecimento anormal de folículos. Foi também observada uma inibição na expressão génica da tiroglobulina (Tg) e da tirotropina (TSH), mostrando que o DES tem impacto sobre a regulação do eixo HPT.

No caso do composto químico IOX, este teve um impacto ao nível da morfologia cardíaca levando a um aumento do volume do ventrículo em paralelo com um aumento da área dos folículos da tiroide. A análise génica demonstrou que houve uma aparente alteração de expressão dos genes *Notch1b* e *Chrn3b*. A expressão da Tg permaneceu igual, no entanto a expressão da TSH demonstrou uma aparente diminuição da expressão. Estas evidências sugerem que o IOX em peixe-zebra juvenil afetou o funcionamento do coração e o eixo HPT.

Em conclusão, ambos os químicos afetaram o eixo HPT, embora de modo diferente confirmando a capacidade de se comportarem como EDCs.

Palavras-chave: Ioxynil, Diethylstilbestrol, Peixe-zebra, Tiroide, Eixo HPT, EDC.

Abstract

There is an urgency to study endocrine disruption chemicals (EDCs), due to their broad dispersion in the environment and negative effect on humans, animals, and ecosystems. The use of live vertebrate models to study the biological and structural function of the cells and tissues affected by pollutants helps to comprehend in detail the molecular and cellular events triggered by these chemicals. The zebrafish (*Danio rerio*) is an outstanding animal model for toxicological studies. It presents all vertebrate characteristics allowing for a detailed comprehension of the EDC may have in human health both during development and adult physiology. Chemicals such as the herbicide Ioxynil (IOX) and the steroid drug Diethylstilbestrol (DES) are commonly present in agricultural and veterinary use, and discarded as wastewater to the environment, they have a low solubility and a high bioaccumulation being important to understand the impact they have in the ecosystems.

In previous studies it was reported that IOX and DES have impairment effects on the embryonic development of the heart, vasculature, and thyroid gland in zebrafish. Those studies describe that effects of these chemicals in zebrafish embryos in micromolar levels are capable of altering the cardiac and vascular physiology and have the potential to indirectly impact the endocrine regulation of the thyroid. Transcriptome analysis also observed that these low concentrations of chemicals have the capacity to alter the expression of endothelial genes. These evidences suggest that low micromolar levels are not safe and might impact the environment.

The aim of this study was to understand the effect of IOX and DES in micromolar concentrations can have in juvenile cardiac morphology and function. Previous evidence shows that cardiac function is fundamental to the homeostasis of the thyroid gland. Therefore, it is interrogated how changes in cardiac morphology/function can impact in the sub-development of the thyroid that in turn affect the HPT axis.

DES chronic exposition in the juvenile did not lead to an alteration of cardiac morphology and likely its function. Although gene expression analyses indicated that the calcium physiology showed some alterations. It was observed an alteration in the dispersion of thyroid follicles alongside the aorta, where is evident an abnormal development of the follicles in areas far posterior and anterior of the normal development area. It was also observed an apparent decrease in Tg and TSH gene expression, suggesting that this steroid chemical might have direct impact on HPT-axis homeostasis.

In case of IOX this had an impact on the juvenile zebrafish cardiac morphology, leading to increased ventricle volume in parallel with an increase of the thyroid follicles. Analysis of gene expression demonstrates that IOX exposition leads to an alteration on the cardiac genes. Likewise, thyroglobulin (Tg) expression was in even levels though there is a low expression of thyrotropin (TSH). This evidence suggests that IOX in juvenile zebrafish had impact on the heart and consequently on the HPT system.

To summarize: (1) micromolar levels of IOX affect the cardiac system, increasing ventricle volume and indirectly impacted the thyroid follicles morphology and HPT axis; (2) the mechanism by which DES acts was not so clear. Nonetheless, it affected the thyroid field size, thus being capable of interfering with the HPT axis homeostasis; (3) these chemicals are capable of disrupting the endocrine function of the thyroid in juvenile zebrafish, in micromolecular levels, lower concentrations than those permitted by law. Overall, both chemicals have EDC potential albeit with different mechanisms.

Keywords: Ioxynil, Diethylstilbestrol, Zebrafish, Thyroid, HPT-axis, EDC.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Index de figuras.....	vii
Index de tabelas.....	vii
Abreviaturas.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Importância do estudo	1
1.2. Biogénese e regulação central do eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide	1
1.3. Sinalização celular das Hormonas da Tiroide	3
1.4. Desenvolvimento do sistema cardíaco e o seu efeito sobre a organogénese da glândula da tiroide.....	6
1.5. Função cardíaca, hipotiroidismo e hipertiroidismo.....	8
1.6. Disrupção endócrina da tiroide	9
1.7. Diethylstilbestrol	10
1.8. Ioxinil	11
1.9. Teleósteos como modelo animal para o estudo da disrupção endócrina da tiroide ..	12
1.10. Desenvolvimento e expressão de genes endoteliais	14
2. Objetivo	17
3. Materiais e métodos.....	17
3.1. Manutenção e reprodução de peixes-zebra	17
3.2. Curva de crescimento	17
3.3. Exposição aos compostos químicos	18
3.4. Análise de expressão génica por PCR não quantitativo (RT-PCR)	20
3.4.1. Recolha dos tecidos para o método RT-PCR.....	20
3.4.2. Extração total de RNA	20
3.4.3. Preparação para a conversão de DNA complementar.....	21
3.4.4. Método de transcrição reversa da reação da cadeia da polimerase (RT-PCR)..	21
3.5. Método de imunohistoquímica de fluorescência do coração em peixes-zebra	24
3.6. Método de imunohistoquímica de fluorescência em cortes histológicos.....	25
3.6.1. Método de Hematoxilina e Eosina em cortes histológicos de cabeça de peixes-zebra.....	25
3.6.2. Método de imunohistoquímica de fluorescência contra a tiroglobulina em cortes histológicos.....	25
3.7. Análise estatística.....	26
4. Resultados.....	28
4.1. Teste preliminar para a averiguação das condições ótimas para o estudo	28
4.2. O impacto dos tratamentos com os compostos químicos Ioxinil e Diethylstilbestrol sobre o crescimento e a mortalidade	30
4.3. Diethylstilbestrol.....	34
4.3.1. Análise morfológica do coração de peixe-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol	34
4.3.2. Análise de expressão génica por RT-PCR dos peixes-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol.....	36
4.3.3. Análise morfométrica dos folículos da tiroide de peixe-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol.....	38
4.4. Ioxinil	40
4.4.1. Análise morfológica do coração de peixes-zebra juvenis após a exposição a Ioxinil.....	40

4.4.2.	Análise de expressão génica em peixes-zebra juvenis após a exposição a Ioxinil.....	42
4.4.3.	Análise histológica dos folículos da tiroide em peixes-zebra juvenis expostos a Ioxinil.....	44
5.	Discussão.....	46
5.1.	Análise sobre as condições ótimas para o estudo.....	46
5.2.	Diethylstilbestrol e o seu impacto na comunicação do eixo HPT e morfologia da tiroide.....	47
5.3.	Ioxinil e o seu impacto na morfologia cardíaca.....	50
6.	Conclusão.....	52
7.	Estudos futuros.....	53
8.	Anexo 1.....	54
9.	Referências.....	55

Index de figuras:

Figura 1.1 Regulação da T4/T3 tem sobre o cérebro e no eixo hipotálamo-pituitária-tiroide (HPT) e a produção de TRH e TSH. Imagem retirada de Brent, G. A. (2012)	2
Figura 1.2 Conformações da tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4) e da triiodotironina (T3) e a reverse T3 (rT3) uma isoforma de T3. Imagem retirada de Brent, G. A. (2012).	3
Figura 1.3 Esquema da sinalização geral da Hormona da Tireoide numa célula.	5
Figura 1.5 Estrutura Molecular do Diethylstilbestrol (DES)	10
Figura 1.6 Estrutura Molecular do Ioxinil (IOX).	11
Figura 3.1 Esquema representativo da zona de interesse recolhida dos peixes-zebra duplo mutantes para análise RT-PCR, imunohistoquímica de coração e da zona dos folículos da tireoide. Esta zona contém o coração, o cérebro e os folículos da tireoide.	20
Figura 3.2 Esquema geral e simplificado da Metodologia aplicada neste estudo, extração para RT-PCR, Imunohistoquímica de fluorescência em corações, medição morfométrica de cortes histológicos.	27
Figura 4.1 Linha de tendência do crescimento de peixe-zebra <i>wild type</i> anotada ao longo de sete dias	28
Figura 4.2 Curvas de crescimento dos animais nas diferentes condições experimentais em cada ensaio independente realizado.	31
Figura 4.3 Gráfico de barras em percentagem sobre a taxa de mortalidade em percentagem, entre os tratamentos e os ensaios realizados em peixe-zebra juvenil.	33
Figura 4.4 (A) Projeção do coração do peixe-zebra dos tratamentos controlo e DES, após análise por imunofluorescência de GFP e mCherry	35
Figura 4.5 Análise de expressão de um conjunto de genes endoteliais e do eixo HPT em peixe-zebra juvenis imaturos expostos a 0.1µM DES durante 2 meses e animais controlo.	37
Figura 4.6. A exposição de peixes-zebra juvenis a 0.1µM DES leva a uma expansão da área ocupada pelos folículos da tireoide ao longo da aorta.	39
Figura 4.7 (A) Projeção do coração do peixe-zebra dos tratamentos controlo e IOX, após análise por imunofluorescência de GFP e mCherry.	41
Figura 4.8 Análise de expressão de um conjunto de genes endoteliais e do eixo HPT em peixe-zebra juvenis imaturos expostos a 0.1µM IOX durante 2 meses e animais controlo.	43
Figura 4.9 A exposição de peixes-zebra juvenis a 0.1µM IOX leva a uma expansão da área ocupada pelos folículos da tireoide ao longo da aorta.	45
Figura 5.1 Esquema geral do impacto do químico DES em peixe-zebra e conclusões gerais.	49
Figura 5.2 Esquema geral do impacto do químico IOX em peixe-zebra e conclusões gerais.	51
Figura 7.1 Imagem de imunohistoquímica de peixe-zebra Tg(cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry), com tratamento com 1µM DES.	54

Index de tabelas

Tabela 3.1 Primers dos genes alvos utilizados na análise de expressão relativa dos PCRs, foram selecionados 15 genes mais o 18s.	23
Tabela 4.1 Tabela resumo, quantidade de alimento e químico a ser administrado por semana no tratamento DES e IOX.	29
Tabela 4.2 Equações das linhas de tendência dos gráficos referentes ao primeiro e segundo ensaio.	23
Tabela 5.2 Resumo dos níveis de expressão das bandas analisadas no tratamento IOX em relação ao controlo.	47
Tabela 5.2 Resumo dos níveis de expressão das bandas analisadas no tratamento IOX em relação ao controlo.	50

Abreviaturas:

Acvr1bb – recetor de activina tipo 1Bb
Adrb1 – recetor adrenérgico 1 β
Cacna1da – subunidade alfa 1D do canal cálcio tipo L dependente da voltagem
Cacna1ha – subunidade alfa 1H do canal cálcio dependente da voltagem
Cacng2b – subunidade gama 2b do canal cálcio dependente da voltagem
Cadma1a – isoforma 3 da molécula de adesão celular 1a
Calcr – recetor da calcitonina
CBP – Proteína de ligação ao cortisol
cDNA – DNA complementar
Chrn3a – recetor colinérgico, nicotínico, precursor do polipéptido beta 3a
cmcl2:GFP – cadeia leve da miosina cardíaca marcada com GFP
CoA - Coativadores
CoR - Corepressores
CRH – Fator de libertação de corticotropina
D1 – Deiodinase I
D2 – Deiodinase II
D3 – Deiodinase III
DES - Diethylstilbestrol
EDCs – Disruptores Endócrinos
hpf – horas pós-fertilização
HPT – Hipotálamo-Pituitária-Tiroide;
HTs – Hormonas da tiroide;
IOX - Ioxinil

kdrl:mCherry – Recetor de domínio de inserção da quinase marcada com mCherry
MCT – Proteína transportadora de monocarboxilatos
Mhc1lia – hemocromatose hereditária
Mybcp2a – proteína tipo C que se liga rapidamente à miosina a
Notch1b – receptor notch 1b
Ptgir – recetor semelhante ao recetor da prostaciclina
rT₃ – triiodotironina reversa
RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR – reação em cadeia polimerase quantitativo em tempo real
RxR – Recetor x Retinoide
T₃ – 3,5,3' - triiodotironina
T₄ – tiroxina
TBG – globulina de ligação à tiroxina
Tg - tiroglobulina
TR – recetor nuclear da tiroide
TREs – Elementos de resposta à hormona da tiroide
TRH – hormona libertadora de tirotropina
TSH – hormona estimuladora da tiroide ou tirotropina
TTR – transtiretina ou proteína transportadora da T₃
VE – ventrículo esquerdo
Vwf – fator von willebrand

1. Introdução

1.1. Importância do estudo

As hormonas da tiroide (HTs) têm efeitos sobre o desenvolvimento, crescimento, metabolismo e homeostasia dos vertebrados. Estas hormonas têm impacto sobre a embriogénese e o desenvolvimento pós-natal, que sem tratamento pode levar ao cretinismo (disfunção cerebral irreversível) e nanismo¹. As HTs têm assim um papel importante na homeostasia dos vertebrados e a prevalência de problemas associados ao sistema endócrino leva a uma urgência de compreender os mecanismos de desregulação². A existência de compostos químicos antropogénicos levam ao desenvolvimento de doenças, tal como obesidade, hipertiroidismo e hipotiroidismo³.

1.2. Biogénese e regulação central do eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide

O sistema endócrino da tiroide encontra-se envolvido em todas as fases de vida dos vertebrados. A sua regulação encontra-se intimamente ligada ao sistema nervoso central. A informação externa e interna é processada pelo cérebro este regula a secreção de hormonas de acordo com variados estímulos (temperatura externa, fotoperíodo, metabolismo basal e secreções químicas de tecidos da periferia).

Em humanos, o eixo Hipotálamo-Pituitária-Tiroide (HPT) começa pela síntese de hormona libertadora de tiotropina (TRH), e esta é sintetizada no hipotálamo. A TRH é entregue nos tiotrofos (células endócrinas) que se situam na glândula pituitária anterior e estimula a síntese e a libertação da hormona estimuladora da tiroide ou tiotropina (TSH). A TSH é libertada para a corrente sanguínea e regula a atividade da tiroide, ligando-se aos recetores da superfície dos folículos e estimulando a entrada do iodeto (I⁻). Este, vai iodar os resíduos tirosil da tiroglobulina (Tg). A partir da Tg disponível no coloide dos folículos são produzidas as iodotironinas: tiroxina (T₄) e pouca 3,5,3'-triodotironina (T₃) (Fig. 1.1)⁴.

Os folículos possuem uma estrutura esférica de interior acelular e com um poder redox muito elevado⁴. A Tg sofre alterações de conformação dentro de vesículas específicas localizadas na célula folicular da tiroide. Que depois é transportada por exocitose para o coloide, onde é armazenada perto das paredes do mesmo. O iodo oxidado liga-se

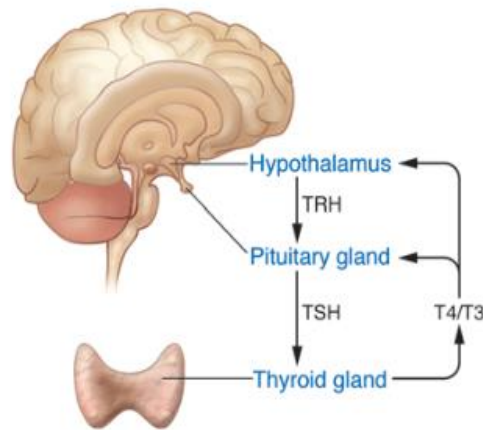


Figura 1.1 Regulação da T₄/T₃ têm sobre o cérebro e no eixo hipotálamo-pituitária-tiroide (HPT) e a produção de TRH e TSH. Imagem retirada de Brent, G. A. (2012).

covalentemente à Tg, originando maioritariamente T₄. As células da tiroide respondem rapidamente às alterações de concentração de TSH que regula a quantidade de Tg produzida. As hormonas T₄ e T₃ são mantidas no coloide, ligadas ao polipéptido da Tg (estrutura molecular das HTs Fig. 1.2)⁴. E após complexas reações, as hormonas T₄ e T₃ são libertadas da Tg com o auxílio de enzimas proteolíticas. As HTs são secretadas para o sangue com o auxílio da proteína transportadora de monocarboxilatos (MCT). Este processo ocorre na zona epitelial das células da tiroide (Fig. 1.3)⁵. A glândula da tiroide, contém uma rede de capilares que rodeia cada folículo providenciando uma libertação contínua de hormonas no sistema vascular¹. Mutações associadas a estes transportadores podem levar a alterações na regulação das HTs⁵.

As hormonas são transportadas no sangue por proteínas específicas como a globulina de ligação à tiroxina (TBG) (75% em humanos), transtiretina ou proteína transportadora de T₃ (TTR) (15%), e as restantes HTs ligam-se à albumina. A TBG é a proteína com maior afinidade pela T₄, e pertence à classe de proteínas de ligação do cortisol. As hormonas que se encontram sobre a forma livre estão diretamente disponíveis para a metabolização das células. Esta forma de associação das hormonas a uma proteína é um método eficaz para a reserva das mesmas⁶.

Na corrente sanguínea, a T_4 é transportada para o fígado e os tecidos periféricos para ser convertida em T_3 ou T_3 reversa (rT_3) com o auxílio das deiodinases. T_3 é a forma da hormona ativa e a rT_3 é a forma inativa⁷. A T_4 regula a libertação de TSH e TRH através do mecanismo de *feedback* negativo⁴. Quando presentes em concentrações elevadas, estas suprimem a libertação de TRH e TSH, reduzindo a produção de HTs. As hormonas da tiroide são inativadas através da sulfatação pelas sulfotransferases do fígado, ou pela glucorinação pela UDP-glucuroniltransferase, sendo por fim expelidas através da urina ou pelo trato intestinal⁴.

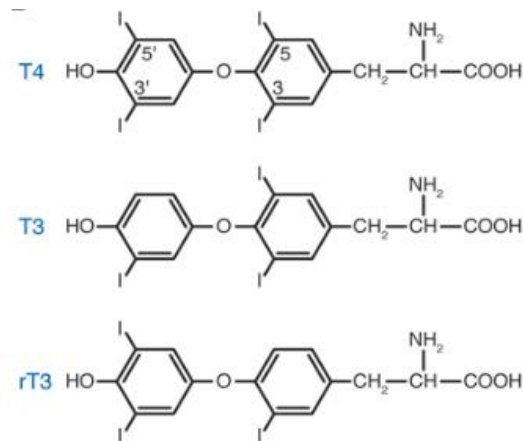


Figura 1.2 Estrutura das moléculas da tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T_4) e da triiodotironina (T_3) e a reverse T_3 (rT_3) uma isoforma de T_3 . Imagem retirada de Brent, G. A. (2012).

A T_3 é a hormona biologicamente ativa e regula processos genéticos como: glicólise, lipogénese, proliferação celular, apoptose e interfere com genes relacionados com a produção de insulina, imunidade celular, estrutura da matriz extracelular, arquitetura da célula e função mitocondrial⁸. As HTs regulam os processos metabólicos no organismo essenciais para o crescimento e homeostasia do indivíduo. Os níveis hormonais no organismo estão diretamente relacionados com o peso e com a energia gasta.

1.3. Sinalização celular das Hormonas da Tiroide

As HTs têm um papel importante na regulação de genes. As HTs entram nas células-alvo com o auxílio de transportadores membranares específicos. Os transportadores orgânicos iónicos são capazes de transportar diferentes iodotironinas como as HTs. Os níveis de HTs nos tecidos nem sempre representam os níveis de hormona total no organismo. Estes níveis de HTs no tecido são determinados pelas deiodinases⁹.

A pro-hormona T₄ necessita de ser convertida em T₃, e este processo é feito através de uma família de enzimas denominadas de deiodinases. A T₃ liga-se aos recetores nucleares da tiroide das células, regulando diretamente todo o processo de transcrição de genes alvo (Fig.1.4). *In vitro* foi observada a ligação T₄ aos recetores da hormona da tiroide (TRs) em concentrações farmacológicas, no entanto, *in vivo* os TRs possuem uma maior afinidade pela T₃⁹.

Existem duas enzimas ativadoras: Deiodinase I e II (D1 e D2) e outra responsável pela inativação da T₃: Deiodinase III (D3). Ao longo do desenvolvimento do indivíduo, estas diferentes enzimas são expressas em diferentes tecidos¹⁰. As deiodinases possuem um papel crucial na regulação dos níveis intracelulares de T₃ e são enzimas membranares localizadas na zona distal do Golgi, e são responsáveis pela remoção do iodo das iodotironinas⁶.

A T₃ interage diretamente com os recetores da hormona da tiroide (TRs). Os TRs pertencem à superfamília dos recetores hormonais nucleares¹¹ e contêm um domínio de ligação ao DNA e um domínio terminal COOH, que medeia as interações de ligação com os coativadores (CoA) e os corepressores (CoR)¹⁰. Os TRs ligam-se diretamente ao DNA e reconhecem sequências muito específicas denominadas de elementos de resposta à hormona da tiroide (TRE) e que se encontram nos promotores dos genes alvo¹¹. Complexos de T₃-TR ligam-se aos TRE, durante este processo, os CoR e os CoA são recrutados ou removidos. Estas interações causam alterações na conformação da cromatina, através da acetilação e da deacetilação das histonas (compactação e libertação da estrutura da cromatina), permitindo regular o acesso da maquinaria transcriptional aos genes alvo (Fig. 1.5). Os TRs promovem ou inibem a transcrição de genes alvo das HTs¹¹. Na ausência das HTs pode ocorrer ligação dos TRs aos TREs e existir uma inibição da transcrição basal. A diferença no comprimento de sequências específicas ajuda a determinar onde é que um CoR ou um CoA se liga aos TRs. (Resumo geral dos mecanismos das HTs Fig.1.3).

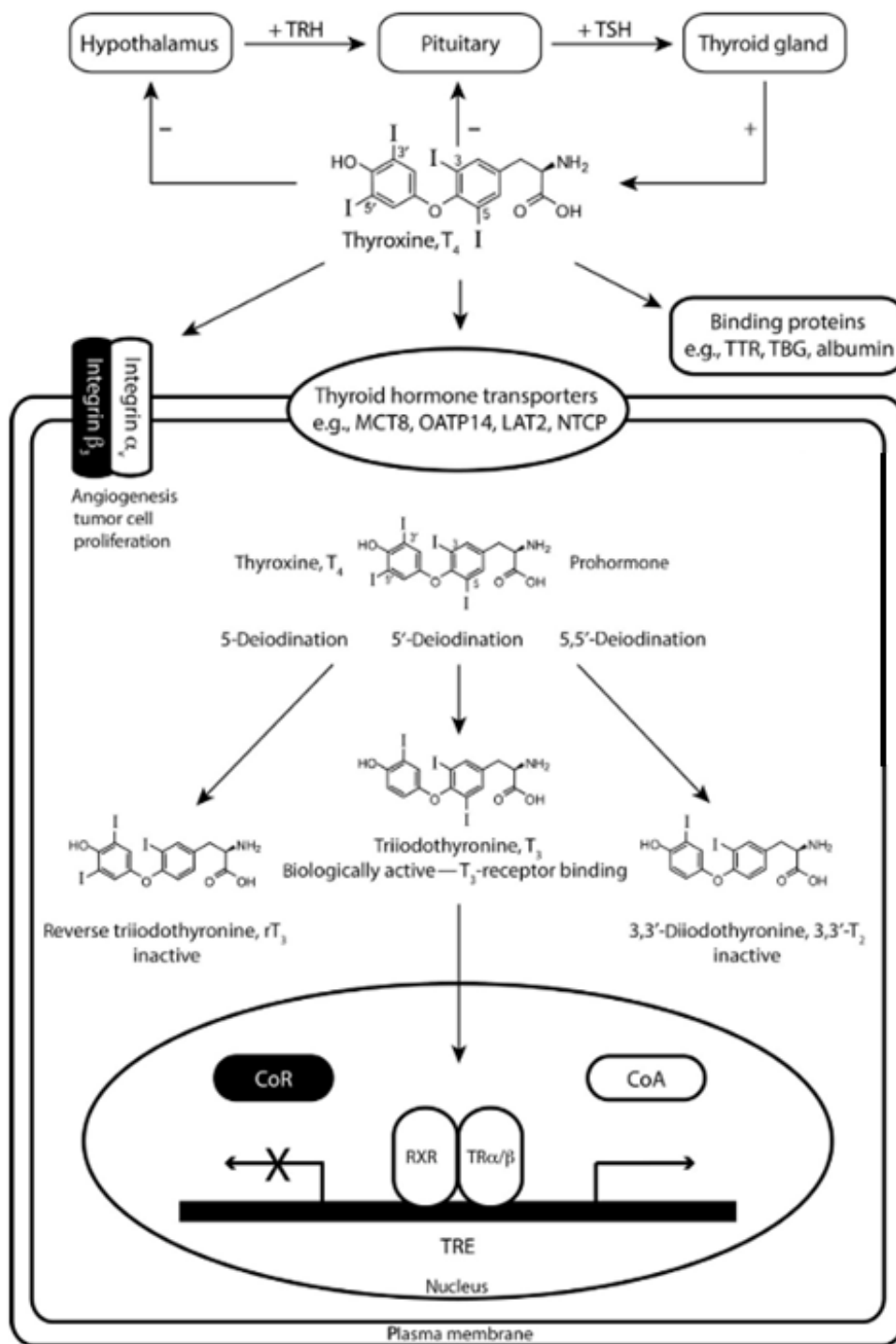


Figura 1.3 Esquema da sinalização geral da Hormona da Tireoide numa célula.

T₄ é libertada pela glândula da tireoide em resposta à TSH secretada pela pituitária que por sua vez é regulada pela TRH do hipotálamo. T₄ pode sinalizar via extracelular pela interação da integrina α_vβ₃ numa ação não genómica. Após a entrada da T₄ na célula pelos recetores esta é convertida a T₃ pelas deiodinases. As deiodinases não só ativam a T₄ como também podem inativar a T₄ e T₃ transformando-as em rT₃ e 3,3'-T₂. T₃ liga-se ao TR no núcleo em que heterodimerizam com o RXR e controlam a transcrição dos genes alvo. Imagem adaptada de Braun, D. & Schweizer, U. (2018).

1.4. Desenvolvimento do sistema cardíaco e o seu efeito sobre a organogênese da glândula da tiroide

O coração é um órgão de grande importância que regula a homeostasia de variados órgãos. O batimento cardíaco irregular está relacionado com o tempo de vida de um indivíduo. O batimento cardíaco é um forte indicador da mortalidade vascular independentemente de outros fatores de risco como hipertensão, diabetes ou tabaco. O batimento cardíaco determina o fluxo coronário sanguíneo e o consumo de oxigênio no miocárdio. Pode ocorrer que a estimulação irregular do miocárdio pode impor stress sobre a vasculatura arterial¹².

No coração, cada câmara serve como uma subunidade funcional, e é reconhecido que as proporções relativas das câmaras cardíacas são constantes em condições fisiológicas normais¹³. Quando existe uma falha na homeostasia do corpo, os órgãos tendem a compensar ou a alterar o seu funcionamento para atingir um equilíbrio homeostático¹⁴.

A alteração da expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e o batimento cardíaco demonstram uma resposta dinâmica, apresentando alterações ao nível da morfologia cardíaca. Padrões importantes nos estudos toxicológicos, demonstram a forma intrínseca de como os fatores epigenéticos influenciam a morfogênese do coração¹⁵. Os problemas associados ao desenvolvimento cardíaco têm impacto sobre a tiroide, que leva a entender que existe um contato próximo tanto físico como molecular entre a tiroide e o saco aórtico¹⁶.

Estudos comparativos em diversos vertebrados realçam a ideia de que a morfologia e o desenvolvimento cardíaco têm impacto sobre o desenvolvimento da tiroide¹⁷. Quando o coração assume a sua posição final durante o desenvolvimento embrionário, este determina a localização da glândula na zona faríngea. Esta hipótese é fundamentada nos folículos ectópicos encontrados perto do coração e da aorta, em condições patológicas e em organismos como os ratos e os peixes-zebra¹⁷. Também existem evidências de malformações cardíacas que têm impacto sobre a morfologia da tiroide¹⁸. Dados como estes sugerem que a dependência da morfogênese da tiroide consoante o desenvolvimento das artérias adjacentes é um mecanismo conservado que liberta de forma eficiente as HTs¹⁹.

Em rato e peixe-zebra foi demonstrado que as artérias definem a posição da glândula da tiroide durante o desenvolvimento¹⁹. Este processo ocorre durante o desenvolvimento do tecido da tiroide e depende do estímulo das células ectópicas vasculares, um estímulo não autónomo. Em peixes-zebra é possível observar que os vasos sanguíneos adjacentes à aorta ventral, na zona faríngea, determinam a localização do tecido da glândula da tiroide. É também essencial a presença de células endoteliais para um desenvolvimento correto da tiroide¹⁹. Foi

também identificado em outros teleósteos como a truta²⁰ que o desenvolvimento da tiroide está intimamente ligado com o desenvolvimento tardio da aorta ventral na vida adulta do indivíduo. No caso dos ratos, é considerado que as artérias carótidas são capazes de ter o mesmo papel que a aorta ventral em peixes-zebra na morfogênese da tiroide¹⁹.

Nestes estudos é evidente que a função do coração tem impacto na tiroide. Foi observado que os compostos químicos como o Diethylstilbestrol (DES) e o Ioxinil (IOX) afetam a relação entre o desenvolvimento do órgão cardíaco e da tiroide em embriões peixes-zebra. É observada uma alteração no batimento cardíaco durante a segunda fase do desenvolvimento, que por sua vez tem impacto sobre o desenvolvimento da tiroide, reduzindo o campo dos folículos ao longo da aorta^{21,22}. Embora existam alguns estudos, ainda não foi aprofundado como é que as alterações no sistema cardíaco podem impactar a regulação e a morfologia da tiroide em peixe-zebra juvenil e, sendo este um ponto a focar neste estudo.

Mas, tal como o coração afeta o desenvolvimento da tiroide, o contrário também ocorre. As HTs têm efeitos sobre a periferia do sistema cardiovascular e em particular no miocárdio. A hormona da tiroide ajuda na regulação da resistência vascular, do *output* cardíaco, do batimento cardíaco e da pressão sanguínea²³. O coração depende da T₃ em circulação, pois nos cardiomiócitos a atividade da enzima D2 é inexistente. As ações genómicas da T₃ resultam quando esta se liga aos TRs. O seu efeito genómico é duradouro apesar de lenta atuação²³. Todas as isoformas de TRs são expressas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos em condições fisiológicas normais.

O sistema cardiovascular responde a mínimas, mas persistentes mudanças, nas alterações dos níveis de HTs. O aumento ou diminuição da ação da tiroide nos *pathways* moleculares do coração podem alterar o estado cardiovascular. Estes estados estão associados a alterações da taxa de batimento cardíaco, do aumento da sístole ventricular esquerda (VE) e do aumento da função diastólica.

1.5. Função cardíaca, hipotireoidismo e hipertireoidismo

Hipotireoidismo: É definido por níveis elevados de TSH na presença de níveis normais de HTs livre. Nos indivíduos com hipotireoidismo existem mudanças na função metabólica e nos órgãos. A taxa cardíaca e pressão sanguínea são normais, no entanto, existem anormalidades significativas no sistema parassimpático nervoso, havendo um crescimento da hipertensão sistêmica²⁴. As complicações reconhecidas são: a disfunção diastólica no ventrículo esquerdo (VE), caracterizado pelo relaxamento lento do miocárdio e o enchimento precoce da cavidade ventricular, tanto no descanso como em esforço. As HT têm impacto sobre a expressão genética dos cardiomiócitos, alterando o impulso e o ritmo cardíaco. Estas alterações podem levar a desregulações cardíacas afetando a morfologia do coração e o sistema cardiovascular que pode levar ao enfarte do miocárdio²⁴. Em animais, uma concentração baixa de T₃ está associada a uma contração cardíaca debilitada e a alteração de expressão de genes – característica do hipotireoidismo²⁴.

Hipertireoidismo: Caracterizado pela inibição ou decréscimo dos níveis de TSH na presença de níveis elevados de HTs. As irregularidades encontradas são: a prevalência de arritmias supraventriculares e o aumento de massa muscular no VE devido ao espessamento da parede cardíaca. Também foi observado que a função sistólica aumenta sutilmente e com este aumento existe uma debilitação diastólica que se deve ao relaxamento lento do miocárdio. Estas alterações cardíacas também envolvem a redução da performance física que leva ao aumento do risco de mortalidade cardiovascular. A hipertrofia do VE é causada pela duração do hipertireoidismo e não pela circulação de HTs, através da alteração intracelular do cálcio. Estas mudanças são todas reguladas pelas HTs ao nível da expressão de genes cardíacos²⁴.

1.6. Disrupção endócrina da tiroide

Recentemente, a sensibilização pública tem aumentado face ao impacto negativo dos poluentes na saúde humana e no ambiente²⁵. Variados problemas de saúde têm sido relacionados com a exposição de contaminantes antropogénicos. Estes compostos químicos que afetam o funcionamento do sistema endócrino são denominados de disruptores endócrinos químicos (EDCs). EDCs são agentes exógenos que interferem com a produção, libertação, transporte, metabolização ou ligação de hormonas naturais no corpo. Estas encontram-se responsáveis por interferir na homeostasia e regulação dos processos de desenvolvimento, podendo ter efeitos prejudiciais¹⁶.

Os teleósteos e os anfíbios são animais modelo com desenvolvimento similar ao dos vertebrados superiores, e permitem observar como é que compostos químicos podem influenciar negativamente o eixo HPT. Estes animais modelo têm a maior parte do seu ciclo de vida num meio aquático, estando expostos de forma constante aos diferentes compostos químicos tóxicos solúveis²⁶. Os EDCs conseguem interferir e alterar os níveis de HTs no organismo, interferindo com o eixo HPT e outros mecanismos a *downstream*⁴ (modificam as HTs em circulação, a expressão de TSH e a biodisponibilidade de HTs, interferindo com a ligação das hormonas e com as proteínas TTR e as deiodinases²⁷). Esta interferência leva a uma compensação no organismo⁴. Alterações hormonais como estas estão comprovadas que podem levar a um retardamento no crescimento em teleósteos²⁸.

Compostos químicos provenientes da agropecuária são fontes de contaminação da água. Esta contaminação é realizada através de escoamentos, deposição atmosférica ou escoamento para lençóis freáticos. O impacto que os pesticidas e herbicidas têm sobre o eixo HPT ainda foi pouco estudado²⁶.

Ioxinil e o Diethylstilbestrol são dois compostos químicos com potencial de EDC sobre a tiroide e estudos recentes têm vindo a ilustrar os problemas associados com a sua exposição.

1.7. Diethylstilbestrol

O Diethylstilbestrol (DES) (Fig. 1.4), é um medicamento estrogénico não esteroide, cuja molécula é composta por dois grupos hidroxilos que são muito semelhantes ao do estradiol (hormona natural do corpo humano). O potencial de disrupção endócrino desta molécula é elevado. Embora atualmente em desuso, nos anos 70 existiu uma polémica relacionada com a sua administração. Foi relacionado o uso do composto químico com o aparecimento de cancro em humanos. Foi inicialmente usado como terapia hormonal para mulheres que possuíam um historial de abortos e este composto químico ajudava na regulação da menopausa. Foi também um suplemento estrogénico administrado para tratar o cancro da próstata e o cancro da mama. O DES é administrado por via oral, via tópica ou por injeção. Sendo um estrogénio não esteroide, comporta-se como um agonista aos recetores de estrogénio²⁹. O DES é conhecido por ter vários efeitos secundários como a criação de coágulos no sangue e problemas cardiovasculares³⁰.

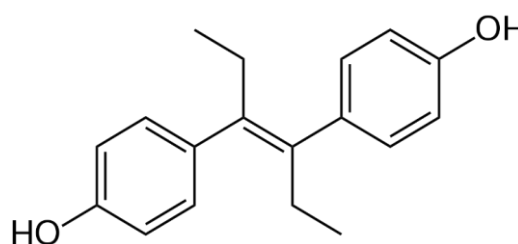


Figura 1.4 Estrutura Molecular do Diethylstilbestrol (DES) retirada de Wikipédia, 2019.

Estudos demonstraram que várias gerações familiares expostas ao DES foram afetadas negativamente com cancros em múltiplos órgãos. Concluindo que o DES tem um impacto ao nível epigenético levando a alterações ao nível da expansão das células germinais³¹. Apesar de proibido em humanos é ainda usado na área da agropecuária. A sua solubilidade é de 12 mg/L na água, mas é bastante solúvel em álcool, éter e clorofórmio³². A utilização do DES no uso veterinário e na agropecuária pode resultar no escoamento para as águas residuais. Sem a remoção apropriada deste fármaco, este acaba por se infiltrar nos rios ou nos lençóis freáticos e que pode afetar outros seres vivos nomeadamente os organismos aquáticos.

A interação do químico DES com a TTR já foi testada em *Rana*, *Xenopus*³³, codorniz³⁴ e galinha³⁵, onde foi observada uma afinidade elevada pela molécula, sendo capaz de competir com o local de ligação com a T₃. Esta evidência é uma indicação de como o químico pode causar disrupção endócrina em peixes-zebra.

Em estudos realizados em *Xenopus* foi observado que o DES em concentrações altas (200 nmol/g de peso) tem impacto sobre a homeostasia das HTs *in vivo*³⁶. No caso dos teleósteos, concentrações micromolares de DES e IOX foram capazes de alterar indiretamente o desenvolvimento da tiroide, atuando sobre o sistema cardiovascular^{21,22}. Um exemplo destes

estudos foi aplicado em dourada e foi demonstrado que o químico DES teve impacto sobre a estimulação dos folículos da tiroide, da pituitária e das deiodinases³⁷.

1.8. Ioxinil

O Ioxinil (IOX), também conhecido como Bentrol, é um herbicida fenólico usado com o objetivo de inibir a fotossíntese e atua sobre o fotossistema II. Também impede a fosforilação oxidativa nas plantas daninhas³⁸. É um herbicida comumente usado na Europa e na Ásia. A sua fórmula química contém dois íons de iodo ligados a um anel aromático (Fig. 1.5). O uso do Ioxinil como herbicida permite o escoamento para os lençóis freáticos ou rios, tendo impacto sobre o ciclo da água. Tem uma solubilidade na água de 3034 mg/L, um valor com impacto ambiental significativo. Estudos ecotóxicos mostram uma acumulação biológica moderada deste químico em peixes, como *Colinus virginianus*, *Oncorhynchus mykiss*, e existindo também uma acumulação pouco significativa em mamíferos e em aves³⁹. A escala de Cramer (escala de preocupação toxicológica) coloca este químico na classe III, com um valor de preocupação elevado. A exposição mais comum é a via de ingestão de comida contaminada³⁹.

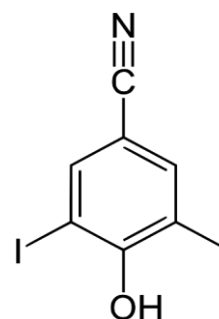


Figura 1.5 Estrutura Molecular do Ioxinil (IOX) retirada de Wikipédia, 2019.

O químico é conhecido por ser um disruptor endócrino.

Estudos feitos até à data comprovaram que o IOX *in vitro* tem uma ligação de grande afinidade à TTR (como observado em dourada⁴⁰), competindo pelo local de ligação com a T₃. E *in vivo* foi observado em diferentes vertebrados (truta arco-íris, sapo touro, galinha, porco, ratazana e rato) a interação deste composto com diferentes proteínas como lipoproteínas, albumina e TTR. Podendo assim interferir no transporte sanguíneo das HTs e não no interior das células³⁸.

Em *Xenopus laevis*^{38,36}, o IOX teve um efeito disruptor da tiroide, através de dois mecanismos propostos: interferência na homeostasia da Tg no plasma e com o *pathway* das HTs nas células. O IOX tem capacidade de suprimir a transcrição da T₃ quando ligado às histonas da cromatina³⁶.

Em dourada foi demonstrado o efeito *in vivo* do IOX sobre o eixo HPT, a pituitária, os tecidos da tiroide e a expressão de deiodinases³⁷. Em embriões de peixes-zebra e quando expostos a concentrações micromolares, este composto foi capaz de alterar o desenvolvimento da tiroide, através do impacto sobre o sistema cardíaco²¹. Mais tarde comprovou-se que este

composto tem impacto sobre o ritmo cardíaco em embriões de peixe-zebra, que resulta na alteração do desenvolvimento dos folículos da tiroide²². Estes estudos demonstram o impacto do químico IOX como disruptor endócrino da tiroide através do impacto que tem sobre o desenvolvimento e função cardíaca.

1.9. Teleósteos como modelo animal para o estudo da disrupção endócrina da tiroide

Os teleósteos são um grupo muito diversificado e, na sua grande maioria, entre a fase embrionária e adulta existe uma fase larvar. O desenvolvimento das larvas em animais juvenis é denominado de metamorfose. A hormona da tiroide é essencial para esta transformação, pois regula esta fase do desenvolvimento.

O peixe-zebra é um modelo animal de grande interesse para ensaios biomédicos. Devido à clareza ótica dos embriões, a sua rápida organogénese e manipulação genética torna este organismo uma ferramenta útil para estudos biotecnológicos e estudos de desenvolvimento. O peixe-zebra tem uma elevada taxa de reprodução, em que cada fêmea tem uma postura de 200-250 ovos. Os custos de manutenção destes animais são relativamente baixos. É reconhecido que o sistema nervoso, cardiovascular e digestivo são similares ao dos mamíferos, criando um paralelismo entre estes organismos⁴¹. O ciclo de vida dos peixes-zebra é composto por cinco fases: ovo não fertilizado, embrião, estado larval, juvenil e por fim adulto⁴².

Ao nível do sistema cardiovascular o peixe-zebra tem o coração composto apenas por um átrio e um ventrículo. Os mecanismos moleculares são semelhantes aos dos corações dos vertebrados superiores. O coração do peixe-zebra consiste na sino venosa, seguida de duas câmaras cardíacas: o átrio e o ventrículo, seguido do bolbo arterioso. O sangue venoso é bombeado pela aorta ventral até às guelras onde ocorre a oxigenação. A partir deste ponto o sangue oxigenado é distribuído pelo corpo⁴³.

Após 48 horas pós-fertilização (hpf) o peixe-zebra, possui um coração totalmente desenvolvido, no entanto, consegue sobreviver durante uma semana sem um sistema cardiovascular funcional. Tendo em conta esta vantagem o peixe-zebra é um organismo modelo de grande interesse com inúmeros estudos ao nível do desenvolvimento cardíaco⁴⁴.

O peixe-zebra começa a expressar Tg antes da evaginação do primórdio da tiroide do epitélio faríngeo após 30 hpf. E após 55 hpf é possível observar-se uma diferenciação total da glândula da tiroide. A glândula depois desenvolve-se com alongamento da maxila¹¹. No peixe-zebra não existe uma glândula perfeitamente encapsulada como nos tetrápodes. No entanto, os

folículos da tireoide têm a mesma morfologia, bioquímica e função. No lúmen dos folículos é iodada a Tg. O desenvolvimento da tireoide no peixe-zebra é geralmente comparado com o desenvolvimento da tireoide nos restantes vertebrados.

Existe uma heterogeneidade na anatomia dos folículos da tireoide nos peixes teleósteos, estes folículos possuem diferentes tamanhos e estados funcionais. Existe a hipótese que os folículos estão num ciclo de geração, maturação e decaimento ao longo do seu ciclo de vida⁴⁵. Os folículos da tireoide são variáveis em tamanho, forma e localização. No caso dos teleósteos, a tireoide encontra-se dispersa nos tecidos conetivos ao longo da região faríngea, localizado perto da aorta ventral¹⁹.

A regulação central dos níveis das HTs em peixes é semelhante à dos mamíferos. Nos mamíferos este sistema é controlado pelo eixo HPT. Em teleósteos o papel do hipotálamo não está definido, diferindo de acordo com a espécie⁴⁶. No caso do peixe-zebra a secreção da hormona TSH é regulada pelo fator de libertação de corticotropina (CRH) sintetizada no hipotálamo. Em peixes-zebra as HTs são importantes para a transição da fase de embrião para a larvar e da fase larvar para a juvenil²⁸. Substâncias que interferem com o desenvolvimento normal dos peixes têm consequências sobre o fitness e a sobrevivência⁴⁷.

Para estes estudos é importante referir que existe um grande número de técnicas e ferramentas que permitem o estudo de disrupção de genes de interesse. Por exemplo, a técnica por uso de morfolinós com oligonucleótidos de cadeia antiparalela permite uma rápida disrupção de genes de interesse, especialmente no caso dos genes relacionados com o sistema cardiovascular⁴⁴.

Assim o peixe-zebra é um modelo animal vertebrado de excelência para estudar *in vivo* os efeitos de disruptores endócrinos.

1.10. Desenvolvimento e expressão de genes endoteliais

O tecido endotelial reveste o sistema vascular e é composto por uma única camada de células endoteliais. O endotélio vascular é importante, pois encontra-se em sinergia com diversos processos fisiológicos como o fluxo sanguíneo, a manutenção do sistema vascular, a coagulação, trocas de nutrientes e o desenvolvimento dos órgãos. As células endoteliais produzem uma variedade de substâncias vasoativas, como a prostacilina e o óxido nítrico (importantes na vasodilatação). Estas células têm uma elevada importância na angiogénese e na vasculogénese. Quando há o primeiro indício de batimento cardíaco, inicia-se o desenvolvimento dos vasos sanguíneos com a diferenciação das artérias, dos capilares e das veias⁴⁸.

Num estudo anterior, em embriões de peixes-zebra²², foi avaliado em células endoteliais isoladas quais os efeitos dos compostos químicos DES e IOX sobre o seu transcriptoma. Estes compostos demonstraram afetar a regulação de genes endoteliais. Os genes que se encontravam com a expressão alterada estão relacionados com a função de células endoteliais, como a função vascular, a função cardíaca, a homeostasia do cálcio, e outros genes.

Os genes relacionados com o sistema cardíaco em estudo são os seguintes:

- *Acvr1bb* (recetor de activina tipo 1Bb) – envolvido em processos que incluem mecanismos associados com o recetor da activina, relacionado com a resposta ao estímulo celular do fator de crescimento e a fosforilação das proteínas⁴⁹;
- *Adrb1* (recetor adrenérgico 1 β) – encontra-se envolvido na regulação da taxa de batimento cardíaco e a regulação da atividade do recetor adrenérgico e com o batimento cardíaco, influenciando a taxa de batimento e a contractilidade do órgão cardíaco⁵⁰;
- *Cadm1a* (isoforma 3 da molécula de adesão celular 1a) – encontra-se envolvido no desenvolvimento das células gliais e da retina, é um componente integral da membrana celular⁵¹;
- *Mybpc2a* (proteína tipo C que se liga rapidamente à miosina) – é um fator crucial envolvido na contração muscular⁵²;
- *Notch1b* (recetor notch 1b) – é previsto estar relacionado com a ligação do ião cálcio e na sinalização da ativação de recetores⁵³. Encontra-se envolvido em diversos processos, incluindo na regeneração das barbatanas, no desenvolvimento do sistema nervoso e no desenvolvimento vascular. Os genes Notch são genes altamente conservados ao longo da evolução animal⁵⁴. Estes recetores permitem a comunicação entre células adjacentes,

regulam proteínas da membrana e as decisões de diferenciação celular e crescimento das células⁵⁵;

- Ptgir (recetor semelhante ao recetor da prostaciclina) – e encontra-se envolvido em diversos processos como, a ativação do mecanismo do recetor acoplado à proteína G de ativação da adenilato ciclase e também encontra-se envolvido com a regulação negativa da proliferação do músculo liso e a regulação positiva da concentração citosólica do ião cálcio⁵⁶.

A homeostasia do cálcio tem uma importância singular na viabilidade das células do miocárdio. Este catião é essencial para o funcionamento cardíaco, contudo em concentrações muito altas ou baixas pode levar à disfunção e morte das células cardíacas⁵⁷. Os genes em estudo sobre a homeostasia do cálcio são os seguintes:

- Cacna1d (subunidade alfa 1D do canal cálcio tipo L dependente da voltagem) – é referente à deteção mecânica dos estímulos recebidos através do som, envolvido também no processo neuromuscular do controlo do equilíbrio, e na organização sináptica⁵⁸;
- Cacna1h (subunidade alfa 1H do canal cálcio dependente da voltagem) – e encontra-se envolvido em diversos processos como: importação dos iões de cálcio e potencial de ação dos neurónios⁵⁹. Este gene está relacionado com o canal de cálcio tipo T, que nos mamíferos é expresso no coração. Também foi comprovado ser expresso nos cardiomiócitos do átrio e do ventrículo dos peixes-zebra. E esta expressão é importante para o batimento cardíaco, contribuindo para a despolarização do *pacemaker*⁶⁰. Em mamíferos, quando a sua expressão aumenta, é responsável por doenças como a hipertensão genética, a hipertrofia cardíaca e a aterosclerose. Os canais de cálcio são importantes para o controlo cardíaco no acoplamento da contração e excitação do coração em peixes-zebra⁶⁰;
- Cacng2b (subunidade gama 2b do canal cálcio dependente da voltagem) – é previsto estar relacionado com processos como: a regulação positiva da transmissão sináptica glutâmica; a localização da proteína no organelo⁶¹;
- Calcr (recetor da calcitonina) – é um recetor endotelial que se conecta à adrenomedulina (péptido vasodilatador), que se encontra intimamente envolvida com o desenvolvimento cardiovascular⁶². Estudos funcionais revelaram que este recetor (como a diminuição da sua expressão) é importante no desenvolvimento vascular e na angiogénese, que inclui a atrofia do entroncamento da aorta, o retardamento do desenvolvimento intersomático dos vasos, e a falta de circulação sanguínea^{63 64}.

Os outros genes observados com expressões alteradas são:

- *Chrn3a* (receptor colinérgico, nicotínico, polypeptide beta 3a) – este pertence a uma superfamília de receptores de acetilcolina (neurotransmissor) e é um gene ortólogo do *CHRB3* humano. Este receptor está relacionado com o transporte de iões transmembranares e processos relacionados com o sistema nervoso⁶⁵. Estes receptores estão envolvidos com a transmissão sináptica de impulsos elétricos, que estimulam não só o movimento dos músculos do corpo como os músculos cardíacos⁶⁶. Quando existe acetilcolina em baixas concentrações, existe o aumento do batimento cardíaco^{67, 68}. Existem evidências^{69, 70} da relação íntima da acetilcolina com o batimento cardíaco, por exemplo a exposição ao químico diazinon teve impacto sobre a taxa cardíaca em embriões de peixe-zebra⁷¹.
- *Mhc1lia* (hemocromatose hereditária) – e encontra-se envolvida na resposta do sistema imunitário⁷².
- *VWF* (factor von willebrand) – e encontra-se envolvido na homeostasia do sistema vascular endotelial⁷³.

2. Objetivo

Em estudos anteriores, foi verificado que o efeito da exposição ao IOX e ao DES em concentrações micromolares durante a embriogênese do peixe-zebra gerou alterações na expressão de genes, na função e morfologia cardíaca afetando indiretamente o desenvolvimento dos folículos da tiroide. Ainda pouco se sabe sobre os efeitos em animais juvenis. Sendo que o objetivo do trabalho é determinar quais os efeitos dos compostos químicos IOX e DES que têm sobre a morfologia cardíaca e o seu impacto sobre a homeostasia da glândula da tiroide e do eixo HPT no peixe-zebra juvenil imaturo.

3. Materiais e métodos

3.1. Manutenção e reprodução de peixes-zebra

Os peixes-zebra adultos foram mantidos num sistema automatizado (Technoplast, Italy) a 28°C, com pH entre os 6.8 a 7.5, num ciclo de iluminação de 14:10h (luz:escuro). Foram alimentados duas vezes por dia com ração seca (Tetramin, Germany) e suplementados com artémia enriquecida com *Red Pepper*.

Os peixes-zebra podem ser reproduzidos em laboratório com o auxílio de um tanque de reprodução de 1L (Technoplast, UK), a postura desta espécie ocorre nas primeiras horas de luz⁷⁴. Os pares selecionados foram deixados o/n separados e nas primeiras horas de luz foi retirada a separação para se proceder à junção dos casais para o acasalamento. Para uma maior eficiência da postura pode ser possível juntar uma fêmea com dois machos⁷⁵. Esta técnica é importante, pois permite uma especificação nos cruzamentos de indivíduos transgênicos.

3.2. Curva de crescimento

Antes do início dos tratamentos com os diferentes químicos, foi necessário conduzir um ensaio preliminar para determinar a taxa de crescimento dos animais (peso/tempo) de modo que fosse constante a quantidade de comida e a quantidade de químicos a administrar ao longo dos 60d de exposição.

Após a fertilização, os embriões de peixes-zebra – strain *wild type* – foram recolhidos para uma caixa de Petri com meio E3 (NaCl, 13,7 mM; KCl, 0,54 mM; MgSO₄, 1,0 mM; CaCl₂, 1,3 mM, Na₂HPO₄, 0,025 mM; KH₂PO₄, 0,044 mM; NaHCO₃, 4,2 mM) com azul-de-metileno. Estes foram incubados a 28,5°C (Sanyo, Japan) durante 72h.

Após a eclosão, as larvas, foram transferidas para um aquário de 5L, num sistema semifechado, com as seguintes condições: temperatura da água de 28°C e com ciclos de luz de

10:14h. Os detritos foram limpos diariamente e 1/4 do volume da água foi renovado a cada dois dias. No primeiro mês de vida as larvas foram alimentadas duas vezes ao dia com rotíferos. Após a metamorfose – na fase juvenil – foram alimentados duas vezes ao dia, com ração seca (Tetramin, Germany) em *ad libitum*.

Diariamente durante duas semanas, foram sacrificados através de uma dose letal por excesso de anestesia (fenoxietanol >250mg/L), cinco peixes juvenis aleatórios, e o seu peso seco estimado. O que permitiu determinar a reta de crescimento dos peixes-zebra, esta equação do incremento de peso ajudou a calcular todas as variáveis necessárias para a fase experimental seguinte. Os animais foram alimentados, manipulados e sacrificados pelo supervisor de acordo com a diretiva 2010/63/EU e a legislação nacional portuguesa sobre o uso laboratorial dos animais.

3.3. Exposição aos compostos químicos

Para este estudo foram selecionadas duas linhas transgênicas de peixes-zebra. Foram usados peixes com a linha transgênica *cmcl2:GFPCaaX*²², que expressam a proteína GFP (proteína de fluorescência verde) nos cardiomiócitos, mais especificamente na cadeia leve de miosina 2 que quando exposta a uma luz azul emite uma fluorescência verde. Foi também usada a linha transgênica *kdrl:mCherry-CaaX*⁷⁶, que expressa a proteína fluorescente mCherry (proteína fluorescente vermelha) sob o controlo do promotor do gene do domínio de inserção da quinase. Esta linha marca com mCherry todas as células endoteliais que formam o sistema vascular.

Os embriões duplos transgênicos Tg(*cmcl2:GFP* x *kdrl:mCherry*) foram recolhidos para uma caixa de Petri com meio E3 e azul-de-metileno. Durante as 24/72h selecionados os animais transgênicos duplos heterozigóticos. As larvas foram colocadas a crescer no sistema, e após completarem a metamorfose (≈30d), os juvenis foram transferidos para três tanques de 6L (n=16/tanque no primeiro ensaio e n=20/tanque no segundo ensaio), num sistema semifechado, expostos a 12:12h luz, a 28-29°C (Newatt 48Hz 100W, Italy). Um 1/4 do volume da água foi renovado a cada dois dias e os detritos removidos diariamente. A água proveio do sistema central de crescimento e manutenção de peixes-zebra.

Os peixes foram expostos aos compostos químicos através do alimento, durante 60 dias. A ração foi preparada semanalmente de acordo com a equação estabelecida da linha de tendência do crescimento dos juvenis *wild type*. O peso consumido em alimento foi de 1,5% o incremento de crescimento dos indivíduos por semana.

Os químicos IOX e DES foram previamente diluídos em 100% etanol e de seguida foram aspergidos sobre a quantidade de alimento semanal e por fim deixado a evaporar durante a noite à temperatura ambiente na hote. A quantidade de químico necessário a administrar para expor cada animal a uma dose de 0.1 μ M foi calculada considerando que a densidade média de cada peixe é igual à da água.

O crescimento dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi monitorizado rigorosamente no final de cada semana e do topo do tanque foram tiradas imagens fotográficas digitais. O comprimento total (da cabeça à cauda) dos animais foi calculado com o auxílio do software FIJI⁷⁷.

Foram realizados dois ensaios de modo a compreender se o estudo seria replicável mantendo todas as variáveis equivalentes. Em cada ensaio o número de indivíduos por grupo experimental foi: primeiro ensaio n por cada tanque =16 e o segundo ensaio n por cada tanque =20, sendo o resultado n=36 indivíduos por cada tratamento (controlo, DES e IOX). Após o período de exposição os animais foram sacrificados através de uma dose letal de fenoxietanol (>250mg/L). Sendo que alguns indivíduos morreram ao longo dos 60d de exposição a contagem total de indivíduos foi n=70. Em que para o método RT-PCR foram utilizados: controlo n=7, IOX n=6, DES n=6. No método de imunohistoquímica de fluorescência no órgão cardíaco: controlo n=4, IOX n=4, DES n=4. No método de imunohistoquímica de fluorescência dos cortes histológicos: controlo n=5, IOX n=5, DES n=5. Os restantes indivíduos foram reservados para a aplicação de outro método à *posteriori*.

Todos os indivíduos foram fotografados individualmente no final do ensaio, com a câmara Canon eos Rebel t6. Este método serviu para calcular o seu comprimento para o uso de medida *standart*, com o objetivo de normalizar os cálculos das análises estatísticas. O cálculo do comprimento foi realizado com o auxílio das ferramentas do FIJI⁷⁷.

3.4. Análise de expressão génica por PCR não quantitativo (RT-PCR)

3.4.1. Recolha dos tecidos para o método RT-PCR

Ao fim dos 60 dias de exposição os peixes-zebra foram sacrificados por excesso de fenoxietanol e foram dissecadas as cabeças em condições estéreis (Fig.3.1 zona do corte efetuado no peixe-zebra). Foram coletados o seguinte número de indivíduos: controlo n=7, DES n=7 e IOX n=6. Após a colheita dos tecidos estes foram congelados imediatamente em gelo seco e as amostras foram armazenadas a -80°C.

O corte realizado (Fig. 3.1) foi importante para os métodos seguintes, pois possibilitou um maior acesso à remoção do coração e permitiu a análise específica às zonas de interesse que inclui o órgão cardíaco e os folículos da tiroide.

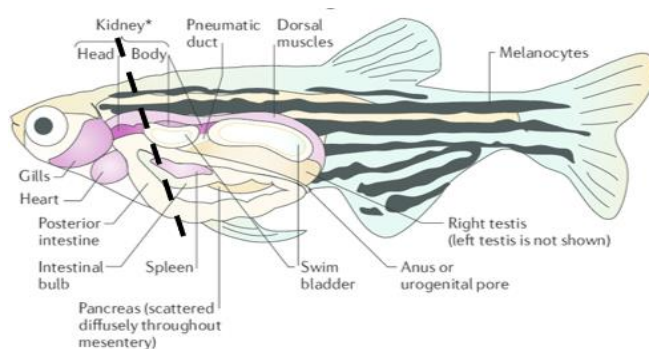


Figura 3.1 Esquema representativo da zona de interesse recolhida dos peixes-zebra duplos mutantes para análise génica pelo método RT-PCR, para a análise da morfologia cardíaca pelo método de imunohistoquímica de fluorescência do coração e análise da morfometria dos folículos da tiroide pelo método de imunohistoquímica por fluorescência através de cortes histológicos. Esta zona contém o coração, o cérebro e a glândula da tiroide que são órgãos importantes para o estudo em questão.

3.4.2. Extração total de RNA

Para manter a integridade do RNA a isolar as amostras foram mantidas em gelo seco. O RNA total dos tecidos foi isolado com o uso do *kit* de extração de RNA total (Kit E.Z.N.ATM total RNA, Omega Bio-tek, Norcross, GA) de acordo com as instruções do fabricante. No primeiro passo foram homogeneizado mecanicamente os tecidos num homogeneizador de vidro. Antes da conversão do RNA total em DNA complementar (cDNA) foi necessária a remoção do DNA genómico com o *kit Turbo DNA-free* da *Ambion* de acordo com as indicações do fabricante. Após este passo foi quantificado o RNA total extraído no aparelho *nanodrop* (1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher, USA). A quantificação do RNA total determina a quantidade de RNA esperada na amostra e a sua pureza. A absorvência a 260 nm com valores aproximados de um, equivalem a 40 µg/µl de ssRNA. O parâmetro 260/280 nm infere a pureza. Se a amostra conter um rácio entre 1.8 a 2.1 o RNA encontra-se altamente purificado⁷⁸.

Para determinar se a extração foi bem-sucedida, foi necessário correr o produto de extração (com 100 ng/μl) num gel de agarose, para confirmar a qualidade do RNA extraído. Este processo de validação, tem como objetivo verificar o ratio do RNA ribossomal 28S/18S. Se a intensidade do 18S ≤ 28S, significa que o RNA não foi degradado. Este é um processo de validação eficaz, pois estes RNAs são os transcritos mais abundantes nas células e de fácil de visualização. Se houver uma degradação no RNA ribossomal é provável que também tenha ocorrido degradação no mRNA.

3.4.3. Preparação para a conversão de DNA complementar

O RNA purificado foi convertido em cDNA com o kit *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific, US). Foi usado 500 ng de RNA total de cada amostra. Foi também utilizado 0.2 μg de primers hexaméricos aleatórios (mistura de hexanucleótidos), que permite a transcrição reversa, em quantidades equivalentes, de todos os transcritos de RNA total em cDNA⁷⁹. As amostras de cDNA foram diluídas 1:5 que equivale a 200 ng/μl de cDNA.

3.4.4. Método de transcrição reversa da reação da cadeia da polimerase (RT-PCR)

O método de RT-PCR é um método que usa a transcrição reversa de mRNA para cDNA, e possibilita a deteção e visualização da expressão relativa dos transcritos produzidos. É um método menos sensível, mas que permite uma análise preliminar e qualitativa da expressão dos genes de interesse. Não é possível medir exatamente quantos transcritos estão no gene, pelo que é importante que o produto de interesse seja amplificado entre 25-35 ciclos de modo a permanecer na fase linear de amplificação. Isto permite inferir que a diferença de intensidade da banda entre os diferentes tratamentos é reflexo da abundância do mRNA de interesse na amostra. Para este método semiquantitativo foi importante um controlo interno de RNA. Por exemplo, genes *housekeeping*, como o 18S, são expressos em grandes quantidades e o seu perfil de amplificação chega à curva de plateau num número reduzido de ciclos^{80,81}.

Para a análise génica, foi utilizado 1 μl (~200 ng/μL) de cDNA diluído de cada amostra (n=7 controlo, n=6 IOX e n=7 DES). Procedendo-se depois à criação de "pools" de cDNA para cada grupo experimental. Estes "pools" foram usados para a determinação relativa da expressão dos diferentes genes. O PCR de cada gene (excepto o 18S) foi realizado com o seguinte protocolo: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificação, em que cada ciclo era de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 10 segundos a 72°C, e por fim durante 5 minutos a

72°C. O gene 18S é o único gene que foi amplificado durante 20 ciclos e serve de gene de referência para validar a existência de RNA nas amostras.

Foram testados 16 genes em que: 14 são referentes aos genes endoteliais que se encontravam com expressões gênicas alteradas em embriões de peixe-zebra quando expostos aos químicos DES e IOX²² e 2 genes referentes ao eixo HPT o gene TSH e o gene Tg (tabela 3.1). O produto do PCR foi corrido em géis de 2,5% agarose a uma voltagem de 100v.

Para a validação dos resultados é necessário um método quantitativo preciso, sensível e curado como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) marcada com SYBR-green (método não realizado).

Tabela 3.1 Primers dos genes alvos utilizados na análise de expressão relativa dos PCRs, foram selecionados 15 genes mais o 18S

Genes	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (nt)
Acvr1bb (receptor de activina tipo 1B)	FW	ACGCTCTGGGTCTGGTGTACTG	112
	RV	TCTATGGAGGGATCTGACGGCAC	
Adrb1 (receptor adrenérgico 1β)	FW	TCGTGGGCATGGGAATCCTCAT	106
	RV	GTGAGCGTCTGGAGCCTCTGAT	
Cacna1da (subunidade alfa 1D do canal cálcio tipo L dependente da voltagem)	FW	CAATGAGCAGCAAGCCGAGGTAA	158
	RV	AGCCTTTGTGGAGGGATATGCCA	
Cacna1ha (subunidade alfa 1H do canal cálcio dependente da voltagem)	FW	CCTTCAGAGACGCAATGCCTCAG	182
	RV	GCCAACTTGATCGCAGCATCCA	
Cacng2b (subunidade gama 2b do canal cálcio dependente da voltagem)	FW	CTCTGGTGGAAATGCGGCAGTATG	173
	RV	GCTGGTCTCGTTCTCGTTGGTG	
Cadm1a (isoforma 3 da molécula de adesão celular 1a)	FW	GCCTCAGCAGGTGAACTGGGTA	126
	RV	GCTGGTCTCGTTCTCGTTGGTG	
Calcr (receptor da calcitonina)	FW	TCGCAGAGGAGCAGCACCTAC	136
	RV	AGCAGATGCGTCTCCACACTCA	
Chrn3a (receptor colinérgico, nicotínico, precursor do polipéptido beta 3a)	FW	CCTTCACGCCAACGACACGATTACT	116
	RV	TCCACTCCTCCCACAACCAGACATT	
Mhc1lia (hemocromatose hereditária)	FW	TGATGGCGAACCAGGACGAATGA	121
	RV	CACATGGGTCGAGACGTTGAAGC	
Mybpc2a (proteína tipo C que se liga rapidamente à miosina)	FW	TATCCAAGAACCGCCTGTACCA	149
	RV	TTCCATCTCGGCTCAGTTCCACA	
Notch1b (receptor notch 1b)	FW	TTGACGACTGCACACCGTTTAC	159
	RV	GGTTGGACAGGCACTCGTTGAC	
Ptgir (receptor semelhante ao receptor da prostaciclina)	FW	AGTGATGGACTCTGCCTGGACAG	169
	RV	GCCTCGATGCTGGTGATGTTCTC	
TSH (hormona estimuladora da tiroide)	FW	AGACCCTCCAGACAGACATCC	
	RV	ACCCTGCCAGTCAAACACTAA	
Tg (tiroglobulina)	FW	CCTGTGCAGTGCAAGTTTGT	
	RV	GTGCTTGGCATCTCTCTTCC	
VWF (factor von willebrand)	FW	GCGTGGAGGCATTTCGGCAACT	193
	RV	CGGCAGTTCTTACATACGGCTCAG	
18s	FW	GGAATTGACGGAAGGGCACCAC	135
	RV	GCACCACCACCCACAGAATCG	

3.5. Método de imunohistoquímica de fluorescência do coração em peixes-zebra

Em simultâneo com a amostragem para análise da expressão génica foram recolhidas amostras de peixes-zebra para os estudos histológicos. Tal como descrito anteriormente, a zona anterior do peixe-zebra foi recolhida (Fig.3.1) para tubos de 2mL; sendo o número de indivíduos recolhido: controlo n=9, DES n=9 e IOX n=9. As cabeças foram imediatamente preservadas em 4% PFA durante a noite a 4°C. Após este tempo os tecidos foram submetidos a uma desidratação de 0% a 100% metanol/1xPBS de modo a serem preservados. Devido ao pequeno tamanho dos peixes-zebra foi necessário realizar a microdissecção do coração à lupa. Após a disseção, os corações foram rehidratados gradualmente para 1xPBS. Após a hidratação, estes foram clarificados durante 3 dias a 4°C com Scale A2⁸². Após a clarificação, procedeu-se ao pré-tratamento com colagenase durante 1 hora a temperatura ambiente (Sigma, type I). A colagenase é uma protease que degrada o colagénio presente no coração, tornando-o mais permeável aos anticorpos. Foram realizadas lavagens de 5x 30 minutos de PBTr (1xPBS + 0,5% Triton X-100) para remover a colagenase. Os corações foram depois pré-incubados durante 2 horas a temperatura ambiente com 1xPBTr/10% soro de ovelha, de modo a bloquear as ligações não específicas da amostra. Após estes pré-tratamentos, foi implementada a técnica de dupla imunohistoquímica contra a GFP e mCherry.

Todos os anticorpos que se seguem foram incubados individualmente durante a noite a 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: o anticorpo coelho anti-GFP que se liga à proteína GFP expressa nos cardiomiócitos (diluição 1:1000, Abcam) e o anticorpo rato anti-mCherry que se liga à proteína mCherry expressa nos tecidos endoteliais (diluição 1:100 St. Johns Lab.). Os anticorpos secundários com marcadores de fluorescência utilizados para detetar os anticorpos primários e de acordo com a ordem de espécie utilizada foi a seguinte; anticorpo cabra anti-coelho IgG – CF 488 a 4°C (diluição 1:400, Jackson Lab) e o anticorpo cabra anti-rato HL CF 594 (1:400, Sigma). Após a incubação os corações foram armazenados a curto prazo em 1xPBS a 4°C até serem visualizados no microscópio de iluminação de plano único (Lightsheet Z1, Zeiss). Após a visualização foram armazenados a longo prazo em Scale U⁸².

As imagens do coração dos peixes-zebra a partir do *software* Calr Zeiss ZEN 2014 SP1 (black) (64bit) *Lightsheet Z.1* versão 9.2.6.54, sendo a primeira vez, realizado um *imaging* da morfologia completa do coração juvenil de peixe-zebra em 3D. As imagens obtidas do microscópio foram reconstruídas em modelos 3D no *software* Arivis *Vision4D*, e foi ainda realizada a análise volumétrica para determinar o volume total do ventrículo. Esta análise foi

realizada com o auxílio do *software* FIJI⁷⁷, mais especificamente com a ferramenta de Plug-in *Volumest*. Os valores volumétricos do ventrículo foram normalizados com o comprimento médio dos peixes-zebra utilizados na análise histológica.

3.6. Método de imunohistoquímica de fluorescência em cortes histológicos

3.6.1. Método de Hematoxilina e Eosina em cortes histológicos de cabeça de peixes-zebra

Após a remoção do coração para a análise anterior, as cabeças dos animais experimentais que se encontrava em 100% metanol, foram transferidas para 70% etanol por uma série de lavagens para permitir a inclusão da parafina. As cabeças foram dispostas num plano sagital. Foram cortadas secções de 8µm e montadas em lâminas (Normax, Portugal) previamente tratadas com APES. De seguida foi realizada a remoção da parafina dos tecidos com banhos de xilol. Por fim os tecidos foram rehidratados em banhos sucessivos até 1xPBS. As lâminas foram então coradas com o procedimento *standart* de hematoxilina e eosina⁸³. Este método foi executado para a averiguação do local onde estariam situados os folículos da tiroide.

3.6.2. Método de imunohistoquímica de fluorescência contra a tiroglobulina em cortes histológicos

Com base no processo anterior, todas as lâminas que se encontrassem na zona de interesse foram selecionadas para o método de imunohistoquímica de fluorescência. Primeiro foi removida a parafina dos cortes com banhos de xilol, sendo depois os tecidos hidratados por uma série de lavagens, desde álcool 100% até 1xPBS. Os cortes foram então pré-incubados durante 1h com 0,5% PBTr/10% soro de ovelha. O anticorpo primário utilizado para a marcação da zona de interesse (os folículos) foi o coelho anti-tiroglobulina humana (diluição 1:1000, Dako) sendo incubado durante a noite a 4°C. O anticorpo secundário responsável pela fluorescência no tecido de interesse foi o cabra anti-coelho IgG (H+L) CF 488 (diluição 1:800, Sigma). Após as lavagens finais com 0,5% PBTr, as lâminas foram montadas com o meio de preservação de 90% glicerol com 2,4% DABCO (1,4-Diazobicyclo-(2,2,2-octane), Carl Roth GmbH), este meio de montagem serve para preservar a fluorescência do tecido e prevenindo a perda rápida por *fotobleaching* dos fluoróforos (composto químico fluorescente). O meio de montagem também contém DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) (1/10 000 diluição, Carl Roth GmbH) que marca os núcleos das células ligando-se ao DNA. O DAPI é um composto que emite no comprimento de onda de 405 nm, emitindo a cor azul quando

exposto à luz ultravioleta. Por fim a lamela foi selada com verniz e as lâminas foram armazenadas no escuro a 4°C para impedir a perda da fluorescência.

Foram analisados três parâmetros: o número de folículos da tiroide, a área total dos folículos da tiroide e o campo de formação dos folículos da tiroide. Todas as medições foram realizadas no software FIJI e o cálculo final foi normalizado com o comprimento individual de cada peixe-zebra utilizados para a análise histológica.

As imagens foram retiradas ao microscópio com o auxílio da câmara LEICA *microsystems* Lda. com o auxílio do software LEICA IM50, versão 4.0 *release* 132. Todas as medições foram realizadas no software FIJI⁷⁷.

3.7. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com o auxílio do *software* Graphpad Prism 6 (versão 6.01). Para a análise da morfologia cardíaca e a análise pelo método imunohistoquímica de fluorescência dos folículos da tiroide foi usado o *Students t-test* para comparar o grupo controlo com cada um dos tratamentos experimentais, DES e IOX. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando o teste probabilístico apresenta-se $P < 0.05$.

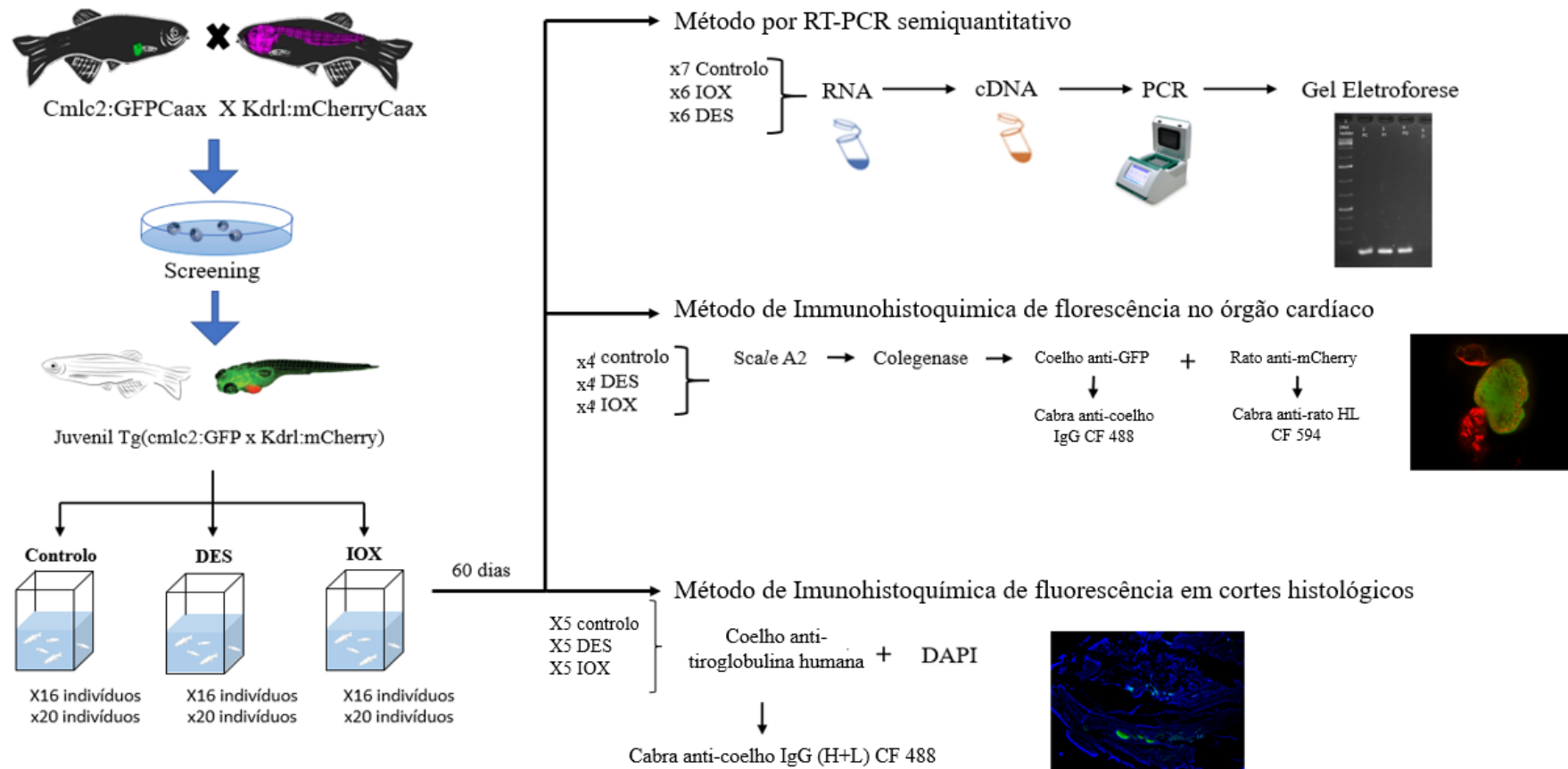


Figura 3.3 Esquema geral e simplificado da metodologia aplicada neste estudo – método de RT-PCR, método imunohistoquímica de fluorescência no órgão cardíaco, e método de imunohistoquímica de fluorescência em cortes histológicos

4. Resultados

4.1. Teste preliminar para a averiguação das condições ótimas para o estudo

De modo a estabelecer os parâmetros para os estudos toxicológicos, foi realizado um estudo preliminar, que tem como objetivo de entender como os peixes-zebra crescem consoante o alimento fornecido, mantendo todas as outras variáveis constantes. Durante uma semana os peixes-zebra *wild type* foram alimentados em *ad libitum*, sendo sacrificados diariamente dez indivíduos (5/ependorf) para anotar o seu peso seco. Ao fim de uma semana foi obtida a seguinte equação da reta da regressão linear: $y = 0.1789x + 0.58$ com um $r^2 = 0.9179$. A variável x equivale ao número de dias e y o peso do peixe-zebra num determinado tempo. Os peixes-zebra *wild type* aumentaram de peso de 0.75 ± 0.04 mg/peixe para 1.73 ± 0.04 mg/peixe no decorrer de uma semana, sendo o incremento de peso de 0.98 mg/semana (Fig. 4.1).

Crescimento de *Danio rerio wild type* mg/dia

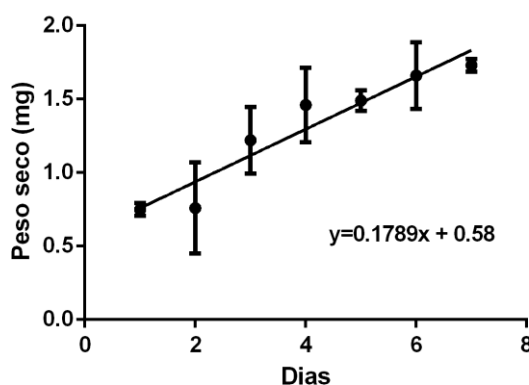


Figura 4.1 Linha de tendência do crescimento de peixe-zebra *wild type* anotada ao longo de sete dias. Os dados obtidos ao longo de uma semana permitiram o cálculo de uma linha de tendência de crescimento dos peixes-zebra *wild type* nas condições que são pretendidas implementar durante os ensaios com a exposição química. Esta equação serviu para determinar todos os parâmetros necessários para o ensaio seguinte: a quantidade de alimento e a quantidade de composto químico a ser administrada durante o ensaio de crescimento dos peixes.

Para o estudo toxicológico os peixes-zebra teriam de ser alimentados com cerca 1.5% do incremento do seu peso. Multiplicando 0.0015 ao valor do peso seco, foi obtida a quantidade de alimento necessária para administrar por cada indivíduo diariamente.

É de reforçar que os peixes ao ingerir o alimento, precisariam de conter no seu organismo $0.1 \mu\text{M}$ de composto químico IOX ou DES de maneira constante. Através da equação do crescimento dos peixes-zebra *wild type*, assumindo que a densidade do peixe-zebra é igual à água, e assumindo que o seu crescimento varia somente com o alimento

providenciado, foi possível calcular a quantidade de moles de químico necessária a administrar no alimento semanalmente (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Tabela resumo referente à quantidade de alimento e composto químico a ser administrado por semana, ao longo de nove semanas, aos peixes-zebra juvenis Tg (cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry).

Semanas	Dias	Comida mg/peixe/semana	Mol de químico/peixe
1	7	0,192	$1,83 \text{ e}^{-10}$
2	14	0,324	$3,09 \text{ e}^{-10}$
3	21	0,455	$4,34 \text{ e}^{-10}$
4	28	0,587	$5,59 \text{ e}^{-10}$
5	35	0,718	$6,84 \text{ e}^{-10}$
6	42	0,850	$8,09 \text{ e}^{-10}$
7	49	0,981	$9,35 \text{ e}^{-10}$
8	56	1,113	$1,06 \text{ e}^{-9}$
9	63	1,244	$1,19 \text{ e}^{-9}$

4.2. O impacto dos tratamentos com os compostos químicos Ioxinil e Diethylstilbestrol sobre o crescimento e a mortalidade

Foram utilizados peixes-zebra duplo transgênicos Tg (cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry) para os testes toxicológicos. Ao fim de cada semana, durante nove semanas, estes foram fotografados, e o tamanho relativo anotado nos diferentes tratamentos: controlo, DES e IOX. Este procedimento foi realizado tanto como no primeiro ensaio como na repetição. Os dois ensaios realizados são independentes entre si, e não aparentaram ter diferenças estatisticamente significativas, indicando que os tratamentos em ambos os ensaios são equivalentes. Mas, para haver uma certeza estatística será necessário realizar um terceiro teste.

No primeiro ensaio, os peixes-zebra duplo transgênicos do tanque do controlo obtiveram um tamanho de 0.42 ± 0.09 cm. Ao fim dos sessenta dias houve um aumento de tamanho chegando ao valor médio de 1.04 ± 0.27 cm. Foi observado também alguma variabilidade de valores na última semana, com um mínimo de 0.65 cm e um máximo de 1.46 cm. No tratamento com o IOX também foi possível observar que a média mínima foi 0.36 ± 0.06 cm e a média máxima de 1.18 ± 0.31 cm. O tratamento com IOX obteve o maior valor de variabilidade nos tamanhos dos indivíduos, desde 0.83 cm até ao tamanho máximo de 1.88 cm. No caso do tanque em que os peixes foram expostos ao composto químico DES registou-se a média mínima de 0.43 ± 0.17 cm com um desvio padrão superior ao dos três, atingindo a média máxima de 1.12 ± 0.29 cm.

O primeiro ensaio demonstra que os peixes-zebra cresceram de uma forma variada, mas mantendo o rácio de crescimento ao fim das nove semanas, foi verificado um aumento relativo de <1 cm em todos os tratamentos. Os gráficos que se seguem (Fig 4.2 A) demonstram os valores médios do tamanho dos peixe-zebra por semana e as respetivas retas de regressão linear.

No segundo ensaio, os valores iniciais foram semelhantes aos do primeiro ensaio. No controlo os peixes-zebra na primeira semana tinham o tamanho mínimo médio de 0.54 ± 0.11 cm e atingiram um tamanho máximo médio de 1.25 ± 0.38 cm. No tratamento com IOX os peixes inicialmente tinham um tamanho mínimo médio de 0.49 ± 0.11 cm, atingindo um tamanho médio máximo de 1.30 ± 0.23 cm ao fim das nove semanas. No tratamento do DES os peixes-zebra tinham um tamanho médio mínimo inicial de 0.44 ± 0.08 cm, sendo este, o menor tamanho médio mínimo dos três tratamentos e o de menor variabilidade nos tamanhos e, ao fim de nove semanas atingiram um tamanho médio máximo de 1.37 ± 0.36 cm. Em todos os tratamentos incluindo o primeiro e segundo ensaio, os desvios padrões do tamanho médio

máximo dos peixes foram acima do valor de confiança indicando uma grande variabilidade de tamanhos ao longo do tempo.

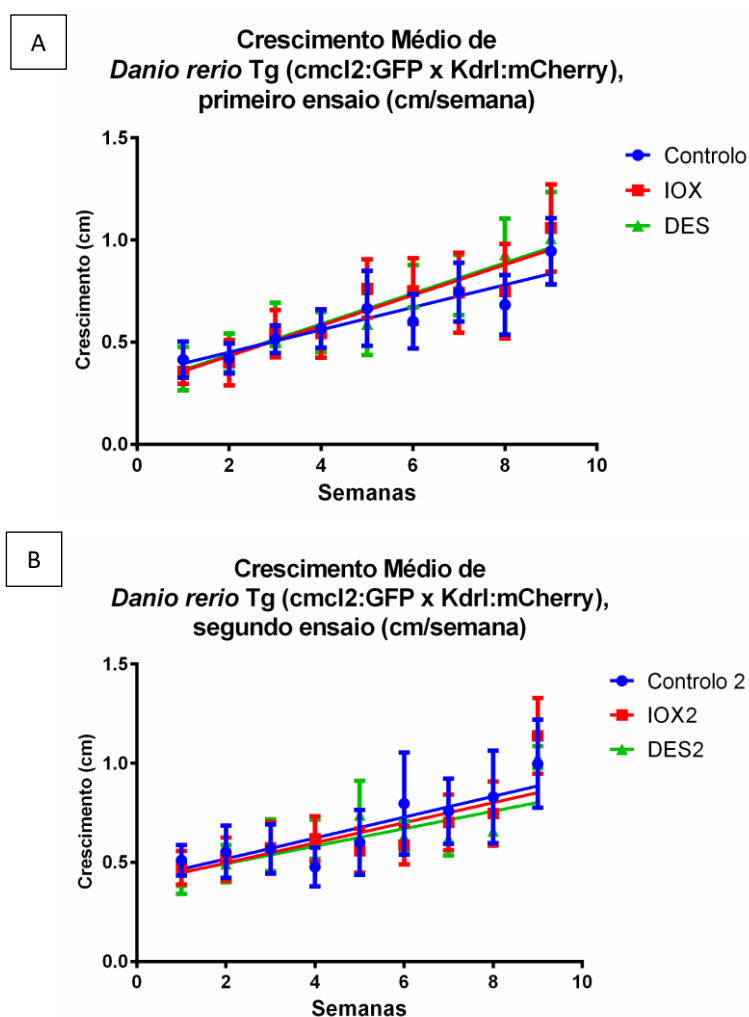


Figura 4.3 Linhas de tendência do crescimento dos peixes-zebra Tg (cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry) nos diferentes tratamentos (controlo, DES e IOX) e nos dois ensaios independentes realizados. A – Linhas de tendência do crescimento de peixe-zebra referentes ao primeiro ensaio. B – Linhas de tendência do crescimento de peixe-zebra referentes ao segundo ensaio. As medições foram realizadas uma vez por semana, durante 9 semanas, e calculadas com o auxílio da aplicação FIJI. As equações da reta de cada tratamento estão descritas na tabela 4.1. Estas retas serviram para realizar o teste probabilístico de correlação de *Pearson* para a análise de diferenças estatísticas entre os ensaios e tratamentos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre resultados, mas foram observadas diferenças entre tratamentos do mesmo ensaio.

Foi realizado um teste de correlação de *Pearson* com o objetivo de determinar as diferenças significativas entre os ensaios e tratamentos. Para uma maior certeza estatística é de referir que seria necessário um terceiro ensaio. A correlação entre os ensaios demonstrou que houve diferenças estatísticas entre os indivíduos expostos ao químico IOX do primeiro ensaio e ao químico IOX do segundo ensaio, numa correlação significativa com $r = 0.71$ e um $P < 0.05$.

No entanto, entre tratamentos do mesmo ensaio foram observadas diferenças. No primeiro ensaio foi observável uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos, sendo a diferença entre o controle e o IOX de $P \text{ value (two tailed)} = 0.0001$ com $r = 0.88$. Uma evidência clara obtida pela diferença de declive das retas dos dois tratamentos. No caso do primeiro ensaio, entre o controle e o DES existiu diferença significativa, demonstrado pelo $P \text{ value (two tailed)} = 0.0015$ e pelo $r = 0.89$. No segundo ensaio também foi observável uma diferença entre o controle e o IOX com um $P \text{ value (two tailed)} = 0.0048$ com $r = 0.96$, e entre o controle com o tratamento com DES em que o $P \text{ value (two tailed)} = 0.0187$ e com $r = 0.75$.

Tabela 4.2 Equações das linhas de tendência dos gráficos referentes ao primeiro e segundo ensaio.

Equações da linha de tendência dos gráficos

Control	$y = 0,05501x + 0,3416$	$R^2=0,4903$
DES	$y = 0,07492x + 0,2901$	$R^2=0,6016$
IOX	$y = 0,07443x + 0,2847$	$R^2=0,5519$
Control2	$y = 0,05246x + 0,4141$	$R^2=0,3774$
DES2	$y = 0,05056x + 0,3975$	$R^2=0,4362$
IOX2	$y = 0,04403x + 0,4067$	$R^2=0,4362$

Com base nos dados dos dois ensaios foi concluído que, a taxa de crescimento nos peixes-zebra duplo transgênicos foi bastante similar ao crescimento relativo observado no ensaio preliminar com peixe-zebra *wild type* e que em termos de crescimento os químicos não tiveram efeitos negativos. Isto demonstrou que ensaios com o composto químico aparentam ter um resultado equivalente no crescimento dos peixes-zebra.

Foi analisada a taxa de mortalidade em cada um dos tratamentos dos dois ensaios. A fórmula para o cálculo da mortalidade foi a seguinte:

$$y = \frac{\text{n}^\circ \text{ de indivíduos mortos}}{\text{População final} \times 10^{\text{fator de conversão}}}$$

O número de indivíduos em cada tanque foram: 16 no primeiro ensaio e 20 no segundo ensaio. Relativamente ao primeiro ensaio, o controle obteve uma percentagem de 26.67% de mortalidade. No segundo ensaio, a percentagem do controle foi de 23.52%. No tratamento com IOX também o primeiro ensaio teve uma maior percentagem de mortalidade comparado com o segundo. O primeiro ensaio com IOX demonstrou a maior taxa de mortalidade com o

valor de 33.33%, mas o segundo ensaio mostra um valor também muito próximo, pois atingiu o valor de 29.41%. No caso do tratamento com DES no primeiro ensaio foi obtido um valor da taxa de mortalidade de 26.67%, contudo o valor superior de mortalidade foi observado no ensaio 2 no tratamento com DES com o valor de 37.50%. Este valor é explicado pelos acidentes que ocorreram durante a aclimação dos indivíduos do sistema para os tanques de experiência, e dos acidentes que ocorreram ao longo do processo de limpeza e trocas de água. Os números não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos e os ensaios demonstrando que os tratamentos não tiveram impacto sobre a mortalidade (Fig. 4.3). Pode ser inferido que à partida este químico não se encontrava numa dose tóxica o suficiente para gerar mortalidade entre os tratamentos. No entanto para verificar se o impacto do químico é replicável será necessário recriar as condições do estudo mais uma vez para o número de amostragens ser suficiente para uma análise estatística significativa.

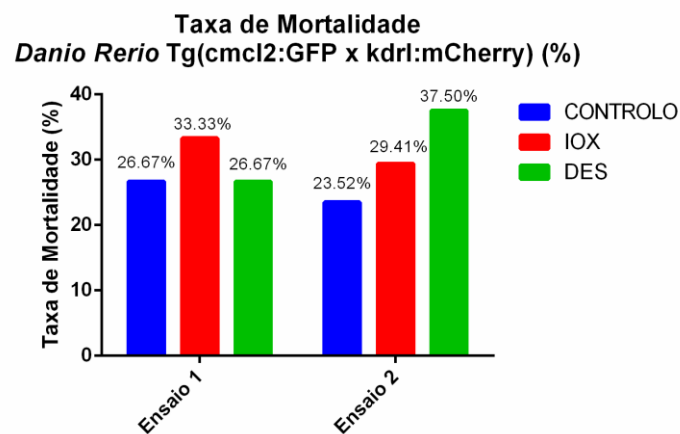


Figura 4.4 Gráfico de barras em percentagem sobre a taxa de mortalidade. É observado que não existem resultados estatisticamente significativos entre os ensaios e os tratamentos realizados em peixe-zebra juvenil. Foi possível observar que os tratamentos químicos não tiveram impacto sobre a mortalidade quer entre tratamentos como em ensaios e assim demonstrando que o químico não se encontra em concentrações letais.

4.3. Diethylstilbestrol

4.3.1. Análise morfológica do coração de peixes-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol

Previamente²² foi descoberto que o DES teve impacto sobre a taxa de batimento cardíaco que por sua vez levou a uma alteração do volume do ventrículo nos embriões expostos a DES. Neste estudo também se pretendeu observar as alterações morfológicas ao nível cardíaco e o seu impacto sobre o eixo HPT em peixes-zebra juvenis após 60d de exposição ao xenobiótico.

A análise volumétrica do ventrículo dos peixes-zebra Tg (cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry) foi realizada com base nas imagens obtidas no microscópio de *laser Lightsheet* (*Lightsheet Z-1*, Zeiss). Com o auxílio deste aparelho e método imunohistoquímico de fluorescência aplicado, foi realizado o *imaging* 3D da morfologia completa do coração de peixe-zebra juvenil e os valores finais foram normalizados com o comprimento referente a cada indivíduo.

Os animais expostos a 0.1 μ M DES não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no volume ventricular quando comparados com os animais controlo (*unpaired t-test* P>0.05). O valor médio do controlo foi de $2.39 \times 10^{-5} \pm 1.76 \times 10^{-6} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e o valor médio do DES foi de $3.51 \times 10^{-5} \pm 9.98 \times 10^{-6} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. O coração com o valor mínimo do controlo foi de $1.70 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e o máximo atingiu $3.09 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. No entanto, existe uma grande diferença na comparação dos dados e observável pela Fig. 4.4 (B), que o tratamento DES apresentou valores mais dispersos, com um mínimo de $1.05 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e um máximo de $7.55 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. Foi possível observar que o tempo de exposição ao químico DES em peixes-zebra juvenis não afetou a capacidade volumétrica da câmara do ventrículo.

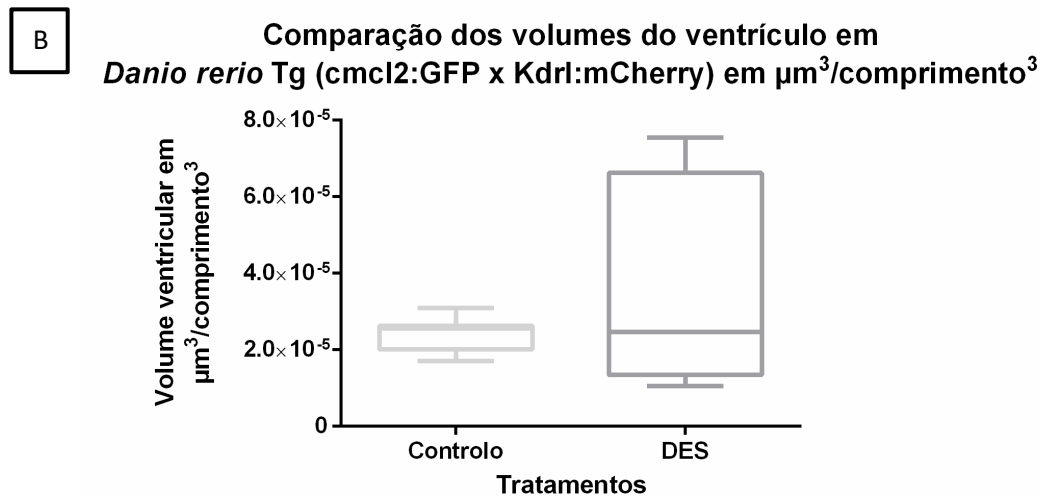
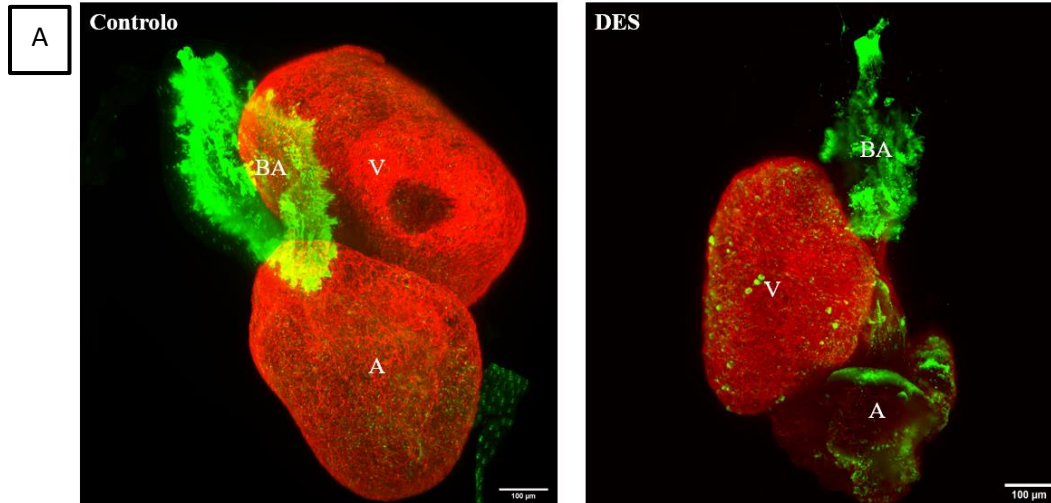


Figura 4.5 (A) Projeção do coração do peixe-zebra referentes aos tratamentos controlo e DES após análise por imunofluorescência contra a GFP (vermelho) e mCherry (verde). (B) Gráfico de caixa com bigodes referente à análise volumétrica do ventrículo dos peixes em $\mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ (A) Projeção do coração do peixe-zebra dos tratamentos controlo e DES, após o tratamento com imunofluorescência. Na figura as siglas representam: BA – bulbo arterial, V – ventrículo, A – átrio. O vermelho descreve as células cardiomiócitas que expressam a cadeia pesada da miosina (cmcl2) e o verde o tecido endotelial (Kdr1). A imagem foi realizada no microscópio de laser *Lightsheet* da ZEISS e a imagem final é uma projeção máxima. O volume foi medido através do uso do software FIJI com o plug-in Volumest e os volumes foram normalizados com o comprimento referente a cada indivíduo. (B) Análise volumétrica do ventrículo dos peixes em $\mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. Para a análise estatística procedeu-se ao uso do teste t-test com variáveis não paramétricas, do qual não se obteve nenhum valor de diferença significativo entre os tratamentos, demonstrado que o químico não alterou o volume da câmara do ventrículo dos peixes-zebra juvenis após 60d de exposição $P > 0.05$.

4.3.2. Análise de expressão génica por RT-PCR dos peixes-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol

Como explicado no tópico 1.10 da introdução, num estudo anterior²² foi realizada a análise ao transcriptoma das células endoteliais de embriões de peixes-zebra e foi observado genes com expressão alterada. Neste estudo o objetivo foi verificar em peixe-zebra juvenis se a expressão dos genes endoteliais e do eixo HPT estariam a ser desreguladas quando exposta ao xenobiótico DES.

A análise de expressão génica pelo método de RT-PCR é um método semiquantitativo que não permite uma quantificação exata dos transcritos, mas ajuda a perceber como o composto químico poderá atuar sobre o organismo. As análises de expressão dos 16 genes nos indivíduos expostos ao composto químico DES, revelaram que apenas 5 genes demonstraram aparentes diferenças de expressão. Os genes que não demonstraram uma alteração aparente de expressão relativamente ao controlo foram os seguintes (Fig. 4.5) os genes relacionados com o sistema cardíaco: *Acvr1bb*, *Adrb1*, *Cadma1a*, *Mybcp2a*, *Notch1b*, *Ptgir* os genes relacionados com a homeostasia do cálcio: *Cacna1da*, *Cacng2b*; e outros genes como: *Mhc1lia* e *Vwf*.

Foi possível identificar uma alteração de expressão em: *Cacna1ha*, *Calcr*, *Chrn3a*, *Tg*, *TSH*. O que demonstra o aparente impacto do composto DES sobre a homeostasia do cálcio e a regulação hormonal no eixo HPT.

Os resultados demonstraram que o composto químico DES aparentemente desregulou os genes relacionados com a homeostasia do cálcio e os genes relacionados com a regulação hormonal do eixo HPT. O gene relacionado com o transportador *Cacna1ha* apresentou um aumento da expressão, enquanto o gene *Calcr* apresentou uma diminuição da expressão. O gene *Chrn3a* apresentou uma aparente redução da expressão. Em relação aos genes relacionados com o eixo HPT, o gene referente à *Tg* e à *TSH*, demonstraram uma aparente diminuição da expressão quando comparados com o grupo controlo.

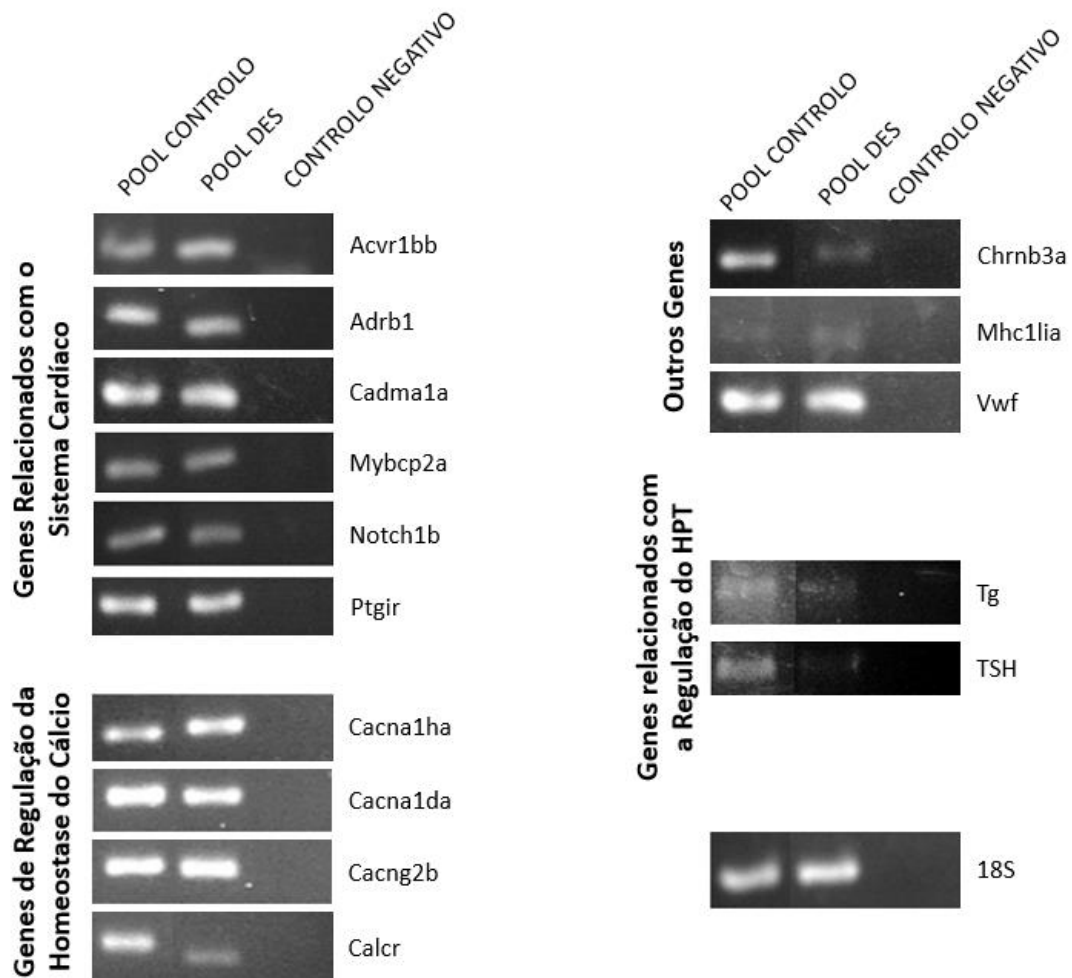


Figura 4.6 Comparação da análise de expressão génica dos genes endoteliais e do eixo HPT em peixes-zebra juvenis imaturos expostos durante 60d a $0.1\mu\text{M}$ DES e controlo. Os genes analisados estão relacionados com o sistema cardíaco, a homeostasia do cálcio, o eixo HPT e outros genes como o recetor do complexo MHC, recetor colinérgico, e o fator *Von Willebrand*. Em todos os ensaios é usado um controlo interno negativo com apenas água. Os tamanhos das bandas estão descritos nos Materiais e Métodos. Todos os ciclos e temperatura foram idênticos à exceção do 18S que é o gene de controlo.

4.3.3. Análise morfométrica dos folículos da tiroide de peixe-zebra juvenis após a exposição a Diethylstilbestrol

De modo a compreender como o composto químico DES pode afetar a fisiologia da tiroide foi conduzida uma análise histológica da glândula aos indivíduos expostos durante sessenta dias ao composto químico DES. Os efeitos sobre a morfologia e desenvolvimento dos folículos da tiroide foram analisados usando os seguintes parâmetros: área total dos folículos da tiroide, campo de desenvolvimento dos folículos da tiroide, e número de folículos presentes (Fig. 4.6 D-F).

Foi possível observar que o tratamento com 0.1 μM DES afetou o desenvolvimento dos folículos da tiroide aumentando a dispersão dos folículos (*unpaired t-test* $P=0.05$). Foi observado no controlo que o valor mínimo do campo dos folículos da tiroide no controlo foi do valor de 0.037 μm e o máximo de 0.058 μm . E em comparação, ao composto DES, este apresentou valores em que o mínimo foi 0.055 μm e o máximo foi 0.090 μm . O valor médio no tratamento com os indivíduos controlo foi de $0,050 \pm 0,0049 \mu\text{m}$ e em DES foi de $0,075 \pm 0,0083 \mu\text{m}$. Foi também visualmente possível fazer a distinção desta dispersão dos folículos (Fig. 4.6 - C).

Também foi observado um aumento da área relativa dos folículos da tiroide (*unpaired t-test* $P=0.02$). O controlo apresentou o valor mínimo de $1.28 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$ e máximo de $1.54 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$, enquanto o DES apresentou o valor mínimo de $1.77 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$ e valor máximo de área folicular total de $2.90 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$. O valor médio do controlo foi cerca de $1.41 \times 10^{-4} \pm 6.12 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{comprimento}^2 \mu\text{m}^2$ e o valor médio do tratamento com o DES foi $2.30 \times 10^{-4} \pm 2.612 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{comprimento}^2 \mu\text{m}^2$. A diferença entre as médias foi $1.182 \times 10^{-4} \pm 4.748 \times 10^{-5}$.

Em pormenor, foi também observada uma formação anormal de folículos na zona posterior e anterior da cabeça nos indivíduos tratados com DES – denominada de hiperplasia (Fig. 8.1 em anexo1). Estes folículos foram contabilizados nos cálculos realizados.

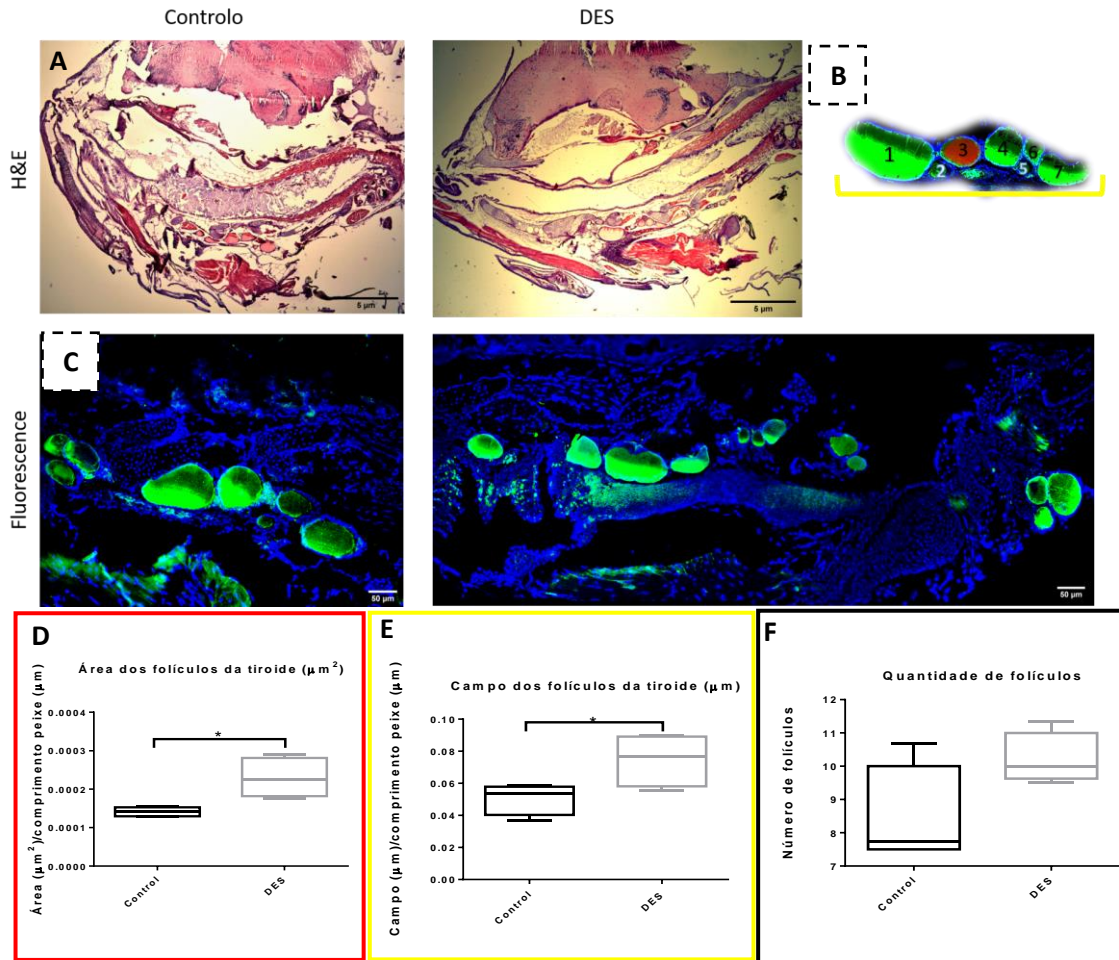


Figura 4.8. A exposição de peixes-zebra juvenis a $0.1\mu\text{M}$ DES leva a uma expansão da área ocupada pelos folículos da tiroide ao longo da aorta. (A) Cortes histológicos da cabeça de peixes-zebra marcado com o método H&E permitiu localizar os folículos da tiroide em peixes-zebra. (B) Esquema visual dos parâmetros testados: vermelho - área dos folículos da tiroide, amarelo - campo dos folículos da tiroide e preto - contagem total de folículos da tiroide em cada indivíduo. (C) Análise por imunohistoquímica de fluorescência em cortes histológicos ($50\mu\text{m}$) contra a Tg. O verde e azul representam respectivamente, imunomarcagem da Tg e marcação com DAPI nos núcleos das células. (D-F) Quantificação dos parâmetros morfológicos da tiroide nos animais experimentais e calculados nas imagens de fluorescência. (D) Área dos folículos da tiroide, (E) extensão campo dos folículos da tiroide. (F) Quantidade de folículos da tiroide presentes em cada indivíduo. Para todos os parâmetros, foi realizado o teste estatístico *t-test* não paramétrico, em que $*P < 0.05$.

4.4. Ioxinil

4.4.1. Análise morfológica do coração de peixes-zebra juvenis após a exposição a Ioxinil

A análise através do método de imunohistoquímica do ventrículo em peixes-zebra Tg (cmcl2: GFP x Kdr1: mCherry) foi realizada com o objetivo de comparar o impacto que o químico IOX teria sobre a morfologia do coração. Foi observado previamente²² que o composto químico IOX teve impacto sobre o volume do ventrículo em comparação com os embriões do controlo. Que seria importante observar o impacto que o IOX teria sobre o volume dos peixes-zebra juvenis após sessenta dias de exposição.

Foi realizado o mesmo teste estatístico que no composto químico DES *t-teste unpaired two-tailed*. Neste teste foi observado um valor de diferença significativo entre o controlo e o tratamento com o químico IOX (Fig. 4.7 - B) $P=0.0007$. O volume analisado no controlo teve um valor mínimo de $1.70 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e um valor máximo de $3.09 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$, em comparação, o IOX teve o valor mínimo de $2.91 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e um valor máximo de $4.84 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. Os valores médios do IOX foram de $3.87 \times 10^{-5} \pm 2.77 \times 10^{-6} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ e do controlo de $2.39 \times 10^{-5} \pm 1.77 \times 10^{-6} \mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. Foi possível concluir que os animais expostos a $0.1 \mu\text{M}$ IOX demonstraram um aumento do volume do ventrículo em comparação ao controlo.

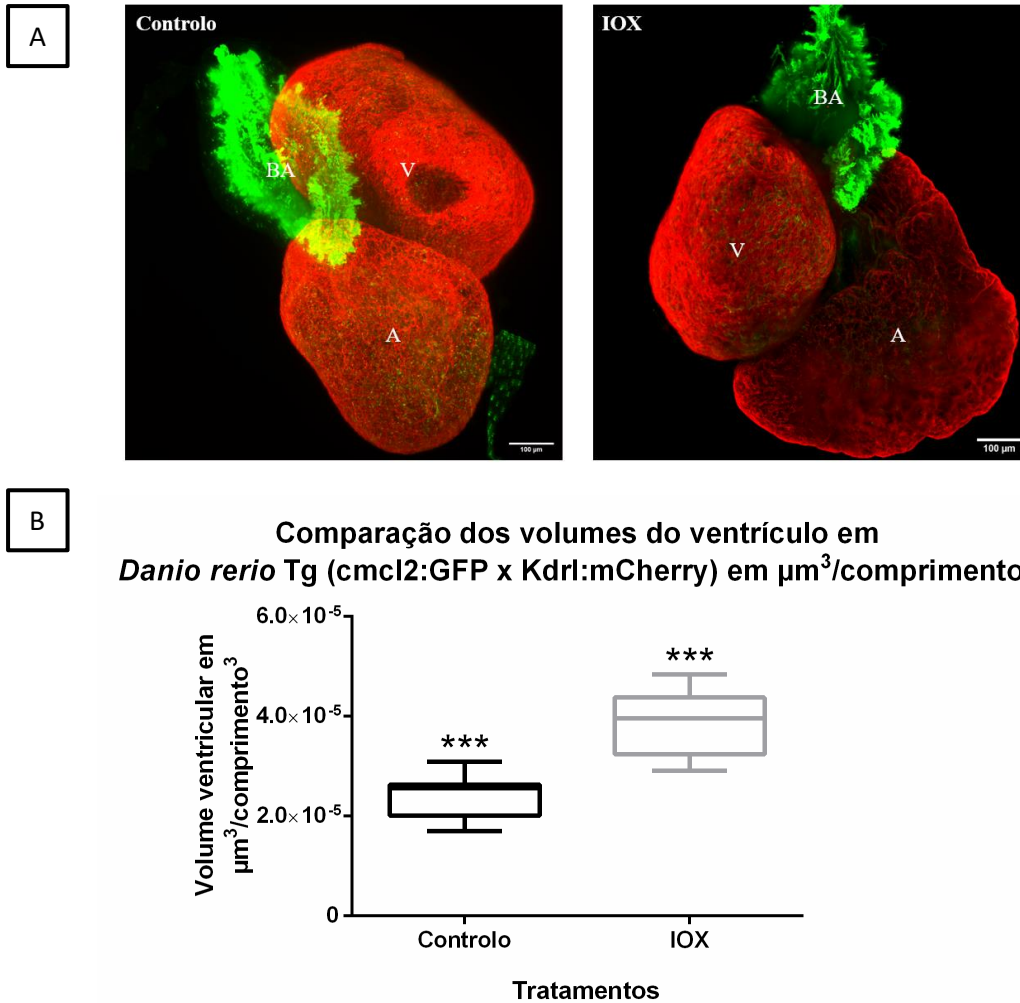


Figura 4.10 (A) Projeção do coração do peixe-zebra referentes aos tratamentos controlo e IOX após análise por imunofluorescência contra a GFP (vermelho) e mCherry (verde). (B) Gráfico de caixa com bigodes referente à análise volumétrica do ventrículo dos peixes em $\mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$ (A) Projeção do coração do peixe-zebra dos tratamentos controlo e DES, após o tratamento com imunofluorescência. Na figura as siglas representam: BA – bulbo arterial, V – ventrículo, A – átrio. O vermelho descreve as células cardiomiócitas que expressam a cadeia pesada da miosina (cmcl2) e o verde de tecido endotelial (Kdr1). A imagem foi realizada no microscópio de laser Lightsheet da ZEISS e a imagem final é uma projeção máxima. O volume foi medido através do uso do software FIJI com o plug-in Volumest e os volumes foram normalizados com o comprimento referente a cada indivíduo. (B) Análise volumétrica do ventrículo dos peixes em $\mu\text{m}^3/\text{comprimento}^3$. Para a análise estatística procedeu-se ao uso do teste t-test com variáveis não paramétricas, para obter o valor significativo entre os dois tratamentos de $***P < 0.0001$. Foi demonstrando que a exposição ao composto químico IOX alterou o volume da câmara do ventrículo dos peixes-zebra juvenis.

4.4.2. Análise de expressão génica em peixes-zebra juvenis após a exposição a Ioxinil

O químico IOX demonstrou alterar a expressão de alguns genes. A Fig. 4.8. representa todos os 16 RT-PCR dos *primers* previamente anotados em Li *et al.* 2019²². Os genes que não demonstraram uma mudança de expressão relativamente ao controlo foram os seguintes, genes relacionados com o sistema cardíaco: *Acvr1bb*, *Adrb1*, *Cadma1a*, *Mybcp2a*, *Ptgir*; genes relacionados com a homeostasia do cálcio: *Cacna1ha*, *Cacna1da*, *Cacng2b* e *Calcr*; e outros genes como: *Mhc1lia* e *Vwf*.

Os animais experimentais expostos ao químico IOX, revelaram que 3 genes demonstraram aparentes diferenças de expressão: *Notch1b*, *Chrn3a* e a TSH.

No caso do gene do *Notch1b* existiu uma aparente diminuição da intensidade da banda em IOX comparativamente ao controlo. No caso do *Chrn3a* (gene relacionado com a atividade de ligação da acetilcolina e com a transmissão sináptica) não foi amplificado qualquer produto de PCR.

Os genes relacionados com a regulação do eixo HPT também apresentaram uma aparente alteração de expressão, apesar de se observar a mesma intensidade de banda no gene referente à Tg foi possível observar uma diminuição da expressão da TSH. A banda encontrou-se tenuemente visível indicando que o gene foi aparentemente pouco expresso.

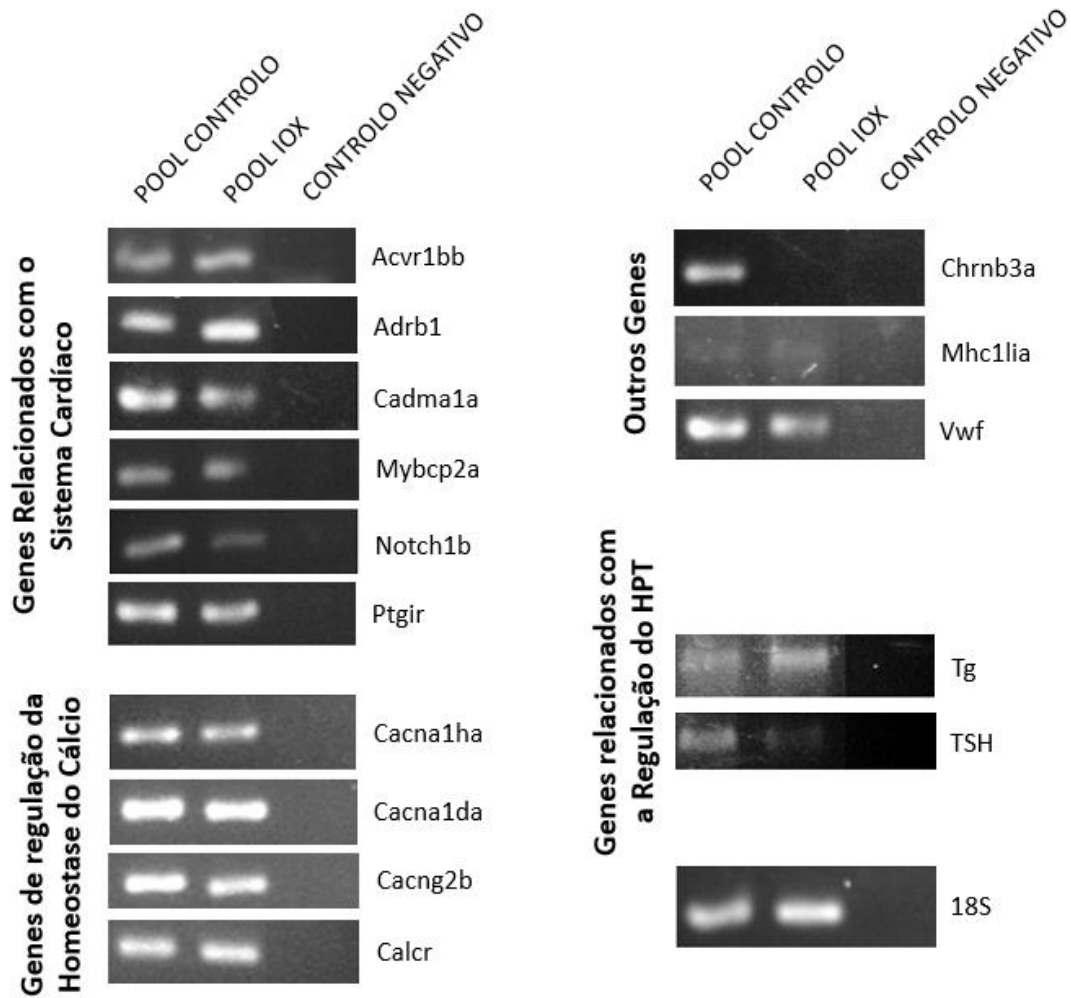


Figura 4.11 Comparação da análise de expressão génica dos genes endoteliais e do eixo HPT em peixes-zebra juvenis imaturos expostos durante 60d a 0.1µM IOX e controlo. Os genes analisados estão relacionados com o sistema cardíaco, a homeostasia do cálcio, o eixo HPT e outros genes como o recetor do complexo MHC, recetor colinérgico, e o fator *Von Willebrand*. Em todos os ensaios é usado um controlo interno negativo com apenas água. Os tamanhos das bandas estão descritos nos métodos. Todos os ciclos e temperatura foram idênticos à exceção do 18S que é o gene de controlo.

4.4.3. Análise histológica dos folículos da tiroide em peixes-zebra juvenis expostos a Ioxinil

A exposição ao xenobiótico IOX em peixes-zebra juvenis alterou a morfologia cardíaca e os genes relacionados com o eixo HPT. A TSH apresentou uma aparente alteração de expressão, levantando a questão de como é que este químico estaria a afetar o desenvolvimento dos folículos da tiroide.

Os efeitos sobre a morfologia e desenvolvimento dos folículos da tiroide foram analisados, usando os seguintes parâmetros: área total dos folículos da tiroide, campo de desenvolvimento dos folículos da tiroide e número de folículos presentes (Fig. 4.9 D-F).

Foi possível observar que o tratamento com 0.1 μM IOX teve impacto sobre a morfologia e histologia dos folículos da tiroide, nomeadamente no aumento relativo da área folicular em comparação com o controlo. Sendo este o único parâmetro com valor significativo (*unpaired t-test* $P = 0.047$). Este resultado foi comprovado com a observação dos dados, sendo que no controlo teve uma área mínima de $1.28 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$ e uma área máxima de $1.54 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$, enquanto que no tratamento com o químico IOX foram observados valores mínimos de $1.68 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$ e máximo de $3.41 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$. O valor mediano do controlo foi de $1.41 \times 10^{-4} \pm 6.12 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$ e o valor médio do tratamento com IOX foi de $2.59 \times 10^{-4} \pm 2.61 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{comprimento } \mu\text{m}^2$. Nos restantes parâmetros não foi verificada nenhuma alteração significativa. Foi observado que, 0.1 μM do composto químico IOX consegue alterar a morfologia dos folículos da tiroide.

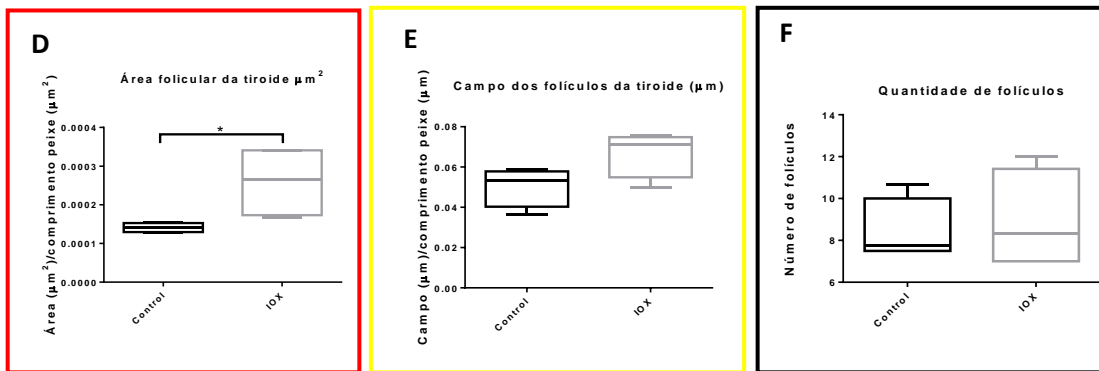
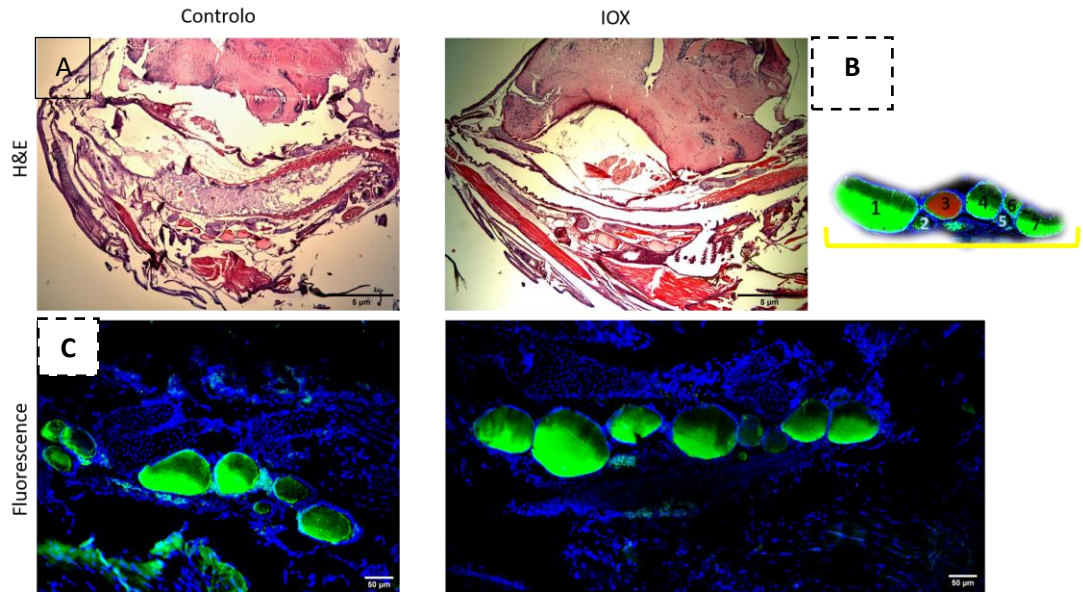


Figura 4.12 A exposição de peixes-zebra juvenis a 0.1μM IOX leva a uma expansão da área ocupada pelos folículos da tiroide ao longo da aorta. (A) Cortes histológicos da cabeça de peixes-zebra marcado com o método H&E permitiu localizar os folículos da tiroide em peixes-zebra. (B) Esquema visual dos parâmetros testados: vermelho - área dos folículos da tiroide, amarelo - campo dos folículos da tiroide e preto - contagem total de folículos da tiroide em cada indivíduo. (C) Análise por imunohistoquímica de fluorescência em cortes histológicos (50 μm) contra a Tg. O verde e azul representam respectivamente, imunomarcção da Tg e marcação com DAPI nos núcleos das células. (D-F) Quantificação dos parâmetros morfológicos da tiroide nos animais experimentais e calculados nas imagens de fluorescência. (D) Área dos folículos da tiroide, (E) extensão campo dos folículos da tiroide. (F) Quantidade de folículos da tiroide presentes em cada indivíduo. Para todos os parâmetros foi realizado o teste estatístico t-test não paramétrico.

5. Discussão

5.1. Análise sobre as condições ótimas para o estudo

Muitos dos problemas dos químicos com potencial disruptor endócrino como o DES e o IOX têm levantado alguma preocupação, pois os mecanismos tóxicos pelo qual atuam são pouco claros.

A hipótese estudada foi qual seria o impacto que estes dois químicos teriam sobre o sistema cardiovascular e o eixo HPT em peixes-zebra juvenis. Foi demonstrado que existiu uma desregulação endócrina nos indivíduos expostos a 0.1 μM de DES e IOX, tal como observado no estudo de Li *et al.* 2019 com embriões de peixe-zebra.

Não foi observado valores estatisticamente diferentes entre os ensaios sobre o crescimento dos animais expostos à concentração de 0.1 μM de DES e IOX. Quando mantidas todas as constantes: alimento, concentração de químico administrado, temperatura, duração da experiência e exposição química em diferentes descendências; pode ser afirmado que os dois ensaios tiveram resultados equivalentes. Mas, para maior confiança estatística é necessário um terceiro ensaio. A diferença entre tratamentos do mesmo ensaio pode ser explicada pelo facto de o químico DES ser um estrogénio não esteroide e a metabolização de estrogénios exógenos no organismo do peixe-zebra interferirem com a hormona do crescimento^{84,85}. No caso do IOX (químico pesticida) já foi demonstrado que pesticidas têm impacto sobre o crescimento dos peixes-zebra retardando o seu crescimento^{86,87}.

A taxa de mortalidade em ambos os ensaios, encontraram-se nos padrões normais. Foi revisto e estudado que, quando os peixes-zebra não foram expostos a qualquer xenobiótico a taxa de sobrevivência é $>70\%$ ⁸⁸⁻⁹¹. A mortalidade revelou que o químico não se encontrou em dose suficiente para induzir morte por toxicidade nos tratamentos.

Os valores aleatórios das taxas de mortalidade podem referir-se à fase inicial da experiência onde os peixes juvenis ainda se encontravam numa fase inicial e importante na sua sobrevivência, à aclimação aos tanques e à limpeza manual dos mesmos.

5.2. Diethylstilbestrol e o seu impacto na comunicação do eixo HPT e morfologia da tiroide

O composto DES (químico estrogénio não esteroide) foi capaz de afetar a comunicação da pituitária causando impacto sobre a morfologia da tiroide em peixes-zebra juvenil. Foi observado em embriões de peixes-zebra, expostos a 0.1 μ M DES, que o tratamento teve impacto sobre a morfologia cardíaca²². O mecanismo de disrupção endócrina deste químico difere em peixes juvenis em comparação com os embriões.

No presente estudo, os peixes-zebra juvenis não demonstraram uma diferença significativa no volume do ventrículo cardíaco, apesar dos genes relacionados com a homeostasia do cálcio (Cacna1ha, Calcr) encontrarem-se relativamente alterados. Isto pode dever-se ao facto que os corações destes animais serem bastante desenvolvidos e robustos, capazes de resistir a alterações do batimento cardíaco que resultaria na alteração da sua morfologia.

Tabela 5.1 Resumo dos níveis de expressão das bandas analisadas do tratamento DES em relação ao controlo.

Genes	DES/CTR
Cacna1ha	↑
Calcr	↓
Chrb3a	↓
Tg	↓
TSH	↓

Foi observado que o químico DES teve impacto sobre o mecanismo de regulação hormonal do eixo HPT. Não sendo possível identificar onde o químico atuou, se ao nível do tecido da tiroide ou na pituitária. Nos animais expostos a 0.1 μ M DES foi observado um aumento no campo de desenvolvimento e na área dos folículos da tiroide (Fig. 4.6), existindo uma desregulação do desenvolvimento da tiroide ao longo da aorta ventral. Foi possível também visualizar o aparecimento de folículos numa zona muito anterior e posterior da área expectável (Fig. Anexo 1). A proliferação dos tecidos pode estar relacionada com o mecanismo de compensação para ativar a pituitária a produzir TSH para equilibrar o sistema endócrino⁹². Estas deformações (desenvolvimento irregular dos tirócitos) são denominadas hiperplasia dos folículos. No presente estudo foi observada hiperplasia folicular simples, reconhecida pela proliferação de tecido da tiroide fora das zonas onde normalmente este tecido se desenvolve⁹³. Esta disrupção endócrina do DES pode ocorrer diretamente sobre a síntese das HTs ou no *uptake* de iodo³⁷.

Comparativamente a outros estudos também foram feitas estas observações nos folículos da tiroide em peixes-zebra. Químicos como o triclosan⁹⁴, perclorato de arsenato⁹⁵ e Propiltiouracil PTU⁹² aumentaram a área relativa dos folículos. Nestes estudos foi referido que os indivíduos apresentavam características hipotiroides. O estudo realizado em peixe-zebra adultos com o químico Propiltiouracil PTU (químico administrado em animais com produção hormonal normal que causa hipotiroidismo)^{92,96}, demonstraram padrões de patologia similares aos observados. Os indivíduos apresentavam hiperplasia e total desorganização dos folículos da tiroide. No caso do uso do químico perclorato de amónia⁹⁷ (químico frequentemente usado para testar lesões da tiroide em peixe-zebra) também foi observado as seguintes características: aumento da área ao nível dos folículos da tiroide, padrões irregulares de folículos e agregados sem estrutura.

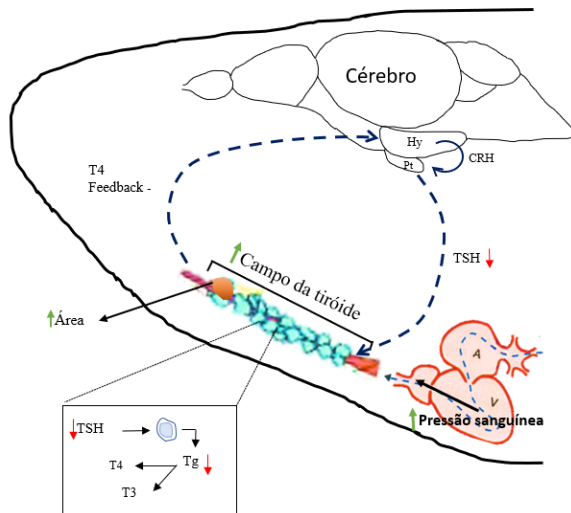
Percebendo como atua o mecanismo de *feedback* negativo do eixo HPT é possível perceber que, caso a TSH não seja expressa em quantidade suficiente, a T₄ não é excretada para o sangue, sendo assim armazenada, levando ao aumento relativo dos folículos da tiroide⁴⁵. Este aumento relativo da área dos folículos da tiroide, indicou que poderá existir pouca secreção das HTs para o sistema circulatório, corroborado pela presença da pouca expressão do gene da Tg. Esta alteração dos níveis de expressão em peixe-zebra foi observada em químicos como o composto anti-tiroide PTU⁹⁴, Perfluorooctane sulfonate^{98,99} e nanopartículas de ZnO⁹⁹. Neste estudo, os mesmos parâmetros foram observados, o que sugere que os peixes expostos a DES podem apresentar características de indivíduos hipotiroides.

Em dourada³⁷, foi demonstrada a disrupção endócrina pelo químico DES, que inibiu a TSH produzida ao nível do cérebro e pituitária. Também foi observado que existiu uma estimulação dos folículos da tiroide aumentando o seu tamanho relativo. Estes resultados foram de encontro aos obtidos em peixes-zebra nesta experiência.

Podemos concluir que o químico DES sendo um estrogénio não-esteróide, atuou de forma similar a outros componentes químicos conhecidos e testados, afetando a morfologia e o desenvolvimento dos folículos da tiroide.

O mecanismo molecular de disrupção do DES em peixes-zebra não é conhecido, contudo os dados deste estudo comparando com outros indicam que poderá estar relacionado com uma interação com o eixo HPT, criando assim uma série de reações que afetaram a morfogénese dos folículos da tiroide. A Fig. 5.1 é um esquema resumo representativo de todas as conclusões retiradas.

**Esquema geral do impacto do químico
DES em *Danio rerio* juvenil**



DES – estrogênio não esteroide sintético

RT-PCR:

- ↑ *Cacna1ha* = hipertensão
- ↓ *Calcr* = desregulação na pituitária
- ↓ *Chenb3a* = relacionado com o sistema nervoso e sobre o batimento cardíaco
- ↓ *Tg*
- ↓ *TSH*

Volume do ventrículo:

Sem diferenças significativas

Histologia da tireóide

- ↑ Área
 - ↑ Campo da tireóide
- DES pode interagir com o eixo HPT não estimulando a produção das hormonas;
 - A Tg encontra-se inibida pelo mecanismo feedback;
 - Armazenamento das HT sem excreção e não produção de Tg leva ao aumento da área dos foliculos;
 - Hiperplasia dos foliculos da tireóide, desenvolvimento de foliculos fora do campo da tireóide para compensar a produção de HT;
 - Os peixes-zebra apresentam características de animais hipotiróides.

Figura 5.1 Esquema geral do impacto do químico DES em peixes-zebra e conclusões gerais.

5.3. Ioxinil e o seu impacto na morfologia cardíaca

Os resultados demonstraram que o químico IOX teve impacto sobre a morfologia cardíaca do peixe-zebra e por consequentemente na regulação do eixo HPT. A exposição ao químico durante sessenta dias foi capaz de alterar a morfologia cardíaca levando ao aumento da câmara ventricular. Este aumento pode ter sido devido a uma mudança da taxa de batimento cardíaco (parâmetro não medido) que influenciou o relaxamento miocárdial. Os peixe-zebra juvenis possuem um coração totalmente desenvolvido e capaz de resistir e tolerar alterações de batimento cardíacas. Alterações na fisiologia do órgão cardíaco podem levar a uma hipertrofia cardíaca¹⁰⁰.

Em Campinho 2013²¹, foi observado em embriões de peixe-zebra, que não foi necessária a presença de tecido cardíaco para o estabelecimento de um campo de folículos, mas o impulso cardíaco foi importante para o desenvolvimento da tiroide e para a correta localização dos folículos. Foi também observado, que o químico IOX teve impacto sobre o volume do ventrículo do coração, que por sua vez teve impacto no desenvolvimento da tiroide. O mesmo parece ocorrer neste estudo, em peixes-zebra juvenis.

No caso da análise de expressão génica os genes o Notch1b e Chrnb3a encontraram-se aparentemente desregulados, mas pouco pode ser concluído, apenas que estão relacionados com o sistema cardíaco. Esta relação da alteração da performance cardíaca, não é possível ser determinada pelo que é necessário verificar outros parâmetros para validar os resultados de RT-PCR.

Tabela 5.2 Resumo dos níveis de expressão das bandas analisadas no tratamento IOX em relação ao controlo

Genes	IOX/CTR
Notch1b	↓
Chrnb3a	X
TSH	↓

Não foi possível definir se o químico teve impacto somente sobre a morfologia ou função cardíaca, ou se atuou de maneira direta ou indireta sobre o sistema cardíaco. Mas a hipótese proposta é que o estímulo cardíaco no peixe-zebra juvenil esteja a estimular a produção de Tg em quantidades normais. A TSH encontra-se aparentemente pouco expressa não estimulando a secreção de Tg para o sangue, armazenando a hormona e consequentemente aumentando a área dos folículos. Esta alteração na dinâmica cardíaca em peixes-zebra juvenis pode ter tido impacto sobre a glândula da tiroide. Pois, foi observado um aumento relativo da área dos folículos da tiroide e a alteração de expressão do gene TSH. A TSH encontrava-se

aparentemente pouco expressa apesar do gene Tg encontrar-se expresso em quantidades normais. Em dourada, quando exposta ao composto IOX³⁷, foi observado uma estimulação dos folículos da tiroide. Os folículos apresentavam maiores dimensões e de vacúolos vazios, sendo este um indicativo de produção de HTs. Outros estudos efetuados em que foi visualizado a mesma expressão de Tg e TSH foram, o Fosfato de trifenila TPP¹⁰¹, Microcistina-LR (hepatoxina produzida por cianobactérias)¹⁰².

Todos estes parâmetros levam a inferir que os animais expostos a IOX ao fim de sessenta dias apresentam características de hipertiroidismo (níveis baixos de TSH, mas níveis de Tg normais^{103, 104}, aumento do volume do ventrículo, aumento da área dos folículos).

A Fig. 5.2 é um esquema resumo representativo de todas as conclusões retiradas.

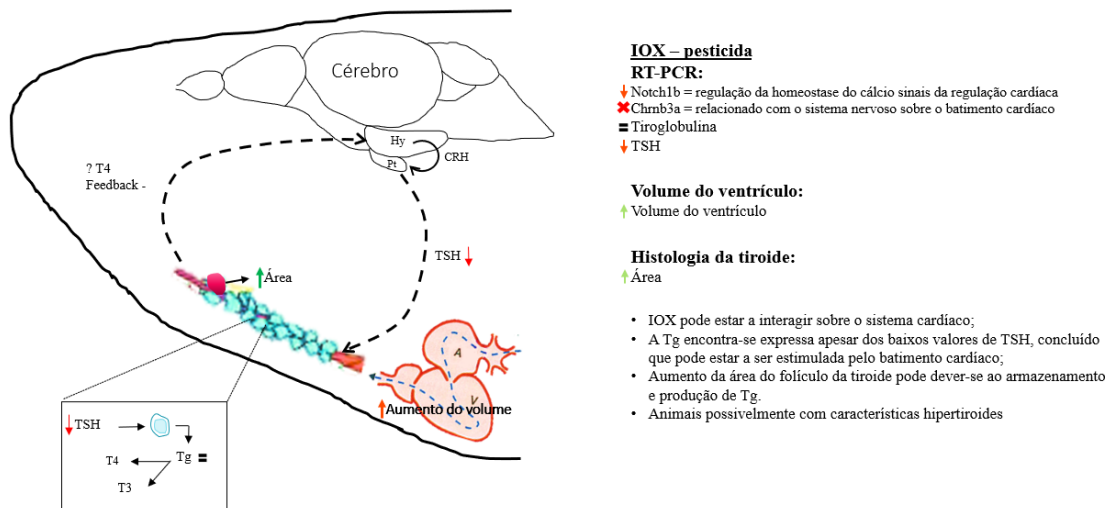


Figura 5.3 Esquema geral do impacto do químico IOX em peixes-zebra e conclusões gerais.

6. Conclusão

Os químicos IOX e DES nas doses usadas não tiveram impacto na mortalidade dos peixe-zebra ao longo dos sessenta dias de exposição. Demonstrando que o efeito do DES e IOX têm sobre os peixes-zebra são específicos ao nível molecular e de efeito contínuo sobre o ciclo de vida dos peixes-zebra.

Como observado em Li *et al.* 2019, foi possível também identificar o poder disruptor endócrino em concentrações micromolares dos compostos químicos DES e IOX em peixes-zebra juvenis, em que estes químicos tiveram impacto sobre genes reguladores da homeostasia do cálcio e dos genes relacionados com o sistema cardíaco. Os químicos também tiveram impacto sobre a regulação hormonal da pituitária diminuindo a produção de TSH, que consequentemente afetou o aumento da área do coloide dos folículos da tiroide. Ainda é necessário determinar o mecanismo específico pelo qual estes químicos atuaram sobre os diferentes órgãos dos peixes-zebra.

Nesta fase do ciclo de vida do peixe-zebra, comparativamente com os estudos realizados em embrião, a maneira como cada um dos químicos atuou no eixo HPT e sistema cardiovascular foi diferente. Mas, é possível verificar que estes resultados são similares com os observados em dourada adulta³⁷, verificando que o seu efeito é similar em diferentes espécies de teleósteos.

No caso do DES, o mecanismo de impacto foi menos claro, mas foi possível observar a estimulação dos folículos da tiroide. A área folicular foi relativamente superior em comparação com o controlo, o que sugere a pouca secreção de Tg e o armazenamento desta, nos folículos. O campo da tiroide também se encontrou mais disperso ao longo dos tecidos conectivos da região faríngea, levando ao aparecimento de folículos em locais muito posteriores ou anteriores da zona de interesse (hiperplasia). As hormonas da TSH e da Tg encontravam-se pouco expressas e podem ser a causa do aumento do campo da tiroide, um mecanismo de compensação do eixo HPT. É necessária uma análise mais sensível e qualitativa sobre a expressão genética, para perceber como o químico DES poderá atuar molecularmente.

No caso do IOX apresentaram um aumento do volume do ventrículo, em que a causa poderá estar relacionada com a alteração do batimento cardíaco (parâmetro não medido). Por consequência esta alteração, pode ter estimulado a produção de Tg nos folículos e a pouca excreção da Tg levou ao aumento da área relativa dos mesmos. Os resultados demonstraram que a Tg encontra-se aparentemente expressa, em quantidades normais, e a TSH encontrou-se aparentemente pouco expressa.

Foi possível concluir que: (1) o IOX atuou sobre o sistema cardíaco, alterando o volume do ventrículo e subsequentemente este efeito teve impacto na morfologia dos folículos da tiroide e no eixo HPT; (2) o mecanismo pelo qual o DES atuou não foi claro, mas teve impacto sobre o desenvolvimento do campo da tiroide e dos folículos, desregulando a homeostasia do eixo HPT; (3) estes químicos têm um potencial de disrupção endócrina da tiroide após exposição crônica em doses micromolares e abaixo dos níveis mínimos permitidos por lei durante a fase juvenil dos peixes-zebra.

7. Estudos futuros

Para estudos futuros recomenda-se um estudo alargado dos diferentes tipos de genes como a CRH, os recetores TR α e TR β , as deiodinases D1 e D2 e medição hormonal da T₄ e T₃ para perceber como todo este processo endócrino está a ser afetado e qual a origem do decréscimo de produção de TSH e Tg (com base nos estudos de Wikinson K. Chan 2011¹⁸, Wei Yan *et al.* 2012¹⁰⁵, Liang Yu *et al.* 2015¹⁰⁶, Chen Jianjie *et al.* 2016¹⁰⁷). É importante ver outros fatores de regulação de diferenciação e formação de folículos no peixe-zebra como Hhex, Pax8 and Nkx2.1 descritos em Wendl *et al.* 2002¹⁰⁸ e Elsalini *et al.* 2003¹⁰⁹, que podem comprovar o mecanismo de compensação do aumento e proliferação dos folículos com DES.

Também é importante averiguar a alteração do batimento cardíaco nos indivíduos tratados com o composto IOX, pois é um importante indicador da alteração da morfologia cardíaca e da estimulação dos folículos da tiroide.

8. Anexo 1

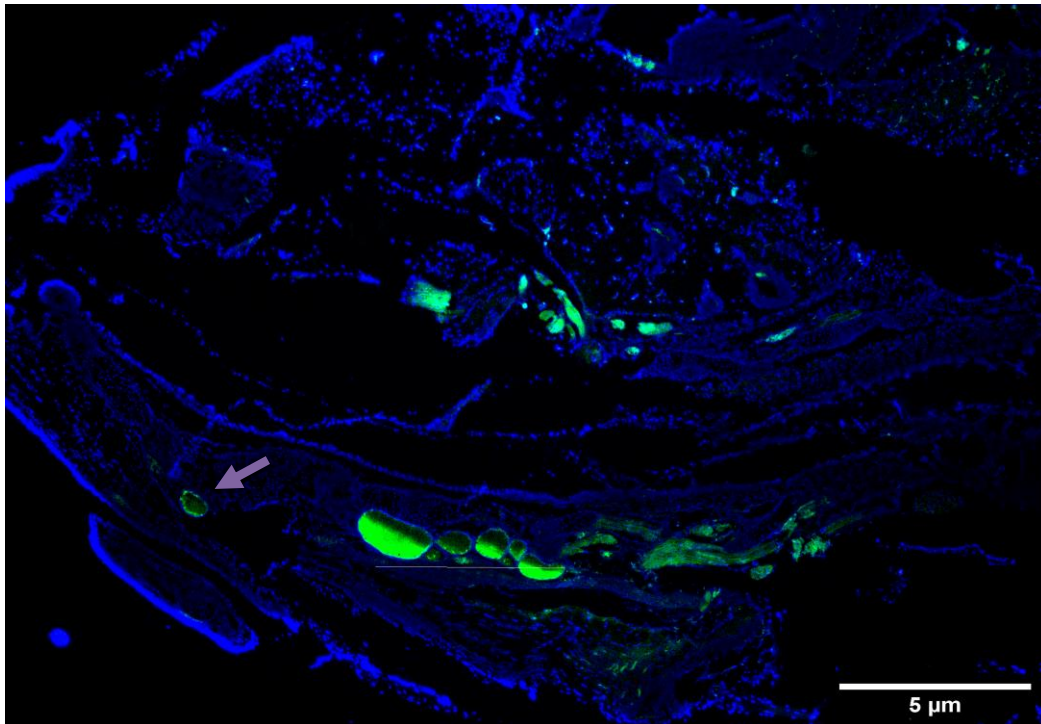


Figura 8.1 Imagem de imunohistoquímica de peixe-zebra Tg(cmcl2:GFP x Kdrl:mCherry), com tratamento com 0.1 μM DES.

Imagem de fluorescência com ampliação de 4x, da zona do campo de desenvolvimento dos folículos da tireoide em peixes-zebra juvenis. O verde e azul representam respectivamente, imunomarcagem da Tg, e marcação com DAPI nos núcleos das células. Nesta imagem é possível observar um folículo da tireoide, realçado com a seta de cor lilás, presente uma zona pouco comum do campo de formação dos folículos. Demonstra assim um caso de hiperplasia – crescimento anormal de folículos fora da zona prevista.

9. Referências

1. Nilsson, M. & Fagman, H. Development of the thyroid gland. *Development* **144**, 2123–2140 (2017).
2. Klee, E. W. *et al.* Zebrafish: A model for the study of addiction genetics. *Hum. Genet.* **131**, 977–1008 (2012).
3. Casals-Casas, C. & Desvergne, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 135–162 (2011).
4. Zoeller, R. T., Tan, S. W. & Tyl, R. W. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit. Rev. Toxicol.* **37**, 11–53 (2007).
5. Brix, K. *et al.* The Thyroid and Its Diseases. (2019) doi:10.1007/978-3-319-72102-6.
6. Braun, D. & Schweizer, U. Thyroid Hormone Transport and Transporters. *Vitamins and Hormones* vol. 106 (Elsevier Inc., 2018).
7. McNabb, F. M. A. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* **37**, 163–193 (2007).
8. Williams, C. B. H. and G. R. Mechanism of Thyroid Hormone Action - Human Physiology. **12**, (2014).
9. van der Spek, A. H., Fliers, E. & Boelen, A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **458**, 29–38 (2017).
10. Mullur, R., Liu, Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Hydrocarb. Eng.* 103 (2008) doi:10.1152/physrev.00030.2013.
11. Boelaert, K. & Franklyn, J. A. Thyroid hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* **187**, 1–15 (2005).
12. Thorin, E. & Thorin-Trescases, N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc. Res.* **84**, 24–32 (2009).
13. Marques, S. R., Lee, Y., Poss, K. D. & Yelon, D. Reiterative roles for FGF signaling in the establishment of size and proportion of the zebrafish heart. *Dev. Biol.* **321**, 397–406 (2008).
14. Wills, A. A., Holdway, J. E., Major, R. J. & Poss, K. D. Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development* **135**, 183–192 (2008).
15. Berdougo, E., Coleman, H., Lee, D. H., Stainier, D. Y. R. & Yelon, D. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* **130**, 6121–6129 (2003).
16. Porazzi, P., Calebiro, D., Benato, F., Tiso, N. & Persani, L. Thyroid gland development and function in the zebrafish model. *Mol. Cell. Endocrinol.* **312**, 14–23 (2009).
17. Fagman, H. & Nilsson, M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 35–54 (2010).
18. Chan, W. K. & Chan, K. M. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquat. Toxicol.* **108**, 106–111 (2012).
19. Alt, B. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development* **133**, 3797–3804 (2006).
20. Raine, J. C. & Leatherland, J. F. Morphological and functional development of the thyroid tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Cell Tissue Res.* **301**, 235–244 (2000).
21. Campinho, M. A. & Power, D. M. Waterborne exposure of zebrafish embryos to micromole concentrations of ioxynil and diethylstilbestrol disrupts thyrocyte development. *Aquat. Toxicol.* **140–141**, 279–287 (2013).

22. Yifeng Li, Adelino Canario, Deborah Power, M. A. C. Ioxynil and diethylstilbestrol disrupt thyrocyte development via impaired vascular and heart development in zebrafish. *Environ. Int.* **124**, 511–520 (2018).
23. Brent, G. A. Science in medicine Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **122**, 3035–3043 (2012).
24. Fazio, S., Palmieri, E. A., Lombardi, G. & Biondi, B. Effects of Thyroid Hormone on the Cardiovascular System. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 31–50 (2004).
25. Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock., R. & Kraak, G. V. Der. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization (World Health Organization, 2002).
26. Carr, J. A. & Patiño, R. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* **170**, 299–312 (2011).
27. Yu, L. et al. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* **97**, 226–233 (2010).
28. Liu, Y. W. & Chan, W. K. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation* **70**, 36–45 (2002).
29. Dieckmann, W. J., Davis, M. E., Rynkiewicz, L. M. & Pottinger, R. E. Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? *Am. J. Obstet. Gynecol.* **66**, 1062–1081 (1953).
30. Yamamoto, M. *et al.* Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. *J. Toxicol. Sci.* **28**, 385–394 (2003).
31. Giusti, R. M., Iwamoto, K. & Hatch, E. E. Diethylstilbestrol revisited: A review of the long-term health effects. *Ann. Intern. Med.* **122**, 778–788 (1995).
32. PubChem. PubChem Compound Summary CID 448537 DES. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethylstilbestrol>.
33. Yamauchi, K., Prapunpoj, P. & Richardson, S. J. Effect of diethylstilbestrol on thyroid hormone binding to amphibian transthyretins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**, 329–339 (2000).
34. Ishihara, A., Nishiyama, N., Sugiyama, S. I. & Yamauchi, K. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **134**, 36–43 (2003).
35. Eguchi, R., Ishihara, A. & Yamauchi, K. Interaction of diethylstilbestrol and ioxynil with transthyretin in chicken serum. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **147**, 345–350 (2008).
36. Otsuka, S., Ishihara, A. & Yamauchi, K. Ioxynil and tetrabromobisphenol a suppress thyroid-hormone-induced activation of transcriptional elongation mediated by histone modifications and RNA polymerase II phosphorylation. *Toxicol. Sci.* **138**, 290–299 (2014).
37. Morgado, I., Campinho, M. A., Costa, R., Jacinto, R. & Power, D. M. Disruption of the thyroid system by diethylstilbestrol and ioxynil in the sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat. Toxicol.* **92**, 271–280 (2009).
38. Akiyoshi, S., Sai, G. & Yamauchi, K. Species-dependent effects of the phenolic herbicide ioxynil with potential thyroid hormone disrupting activity: Modulation of its cellular uptake and activity by interaction with serum thyroid hormone-binding proteins. *J. Environ. Sci.* **24**, 949–955 (2012).
39. PubChem. PubChem Compound Summary for CID 15530 IOX. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ioxynil>.

40. Morgado, I., Hamers, T., Van der Ven, L. & Power, D. M. Disruption of thyroid hormone binding to sea bream recombinant transthyretin by ioxinyl and polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere* **69**, 155–163 (2007).
41. Chakraborty, C., Hsu, C., Wen, Z., Lin, C. & Agoramoorthy, G. Zebrafish: A Complete Animal Model for In Vivo Drug Discovery and Development. *Curr. Drug Metab.* **10**, 116–124 (2009).
42. D’Costa, A. & Shepherd, I. T. Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish* **6**, 169–177 (2009).
43. Hu, N., Sedmera, D., Yost, H. J. & Clark, E. B. Developing Zebrafish Heart. *Anat. Rec.* **157**, 148–157 (2000).
44. Staudt, D. & Stainier, D. Uncovering the Molecular and Cellular Mechanisms of Heart Development Using the Zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 397–418 (2012).
45. Rolland, R. M. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J. Wildl. Dis.* **36**, 615–635 (2000).
46. Campinho, M. A. Teleost metamorphosis: The role of thyroid hormone. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–12 (2019).
47. Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N. E. & Main, K. M. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 599–611 (2006).
48. Bauer, E. S., J., T. R. & Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1508–1512 (2002).
49. Zfin. The Zebrafish Information Network (ZFIN) *Acvr1bb*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-131120-9>.
50. Parvez, B. *et al.* A common β 1-adrenergic receptor polymorphism predicts favorable response to rate-control therapy in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 49–56 (2012).
51. ZFIN. The Zebrafish Information Network *cadmla*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-080505-2>.
52. Yang, W., Qi, Y. & Fu, J. Genetic signals of high-altitude adaptation in amphibians: A comparative transcriptome analysis. *BMC Genet.* **17**, 1–10 (2016).
53. ZFIN. The Zebrafish Information Network *notch1b*.
54. Williams, R., Lendahl, U. & Lardelli, M. Complementary and combinatorial patterns of Notch gene family expression during early mouse development. *Mech. Dev.* **53**, 357–368 (1995).
55. Zhang, X. P. *et al.* Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **307**, 101–108 (2008).
56. ZFIN. The Zebrafish Information Network *ptgir*.
57. Dhalla, N. S., Pierce, G. N., Panagia, V., Singal, P. K. & Beamish, R. E. Calcium movements in relation to heart function. *Basic Res. Cardiol.* **77**, 117–139 (1982).
58. ZFIN. The Zebrafish Information Network *cacna1da*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-030616-135>.
59. ZFIN. The Zebrafish Information Network *cacna1ha*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-030616-135>.
60. Haverinen, J., Hassinen, M., Dash, S. N. & Vornanen, M. Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: dominance of T-type channels. *J. Exp. Biol.* **221**, 1–10 (2018).
61. ZFIN. The Zebrafish Information Network *cacng2b*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-090624-3>.
62. ZFIN. The Zebrafish Information Network *calcr*. <https://zfin.org/ZDB-GENE-060503->

- 420#.
63. Wilkinson, R. N. *et al.* Hedgehog signaling via a calcitonin receptor-like receptor can induce arterial differentiation independently of VEGF signaling in zebrafish. *Blood* **120**, 477–488 (2012).
 64. Nicoli, S., Tobia, C., Gualandi, L., De Sena, G. & Presta, M. Calcitonin receptor-like receptor guides arterial differentiation in zebrafish. *Blood* **111**, 4965–4972 (2008).
 65. ZFIN. The Zebrafish Information Network chrnb3a. <https://zfin.org/ZDB-GENE-040108-1>.
 66. Ono, F., Mandel, G. & Brehm, P. Acetylcholine receptors direct rapsyn clusters to the neuromuscular synapse in zebrafish. *J. Neurosci.* **24**, 5475–5481 (2004).
 67. Herring, N. *et al.* Particulate guanylyl cyclase and cholinergic control of cardiac excitability is site specific [2] (multiple letters). *Cardiovasc. Res.* **54**, 697–700 (2002).
 68. Lin, C. C., Hui, M. N. Y. & Cheng, S. H. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 159–168 (2007).
 69. Watson, F. L. *et al.* Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 1337–1345 (2014).
 70. Loeb, J. M. & Vassalle, M. An analysis of cholinergic involvement in postvagal tachycardia. *Cardiol.* **63**, 270–279 (1978).
 71. Osterauer, R. & Köhler, H. R. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **86**, 485–494 (2008).
 72. ZFIN. The Zebrafish Information Network mhc1lia. <https://zfin.org/ZDB-GENE-140820-10>.
 73. ZFIN. The Zebrafish Information Network vwf. <https://zfin.org/ZDB-GENE-070103-1>.
 74. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* **83**, 13–34 (2008).
 75. Tsang, B. *et al.* Breeding zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization. *Zebrafish* **14**, 561–573 (2017).
 76. Fujita, M. *et al.* Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain. *Development* **138**, 1705–1715 (2011).
 77. Rasband, W. Fiji.
 78. Wilfinger, W. W., Mackey, K. & Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474–481 (1997).
 79. Stangegaard, M., Dufva, I. H. & Dufva, M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *Biotechniques* **40**, 649–657 (2006).
 80. Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L. & Scambia, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online* **3**, 19–25 (2001).
 81. Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T. & Lieb, B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evol. Biol.* **10**, (2010).
 82. Hama, H. *et al.* Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* **14**, 1481–1488 (2011).
 83. Campinho, M. A. *et al.* Molecular and cellular changes in skin and muscle during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) are accompanied by changes in deiodinases expression. *Cell Tissue Res.* **350**, 333–346 (2012).

84. Sun, S. X. *et al.* Concentration-dependent effects of 17 β -estradiol and bisphenol A on lipid deposition, inflammation and antioxidant response in male zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* **237**, 124422 (2019).
85. Schäfers, C. *et al.* Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **70**, 768–779 (2007).
86. Pamanji, R., Bethu, M. S., Yashwanth, B., Leelavathi, S. & Venkateswara Rao, J. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 7744–7753 (2015).
87. Cook, L. W., Paradise, C. J. & Barbara, L. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 1745–1750 (2016).
88. Ensenbach, U. & Nagel, R. Toxicity of complex chemical mixtures: Acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 30 151–157 (1995).
89. Mukhi, S., Torres, L. & Patiño, R. Effects of larval-juvenile treatment with perchlorate and co-treatment with thyroxine on zebrafish sex ratios. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**, 486–494 (2007).
90. Baumann, L. *et al.* Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **278**, 230–237 (2014).
91. Sharma, P. & Patiño, R. Regulation of gonadal sex ratios and pubertal development by the thyroid endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **184**, 111–119 (2013).
92. Schmidt, F. & Braunbeck, T. Alterations along the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to propylthiouracil. *J. Thyroid Res.* **2011**, (2011).
93. Fournie, J. W. *et al.* Diagnostic criteria for proliferative thyroid lesions in bony fishes. *Toxicol. Pathol.* **33**, 540–551 (2005).
94. Pinto, P. I. S., Guerreiro, E. M. & Power, D. M. Triclosan interferes with the thyroid axis in the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Res. (Camb)*. **2**, 60–69 (2013).
95. Liu, F., Gentles, A. & Theodorakis, C. W. Arsenate and perchlorate toxicity, growth effects, and thyroid histopathology in hypothyroid zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* **71**, 1369–1376 (2008).
96. Van Der Ven, L. T. M., Van Den Brandhof, E. J., Vos, J. H., Power, D. M. & Wester, P. W. Effects of the antithyroid agent propylthiouracil in a partial life cycle assay with zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 74–81 (2006).
97. Patiño, R. *et al.* Effects of ammonium perchlorate on the reproductive performance and thyroid follicle histology of zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 1115–1121 (2003).
98. Shi, X., Liu, C., Wu, G. & Zhou, B. Waterborne exposure to PFOS causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* **77**, 1010–1018 (2009).
99. Du, J., Wang, S., You, H. & Liu, Z. Effects of ZnO nanoparticles on perfluorooctane sulfonate induced thyroid-disrupting on zebrafish larvae. *J. Environ. Sci. (China)* **47**, 153–164 (2016).
100. Biondi, B., Palmieri, E. A., Lombardi, G. & Fazio, S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: The relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 968–974 (2002).
101. Kim, S. *et al.* Thyroid disruption by triphenyl phosphate, an organophosphate flame retardant, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae, and in GH3 and FRTL-5 cell lines.

- Aquat. Toxicol. **160**, 188–196 (2015).
102. Cheng, H. *et al.* Parental exposure to microcystin-LR induced thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring, a transgenerational toxicity. *Environ. Pollut.* **230**, 981–988 (2017).
 103. Gardner, D. F., Rothman, J. & Utiger, R. D. Serum Thyroglobulin in Normal Subjects and Patients With Hyperthyroidism Due To Graves' Disease: Effects of T3, Iodide, 131 I and Antithyroid Drugs. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **11**, 585–594 (1979).
 104. G, E., Tga, S., Jgp, T. & Wm, W. Natural history of the transition from euthyroidism to overt autoimmune hypo- and hyperthyroidism: a prospective study. *Eur. J. Endocrinol.* **164**, 107–113 (2011).
 105. Chang, J. *et al.* Species-dependent effects of the phenolic herbicide ioxynil with potential thyroid hormone disrupting activity: Modulation of its cellular uptake and activity by interaction with serum thyroid hormone-binding proteins. *Aquat. Toxicol.* **199**, 290–299 (2012).
 106. Liang, X., Yu, L., Gui, W. & Zhu, G. Exposure to difenoconazole causes changes of thyroid hormone and gene expression levels in zebrafish larvae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 983–987 (2015).
 107. Jianjie, C. *et al.* Fluoride caused thyroid endocrine disruption in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **171**, 48–58 (2016).
 108. Wendl, T. *et al.* Pax2.1 Is Required for the Development of Thyroid Follicles in Zebrafish. *Development* **129**, 3751–3760 (2002).
 109. Elsalini, O. A., Von Gartzen, J., Cramer, M. & Rohr, K. B. Zebrafish *hhex*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. *Dev. Biol.* **263**, 67–80 (2003).