



*Universidade do Algarve
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais
Mestrado em Biotecnologia*

***"Efeito do cloro no desenvolvimento e na tiróide da
Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*)"***

Rita Carina Saraiva Silva Bicho

Faro 2009

Universidade do Algarve
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia

***"Efeito do cloro no desenvolvimento e na tiróide da
Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*)"***

Orientadora: Prof. Doutora Deborah Mary Power

Co-Orientador: Prof. Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário

Rita Carina Saraiva Silva Bicho

Faro 2009

Agradecimentos

Um enorme agradecimento à Professora Doutora Deborah Power, porque mais que uma excelente orientadora foi uma amiga e conselheira. Obrigada pelo apoio e incentivo prestados ao longo de todo este percurso. Ao Professor Doutor Adelino Canário muito obrigado pela oportunidade que me concedeu em trabalhar no seu laboratório.

À Doutora Patrícia Pinto e à Doutora Laurence Dellofre muito obrigada pelo apoio prestado na parte molecular e por toda amizade.

Um enorme agradecimento à Nádia, Ângela e Rita por toda a companhia, conselhos e ajuda prestada ao longo do trabalho. Um obrigada também a todos os presentes do laboratório 2.28 pelos sorrisos e boa disposição.

A todos os meus colegas de mestrado, sem vocês esta experiência não tinha sido excelente como foi. Em especial obrigada ao Nelson, Carlos, João e Rogério.

A ti minha hermanita Daylin... para começar se não fosses tu nem começaria este trabalho. Não existem palavras que possam descrever a confiança e toda a ajuda prestadas. Muito muito obrigada.

A ti minha Parker, como te posso agradecer por todo o apoio e amizade. Muito muito obrigada, principalmente por me suportares. Um grande obrigada também para ti Nuna pela ajuda e por seres essa pessoa maravilhosa.

Ao Kiko, muito obrigada pelo teu amor, apoio, paciência. Sem ti a vida não tinha este sabor especial.

À minha avó e à minha mãe, por serem simplesmente as melhores do mundo! Devo tudo a vocês.

Por último, ao meu Pai querido, tudo é por ti.

Resumo

O cloro é um elemento que tem sido largamente utilizado na indústria desde o início do século XX. Uma das principais utilizações do cloro é na forma de hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfecção de águas de piscinas e tratamento de efluentes. Podendo por isso ser muito comum encontrar este desinfectante em descargas para o meio aquático. Contudo sabe-se muito pouco sobre os efeitos que este contaminante pode causar em populações animais dos sistemas aquáticos. Este estudo pretendeu verificar se a exposição ao NaOCl afecta o desenvolvimento larvar de uma espécie de peixe eurialina (*Oreochromis mossambicus*). Em particular, foram estudados os seus efeitos no desenvolvimento do esqueleto e na glândula tiróide. Foram conduzidas experiências em que larvas foram expostas ao NaOCl em várias concentrações durante 24h, logo após a eclosão ou a uma exposição contínua durante 21 dias. Posteriormente foram realizadas análises da morfologia externa e da ontogenia do esqueleto, histologia do tecido da tiróide e estudo da expressão de um gene envolvido no desenvolvimento do esqueleto (BMP2). Verificou-se que uma única exposição de 1mg/L NaOCl logo após a eclosão e uma exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl durante 21 dias após eclosão, afectou a morfologia externa, provocou atraso na ossificação do esqueleto e redução na actividade da tiróide (hipotrofia dos tirócitos). Não se encontraram diferenças na expressão da BMP2. Em conclusão uma exposição curta (24h) ao NaOCl a uma concentração que facilmente poderá ser encontrada no meio aquático, afectou significativamente o desenvolvimento das larvas de *Oreochromis mossambicus*, tornando necessários estudos futuros para entender quais os mecanismos fisiológicos envolvidos e se estes efeitos na fase larvar poderão afectar o desenvolvimento em fases do crescimento posteriores.

Abstract

Chlorine is an element that has been used in industry since the beginning of the 20th century. One of the main uses of sodium hypochlorite (NaOCl) is the disinfection of water in swimming pools and treatment of effluents. Therefore it is very common to find this disinfectant in discharges to the aquatic environment. However little is known about the effects that this contaminant can cause on animal populations in aquatic ecosystems. The present study aimed to verify if exposition to NaOCl affects larval development in a euryhaline specie *Oreochromis mossambicus*. In particular its effects on skeletal development and the thyroid gland were studied. Experiments involved exposure of larvae to different NaOCl concentrations, for 24 hours immediately post-hatch or continuous exposure for 21 days. Analyses of external morphology and skeletal development, thyroid tissue histology and the expression of a gene involved in skeletal development (BMP2) were carried out. A single exposure to 1mg/L NaOCl post-hatch and continuous exposure for 21 days post-hatch to 0.01mg/L NaOCl affected external morphology and caused a delay in ossification of the skeleton and a reduction in thyroid activity (thyrocytes hypotrophy). There were no differences found in the expression of BMP2. In conclusion, short exposure (24 hours) to NaOCl, at a concentration which is frequently found in aquatic environments significantly modifies development of *Oreochromis mossambicus* larva. In order to understand the way in which NaOCl brings about its effect, the physiological mechanisms involved and if the early effects observed continue into later phases of growth and maintenance further studies will be required.

Abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico;
- ADNc: ADN complementar;
- ARN: ácido ribonucleico;
- ARNm: ARN mensageiro;
- ARNt: ARN total;
- BMP: proteína morfogenética do osso;
- bp: pares de base;
- NaOCl: Hipoclorito de sódio;
- OSC: osteocalcina;
- PCR: reacção em cadeia de polimerização;
- qRT-PCR: PCR – quantitativo de transcrição reversa;
- RT: temperatura ambiente;
- RT-PCR: transcrição reversa - reacção em cadeia de polimerização;
- T₃: triiodotironina;
- T₄: tiroxina;
- TSH: hormona estimuladora da tiróide.

ÍNDICE

1. Introdução.....	11
1.1. O cloro e as suas aplicações.....	2
1.2. Hipoclorito de sódio.....	4
1.3. Problemas ambientais.....	6
1.4. Função biológica do cloro e outros halogéneos.....	8
1.5. Sistema endócrino.....	10
1.5.1. A glândula tiróide.....	10
1.5.2. O eixo hipotálamo – hipófise – tiróide.....	11
1.5.3. As hormonas da tiróide (TH).....	12
1.6. O desenvolvimento do esqueleto.....	18
1.6.1. O esqueleto.....	18
1.6.2. O esqueleto dos teleósteos.....	20
1.7. A tilápia Moçambicana como organismo modelo.....	21
1.8. As hipóteses que serão testadas.....	23
2. Materiais e Métodos	24
2.1. Experimentação animal.....	26
2.1.1. Material biológico e sistema de cultivo.....	26
2.1.2. Optimização da dosagem de tratamento.....	28
2.1.2.1. Exposição periódica.....	28
2.1.2.2. Exposição contínua.....	30
2.2. Análise morfológica.....	30

2.2.1. Análise da morfologia externa	31
2.2.2. Análise da morfologia interna do esqueleto	32
2.2.3 Análise Histológica.....	34
2.3. Análise Molecular.....	39
2.3.1. Extracção de ARN total.....	40
2.3.2. Síntese de ADN complementar.....	41
2.3.3. Preparação dos <i>primers</i> para clonagem e qRT-PCR.....	43
2.3.4. Transcrição Reversa – Reacção de Polimerização em Cadeia (RT-PCR) para a inserção da sequência de interesse no vector	45
2.3.5. Clonagem dos genes.....	47
2.3.6. Isolamento do ADN pelo método de lise alcalina (preparação das minipreps)	49
2.3.7. RT-PCR em Tempo real (qRT-PCR).....	50
2.3.7.1. Métodos de detecção.....	52
2.3.7.2. Análise da expressão génica.....	54
2.3.7.3. Genes de referência.....	54
2.3.7.4. Reacções de qRT-PCR.....	55
2.3.7.5. Optimizações das reacções de qRT-PCR.	56
2.4. Tratamento estatístico.....	59
3. Resultados.....	60
3.1. Optimização da dosagem de tratamento.....	60
3.1.1 Taxas de sobrevivência (exposição periódica: primeira fase).....	62
3.1.2 Tamanho e peso dos indivíduos expostos a 2mg/L e 1mg/L de NaOCl.....	63

3.1.3 Taxas de sobrevivência (exposição periódica: segunda fase).....	66
3.1.4 Taxas de sobrevivência (exposição contínua: terceira fase).....	67
3.2. Análise morfológica externa.....	68
3.3. Análise morfológica interna do esqueleto.....	73
3.4. Análise Histológica.....	80
3.5. Análise Molecular.....	82
4. Discussão.....	83
4.1. Efeito do NaOCl na sobrevivência	83
4.2. Efeito da exposição ao NaOCl na morfologia externa e no desenvolvimento do esqueleto	84
4.3. Efeito da exposição do NaOCl na tiróide.....	85
4.4. Atraso na ossificação do tecido ósseo, efeito directo ou indirecto?.....	88
4.5. Enquadramento ambiental.....	91
5. Conclusões.....	93
6. Trabalho Futuro.....	94
7. Referências Bibliográficas.....	95
8. Anexos.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A árvore do cloro.....	1
Figura 2: Comportamento do ácido hipocloroso e ião hipoclorito.....	5
Figura 3: Eixo hipotálamo – hipófise – tiróide.....	12
Figura 4: Transporte do iodeto para os folículos da tiróide.....	13
Figura 5: Síntese das hormonas da tiróide.....	14
Figura 6: Estrutura molecular das hormonas da tiróide.....	15
Figura 7: Receptores nucleares das hormonas da tiróide.....	16
Figura 8: Esqueleto de um peixe ósseo.....	20
Figura 9: Representação gráfica da <i>Oreochromis mossambicus</i>.....	22
Figura 10: Esquema das hipóteses a testar.....	23
Figura 11: Esquema dos passos experimentais.....	25
Figura 12: Esquema do sistema de incubação dos ovos.....	27
Figura 13: Esquema dos passos experimentais realizados para a análise da morfologia externa.....	31
Figura 14: Medição dos parâmetros morfométricos.....	32

Figura 15: Esquema dos passos experimentais realizados para a análise da morfologia interna.....	32
Figura 16: Esquema dos passos experimentais realizados para a análise histológica.....	34
Figura 17: Esquema do folículo da tiróide.....	37
Figura 18: Esquema dos passos experimentais realizados para a análise molecular.....	39
Figura 19: Fluorescência no qPCR.....	51
Figura 20: Curva do qPCR.....	52
Figura 21: SYBR Green dye.....	53
Figura 22: Taxas de sobrevivência (exposição periódica: primeira fase).....	63
Figura 23: Comprimento e peso das larvas expostas a 2mg/L e 1mg/L NaOCl.....	65
Figura 24: Taxas de sobrevivência (exposicao periódica: segunda fase).....	67
Figura 25: Curvas de crescimento.....	70
Figura 26: Relações morfométricas.....	71
Figura 27: Larvas com possível contaminação por sulfato de cobre.....	73
Figura 28: Dupla coloração <i>whole mount</i> da cartilagem – osso (grupo controle 1mg/L NaOCl).....	74
Figura 29: Dupla coloração <i>whole mount</i> da cartilagem – osso (grupo tratado 1mg/L NaOCl).....	75
Figura 30: Dupla coloração <i>whole mount</i> da cartilagem – osso (grupo controle 0,01mg/L NaOCl).....	76

Figura 31: Dupla coloração <i>whole mount</i> da cartilagem – osso (grupo tratado 0,01mg/L NaOCl).....	76
Figura 32: Valores acumulativos das estruturas ossificadas.....	78
Figura 33: Valores acumulativos das estruturas ossificadas por região do corpo.....	79
Figura 34: Cortes histológicos do tecido da tiróide.....	81
Figura 35: Medição da actividade da tiróide.....	81
Figura 36: Quantificação da expressão do gene da BMP2.....	82

1. INTRODUÇÃO

Preambulo

O cloro é um elemento que tem sido largamente utilizado na indústria e uma das formas mais utilizadas é sob a forma de hipoclorito de sódio na desinfecção de águas e efluentes. É um composto muito reactivo e com tempo de meia – vida muito curto, no entanto devido à sua constante utilização e falta de legislação pode ser constantemente encontrado no meio ambiente em descargas para o meio aquático. Existem evidências que compostos clorados como PCBs e percloratos causam disrupção endócrina em peixes, no entanto para o cloro sob a forma de hipoclorito de sódio existem apenas alguns estudos que indicam que este composto causa hipotiroidismo em mamíferos, não existindo estudos conhecidos em peixes. Por falta de informação, este composto não é considerado um disruptor endócrino. Por outro lado, existem evidências que mamíferos e peixes expostos a águas tratadas com cloro apresentaram um atraso na ossificação do esqueleto. No entanto pouco se sabe sobre este assunto, nomeadamente sobre quais os mecanismos que podem intervir neste processo.

Neste trabalho fez-se uma abordagem geral sobre o cloro e sua utilização pelo Homem, em particular sobre o hipoclorito de sódio e os problemas ambientais que têm sido associados ao uso deste composto. Por outro lado, fez-se uma abordagem sobre os halogenados com função biológica no organismo, nomeadamente o ião cloreto e o ião iodeto. Seguindo-se uma breve descrição sobre a glândula tiróide que é parte integrante do sistema endócrino e utiliza um halogenado, o iodo sob a forma de ião iodeto e como este órgão pode ser afectado pela exposição ao cloro. Posteriormente é abordada a importância da tiróide no desenvolvimento dos animais, em particular no

desenvolvimento do esqueleto. Por outro lado, é feita uma abordagem acerca da forma como o cloro poderá afectar o funcionamento da tiróide e como isso pode ter consequências no desenvolvimento do esqueleto. São também focados os problemas no desenvolvimento do tecido ósseo que têm sido associados à exposição ao cloro e apresentada uma breve descrição sobre a formação do esqueleto. Por último, são apresentadas as hipóteses colocadas neste estudo.

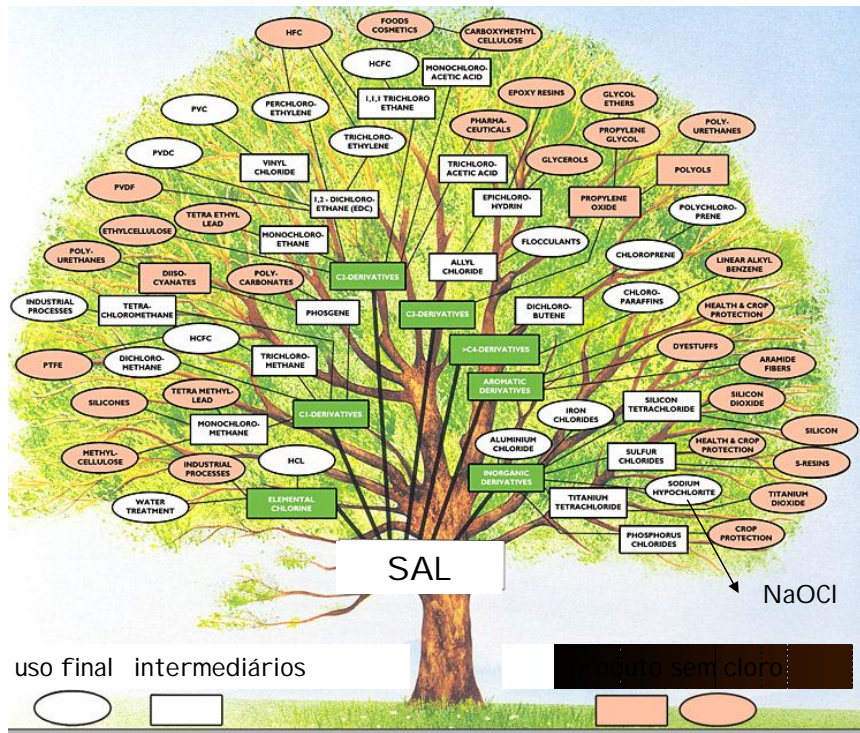
1.1 O cloro e as suas aplicações

O cloro é um elemento químico que pertence à família dos halogenados, do grupo 17 da tabela periódica. De entre os quais encontram-se o flúor, o brómio, o iodo e o astato (Chang, 1994). A sua fórmula química é Cl_2 e à temperatura ambiente encontra-se no estado gasoso, sob a forma de um gás verde. O cloro é duas vezes e meia mais denso que o ar e tem um odor sufocante e desagradável, além de ser extremamente tóxico. Na sua forma líquida e sólida é um poderoso agente oxidante, branqueador e desinfectante.

Este elemento existe na Natureza, normalmente combinado com o sódio sal comum (NaCl), no entanto é largamente utilizado pelo Homem (Figura 1). Desde o princípio do século XX, o cloro é dos químicos mais produzidos industrialmente (Kleijn & Voet, 1998; Jenkins, 2000). De 70.000 produtos frequentemente utilizados no quotidiano, cerca de 10% contêm cloro (Kleijn & Voet, 1998). Por outro lado, um terço dos produtos finais não contêm cloro, no entanto contêm materiais cuja produção envolve o uso de cloro ou de produtos derivados do cloro (Kleijn & Voet, 1998). Das suas vastas aplicações destacam-se os sistemas de tratamentos de água potável, águas residuais e águas de

piscinas públicas ou privadas, as indústrias de produção de papel e papel reciclado, anti sépticos, insecticidas, tintas, produtos derivados de petróleo, plásticos, medicamentos, têxteis e solventes (www.mindfully.org). Outras áreas de aplicação são os sistemas de aquacultura, na prevenção ou tratamento de contaminações, na química orgânica como agente oxidante e na produção de clorados, clorofórmio e tetracloreto de carbono (www.mindfully.org).

A ÁRVORE DO CLORO



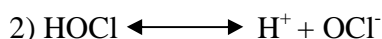
O cloro tem diversas aplicações. Cerca de 1/3 dos produtos finais não têm cloro, embora tenham sido feitos com cloro.

Figura 1: O cloro e os diversos produtos derivados do cloro. Adaptado de www.allergreen.com.

1.2 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um dos produtos derivados do cloro mais utilizados (Bogra *et al*, 2003; Barnes *et al*, 2008). As suas aplicações são vastas: branqueamento de celulose e têxteis; tinturaria; produtos de limpeza; lavagem de frutas e legumes; produção de diversos químicos (oxidantes, branqueadores e desinfectantes); tratamento de águas, nomeadamente em desinfecção, esterilização, acção algicida e desodorização de águas industriais, água potável e piscinas.

Quando o hipoclorito de sódio é adicionado à água forma hidróxido de sódio, ácido hipocloroso (HOCl) e o ião hipoclorito (OCl⁻) de acordo com as reacções seguintes:



O ácido hipocloroso e o ião hipoclorito são ambas formas de cloro livre, também denominado de cloro disponível ou cloro activo (Phillips e Spotts, 1995). No entanto, o ácido hipocloroso é mais eficaz como desinfectante (Phillips e Spotts, 1995). Em solução, este pode dissociar-se para formar o ião hipoclorito, a proporção de cada um depende da temperatura e do pH do meio. Quanto maior a temperatura maior a percentagem de ácido hipocloroso. A pHs baixos é mais elevada a percentagem de ácido hipocloroso, enquanto que a pHs elevados é maior a percentagem do ião hipoclorito (Phillips e Spotts, 1995), como se pode verificar na figura 2.

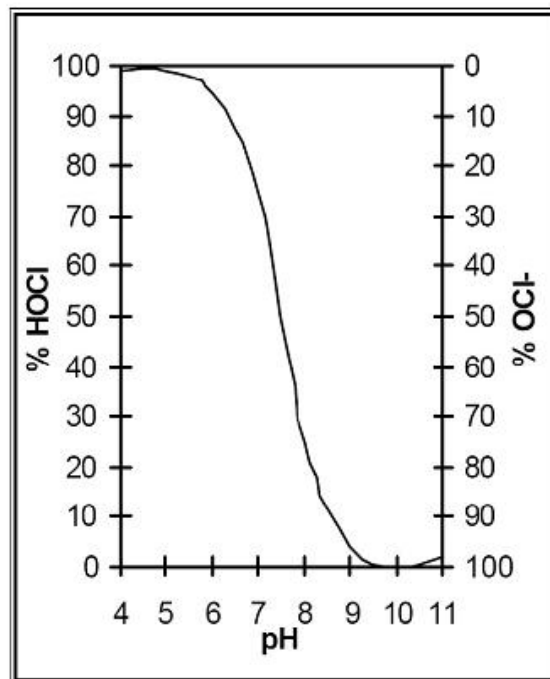
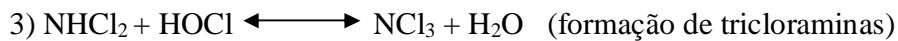
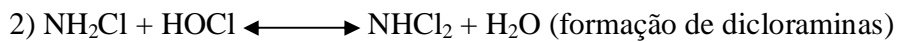
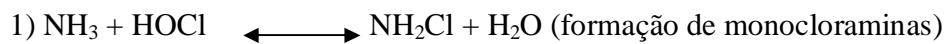


Figura 2: Comportamento do ácido hipocloroso (HOCl) e do íon hipoclorito (OCl⁻) em função das variações do pH de uma amostra (www.policontrol.com.br).

A amónia (NH₃) é um composto que pode ser muito comum nos sistemas de fornecimento de água, em piscinas e tanques de aquacultura. A presença deste composto na água é um problema no processo de cloração, uma vez que o cloro tem grande afinidade com a amónia (Phillips e Spotts, 1995). Quando a amónia está presente na água, reage com o cloro livre para formar vários derivados do cloro, denominados de cloro combinado. Os produtos de reacção que se formam são as monocloraminas (NH₂Cl), as dicloraminas (NHCl₂) e as tricloraminas (NCl₃), cujas composições dependem também do pH, da temperatura e da razão concentração de cloro/ amónia (Phillips e Spotts, 1995; Bauman, 1999). A sua formação ocorre de acordo com as seguintes reacções (Phillips e Spotts, 1995; Bauman, 1999):



Quando o pH é superior ou próximo de 7 normalmente formam-se as monocloramias, a um pH de cerca de 4 formam-se as tricloraminas se existir uma razão elevada cloro/amónia, enquanto que as dicloraminas formam-se a uma escala de pH entre os 4,5 e os 6, com razões moderadas de cloro/amónia (Bauman, 1999).

1.3 Problemas ambientais

Actualmente os problemas ambientais associados ao cloro e seus derivados são inúmeros: depleção do ozono, aquecimento global, toxicidade para o Homem e para os ecossistemas, acidificação, formação de gases poluentes, maus odores e produção de desperdícios sólidos (Berends e Stoppelenburg, 1990; Thornton, 1991; International Joint Commission, 1992 e 1993; Johnston e McCrea, 1992; Kleijn e Voet, 1998).

Durante quase todo o século XX não existia legislação que limitasse o uso do cloro nos seus vários sectores. Águas cloradas resultantes de sistemas de tratamentos de águas e indústrias de produção de papel foram despejadas deliberadamente em correntes de águas, lagos, rios e oceanos comprometendo todos os ecossistemas envolventes, bem como as espécies que neles habitavam (Jenkins, 2000). Apenas por volta dos anos oitenta

começou a existir legislação sobre este assunto, nos Estados Unidos da América e na Europa.

O cloro e seus derivados têm demonstrado ser muito tóxicos em ambientes aquáticos e marinhos. Estes poluentes foram a causa de morte de muitas populações de várias espécies de peixes, lontras e tartarugas. Estes animais apresentaram problemas reprodutores, desenvolvimento anormal dos embriões e problemas na eclosão dos mesmos (Jenkins, 2000). Existem evidências que demonstram que peixes e mamíferos expostos ao cloro apresentaram problemas no desenvolvimento do tecido esquelético, nomeadamente um atraso na ossificação do esqueleto (Abdel-Rahman *et al*, 1982; Weis, 1989). Por outro lado, a exposição ao NaOCl causou hipotireoidismo em mamíferos (Bercz *et al*, 1981; Revis *et al*, 1985; Revis *et al*, 1986). Indicando que o cloro poderá ser um potencial disruptor endócrino.

Em 1976, a EPA (US Environmental Protection Agency) reportou que o uso do cloro poderia estar a causar a formação de produtos que provocam o cancro, tais como o clorofórmio. Alguns dos efeitos conhecidos pelos poluentes derivados de cloro no Homem incluem problemas de memória, taxas de crescimento reduzido (crescimento anormal) e cancro (Jenkins, 2000).

Em países desenvolvidos as principais fontes de exposição directa ao cloro (hipocloritos) nos seres humanos passam pelo consumo de água potável e a utilização de piscinas. Segundo as regras da Comunidade Europeia não existe um valor limite para o cloro nas águas de consumo Humano, sobre este assunto apenas é referido que as concentrações utilizadas devem ser as menores possíveis e que não prejudiquem as populações humanas. Em Portugal foi publicado um decreto de lei (Decreto - Lei nº 306/2007 de 27

de Agosto) que entrou em vigor no início do ano de 2008 que refere apenas um valor mínimo recomendado de 0,2mg/L e um valor máximo recomendado de 0,6mg/L de cloro residual para as águas de consumo humano, no entanto são apenas valores recomendados, não são obrigatórios por lei. Em piscinas públicas, por lei o valor mínimo é de 0,5mg/L e o valor máximo é de 2mg/L de cloro residual (Decreto-Lei nº 121/02 de 3 de Maio). A nível global a concentração mais recomendada é de 1mg/L (www.healthyswimming.org; www.lenntech.com; www.health.alberta.ca/documents/Standards-Pools).

1.4 Função biológica do cloro e outros halogéneos

Parte dos elementos do grupo dos halogéneos são necessários em mecanismos fisiológicos. No que respeita ao cloro, sob a forma de ião cloreto (Cl⁻), é absorvido pelo tracto gastrointestinal, pele, barbatanas e brânquias dos peixes (Tacon, 1987; Bucking e Wood, 2006). Este ião ocorre naturalmente nos fluidos do corpo em quantidades significativas, nos tecidos moles e também no suco gástrico. Está envolvido em processos de osmorregulação, tendo como função vital controlar as pressões osmóticas e o equilíbrio ácido-base, apresentando também um papel importante no metabolismo da água (Tacon, 1987). É o principal ião monovalente dos fluidos extracelulares, os iões cloro constituem cerca de 65% do total dos aniões no plasma do sangue e de outros fluidos extracelulares. Este anião também tem uma função específica no transporte de oxigénio e dióxido de carbono no sangue (Tacon, 1987). Quando o dióxido de carbono entra por difusão nos eritrócitos, reage com a água e forma ácido carbónico (H₂CO₃), este dissocia-se para formar iões hidrogénio e iões hidrogenocarbonatos (HCO₃⁻). No interior

dos eritrócitos, os iões HCO_3^- difundem-se do citoplasma para o plasma, este processo é contrabalançado com a entrada por difusão de iões cloro na direcção oposta, mantendo a electroneutralidade (Eckert, 1998). Este processo é denominado de “chlorine shift”.

O flúor na forma de ião (F^-) é essencial para a mineralização da matriz óssea e para a formação do esmalte dentário. No entanto, não está presente nos fluidos corporais em quantidades significativas, e acima de determinadas concentrações é tóxico (Bercz *et al*, 1986). Por outro lado, o ião brometo (Br^-) é tóxico em elevadas concentrações. Normalmente não está presente nos fluidos corporais, apenas nos eosinófilos existe uma enzima que usa preferencialmente este ião para a produção de compostos antiparasitários, no entanto esta função pode ser substituída pelo ião cloreto (Mayeno *et al*, 1989). Não tendo por isso uma função essencial à vida. Enquanto que o ião astatite (At^-) é raro e instável e não tem qualquer função biológica conhecida (Bercz *et al*, 1986).

Finalmente, o ião iodeto (I^-) está presente em quantidades significativas nos fluidos do corpo. O iodeto é essencial para a síntese das hormonas da tiróide. Está concentrado na glândula tiróide, nas glândulas salivares e nas células parietais (Bercz *et al*, 1986).

Assim sendo, do grupo dos elementos halogéneos, o ião cloreto e o ião iodeto são os dois elementos presentes no organismo em quantidades significativas, com funções biológicas importantes.

Apesar da função biológica importante do ião cloreto no organismo, o cloro na forma de ácido hipocloroso e ião hipoclorito é muito reactivo, tendo capacidade de reagir com proteínas e nucleótidos de forma a produzir uma elevada variedade de compostos orgânicos clorados (EPA, 1999; Winder, 2001). Tem também capacidade de oxidar o ião iodeto (Bercz *et al*, 1986; Revis *et al*, 1986), o que poderá afectar o normal

funcionamento da glândula tiróide, que necessita deste ião para a síntese das hormonas da tiróide

Neste estudo pretende saber-se se a exposição ao cloro na forma de hipoclorito de sódio afecta o funcionamento do eixo hipotálamo – hipófise – tiróide, em particular da glândula tiróide, na espécie estudada (*Oreochromis mossambicus*) durante o desenvolvimento larvar.

1.5 Sistema endócrino

1.5.1 A glândula tiróide

Em humanos e mamíferos, a glândula tiróide é composta por dois tipos de células com actividade endócrina, os tirócitos (que segregam as hormonas da tiróide) e as células C (que segregam a calcitonina). Nos peixes, a glândula tiróide não está encapsulada como nos mamíferos e humanos, nestes animais os folículos da tiróide encontram-se dispersos no tecido conjuntivo da zona da faringe (Raine e Leatherland, 2000; Wendl *et al*, 2002) e as células C encontram-se nas glândulas ultimobranquiais em distintas partes do corpo (Le Dourain *et al*, 1974; Burkhard *et al*, 2006). Por outro lado, na maioria dos teleósteos os folículos encontram-se concentrados na zona da subfaringe, existem no entanto folículos da tiróide em outras regiões, como por exemplo na zona do coração e do rim, a estes folículos denomina-se de folículos da tiróide ectópicos (Sathyanesan, 1963; Qureshi *et al*, 1978; Agrawala e Dixit, 1979). Em algumas espécies os folículos ectópicos estão activos em conjunto com os folículos da tiróide (Frisén e Frisén, 1967; Bhattacharya *et al*, 1976). Um estudo conduzido por Geven *et al* (2007), demonstrou que a actividade dos

folículos da tiróide na tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), encontra-se concentrada na zona da subfaringe.

A tiróide é uma glândula de secreção endócrina, ou seja, uma glândula que produz hormonas que vão ser libertadas para a corrente sanguínea, denominadas de hormonas da tiróide. As hormonas da tiróide, tiroxina (T_4 , Figura 6) e triiodotironina (T_3 , Figura 6), são pequenas moléculas hidrofóbicas e são produzidas pela glândula tiróide por todos os vertebrados (Power *et al*, 2001; Helbing *et al*, 2006). Nos vertebrados, as hormonas da tiróide desempenham um papel crucial na regulação do desenvolvimento, diferenciação e metabolismo e a maior parte dos vertebrados são incapazes de crescer e atingir a sua forma adulta sem estas hormonas (Turner e Bagnara, 1976; Porterfield e Henderson 1993).

1.5.2 O eixo hipotálamo – hipófise – tiróide

A actividade da glândula tiróide é controlada por duas hormonas produzidas por dois órgãos localizados no cérebro, a hipófise (ou glândula pituitária) que produz a tireotropina (TSH) que é a hormona de estimulação da tiróide, e o hipotálamo que produz a TRH (hormona de libertação da tireotropina) (Figura 3). Estes dois órgãos são sensíveis aos níveis de hormonas da tiróide em circulação, se os níveis de T_3 e T_4 forem baixos o hipotálamo liberta TRH que estimula a libertação de TSH pela hipófise. Por sua vez, a TSH estimula a produção de hormonas pela glândula tiróide de forma a repor os níveis normais para o organismo. A situação inversa, níveis de hormonas da tiróide em circulação acima dos valores normais, o hipotálamo e a hipófise reduzem a libertação de TRH e TSH respectivamente, para que haja uma menor produção de T_3 e T_4 . As três

glândulas e as hormonas por elas segregadas constituem o eixo hipotálamo – hipófise – tiróide. Quando um organismo produz hormonas da tiróide acima dos valores normais para a sua espécie, diz-se que sofre de hipertiroidismo, o contrário denomina-se de hipotiroidismo.

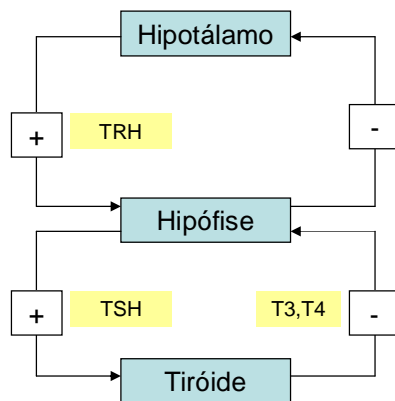


Figura 3: Esquema representativo do eixo hipotálamo – hipófise – tiróide.

1.5.3 As hormonas da tiróide (TH)

Na síntese das TH, os folículos da tiróide sempre rodeados de vasos capilares captam o iodeto presente na corrente sanguínea. O transporte do iodeto para o interior é o primeiro passo na síntese destas hormonas (Rousset e Dunn, 2004). O transporte é efectuado através de um transporte activo onde intervém uma proteína transportadora do tipo simporte Na^+/I^- (NIS, sodium-iodide symporter), localizada na porção basal da membrana celular (Figura 4).

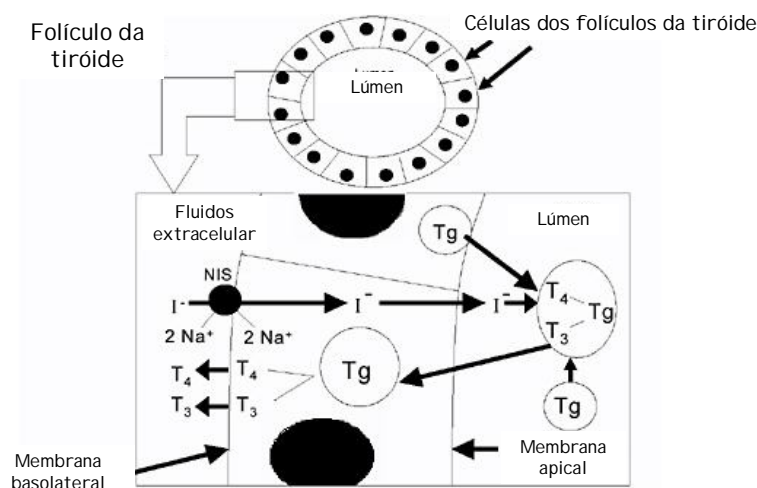


Figura 4: A imagem representa o transporte do iodeto para o interior das células dos folículos da tiróide (Adaptado de www.nap.edu)

Posteriormente no lúmen dos folículos, o iodeto é combinado com um aminoácido a tirosina. A T_4 é produzida pela ligação de átomos de iodeto às estruturas de anel das moléculas de tirosina, contendo quatro átomos de iodeto. A T_3 é idêntica à T_4 , mas contém menos um átomo de iodeto por molécula. Através de uma reacção com a enzima peroxidase da tiróide (TPO), o iodeto liga-se, por ligação covalente com os resíduos da tirosina nas moléculas da tireoglobulina (Tg), formando monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A ligação de duas moléculas de DIT produz a T_4 , enquanto que a combinação de uma MIT com uma molécula de DIT produz a T_3 . A T_4 é a hormona predominante e é considerada como precursora da T_3 , que é a forma biologicamente activa das hormonas da tiróide (Hadley, 1992) (Figura 6). A T_4 é convertida em T_3 pela acção das enzimas iodotironinas desiodinases (ID), que removem uma unidade de iodeto do anel fenol que contém o grupo hidróxido (“outer ring”, ORD) da T_4 (Figura 6).

Após o processo de iodinação, as iodotirosinas permanecem ligadas à Tg e para se libertarem é necessário ocorrer previamente uma reabsorção de colóide pela célula através de um mecanismo de endocitose (Dunn e Dunn, 2004). Sob a influência da TSH, pequenas gotículas de colóide consistindo em TH e Tg são absorvidas do lúmen para dentro das células foliculares (tirócitos). Após a entrada, estas gotículas fundem-se com os lisossomas formando fagolisossomas. As proteases quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos iodizados e a Tg, formando-se assim T₄, T₃, MIT e DIT, posteriormente as TH são libertadas para a corrente sanguínea (Nussey e Whitehed, 2001; Rousset e Dunn, 2004). Estes passos estão representados na figura 5.

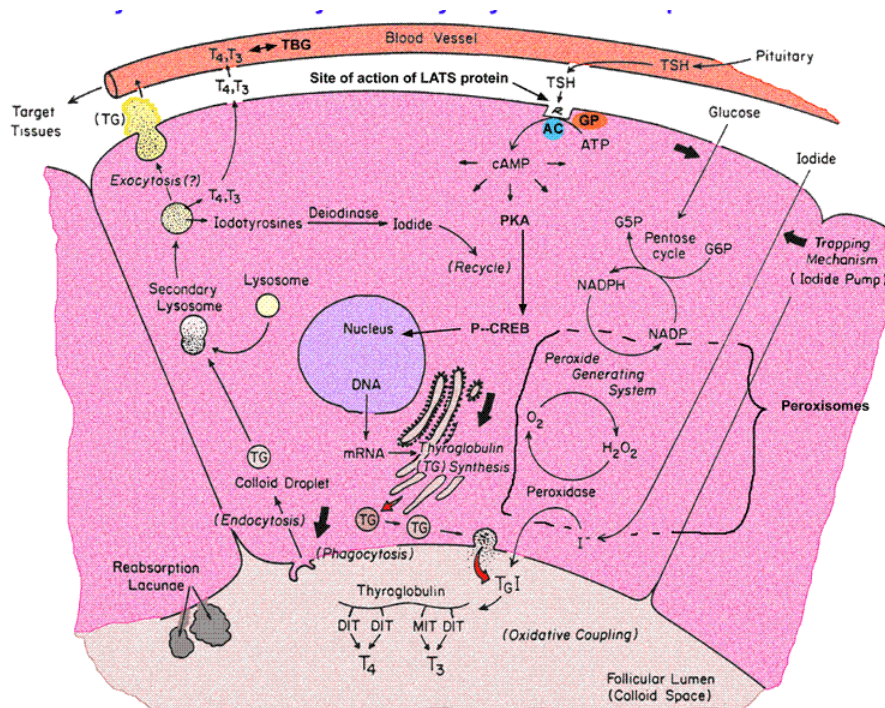


Figura 5: A imagem representa os passos envolvidos na síntese das hormonas da tiróide, nos folículos da tiróide (fonte: Hadley, 1992).

As ID também funcionam como enzimas de inativação das hormonas da tiróide, sempre que os valores das mesmas tiverem que ser controlados, embora a descarboxilação

também possa desempenhar um papel neste processo. Desta forma, a desiodinização controla os níveis destas hormonas, bem como a sua actividade biológica (Power *et al*, 2001). A ORD produz a forma mais activa das hormonas da tiróide, a T₃, enquanto que a remoção de uma unidade de iodeto do anel ligado ao grupo L-alanina (“inner ring deiodination, IRD) produz a T₃ reversa (rT₃), por sua vez, a IRD da T₃ produz a diiodotironina (T₂) (Figura 6). Ambos rT₃ e T₂ são metabolitos das hormonas da tiróide que são considerados biologicamente inactivos. A inactivação das hormonas ocorre principalmente no fígado, rim, cérebro e músculo (Power *et al*, 2001).

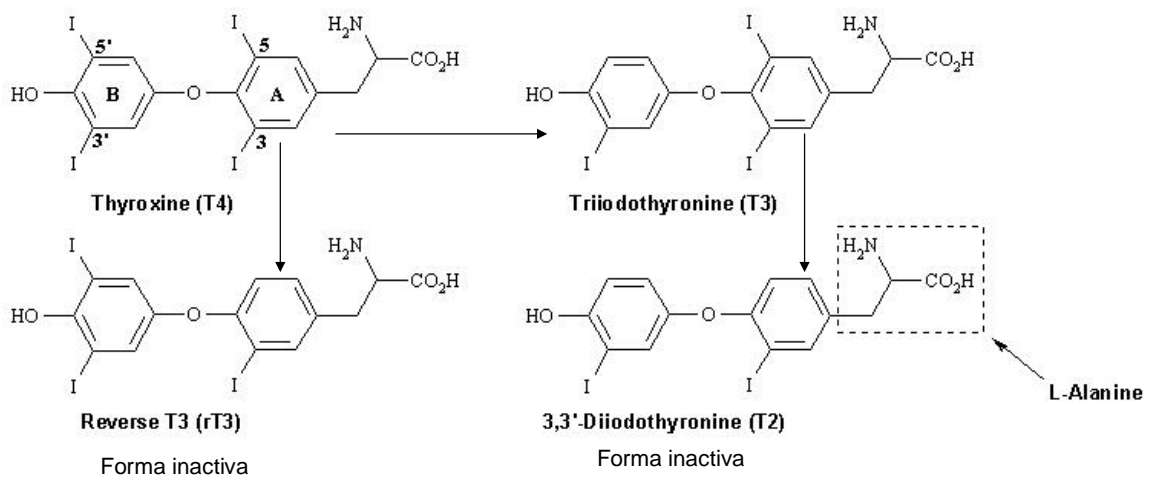


Figura 6: Estruturas moleculares da T₄, T₃, rT₃ e T₂ (adaptado de es.epa.gov).

O eixo hipotálamo – hipófise – tiróide parece ser semelhante em todos os vertebrados, incluindo a TSH, T₄ e T₃, proteínas de ligação às hormonas da tiróide, deiodinases e receptores nucleares (Power *et al*, 2001). Nos vertebrados, as hormonas da tiróide circulam no plasma ligadas às proteínas de ligação, que incluem a albumina, a transtirretina (TTR) e a globulina de ligação à tiroxina (TGB) (Power *et al*, 2001). As

hormonas da tiróide são lipofílicas e por isso atravessam as membranas das células facilmente (Abe *et al*, 2002).

A acção das hormonas da tiróide é mediada pela sua ligação aos receptores nucleares que actuam directamente em genes alvo, ligando-se a sequências de ADN específicas de forma a aumentar ou diminuir a expressão do gene, trazendo a resposta celular às hormonas da tiróide (Yen e Chin, 1994). A afinidade da ligação da hormona com o receptor depende da estrutura da hormona. A T₃ apresenta uma estrutura molecular que se adapta melhor aos receptores nucleares, é por isso biologicamente mais activa (Figura 7).

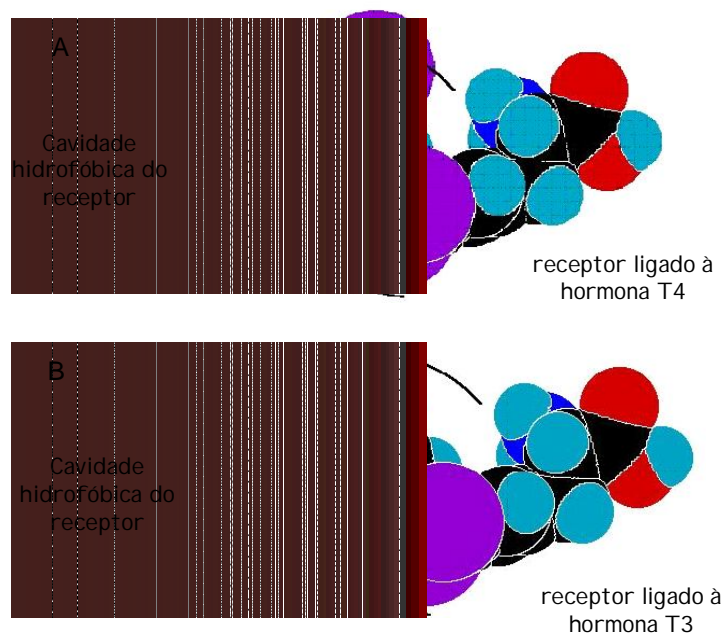


Figura 7: Esquema representativo das TH ligadas ao receptor nuclear. (Adaptado de Harold, 2001).

A figura 7A representa a T₄ ligada ao seu receptor nuclear. É de notar que o grupo 3'-iodo está ligado à larga cavidade hidrofóbica (representada pela linha preta à volta da estrutura). Note-se também que não existe uma cavidade hidrofóbica semelhante para o

grupo 5'-iodo, o que vai diminuir a ligação da T₄ ao receptor. A figura 7B representa a T₃ ligada ao receptor nuclear da tiróide. Tal como a T₄, o grupo 3'-Iodo liga-se à grande cavidade hidrofóbica. No entanto, ao contrário da T₄, a ausência do grupo 5'-Iodo permite que a T₃ adapte-se perfeitamente no receptor. A hormona T₃ é por isso biologicamente mais activa que a T₄.

Nos peixes, as hormonas da tiróide (TH) são essenciais durante a fase do desenvolvimento larvar e metamorfose (Power *et al*, 2001). Em algumas espécies de peixes existe um aumento das hormonas da tiróide e dos receptores nucleares, durante o processo da metamorfose e uma ligeira diminuição destes valores após esta fase (Yamano e Miwa, 1998). Contudo, estas hormonas são igualmente importantes nos estágios iniciais do desenvolvimento e no crescimento dos peixes nas fases juvenil e adulta (Leatherland 1994; Power *et al*, 2001). No peixe zebra, a diferenciação do primeiro folículo da tiróide ocorre entre as 55h e as 60h após a fertilização e o tecido está completamente diferenciado às 100h após a fertilização (Wendl *et al*, 2002; Elsalini *et al*, 2003; Burkhard *et al*, 2006). As hormonas da tiróide apresentam também um papel fundamental no desenvolvimento do tecido ósseo quer de origem dermal, quer de origem endocondral (Marians *et al*, 2003; O'Shea *et al*, 2005; Bassett *et al*, 2007; Bassett *et al*, 2008), outros estudos têm demonstrado a importância da TSH neste processo (Abe *et al*, 2003; Bassett *et al*, 2008).

1.6 O desenvolvimento do esqueleto

Existem estudos que demonstraram que a exposição ao ácido hipocloroso afecta o desenvolvimento larvar em peixes, nomeadamente provoca anomalias no esqueleto desses animais (Weis e Greenberg, 1989) e que este composto também provoca uma ossificação incompleta do esqueleto em fetos de ratos (Abdel-Rahman *et al*, 1982).

Neste estudo pretende-se saber se a exposição ao cloro na forma de hipoclorito de sódio em larvas de *Oreochromis mossambicus* após eclodidas, poderá afectar o seu subsequente desenvolvimento. A estrutura que vai ser observada para este efeito é o esqueleto.

1.6.1 O esqueleto

O esqueleto é constituído por osso e cartilagem, sendo a estrutura de suporte para o crescimento nos vertebrados.

A cartilagem tem a sua origem no mesênquima e é constituída por uma matriz extracelular e pelos condrócitos. Os condrócitos segregam os componentes da matriz extracelular, composta por fibras de colagénio tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas. A matriz da cartilagem contém um elevado teor de água, quer ligado aos proteoglicanos, quer livre, o que confere ao tecido cartilágneo a sua flexibilidade (Alberts *et al*, 1994).

O osso é um tecido conjuntivo constituído pela matriz óssea, material extracelular calcificado e três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Cada osso é revestido por um tecido conjuntivo externo, o perióstio.

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos e pela deposição dos componentes inorgânicos da matriz óssea. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica, que confere a flexibilidade ao osso, e uma parte inorgânica, que

confere a rigidez e resistência ao osso. A parte orgânica é constituída por fibras de colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. A parte inorgânica é constituída principalmente por cálcio e fósforo. Os osteócitos derivam dos osteoblastos e estão envolvidos na manutenção da matriz óssea. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo (Junqueira *et al*, 1995).

O desenvolvimento do tecido ósseo pode ter duas origens: endocondral (origem cartilágnea) e dermal. O osso de origem endocondral forma-se após a estrutura esquelética em desenvolvimento atingir a sua forma e posição final como cartilagem. A este processo denomina-se de ossificação endocondral. O osso de origem dermal deriva directamente das células do mesênquima, processo denominado de ossificação dermal.

O processo de ossificação dermal inicia-se quando células do mesênquima diferenciam-se em osteoblastos, forma-se a matriz óssea e segue-se a calcificação. Alguns destes osteoblastos ficam encapsulados na matriz e diferenciam-se em osteócitos, que mantêm a matriz extracelular mineralizada (Junqueira *et al*, 1995). A ossificação endocondral começa com a hipertrofia e destruição dos condrócitos, deixando espaços vazios na matriz cartilágnea, estes espaços são depois preenchidos pelos osteoblastos, os processos que seguem são idênticos aos descritos para a ossificação dermal (Junqueira *et al*, 1995).

Em ambos os tecidos ósseos, os osteoclastos desempenham uma função de contínua remodelação do osso, reabsorvendo-o e permitindo a formação de novos locais de invasão e reconstrução por parte dos osteoblastos (Dorit *et al*, 1991; Alberts *et al*, 1994).

A calcificação da matriz óssea é um processo de deposição de sais de cálcio nas fibras de colagénio. Este processo é induzido pelos proteoglicanos e de glicoproteínas com elevada afinidade para o cálcio. O depósito de sais de cálcio é acelerado pela capacidade dos

osteoblastos em concentrarem estes sais e os libertarem sempre que necessário para o meio extracelular (Junqueira *et al*, 1995).

A ossificação é regulada por um conjunto de genes que estão associados a este processo. Dos mais estudados, salientam-se os que codificam para as proteínas morfogenéticas do osso (BMP2 e BMP4) que estão envolvidas no processo de diferenciação das células do mesênquima nos osteoblastos (Wan e Cao, 2004; Cao e Chen 2005; Leboy 2006). No processo de produção da matriz óssea está envolvida a fosfatase alcalina e na mineralização desta matriz a osteocalcina ambas segregadas pelos osteoblastos (Stein e Lian, 1993; Junqueira *et al*, 1995). Estudos de expressão dos genes que codificam para estas proteínas são potenciais marcadores do processo de ossificação.

1.6.2 O esqueleto dos teleósteos

O esqueleto nos teleósteos pode ser dividido em esqueleto axial, comportando o crânio, a coluna vertebral e o complexo da barbatana caudal e esqueleto apendicular, comportando a barbatana dorsal, anal e as barbatanas pélvicas e peitorais (Figura 8).

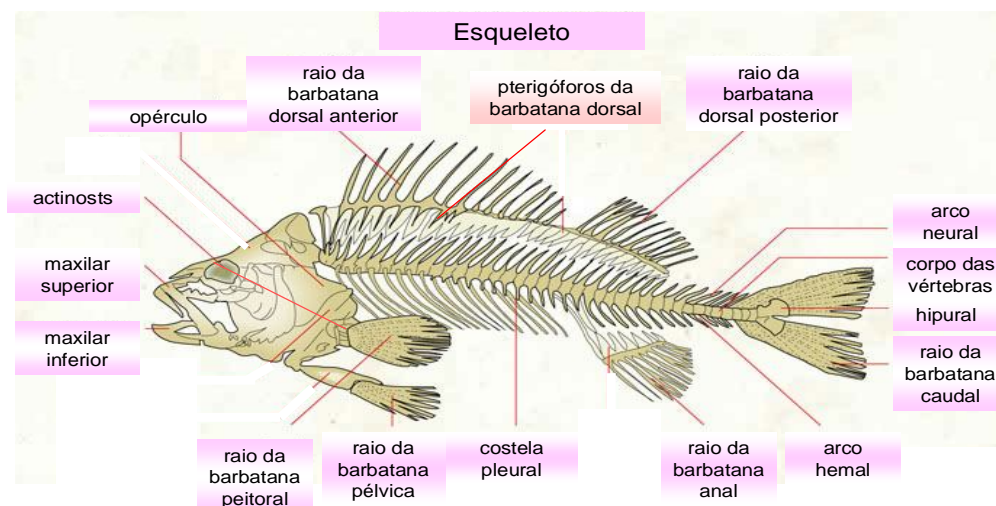


Figura 8: Esqueleto de um peixe ósseo. Fonte: www.infovisual.info

As estruturas constituintes do esqueleto interno nos teleósteos que foram analisadas neste estudo estão descritas na tabela 1, onde está indicada a respectiva origem do tecido ósseo.

Tabela 1: A tabela apresenta as principais estruturas do esqueleto nos teleósteos e a respectiva origem, dermal ou endocondral, dos componentes ósseos.

Estruturas esqueléticas	Componentes ósseos	Origem dermal	Origem endocondral
Coluna Vertebral	Costelas pleurais	-	√
	Corpo das vértebras	√	-
	Arcos neurais e hemais	-	√
Barbatana dorsal	Pterigóforos	-	√
	Raios ósseos	√	-
Barbatana peitoral	Cleitrum	-	√
	Actinosts	-	√
	Raios ósseos	√	-
	Coracóide-Escápula	-	√
Barbatana anal	Pterigóforos	-	√
	Raios ósseos	√	-
Barbatana caudal	Hipurais	-	√
	Epurais	-	√
	Raios ósseos	√	-
	Uróstilo	√	-
Crânio	Neurocrânio	√	-
	ossos opérculares	√	-
Barbatana pélvica	Basipterígeo	-	√
	Raios ósseos	√	-

1.7 A Tilápia Moçambicana como organismo modelo

Os peixes têm sido largamente utilizados como modelos em estudos toxicológicos, uma vez que são animais normalmente fáceis de manter e reproduzir em cativeiro, com ciclos de vida curtos e simples, o que torna possível a obtenção de resultados sólidos e

reprodutíveis em pouco tempo. Por outro lado, possuem mecanismos fisiológicos comuns à maioria dos vertebrados (Burkhard *et al*, 2006).

A tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) foi escolhida como modelo devido à sua facilidade de cultivo, robustez e tamanho das larvas. A tilápia moçambicana é um teleósteo eurialino pertencente à família Cichlidae, membro da ordem Perciforme, geograficamente encontra-se distribuída pelas águas africanas intertropicais. As tilápias são peixes de água quente tendo como temperaturas ótimas de crescimento e reprodução os 27-28°C (Bardach *et al*, 1972). Apresenta dimorfismo sexual e é omnívora. As famílias são constituídas por 3 a 4 fêmeas. Estes animais reproduzem-se continuamente, existindo uma época de reprodução de aproximadamente 15 em 15 dias (Bardach *et al*, 1972). Esta espécie apresenta, um crescimento típico de um teleósteo, constituído pelas fases: larvar, juvenil e adulta. O desenvolvimento do esqueleto na tilápia moçambicana inicia-se por volta dos 2 a 3 dias após a fertilização, ao quinto após fertilização, quase todas as estruturas do esqueleto iniciaram o seu desenvolvimento (Bardach *et al*, 1972).

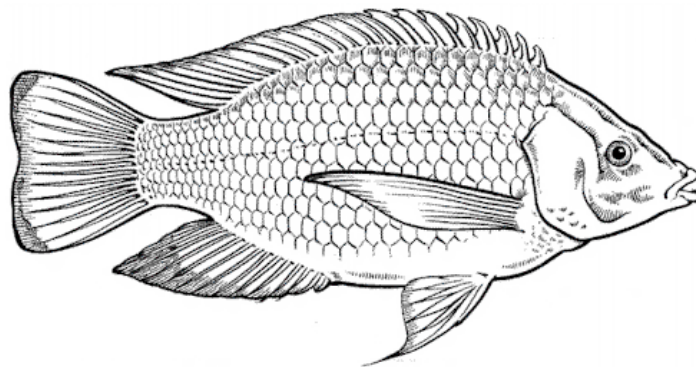


Figura 9: Representação gráfica da espécie *Oreochromis mossambicus* (http://www2.dpi.qld.gov.au/extra/aquaticinvaders/add_noxious_nonindigenous.html).

1.8 As hipóteses a testar

O presente estudo pretende verificar se a exposição precoce ao hipoclorito de sódio (NaOCl) afecta o desenvolvimento da tilápia moçambicana, durante a fase do desenvolvimento larvar. Em particular, pretende-se verificar se a exposição ao NaOCl provoca um efeito tóxico, que afecte o desenvolvimento do tecido ósseo e o funcionamento do eixo hipotálamo – hipófise – tiróide.

As hipóteses que vão ser testadas:

1. A exposição ao NaOCl tem efeito no desenvolvimento larvar, em particular no tecido ósseo;
2. A exposição ao NaOCl tem efeito no funcionamento da tiróide e modificações no desenvolvimento que pode ser de origem endócrina;

As hipóteses colocadas estão representadas esquematicamente na figura 10:

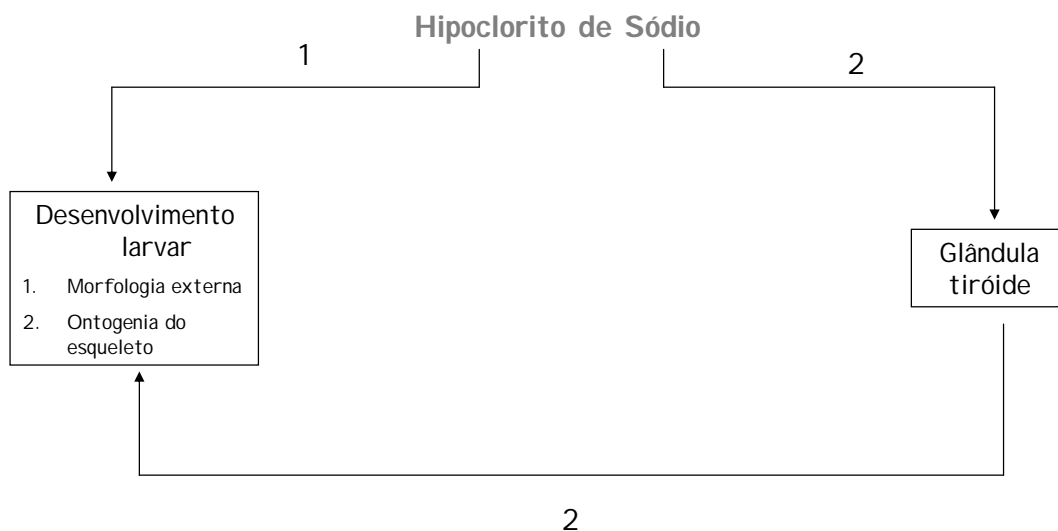


Figura 10: Esquema representativo das hipóteses colocadas por este estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho pretendeu-se estudar o efeito da exposição ao hipoclorito de sódio na ontogenia do esqueleto e no eixo hipotálamo – hipófise – tiróide em larvas de *Oreochromis mossambicus*. Os métodos descritos neste capítulo encontram-se divididos em 3 partes:

- Experimentação animal;
- Análise morfológica;
- Análise molecular.

A experimentação animal subdivide-se em duas partes, a obtenção do material biológico e sistemas de cultivo e a optimização da dosagem de tratamento. A análise morfológica subdivide-se na análise da morfologia externa, análise da morfologia interna e análise histológica da tiróide. A análise molecular incluiu a extracção do ARNt e a respectiva síntese de ADNc; a preparação das curvas padrão que incluiu a amplificação do fragmento de interesse por RT-PCR, a sua inserção num vector e respectiva clonagem, isolamento do ADNp (minipreps); realização do qRT-PCR.

Seguindo-se a descrição do tratamento estatístico efectuado aos resultados obtidos.

Na página seguinte, figura 11, estão representados os passos experimentais efectuados neste capítulo.

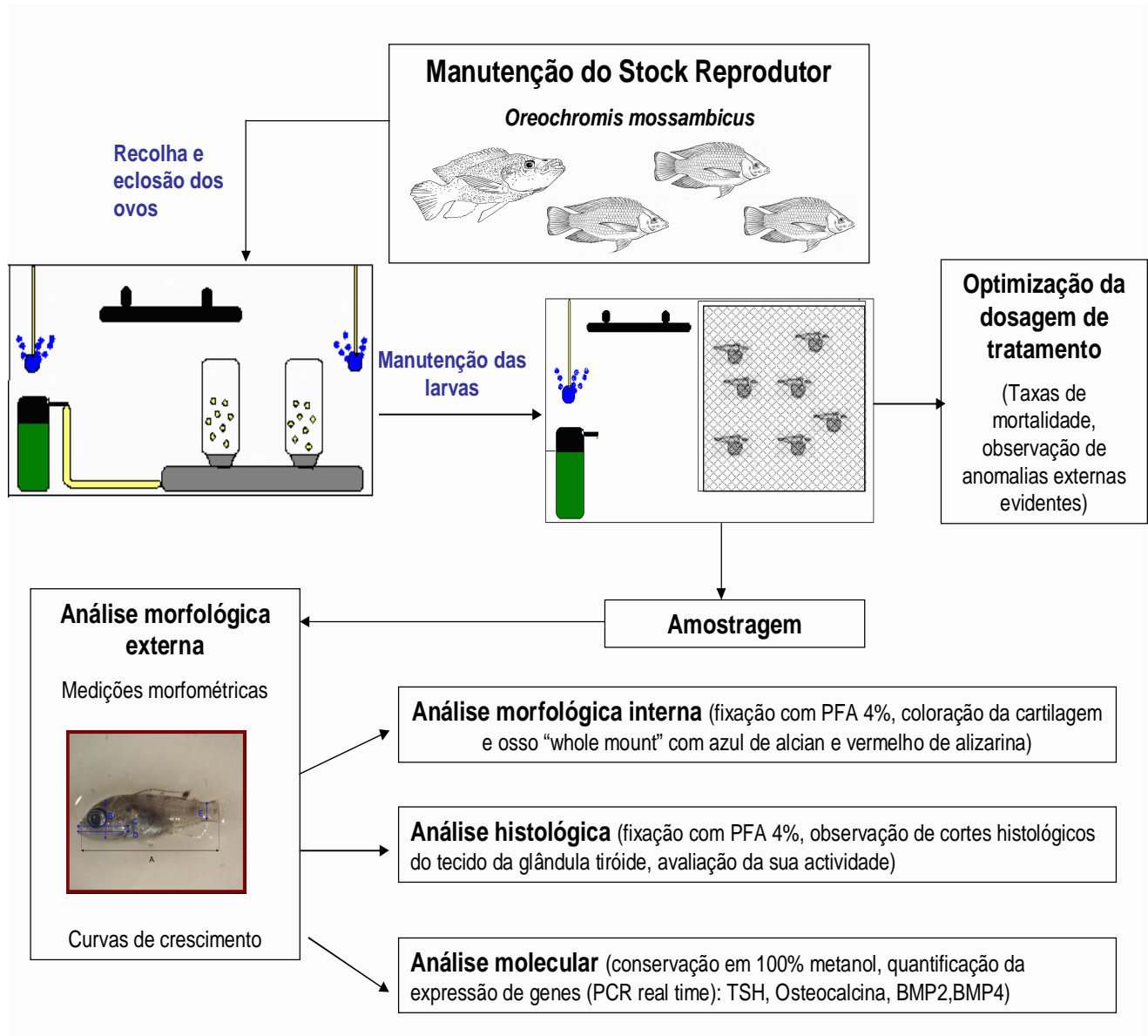


Figura 11: Representação esquemática dos passos experimentais realizados neste estudo.

Legenda: PCR – reacção em cadeia de polimerização; TSH – hormona estimuladora da tiróide;

BMP – proteínas ósseas morfogénicas.

2.1 Experimentação animal

2.1.1 Material biológico e sistema de cultivo

Tilápias moçambicanas adultas foram mantidas no Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos (LEOA) da Universidade do Algarve. Nos tanques das famílias reprodutoras a distribuição dos adultos consistiu num macho e 3 fêmeas por tanque, de água doce (200L), num total de 3 tanques. Foram garantidos todos os cuidados de manutenção de forma a proporcionar uma boa qualidade dos ovos. A água foi sempre mantida a 27°C (temperatura óptima de reprodução desta espécie) e um ciclo luz:escuro alternado de 12:12 horas. Foi efectuada limpeza semanal dos tanques e dos filtros, bem como substituição parcial de água uma vez por semana. Os animais foram alimentados com alimento congelado que continha uma qualidade nutricional superior a outras rações administradas habitualmente. Nestas condições os animais entram em época de acasalamento aproximadamente de 16 em 16 dias.

Os ovos foram retirados da boca das fêmeas logo após a fertilização e analisados à lupa de forma a verificar o número de ovos viáveis e o número de ovos inviáveis. Os ovos inviáveis eram totalmente opacos ou com grânulos de gordura no pólo animal. Os ovos viáveis apresentavam o pólo animal e vegetal bem distintos, no pólo animal continham um conjunto de células em divisão no estágio de mórula. Nos ensaios, foram utilizadas posturas cuja percentagem de viabilidade era superior a 80%. Posteriormente foram colocados em tanques de água doce desclorinizada com 30L a uma temperatura de 27°C. Os ovos foram mantidos até à eclosão sob um fluxo constante de água ascendente que os

mantinha na coluna de água em movimento, com fornecimento de oxigénio, imitando o comportamento da progenitora que os mantém na boca com movimentos constantes dos maxilares durante o período de incubação (Figura 12).

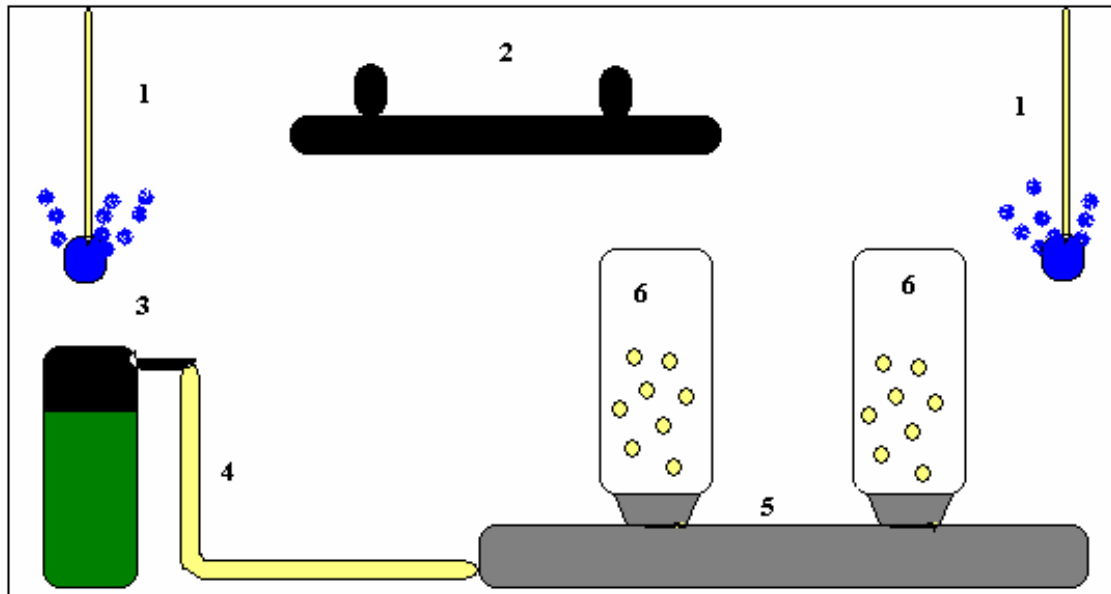


Figura 12: Esquema representativo do sistema de incubação dos ovos de tilápia. Os ovos são incubados à temperatura de 27°C, com fornecimento de oxigénio estável, mantido num fluxo de água constante que proporciona a sua circulação. **1:** Fornecimento de oxigénio; **2:** Termóstato; **3:** Filtro de água (com filtro de esponja nos tanques tratamento e carvão activado nos tanques controlo); **4:** tubo que fornece o fluxo de água; **5:** suporte de plástico para as incubadoras; **6:** incubadoras com ovos de tilápia (garrafas de plástico cortadas na parte de baixo e a rolha cortada de forma a que o fluxo de água possa passar, onde foi colocada uma membrana para que os ovos se mantenham nas incubadoras).

2.1.2 Optimização da dosagem de tratamento

Existe pouca informação sobre a toxicidade ao hipoclorito de sódio (NaOCl) nos organismos aquáticos. Em particular, em relação à toxicidade na espécie *Oreochromis mossambicus*, não há estudos conhecidos. Neste sentido foram realizadas um conjunto de experiências iniciais com o objectivo de determinar que concentração máxima do desinfectante, hipoclorito de sódio, poderia ser administrada sem comprometer a sobrevivência dos indivíduos, (taxa de mortalidade ou taxa de sobrevivência semelhante aos indivíduos do tanque controlo).

Em todos os ensaios, após a eclosão as larvas foram colocadas nos tanques controlo e tratamento, com o mesmo sistema de incubação (Figura 12) até ao terceiro dia após eclosão. Nessa altura as larvas foram retiradas das incubadoras e colocadas em maternidades, pois com 3 dias após eclosão já adquiriram a capacidade de natação. Os volumes de NaOCl nos tanques de tratamento foram administrados na água no momento em que as larvas eram colocadas nos tanques. Não houve substituição da água, a qualidade desta foi assegurada por um filtro biológico. A água foi sempre mantida à temperatura de 27°C, com fornecimento de oxigénio constante. Foram medidos o pH e a percentagem de oxigénio dissolvido na água com um oxímetro.

2.1.2.1 Exposição periódica

Numa primeira fase foram testadas as concentrações de 10 mg/L, 5mg/L, 2mg/L e 1mg/L de NaOCl. As larvas foram mantidas durante 5 dias nos tanques, ao quinto dia

foram anestesiadas com 2 – fenoxietanol (0,1% Sigma, Aldrich) e fixadas com paraformaldeído a 4% durante a noite a 4°C. Posteriormente foram lavadas com PBS 1x, três vezes durante 15min e conservados em 100% metanol a 4°C. Todos os indivíduos foram observados à lupa afim de determinar a existência de possíveis anomalias evidentes (malformações do corpo, pigmentação anormal, conformação do opérculo).

Posteriormente, foi conduzido um segundo ensaio em que novamente larvas recentemente eclodidas foram sujeitas a uma concentração de 1mg/L de NaOCl (administrado apenas uma única vez no início da experiência). A experiência foi composta por um tanque controle e 2 tanques de tratamento. As larvas foram mantidas durante 15 dias nos tanques. Ao quinto dia 6 indivíduos de cada tanque foram fixados com paraformaldeído a 4% (conservados a 4°C) e os outros 9 de cada tanque foram congeladas a -20°C em 100% metanol. Todos os indivíduos antes de serem sacrificados foram anestesiados com 2 – fenoxietanol (0,1% Sigma, Aldrich). O mesmo procedimento foi repetido ao fim dos 15 dias.

Na fase seguinte dos ensaios, larvas após eclosão foram sujeitas a concentrações de 1mg/L; 0,5mg/L; 0,1mg/L e 0,01mg/L de NaOCl (administrado na água uma única vez no início da experiência). Em cada experiência existia um tanque controle e dois de tratamento com as respectivas concentrações. Os indivíduos foram mantidos nos tanques durante 31 dias. Foram sacrificados indivíduos aos 5, 15 e 31 dias. De cada tanque foram fixadas 12 larvas em paraformaldeído a 4% (conservados a 4°C) e outras 15 foram congeladas a -20°C em 100% metanol. Novamente, todos os indivíduos antes de serem sacrificados foram anestesiados com 2 – fenoxietanol (0,1% Sigma, Aldrich).

2.1.2.2 Exposição contínua

Numa seguinte fase de ensaios, larvas após eclosão foram sujeitas a uma concentração de 0,01mg/L de NaOCl (administrado na água todos os dias às 10h da manhã até ao final da experiência). Nesta experiência usou-se um tanque controlo e um tanque de tratamento. Os indivíduos foram mantidos nos tanques durante 21 dias. Aos 7 dias foram sacrificados 10 indivíduos e aos 21 dias 15 indivíduos, fixados com paraformaldeído a 4% (conservados a 4°C). Respectivamente aos 7 e 21 dias, 10 e 15 indivíduos foram congelados a -20°C em 100% metanol. Novamente, todos os indivíduos antes de serem sacrificados foram anestesiados com 2 – fenoxietanol (0,1% Sigma, Aldrich).

2.2 Análise morfológica

A análise morfológica consistiu na caracterização da morfologia externa dos indivíduos através da medição do comprimento padrão e de outros parâmetros morfométricos. Por outro lado, consistiu também na caracterização da morfologia interna ao nível da ontogenia do tecido esquelético. Por último, na análise histológica do tecido da glândula tiróide, através da descrição visual do tecido e da medição de parâmetros que indicam o seu estado de actividade.

2.2.1 Análise da Morfologia externa

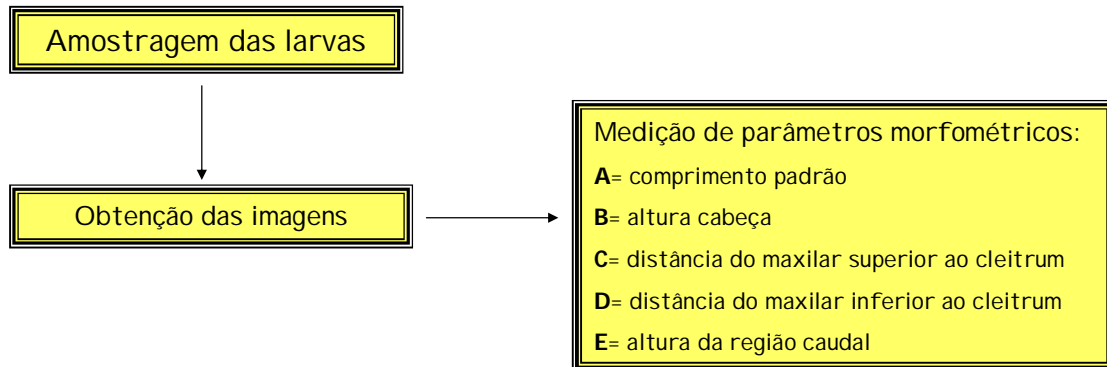


Figura 13: Esquema representativo dos passos experimentais realizados para a análise da morfologia externa.

Após as amostragens em cada tratamento os indivíduos foram fixados e conservados em metanol 100% a 4°C, ou conservados directamente em metanol 100% a -20°C. Com o objectivo de evitar a degradação dos tecidos, o manuseamento dos animais para a aquisição das imagens, foi sempre feito de forma cuidada com gelo e metanol a 100%. As imagens foram obtidas fotograficamente com uma lupa binocular (*Olympus SZ-PT*) acoplada a uma câmara digital (*Olympus DP 11*). Todas as medições dos parâmetros (Figura 14) foram adquiridas através de um programa de imagem: image J.

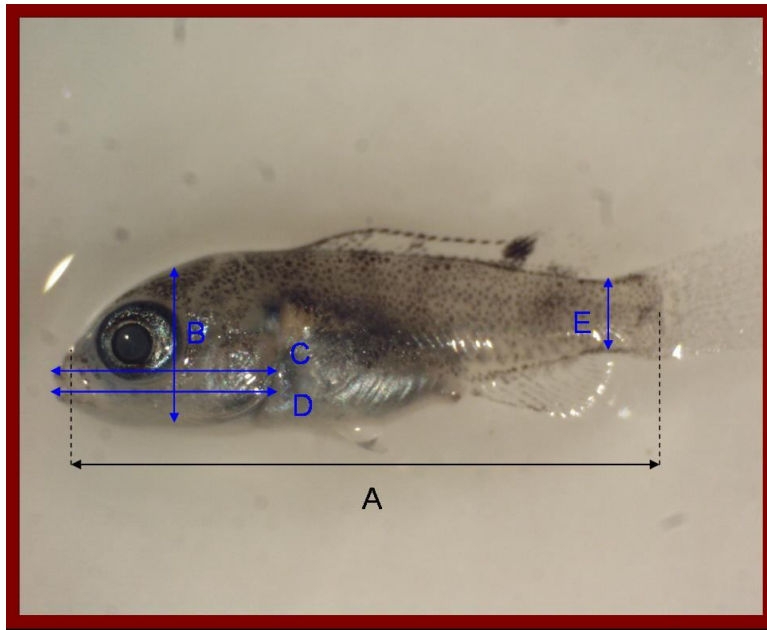


Figura 14: Larva de tilápia moçambicana com 15 dias após eclosão. As letras representam as 5 medidas morfométricas convencionadas para estimar a morfometria de cada indivíduo. Legenda: A = comprimento padrão; B = altura da cabeça; C = distância do maxilar superior ao cleitrum; D = distância do maxilar inferior ao cleitrum; E = altura de região caudal.

2.2.2. Análise da morfologia interna do esqueleto

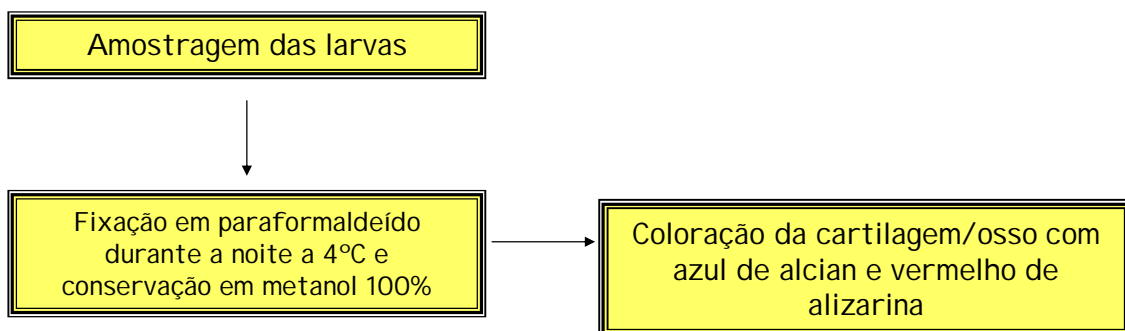


Figura 15: Esquema representativo dos passos práticos realizados para a análise da morfologia interna.

A técnica de coloração *Whole-mount* da cartilagem-osso é uma técnica importante no estudo da ontogenia esquelética dos peixes ósseos. Neste trabalho utilizou-se uma técnica de coloração *Whole-mount* que resultou da aplicação do método de coloração azul de Alcian/vermelho de Alizarina, método este que cora todo o organismo permitindo a identificação das estruturas cartilagueas e ósseas que ficam coradas de azul e vermelho respectivamente. Esta técnica tem como vantagens permitir uma visão tridimensional instantânea das estruturas coradas sem que haja uma distorção da morfologia dos tecidos e não requer a descalcificação do organismo em estudo.

O corante azul de Alcian 8GX é utilizado para a coloração do tecido cartilagueo pois possui uma elevada afinidade para os mucopolissacáridos ácidos que são um dos principais componentes da matriz extracelular cartilaguea (Klymkowsky e Hanken, 1991). O vermelho de Alizarina S é muito utilizado para a coloração do osso porque forma um complexo com os iões cálcio numa reacção de quelação (Dingerkus e Uhler, 1977; Klymkowsky e Hanken, 1991).

Foi feita uma observação comparativa do esqueleto dos indivíduos nos vários tratamentos com os respectivos indivíduos controlo em termos da ossificação, valores acumulativos e anomalias observadas. As imagens foram obtidas com uma lupa binocular (*Olympus SZ-PT*) acoplada a uma câmara digital (*Olympus DP 11*).

O procedimento utilizado para a coloração foi o seguinte:

1. Os animais foram previamente fixados com paraformaldeído (para preservar a morfologia dos tecidos) e guardados a 4°C durante a noite e depois lavados 3 vezes com PBS 1x durante 15m e água DEPC durante 10m, armazenados em metanol 100% a 4°C.
2. Seguiu-se uma hidratação dos tecidos, 15 min numa série de álcoois a 75%, 50%, 25% (etanol) e 2X DEPC.
3. Coloração da cartilagem durante 1h30m em azul de Alcian 8GX.
4. Despigmentação da pele em 3% H₂O₂ com 0,5% KOH durante 35min.
5. Posteriormente a deterioração do músculo (transparência) em 0,45g de Tripsina com 400ml de solução saturada de Bórax (30%).
6. Por último a coloração do osso em 25µl de vermelho de Alizarina S com 10ml de KOH (0,5%) durante a noite.

2.2.3 Análise Histológica

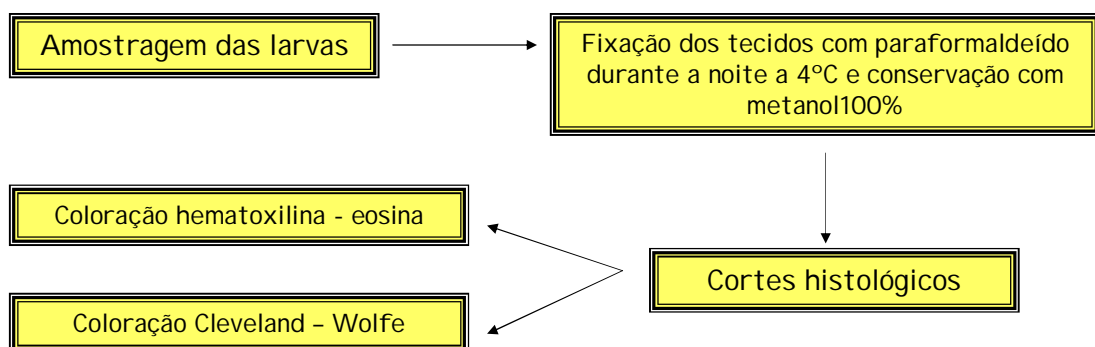


Figura 16: Esquema representativo dos passos práticos realizados para a análise histológica.

A histologia é uma técnica que permite o estudo de tecidos que são cortados em secções finas, sendo que os diferentes tecidos são evidenciados pelo uso de corantes biológicos específicos. Técnicas de histologia têm sido largamente utilizadas para examinar os tecidos da glândula tiróide, com o objectivo de analisar o estado ou funcionamento alterado da tiróide como a hipertrofia ou hipotrofia.

Neste trabalho prático usaram-se duas técnicas de histologia diferentes, coloração Hematoxilina-Eosina e coloração Cleveland – Wolfe. A técnica de coloração Hematoxilina-Eosina teve como objectivo principal identificar as várias estruturas presentes nos tecidos da cabeça para auxiliar a identificação da zona onde se encontrava a tiróide. Esta técnica permite a identificação morfológica das células e dos tecidos corando as estruturas básicas de cor púrpura (p.ex. núcleos) e as estruturas ácidas de rosa (p.ex. citoplasma) (Junqueira *et al*, 1995). A coloração Cleveland – Wolfe foi utilizada para a medição da actividade da tiróide pois esta técnica cora os folículos da tiróide (colóide de cor de laranja e tirócitos de roxo ou azul) e as restantes células de cor púrpura, o que facilita bastante a localização da glândula tiróide e a identificação dos seus folículos.

Os tecidos utilizados para a histologia foram previamente fixados em PFA a 4% durante a noite a 4°C para preservar as características morfológicas (Junqueira *et al*, 1995). Após a fixação, os tecidos foram lavados 3 vezes com PBS 1x durante 15min e com água DEPC durante 10min, por fim armazenados em metanol 100% a 4°C. Posteriormente procedeu-se à descalcificação dos tecidos, estes foram lavados com água DEPC 3X durante 10min e transferidos para EDTA (USB Corporation) 0,5M pH 8,0. Os indivíduos ficaram nesta solução durante 7 dias. Para a realização dos blocos usaram-se apenas as cabeças dos peixes para facilitar a localização da glândula tiróide nos cortes. Os cortes foram

transversais. As cabeças foram novamente lavadas com água DEPC durante 2h e logo de seguida colocadas em cassetes e embebidas em parafina num processador de tecidos LeicaTP1020 em que o programa consistiu numa passagem por uma série de álcoois, etanol a 70% durante 10min, 95% 2X durante 30min, 100% 2X durante 1h. Depois passagem por soluções com xilol, xilol: etanol (1:1) durante 1h, xilol a 100% 2X durante 1h e 1h30min, xilol: parafina (1:1) durante 2h e por fim parafina pura durante 2h. Cumprido o programa efectuaram-se os blocos de parafina numa consola da Miles Scientific (Thermal Console, Dispensing Console e Cryo Console, Tisseu-Tek, Miles Scientific).

Efectuaram-se cortes transversais das cabeças com 5 μ m de espessura com um micrótomo LeicaRM2125RT de 4 indivíduos controlo e 4 indivíduos tratados sujeitos a exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl com 21 dias. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com APES (Anexo 1), o que permite uma melhor aderência dos tecidos às lâminas. De cada bloco de parafina efectuaram-se 50 cortes.

Procedeu-se à coloração das lâminas, que foram corados com hematoxilina/eosina (HE) para verificar o estado dos tecidos e posteriormente coraram-se outros slides com a coloração Cleveland – Wolfe (1932) para fazer as medições. Nestas secções foram medidas a área total dos folículos da tiróide, a altura dos respectivos tirócitos (quatro de cada folículo a 90° cada um) e a altura do núcleo destas células (Figura 17). Estas medições foram feitas através de um programa de imagem (Image J). As imagens foram fotograficamente obtidas através de um microscópio (*Olympus U-PMTVC*) acoplado a uma câmara digital (*Olympus DP 11*).

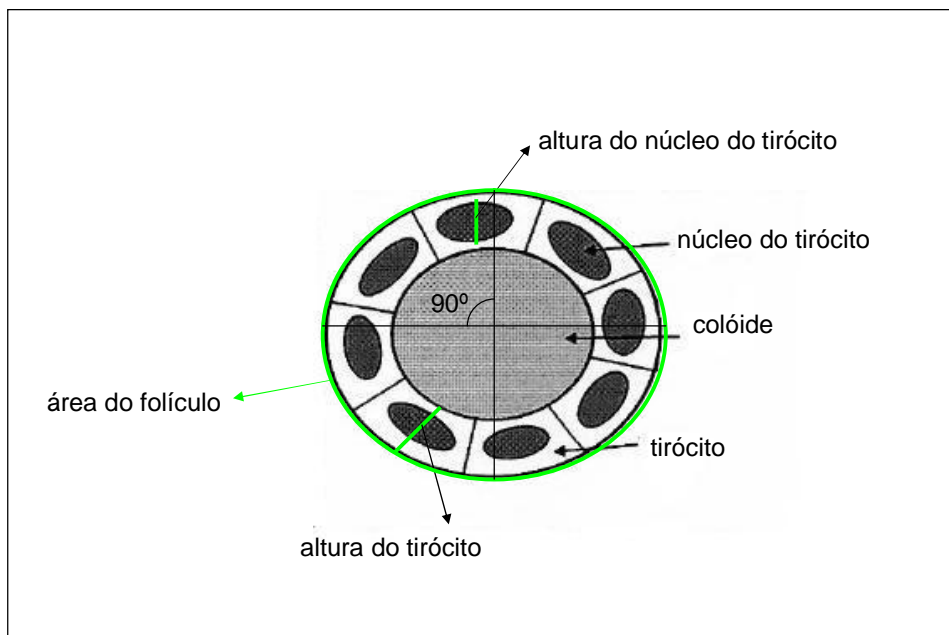


Figura 17: Representação esquemática de um folículo da glândula tireóide. Ilustração da medição da altura de um tirócito, da altura do respectivo núcleo e da área total do folículo.

O procedimento utilizado para a coloração hematoxilina/eosina foi o seguinte:

- a) Hidratação dos tecidos, passagem por xilol 2X durante 15min e por uma série de álcoois: 10min etanol a 100%, 5min etanol a 95%, 5min etanol a 70% e 5min água destilada.
- b) Imersão dos tecidos em hematoxilina durante 5min.
- c) Lavagem com água da torneira durante 3min e passagem por água destilada.
- d) Imersão dos tecidos em eosina durante 5min.
- e) Lavagem com água destilada com umas gotas de ácido acético durante 3min e passagem por água destilada.
- f) Desidratação por uma série de álcoois: etanol a 70%, 95% e 100% durante 5min.
- g) Imersão em Kclear 2X durante 10min e montagem com DPX.

O procedimento utilizado para a coloração Cleveland – Wolfe foi o seguinte:

- a) Hidratação dos tecidos passagem 2x 15min por xilol e através por uma série de álcoois: 10min em etanol 100%, 5min em etanol 95%, 5min em etanol 70% e 5min em água destilada.
- b) Imersão dos tecidos 5min em hematoxilina de Erlich.
- c) Lavagem com água da torneira e depois com água destilada.
- d) Imersão dos tecidos 5min em eritrosina 1% aquosa.
- e) Lavagem com água da torneira e com água destilada.
- f) Imersão durante 8-10 segundos com Orange G (2% em 1% ácido fosfotúngstico).
- g) Lavagem rápida com água destilada.
- h) Imersão com azul de Anilina aquoso (0,25% aquoso, acidificado para pH 3-4) durante 1,5min.
- i) Lavagem rápida em etanol a 100% e depois 2x 5min em Kclear.
- j) Montagem com DPX.

2.3 Análise Molecular

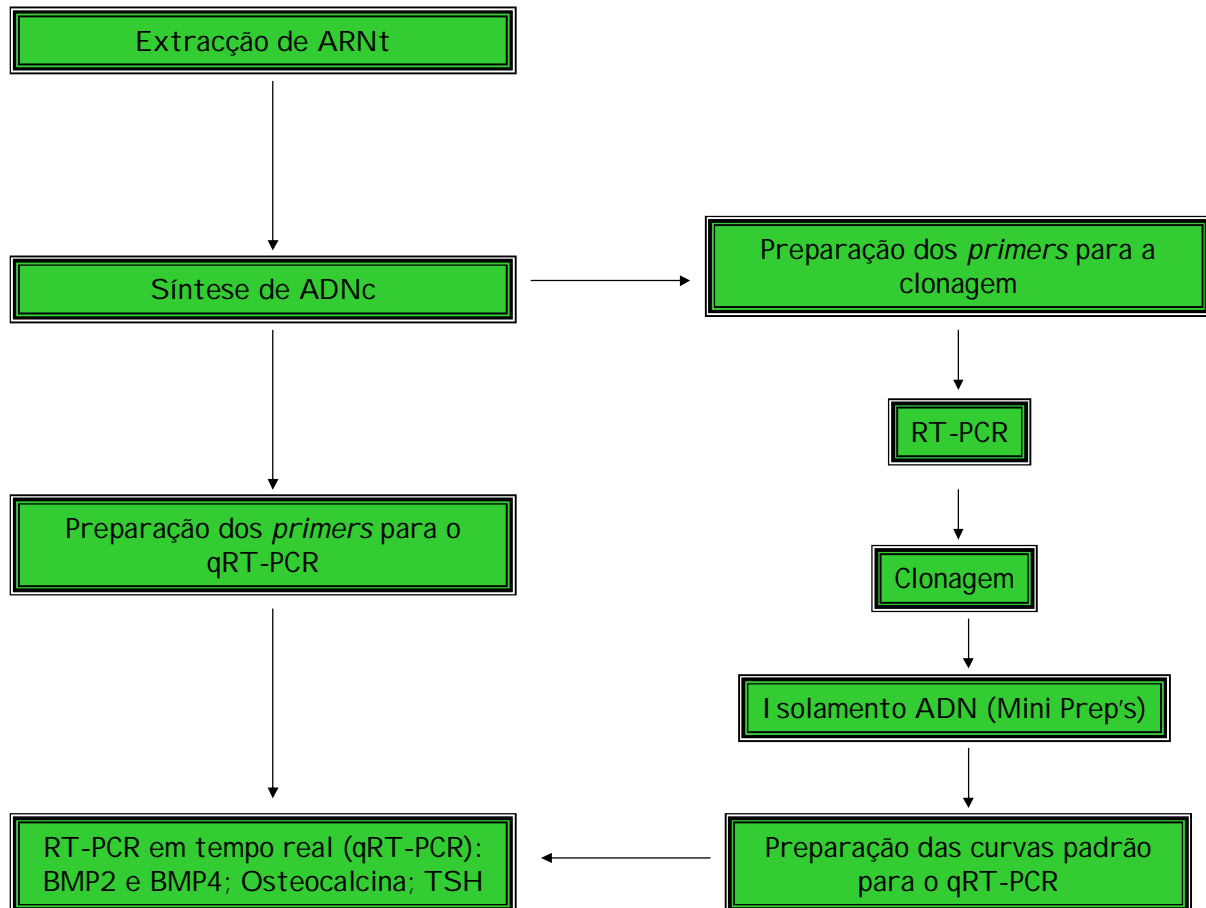


Figura 18: Esquema representativo dos passos práticos realizados para a análise molecular.

Os passos práticos descritos nesta secção foram realizados para se proceder à análise da expressão, através da respectiva quantificação de 4 genes (proteínas morfogénicas do osso: BMP2 e BMP4; osteocalcina: OSC; hormona estimuladora da tiróide: TSH), em larvas de *Oreochromis mossambicus*, sujeitas aos tratamentos descritos anteriormente (2.3). A técnica usada para quantificação dos genes foi o qRT-PCR (PCR - quantitativo de transcrição reversa). Os passos descritos em 2.7.2 a 2.7.6 descrevem a metodologia

experimental que foi realizada antecipadamente ao qRT-PCR e o passo 2.7.7 definem o método e a aplicação do mesmo. Nesta técnica o método de detecção química utilizado foi o SYBR Green dye e o método de quantificação foi a curva padrão. Estas tarefas incluíram a extracção do ARNt e a respectiva síntese de ADNc; a preparação das curvas padrão que incluiu a amplificação do fragmento de interesse por RT-PCR, a sua inserção num vector e respectiva clonagem, isolamento do ADNp (minipreps); realização do qRT-PCR.

2.3.1 Extracção de ARN total

A extracção de ARNt foi feita de larvas (*Oreochromis mossambicus*) com 15 dias sujeitas ao tratamento de exposição periódica de 1mg/L NaOCl. Foi efectuada utilizando o reagente TRI (Sigma), segundo as indicações do fornecedor. Este método consiste num melhoramento do método *single-step* descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). O reagente TRI é uma mistura de isotiocianato de guanidina e fenol numa solução monofásica que dissolve o ADN, ARN e proteínas. O ARNt foi extraído de larvas de *Oreochromis mossambicus* inteiras.

Utilizou-se 1ml de reagente TRI e os tecidos foram homogeneizados utilizando um homogeneizador de vidro autoclavado. A pressão exercida através do êmbolo do homogeneizador faz com que a membrana das células dos tecidos rebentem, libertando todo o seu conteúdo intracelular. O homogeneizado foi transferido para *ependorfs* de 1,5ml e ficou a reagir durante 5min à temperatura ambiente (RT). Adicionaram-se 200µl (por cada ml de TRI adicionado) de clorofórmio em cada tubo e deixou-se reagir durante 15min RT, com agitação manual frequente. Centrifugou-se durante 15min a 12000rpm a

4°C. Formaram-se 3 fases, uma fase superior incolor que continha o ARN, uma interfase de cor escura que continha o ADN e uma fase inferior de cor vermelha (fase orgânica) que continha as proteínas. Retirou-se a fase incolor (ARN) e transferiu-se para tubos de *eppendorf* aos quais se adicionou 500ul de isopropanol (por cada ml de TRI adicionado), para que ocorresse a precipitação do ARN. Deixou-se a precipitar durante a noite a -20°C. Posteriormente centrifugou-se a 12000rpm durante 10min a 4°C, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1ml de etanol a 75% (por cada ml de TRI adicionado). Agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 12000rpm durante 5min a 4°C, descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* (não totalmente) durante 10-15min. O precipitado de ARN foi dissolvido num volume de apropriado (20-80µ) de água DEPC. As amostras foram sujeitas a electroforese num gel de agarose a 1% para verificar a integridade e foram armazenadas a -80°C.

2.3.2 Síntese de ADN complementar

A síntese de ADNc permite o manuseamento e caracterização do ARN. Esta síntese foi feita através da reacção de RT (Transcrição reversa), caracterizada pela síntese de uma molécula de ADNc de cadeia simples, tendo como molde o ARN extraído das células (Sambrook *et al*, 1989). Através da enzima transcriptase reversa MMLV-RT é possível a partir do ARNm e de um conjunto de *primers* sintetizar o respectivo ADNc. Antes de se proceder à síntese do ADNc todas as amostras foram quantificadas com o fluorímetro QubitTM e tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com ADN

genómico. A DNase é uma enzima que tem a capacidade de degradar o ADN genómico em nucleótidos.

A quantificação com o Qubit kit foi realizada utilizando 1µl de ARNt e 199µl de uma mistura reaccional, sendo esta constituída por 199µl de tampão de reacção Quant-iT™ e 1µl de reagente Quant-iT™(RNA). Deixou-se reagir 2min RT, depois leram-se as amostras no fluorímetro Qubit™ que foi previamente calibrado com soluções padrão.

Para o tratamento com DNase colocou-se 2µg de ARNt (calculado anteriormente) e 6,25µl de mistura reaccional (5µl de tampão de reacção e 1,25 da enzima) perfazendo o volume de 50µl com água DEPC. Ficou a reagir durante 30min a 37°C, depois foi adicionado 5µl de tampão de inactivação que reagiu durante 2min RT. Depois centrifugou-se durante 1,5min a 13000rpm e transferiu-se o sobrenadante para um tubo novo. Posteriormente as amostras foram novamente quantificadas com Qubit kit para se realizar a síntese do ADNc.

Para a síntese do ADNc utilizou-se o ARNt tratado com DNase (volume calculado para 500ng), 1µl de dNTP's, 1µl de *random hexamers*, 0,5µl da enzima MMLV-RT (50U, Promega), 0,5µl da enzima *RNAgard™ RNase inhibitor* (1,0U, Pharmacia) e 8µl tampão reaccional (5XRT MMLV). Prepararam-se 2 tubos de controlo negativo onde não se colocou a enzima MMLV-RT. Ficou a reagir durante 10min a 20°C, depois 50min a 42°C para que ocorresse a síntese de ADNc. A actividade da enzima MMLV-RT foi desactivada a 72°C durante 5min. A qualidade do ADNc foi determinada por PCR com os *primers* do 18s de dourada (*Sparus aurata*) desenhados para regiões conservadas do gene 18s.

O PCR foi realizado utilizando 1µl de ADNc e 24µl de mistura reaccional, sendo esta constituída por 2,5µl de tampão de reacção (EuroTaq), 0,75 de MgCl₂ (EuroTaq), 1µl de cada *primer* (10pmol/µl) 18s, 0,3µl de dNTP's, 0,1µl de Taq polimerase (1U, EuroTaq) e 18,35µl de água estéril (Sigma) para um volume final de 25µl. O passo de desnaturação inicial foi realizado a 95°C durante 2min, seguindo-se um total de 35ciclos (95°C durante 45s, 59°C durante 30s, 72°C durante 45s) com uma extensão final de 72°C durante 5min.

2.3.3 Preparação dos *primers* para clonagem e qRT-PCR

Esta fase do trabalho foi iniciada com uma pesquisa *in silico* das sequências de genes envolvidos no eixo hipotálamo – hipófise – tiróide (TSH) e na formação/desenvolvimento do esqueleto ósseo (BMP2, BMP4, OSC) no genoma de *Oreochromis mossambicus*. O objectivo nesta parte do trabalho foi encontrar estas sequências de interesse para desenhar *primers* para a clonagem dos genes (BMP2, BMP4, OSC e TSH) e respectiva quantificação por qRT-PCR. As sequências de BMP2 e BMP4 e respectivos *primers* para a clonagem foram gentilmente concedidas pela Doutora Laurence Deloffre (CCMAR). Para as sequências de OSC e TSH as pesquisas foram efectuadas nas bases de dados disponíveis *on-line*. Não foram encontradas sequências destes genes disponíveis para esta espécie. Utilizaram-se por isso as sequências que estavam disponíveis para o organismo do mesmo género desta espécie, o *Oreochromis niloticus*, no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências obtidas foram alinhadas por similaridade com outras sequências dos mesmos genes para outras espécies de peixes, através do programa *ClustalW*, programa de alinhamento de múltiplas sequências

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os *primers* para a clonagem dos genes (Anexo 4) foram desenhados em regiões conservadas identificadas pelo programa.

No desenho dos *primers* os seguintes parâmetros foram controlados, usando o programa *Oligonucleotide Properties Calculator* (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc): percentagem de nucleótidos G e C (40 a 60%); a temperatura de melting entre 54 e 68°C, não mais de 5°C de diferença entre o *primer forward e reverse*; o tamanho dos *primers* entre 20 a 30pb.

O desenho dos *primers* para o qRT-PCR (Anexo 4) baseou-se nas sequências encontradas para cada gene utilizando o programa Beacon Designer (Premier, Biosoft International), limitadas pelos *primers* usados para obter os fragmentos clonados. A selecção dos vários *primers* obtidos no programa teve em conta alguns parâmetros: a temperatura de melting (60°C±10°C); o conteúdo de G e C (40 a 60%); possuir mais G e C na extremidade 3' pois facilita a ligação do *primer* à sequência; o tamanho da zona de amplificação (75-150pb) e a existência de estruturas secundárias entre os *primers* (*hairpins*, *self-dimers*, *cross-dimers*), desenhar os *primers* com base no alinhamento do ADNc alvo com o ADNc de proteínas similares para evitar amplificação cruzada; desenhar os *primers* num exão diferente para que a contaminação por ADNg seja reduzida ou distinguível pelo tamanho da amplificação do ADNc.

Todos os *primers* (clonagem e qRT-PCR) foram sintetizados pela Metabion (Alemanha).

2.3.4 Transcrição Reversa – Reacção de Polimerização em Cadeia (RT-PCR) para a inserção da sequência de interesse no vector

A RT-PCR é uma técnica que permite a amplificação de um fragmento de ARN. O primeiro passo é a síntese do ADNc a partir do fragmento de ARN (como descrito em 2.3.2), seguindo-se a amplificação do ADNc formado por PCR (Sambrook *et al*, 1989).

A reacção de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de uma sequência específica de ADN de uma forma exponencial, utilizando um par de *primers* e uma enzima ADN polimerase. O PCR é uma reacção cíclica que se divide em 3 etapas principais: desnaturação (separação do ADN de cadeia dupla em duas cadeias simples com a quebra das ligações de hidrogénio entre as bases), iniciação (ligação por pontes de hidrogénio entre os *primers* e as sequências de cadeia simples complementares) e extensão (polimerização da cadeia de ADN a partir da região onde o *primer* se liga, pela acção da enzima ADN polimerase) (Bartlett e Stirling, 2003). Após vários ciclos de amplificação o fragmento de ADN de interesse aumenta exponencialmente obtendo-se um número de cadeias 2^n , em que n representa o número de ciclos (Bartlett e Stirling, 2003).

Para efectuar uma reacção de PCR, adiciona-se o ADN a uma solução tamponizada contendo Taq polimerase (extraída de *Thermus aquaticus*, um microorganismo termófilo, que resiste sem desnaturar a temperaturas elevadas), oligonucleótidos sintetizados (*primers*), quatro desoxirribonucleótidos estruturais do ADN (dNTP's) e o co-factor $MgCl_2$, necessário para a actividade enzimática (Bartlett e Stirling, 2003). O desenho dos *primers* foi previamente descrito (2.3.3).

O PCR para a clonagem da BMP2 e BMP4 foi realizado utilizando-se 3µl de ADNc e uma mistura reaccional, sendo esta constituída por 5µl de tampão de reacção 10X (EuroTaq), 2µl de MgCl₂ (EuroTaq), 1µl de dNTP's, 1µl de cada *primer* (10pmol/µl), 0,2µl de *Taq polimerase* (EuroTaq) e 36,8µl de água estéril (Sigma) para um volume final de 50µl. O passo de desnaturação inicial foi realizado a 94°C durante 2min, seguindo-se um total de 35ciclos (94°C durante 30s, 55°C durante 30s, 72°C durante 45s) com uma extensão final de 72°C durante 10min.

O PCR para a clonagem da OSC e TSH foi realizado utilizando uma mistura reaccional idêntica ao PCR para a BMP2 e BMP4, com excepção da quantidade de MgCl₂ (2,5µl). O passo de desnaturação inicial foi realizado a 94°C durante 4min, seguindo-se um total de 10 ciclos (94°C durante 30s, 52°C durante 40s, 72°C durante 45s) e um total de 25 ciclos (94°C durante 30s, 55°C durante 40s, 72°C durante 45s) com uma extensão final de 72°C durante 10min. Os produtos PCR foram sujeitos a electroforese em gel de agarose 1,5% para verificar a existência de um produto específico (uma banda).

Os produtos de PCR para todos os genes deram só uma banda no gel de agarose, assim foram directamente purificados com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo as indicações do fornecedor. Adicionou-se 500µl de *capture buffer* e o restante volume de amostra na coluna. Centrifugou-se durante 30s a 13000rpm, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente à coluna 500µl de *washing buffer*. Centrifugou-se durante 30s a 13000rpm e descartou-se o sobrenadante. Transferiu-se a coluna para um novo eppendorf e colocou-se 30µl de água estéril (Sigma), deixou-se incubar durante 1min RT e centrifugou-se durante 60s a 13000rpm. As amostras foram

sujeitas a electroforese num gel de agarose a 1,5% para verificar a integridade e recuperação do ADNc purificado.

2.3.5 Clonagem dos genes

A clonagem consiste na inserção de um fragmento de ADN num vector de clonagem utilizando uma enzima que catalisa a ligação covalente de moléculas de ADN com extremidades coesivas complementares (Sambrook *et al*, 1989).

Neste estudo utilizou-se o vector de clonagem *pGEM-T Easy* (Promega) (Anexo 3) contendo o gene de resistência à ampicilina, para que só as bactérias transformadas com o vector possam crescer em meio suplementado com este antibiótico. Este vector possui um segmento do gene Lac-Z que codifica para a β -galactosidade da *E. coli*. O local onde o fragmento exógeno de ADN se insere neste vector está na região que codifica para o péptido da β -galactosidade, quando o fragmento se insere no vector a síntese da β -galactosidade não é activada. Podendo-se assim identificar os clones recombinantes por meios selectivos, pela análise e selecção de cor azul/branca. Este vector foi utilizado uma vez que se pretendia inserir fragmentos de ADN com menos de 1000bp (Sambrook *et al*, 1989).

Nesta fase pretendia-se clonar os genes de interesse (BMP2, OSC, TSH). Utilizaram-se por isso os produtos de PCR purificados anteriormente descritos (2.7.4) para se inserirem os fragmentos de ADN de interesse no vector. A ligação de ADN de interesse foi efectuada adicionando num *ependorf* 0,3 μ l do vector *pGEM-T Easy* (1,5ng/ μ l, Promega), 5 μ l de tampão ligase 2X (Promega), 1,5 μ l do produto PCR, 0,75 μ l da enzima T4 ADN ligase (100U, Promega) e 2,45 μ l de água estéril (Sigma) para um volume final

de 10µl. A mistura reaccional ficou a incubar durante a noite a 4°C para que ocorresse a ligação.

Esta reacção foi utilizada para transfectar bactérias para permitir a multiplicação do vector á medida que as bactérias se replicam.

Neste trabalho foi utilizado como hospedeiro biológico a bactéria *E. coli* da estirpe XL-Blue, estas bactérias foram tratadas com CaCl₂ (Anexo 2) de modo a tornarem-se competentes para poderem receber o plasmídeo exógeno. A transformação das bactérias *E.coli* XL1-Blue foi efectuada adicionando num tubo (1,5ml) com 5µl do produto de ligação (sequência + plasmídeo) a 100µl das células competentes, incubando no gelo durante 20min, seguindo-se um choque térmico a 42°C durante 2min. Posteriormente as células foram semeadas em placas com LB agar (Sigma) suplementado com ampicilina (50µg/ml, Sigma), com IPTG (0,05M, Eppendorf AG) e com X-gal (80µg, Sigma) e cresceram durante a noite a 37°C.

Para a identificação dos clones recombinantes tirou-se partido das propriedades conferidas ás bactérias transformadas. As bactérias que recebem o vector são resistentes à ampicilina. As que recebem o vector sem o fragmento têm o gene *lacZ* activo, que codifica para a β-galactosidase, esta enzima degrada o X-gal o que confere uma cor azul à colónia. Nas bactérias que recebem o vector com o inserto, o gene *lacZ* está inactivo, o X-gal não é degradado o que confere uma cor branca à colónia.

2.3.6 Isolamento do ADN pelo método de lise alcalina (preparação das *minipreps*)

Este passo foi realizado para que se obtivesse elevadas quantidades isoladas de ADN plasmídeo com o fragmento de interesse para cada gene. Assim para cada gene,

seleccionaram-se as colónias brancas e inocularam-se em 3ml de meio LB (Anexo 5) suplementado com ampicilina (50ng/ml) em tubos de cultura bacteriana e deixou-se crescer durante a noite a 37°C num agitador orbital a 250rpm.

A preparação das *minipreps* consistiu na extracção de ADN plasmídeo de uma cultura bacteriana, utilizando-se o método de lise alcalina (Bimboim e Doly, 1979). Para tal, colocou-se um 1,5ml da cultura num eppendorf e centrifugou-se 13400rpm durante 1min, descartando-se o sobrenadante. Ao pellet de bactérias formado adicionou-se 100 µl de solução tampão P1 (Anexo 5) com RNase (10 µl / 1 ml de água DEPC). Os tubos foram agitados no vórtex e adicionou-se 100µl da solução P2 (Anexo 5) para provocar a lise das bactérias. Ficou a incubar durante 5min RT. Finalmente 100µl da solução P3 foi adicionada para que ocorresse a precipitação do ADN genómico das bactérias. Agitou-se por inversão e ficou no gelo durante 10min. Depois centrifugou-se durante 5min a 13400rpm e o sobrenadante que continha o ADN plasmídeo foi retirado para um *eppendorf* novo. Foram adicionados 2 volumes de etanol a 100%, misturado por inversão e centrifugado durante 2min a 13400rpm. Repetiu-se este passo com etanol a 70% (2 volumes), centrifugou-se durante 1min e descartou-se o etanol. Por fim, o plasmídeo foi suspenso em 40 µl de água estéril (Sigma). As amostras foram sujeitas a electroforese num gel de agarose a 1% para verificar a integridade.

As amostras foram enviadas para sequenciação (3130xl Genetic Analyzer de 16 capilares da Applied Biosystems) nas instalações do CCMAR.

2.3.7 RT-PCR em Tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo de transcrição reversa, ou PCR de transcrição reversa em tempo real é uma técnica muito usada para quantificar o número de cópias presente numa amostra, de um determinado fragmento transcrito de ARNm em ADNc. É uma técnica muito usada para a análise da expressão de genes (Vandesompele *et al*, 2002). Dos vários benefícios desta técnica salienta-se o facto da amplificação poder ser monitorizada em tempo real, os ciclos de amplificação são mais rápidos, detecção de alteração menor que 2X, maior extensão dinâmica (até 10^{10} X), quantificação precisa da expressão de um gene específico (Vandesompele *et al*, 2002). O que tornam esta técnica sensível, específica e reproduzível.

É um sistema baseado na detecção e quantificação de um sinal fluorescente. A emissão dos compostos fluorescentes geral um sinal que aumenta na proporção directa à quantidade de produto PCR. Esses valores de fluorescência são gravados em cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (Figura 19A). O software usado foi o iCycler iQ 3.1 (BIO-RAD).

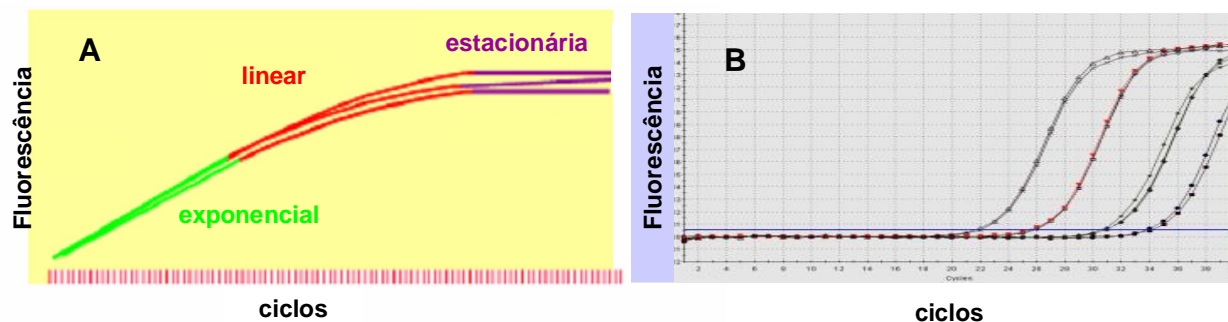


Figura 19: A: Representação esquemática das 3 fases da fluorescência no qRT-PCR: fase exponencial; linear e estacionária. Adaptado de www.dbc.uem.br B: A imagem representa o sinal fluorescente que aumenta durante os ciclos de PCR, por causa da amplificação do ADN. Adaptado de www.biocat.com

Três fases caracterizam a fluorescência durante os ciclos de PCR. A fase exponencial, linear e estacionária (Figura 19B). Na fase exponencial o dobro do produto é acumulado em cada ciclo (reação com aproximadamente 100% de eficiência), nesta fase a reação é específica e precisa. Na fase linear, existe uma alta variabilidade do produto formado e da eficiência da reação (consumo dos componentes da reação). Na fase estacionária já não há mais produção de produto e estes começam a ser degradados, é nesta fase que se detectam os produtos nos métodos de PCR convencionais.

Uma vez que o sinal de fluorescência é directamente proporcional à concentração, a correlação linear entre o produto de PCR e a intensidade de fluorescência é usado para calcular a quantidade da sequência de interesse presente no início da reação. O ponto no qual a fluorescência é logo detectada como estatisticamente acima da linha de base (no limiar da fase exponencial) é denominado de valor Ct (*cycle threshold*) (Figura 20). Este

ponto permite a quantificação exacta e reprodutível baseado na fluorescência. Quanto maior a quantidade de fragmentos de interesse no início da reacção, menor será o valor Ct (Figura 20).

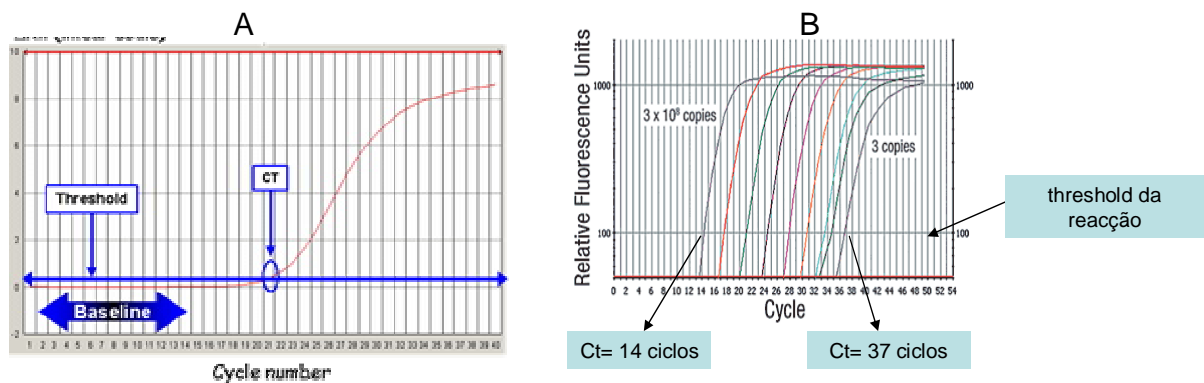


Figura 20: A = Esquema da amplificação da curva de qRT-PCR. Linha de base: ciclos nos quais o sinal de fluorescência está abaixo dos limites de detecção do equipamento; *Threshold*: ponto de corte a partir do qual o sinal de fluorescência das amostras é detectado; Ct: ciclo do PCR no qual a amostra corta o *threshold*. Adaptado: www.inra.fr/internet/Centres/toulouse/pharmacologie

B = Exemplo da comparação da fluorescência de diferentes amostras. Determinado o ponto que está acima da linha de base (*threshold da reacção*), a diferença entre a quantidade de fragmento inicial entre cada amostra traduz-se num valor de Ct diferente para cada amostra. Adaptado: e-biolearning.com/bbs/attachments

2.3.7.1 Métodos de detecção

Os dois métodos de detecção química mais usados são as sondas *TaqMan*[®] e o *SYBR Green dye*. O sistema de detecção SYBR Green dye foi o utilizado neste trabalho. Apesar de não ser um sistema tão específico como a *TaqMan*, no entanto não acarreta o elevado custo na compra de sondas específicas para cada gene, é portanto adequado sempre que se quer quantificar vários genes num pequeno número de amostras. Este liga-se à

cadeia dupla de ADN e com a excitação da luz emitida pelo sistema do termociclador emite uma fluorescência verde (Figura 21), podendo ligar-se a qualquer cadeia dupla de ADN que se forme na reacção. No entanto, este problema pode ser resolvido pela análise de uma curva de dissociação. Assim, a análise dos resultados de uma curva de amplificação com SYBR Green são feitos através da curva de dissociação, o que permite a caracterização de produtos de amplificação não específicos. Esta curva representa graficamente a deriva negativa da fluorescência em relação à temperatura, distinguindo as diferentes sequências a partir da percentagem do conteúdo das bases G e C, sendo que quanto mais elevado for este valor maior será a temperatura de melting da sequência (Ginzinger, 2002).

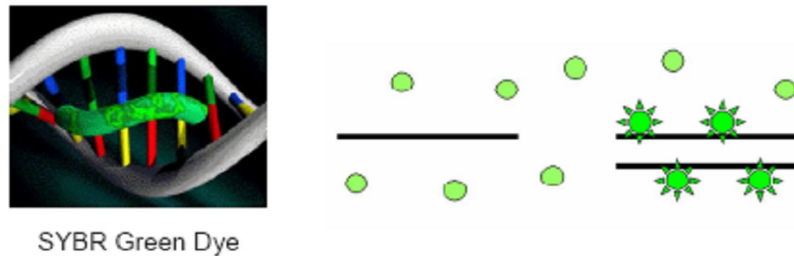


Figura 21: Representação esquemática do funcionamento do SYBR Green dye. O SYBR Green liga-se apenas à cadeia dupla de ADN à medida que esta é sintetizada e começa a emitir fluorescência. Adaptado de www.dbc.uem.br.

2.3.7.2 Análise da expressão génica

Neste trabalho a análise dos resultados foi feita pela quantificação através da curva padrão. Na quantificação através da curva padrão, uma amostra conhecida de cada gene (contendo o fragmento de interesse) é representada graficamente, relacionando a concentração da amostra ao respectivo valor de Ct, sendo necessária uma curva padrão para cada gene estudado. A estratégia utilizada neste estudo para a obtenção de amostras quantificadas foi a preparação das *minipreps* linearizadas e quantificadas (tal como descrito em 2.3.4 a 2.3.6), para cada gene. A partir da amostra quantificada foi realizada uma diluição seriada para a amplificação por qRT-PCR, na qual se construiu a curva padrão. As amostras desconhecidas (ADNc) foram amplificadas nas mesmas condições que as amostras de concentração conhecida (na mesma placa), e os valores de Ct foram analisados comparativamente à curva padrão. Este método é bastante fiável e é dos mais aplicados nos ensaios de quantificação.

2.3.7.3 Genes de Referência

No qRT-PCR utilizam-se genes de referência para padronizar a quantidade de ARN (Vandesompele *et al*, 2002). É um método comum para controlo interno do erro no qRT-PCR, tal como a quantidade de material de partida (nas amostras, no início da reacção) e a variação da eficiência da transcrição reversa na síntese do ADNc. Um gene de referência deve ter níveis de expressão estáveis e semelhantes em todos os tecidos investigados, não podendo ser influenciado pelas condições experimentais (Vandesompele *et al*, 2002). Um vasto número de genes de referência têm sido propostos para a análise da expressão de genes. Dos genes de referência mais utilizados pode citar-

se: β -actina, 18S ARNr, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Weisser *et al* 2004; Araya *et al*, 2008). Contudo não existe nenhum gene de referência universal e estes têm que ser validados para as condições experimentais de cada caso (Vandesompele *et al*, 2002). Neste trabalho começou-se por utilizar o 18S e uma vez que este demonstrou um nível de expressão constante em todas amostras, foi o gene de referência para todo o trabalho. A aplicação da técnica de qRT-PCR para avaliar a expressão deste gene de referência foi semelhante à descrita neste trabalho para os restantes genes, incluindo a optimização das condições da reacção (temperatura dos *primers*). As *minipreps* e os *primers* específicos (*forward* e *reverse*) foram gentilmente concedidos pela Doutora Patrícia Pinto (CCMAR).

2.3.7.4 Reacções de qRT-PCR

Nesta fase do trabalho apenas foi quantificada a expressão do gene BMP2. Não houve tempo para fazer a quantificação dos restantes (BMP4, TSH, OSC).

As reacções de qRT-PCR foram realizadas com 2 μ l de amostra (ADNc não diluído ou miniprep na respectiva diluição), 10 μ l de mistura SYBR[®] Green PCR (2X) (Applied Biosystems, UK), 0,2 μ l de cada *primer* específico (10pmol/ μ l) e 7,6 μ l de água estéril (Sigma). A reacção qRT-PCR (termociclador Bio-Rad iClycler iQ5) iniciou-se a 95°C durante 10min para a activação enzimática, seguido de 55 ciclos: desnaturação a 95°C durante 30s, temperatura de ligação específica dos *primers* durante 20s e síntese a 72°C durante 30s.

Após o término dos ciclos ocorreu a curva de dissociação com um aumento progressivo da temperatura num total de 75 ciclos, começando com 60°C durante 10s e aumentado em

cada ciclo 0,5°C com o objectivo de separar os produtos PCR pela sua temperatura de fusão, permitindo a detecção de produtos não específicos e dímeros.

2.3.7.5 Optimizações das reacções de qRT-PCR

Vários passos práticos foram necessários a fim de otimizar as condições das reacções finais (quantificação da expressão dos genes) descritas na secção anterior. Em primeiro lugar foi necessário otimizar a temperatura de ligação de cada par de *primers* (T_a), depois foi necessário preparar diluições do ADNc e por fim diluições seriadas das *minipreps* para as curvas padrão.

1) Optimização da T_a

A optimização da temperatura de ligação dos *primers* (T_a) é um passo fundamental para que a reacção (ligação e respectiva extensão) ocorra nas condições próximas das ideais.

O ADNc foi utilizado para otimizar todos os pares de *primers* (foi feita uma mistura dos ADNc do grupo controlo e dilui-se de 1:10). Testou-se a amplificação através de um gradiente de temperatura baseada na T_a que foi sugerida pelo software de desenho dos *primers*. Foi escolhida uma temperatura óptima de 60°C para o par de *primers* da BMP2 (temperatura que obteve um Ct mais baixo com maior sinal de fluorescência para o mesmo ADNc).

Os *primers* foram desenhados tal como descrito em 2.3.3.

2) Preparação dos standards

A preparação de standards (amostra com concentração conhecida com o fragmento de interesse), para a obtenção das curvas padrão consistiu, na clonagem dos fragmentos de interesse correspondentes a cada gene, *minipreps* (extração do ADN plasmídeo). Todos estes processos foram descritos nas secções anteriores (2.3.3 a 2.3.6). Seguiu-se a linearização do ADNp (para que a sua estrutura fosse o mais semelhante possível ao ADNc), purificação e respectiva quantificação.

O plasmídeo foi linearizado com uma enzima de restrição SacI. Num *ependorf* colocou-se 4µl de plasmídeo (aproximadamente 1µg de plasmídeo), 2µl de enzima (SacI-1,5U) e 4µl de tampão de reacção, a digestão foi feita durante 1h30min a 37°C. Depois inactivou-se a actividade da enzima por aquecimento aos 65°C. Para a purificação utilizou-se *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo as indicações do fornecedor, tal como descrito na secção (2.3.4). As amostras foram sujeitas a electroforese num gel de agarose a 1,5% para verificar a integridade e recuperação do ADNp purificado e linearizado.

Seguidamente foram quantificadas com o fluorímetro Qubit™, usando o Qubit kit. A quantificação com o Qubit kit foi realizada utilizando 1µl de plasmídeo e 199µl de uma mistura reaccional, sendo esta constituída por 199µl de tampão de reacção Quant-iT™ e 1µl de reagente Quant-iT™ (DNA BR). Deixou-se reagir 2min RT, depois leram-se as amostras no fluorímetro Qubit™ que foi previamente calibrado com soluções padrão.

3) Diluições do ADNc e ADNp

As curvas padrão realizaram-se através de diluições seriadas (0,5ng/μl a 5,0ag/μl), do ADNp linearizado contendo o fragmento clonado, usado para calcular a eficiência da reacção de qRT-PCR.

Efectuaram-se diluições do ADNc de 1:5 (efectuaram-se 5 diluições), que serviram para identificar se o número de transcritos do gene se encontrava na curva padrão linear e também para verificar a eficiência do PCR.

4) Padronização com o gene de referência

O gene 18s foi testado usando *primers* otimizados e uma Ta de 60°C. Não apresentou diferenças significativas na expressão entre os grupos (controlo e tratado), tendo sido utilizado para normalizar as amostras. Assim, o valor obtido para cada amostra foi dividido pelo valor absoluto para o 18s (valor este que foi obtido segundo o mesmo procedimento dos genes alvo).

2.4 Tratamento estatístico

Dos ensaios efectuados com as larvas de *Oreochromis mossambicus* tratadas com NaOCl, foram calculadas as respectivas médias e desvio padrão para cada grupo controlo e tratado de cada experiência. Para a análise morfológica externa e interna, histológica e molecular efectuaram-se análises estatísticas, com o objectivo de determinar efeitos significativos dos tratamentos. As respectivas análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat 3.0 utilizando o t-Student Test ou One Way ANOVA.

Em todos os tratamentos foi determinada a taxa de sobrevivência. A taxa de sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de sobreviventes no final da experiência e o número de indivíduos no início da experiência.

3. RESULTADOS

3.1 Optimização da dosagem de tratamento

Nesta fase do trabalho os resultados são descritos em termos das etapas de fases experimentais a que larvas de *Oreochromis mossambicus* foram sujeitas nos vários tratamentos com o NaOCl. Estas dividem-se em três fases, duas de exposição periódica de várias concentrações e uma fase de exposição contínua. Os resultados apresentados referem-se a: parâmetros físicos/químicos (oxigénio e pH) da água dos tanques, taxas de sobrevivência e análise do tamanho e peso dos animais da primeira fase de experiências.

Na tabela seguinte (tabela 2) é apresentado um resumo das experiências conduzidas nos animais para facilitar a compreensão do trabalho efectuado.

Tabela 2: Resumo das experiências nos animais conduzidas neste estudo, onde são indicadas as concentrações usadas, tipo de tratamento e pontos de amostragem.

Primeira fase		
Concentração NaOCl (mg/L)	Tratamento	Pontos de amostragem (dias após eclosão)
10	Exposição periódica (24h): - Administração do NaOCl na água, 1 única vez no início da experiência; - Larvas expostas ao NaOCl após a eclosão.	0
5		1
2		5
1		5

Segunda fase		
Concentração NaOCl (mg/L)	Tratamento	Pontos de amostragem (dias após eclosão)
1	Exposição periódica (24h): - Administração do NaOCl na água, 1 única vez no início da experiência; - Larvas expostas ao NaOCl após a eclosão.	5;15;31
0,5		5;15;31
0,1		5;15;31
0,01		5;15;31

Terceira fase		
Concentração NaOCl (mg/L)	Tratamento	Pontos de amostragem (dias após eclosão)
0,01	Exposição contínua: - Administração do NaOCl na água, todos os dias durante a experiência; - Larvas expostas ao NaOCl após a eclosão.	7;21

3.1.1 Taxas de sobrevivência (exposição periódica: primeira fase)

Os indivíduos sujeitos à concentração de 10mg/L NaOCl, morreram 30min após terem sido colocados no tanque com esta concentração, a taxa de sobrevivência foi portanto de 0% (Figura 22). As larvas sujeitas a uma concentração de 5mg/L NaOCl apresentaram uma taxa de sobrevivência de 30%, 1 dias após a eclosão, ou seja 1 dia após o tratamento. O controlo apresentou uma taxa de sobrevivência de 88% (Figura 22). Em cada tanque foram colocados 30 indivíduos, todos da mesma postura.

As larvas sujeitas à concentração de 2 mg/L NaOCl apresentaram uma taxa de sobrevivência de 70% ao fim dos 5 dias, enquanto que o controlo obteve uma taxa de sobrevivência de 89% (Figura 22). Em cada tanque foram colocados 45 indivíduos, todos da mesma postura.

No que respeita aos indivíduos submetidos à concentração de 1mg/L NaOCl, estes apresentaram uma taxa de sobrevivência de 80%, enquanto que o controlo apresentou uma taxa de 83% (Figura 22). Em cada tanque foram colocados 70 indivíduos, todos da mesma postura.

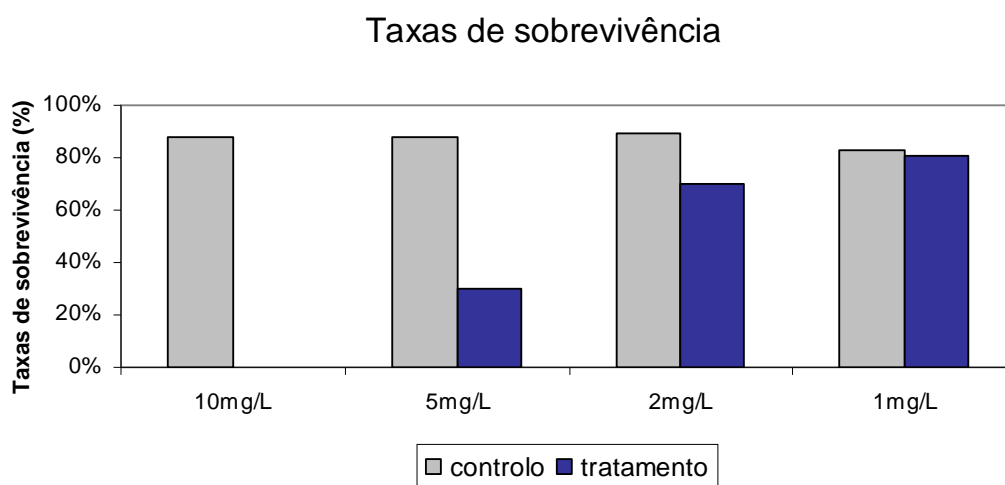


Figura 22: O gráfico representa as taxas de sobrevivência de larvas de *Oreochromis mossambicus* com 5 dias após eclosão, para os grupos controlo e tratamento (10mg/L; 5mg/L; 2mg/L;1mg/L de NaOCl).

3.1.2 Tamanho e peso dos indivíduos expostos a 2mg/L e 1mg/L de NaOCl

As concentrações de 5mg/L e 10mg/L de NaOCl demonstraram ser mortalmente tóxicas para esta espécie nesta fase do desenvolvimento. Pelo que foram excluídas para a continuação deste estudo. As concentrações de 2mg/L e 1mg/L apresentaram taxas de sobrevivência próximas do grupo controlo pelo que se procedeu a análise do tamanho e peso das larvas.

A concentração de 2mg/L afectou significativamente o tamanho e o peso das larvas em relação às larvas controlo, o que não se verificou na concentração de 1mg/L NaOCl (Figura 23). Toda a morfologia externa das larvas expostas a 2mg/L foi modificada. Estes

indivíduos eram visualmente mais pequenos que os peixes do grupo controlo (Figura 23). Por outro lado, os indivíduos sujeitos a esta concentração, apresentaram um desenvolvimento retardado em relação aos indivíduos controlo, aos 5 dias ainda continham grande parte do saco vitelino (Figura 23). Estas modificações não foram observadas nas larvas sujeitas à concentração de 1mg/L NaOCl. Nesta experiência, ambos peso e comprimento foram semelhantes aos peixes controlo (Figura 23). Em ambas as experiências não foi possível detectar nenhuma anomalia ao nível da morfologia externa, pigmentação e forma do opérculo.

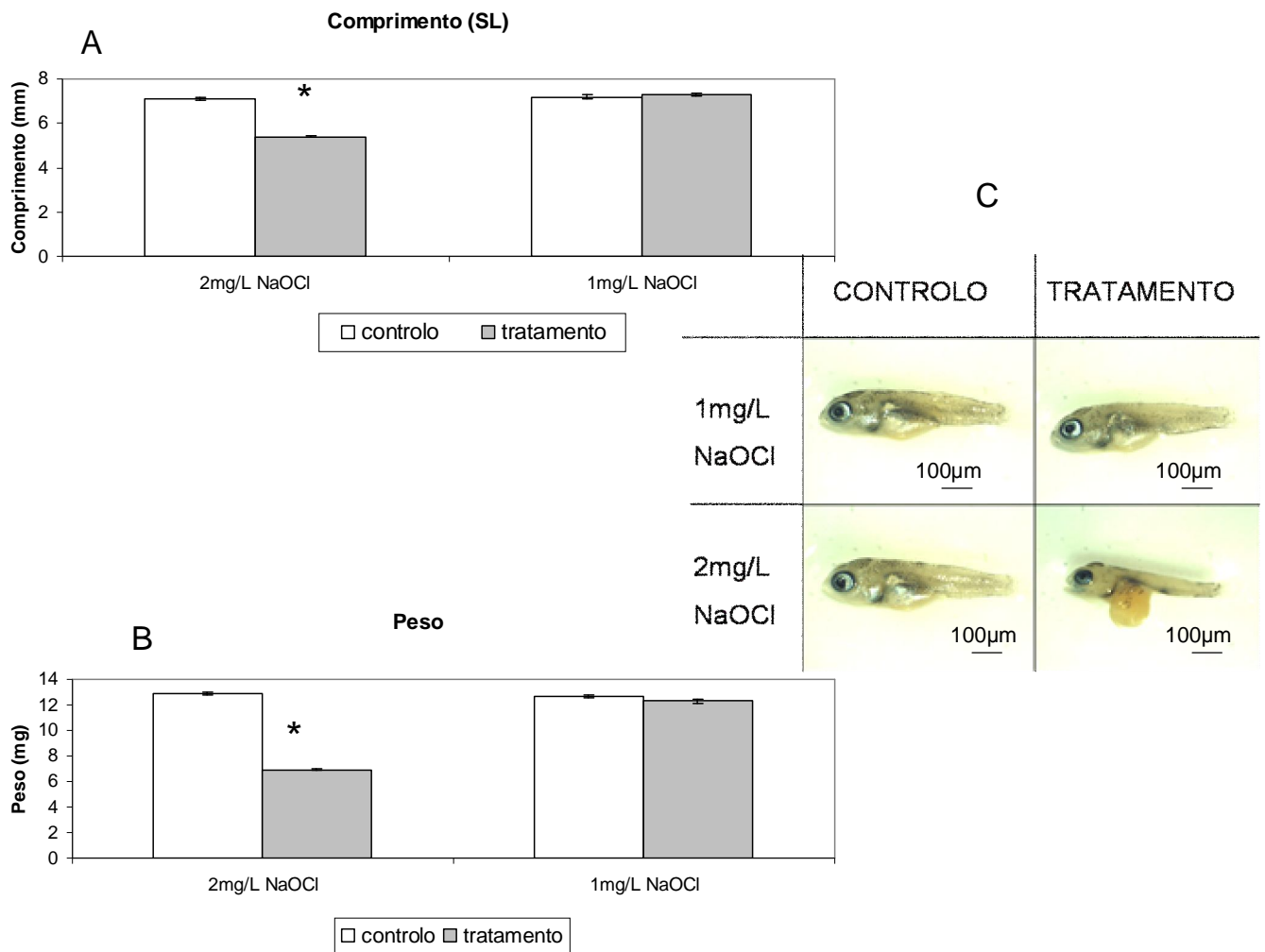


Figura 23: Os gráficos apresentam o comprimento (A), e o peso (B) das larvas expostas a 2mg/L e 1mg/L NaOCl, com 5 dias após eclosão (n=15). As larvas expostas a 2mg/L são significativamente mais pequenas e com menos peso do que os peixes controlo. * $p < 0,001$

A imagem (C) representa a morfologia externa de larvas (5 dias após eclosão), controlo e sujeitas a 1mg/L e 2mg/L de NaOCl (exposição periódica). Nota: É de salientar a pequena dimensão e a presença tardia do saco vitelino da larva sujeita a 2mg/L NaOCl em comparação com as larvas controlo e tratada com 1mg/L NaOCl.

3.1.3 Taxas de sobrevivência (exposição periódica: segunda fase)

A exposição à concentração de 2mg/L de NaOCl afectou o desenvolvimento das larvas. De tal forma que a taxa de sobrevivência foi significativamente inferior ao grupo controlo, nesta fase do desenvolvimento tão precoce. O que se pretendeu neste estudo foi pesquisar o efeito do NaOCl em fases mais avançadas do desenvolvimento larvar, nomeadamente após a metamorfose. Neste sentido a concentração com que se pretendia trabalhar não deveria comprometer o desenvolvimento e a sobrevivência dos indivíduos. Posto isto, na seguinte fase experimental testou-se novamente a concentração de 1mg/L NaOCl, exposição periódica, mantendo-se os animais durante 15 dias com o objectivo de se saber se esta concentração teria efeitos no desenvolvimento após a metamorfose. Seguidamente, os indivíduos foram sujeitos a um tratamento de exposição periódica com a concentração de 1mg/L de NaOCl e inferiores durante 31 dias, novamente o NaOCl foi administrado na água uma única vez no início da experiência, após a eclosão das larvas. O objectivo era saber qual a concentração mínima que poderia provocar efeitos na morfologia externa e interna dos indivíduos. As respectivas taxas de sobrevivência são indicadas na figura 24.

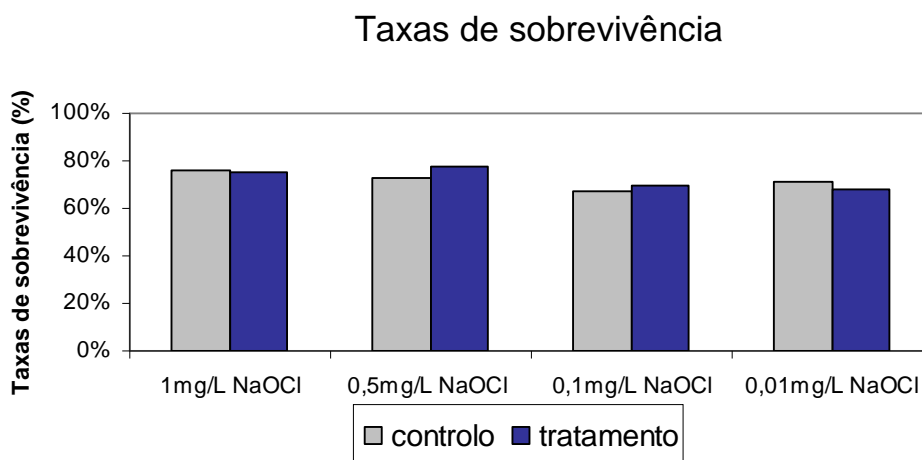


Figura 24: O gráfico apresenta as taxas de sobrevivência para: 1mg/L; 0,5mg/L; 0,1mg/L e 0,01mg/L NaOCl ao fim de 31 dias. Com um número de indivíduos por tanque respectivamente de: 100, 80, 75 e 90. Cada grupo de tratamento e respectivo controlo eram provenientes de uma mesma postura.

As taxas de sobrevivência dos peixes sujeitos a estes tratamentos foram semelhantes ao grupo controlo, indicando que estas concentrações não afectaram a sobrevivência das larvas. Posteriormente procedeu-se a análise da morfologia externa e interna dos indivíduos.

3.1.4 Taxas de sobrevivência (exposição contínua: terceira fase)

A taxa de sobrevivência nesta experiência foi de 100% para os indivíduos controlo e tratados. A exposição contínua a 0,01mg/L de NaOCl, administrado todos os dias na água durante 21 dias, não afectou a sobrevivência dos peixes sujeitos ao tratamento. A percentagem de oxigénio dissolvido na água foi de 93% e o pH de 8,5 (+/- 0,1) no tanque de tratamento e de 8,4 (+/- 0,1) no tanque controlo ao longo da experiência.

3.2 Análise morfológica externa

Fez-se a análise estatística, comparando os valores obtidos das medições efectuadas, nos grupos tratados *versus* respectivo grupo controlo. Com base no tratamento estatístico efectuado, a exposição periódica à concentração de 1mg/L NaOCl, foi a única cujos valores das medições apresentaram diferenças significativas do grupo tratado em relação ao seu controlo, em todas as idades (5 dias, 15 dias, 31 dias) Nos tratamentos efectuados com concentrações inferiores a 1mg/L NaOCl (exposição periódica), todos os valores das medições dos parâmetros morfométricos efectuadas não foram estatisticamente diferentes do respectivo grupo controlo.

Aos 5 dias após eclosão, as larvas tratadas com 1mg/L (exposição periódica) eram significativamente mais pequenas que as larvas do grupo controlo, enquanto que as larvas com 15 e 31 dias após eclosão eram significativamente maiores que os indivíduos do grupo controlo (Figura 25). Indicando que este tratamento afectou o crescimento. Por outro lado, procurou-se saber se o tratamento efectuado causou algum efeito nas proporções das partes do corpo, alterando a forma dos indivíduos. Fez-se uma análise estatística dos rácios das dimensões de diferentes partes do corpo. Neste tratamento apenas aos 31 dias houve uma alteração significativa na forma do animal. Aos 31 dias o rácio entre a altura da cabeça e o comprimento padrão foi significativamente maior nos indivíduos tratados em relação aos indivíduos controlo (Figura 26). Indicando que a altura da cabeça era desproporcionalmente maior em relação ao comprimento do animal.

No tratamento com exposição contínua de 0,01mg/L a análise da morfometria foi feita em duas idades: 7 dias e 21 dias após eclosão. Embora a exposição periódica à concentração de 0,01mg/L NaOCl não tivesse provocado nenhum efeito na morfologia externa dos

peixes, o contrário verificou-se para uma exposição contínua da mesma concentração. Este tratamento afectou significativamente o crescimento das larvas em ambas as idades. Aos 7 e 21 dias os indivíduos tratados eram significativamente mais pequenos que o grupo controlo (Figura 25). Por outro lado, também afectou a forma dos animais. Aos 7 dias o rácio entre a altura da cabeça e o comprimento padrão foi significativamente maior nos indivíduos tratados que no controlo (Figura 26), indicando que nesta idade a cabeça era desproporcionalmente maior que o comprimento do animal. Enquanto que aos 21 dias, o rácio entre a altura da cabeça e a distância do maxilar ao cleitrum e, o rácio entre a altura da cabeça e o comprimento padrão foram significativamente mais pequenos nos indivíduos tratados que os indivíduos do grupo controlo. Indicando que a altura da cabeça era desproporcionalmente mais pequena que o seu comprimento e que o comprimento total do corpo (comprimento padrão).

Apesar de terem sido efectuadas medições dos parâmetros morfométricos em todos os grupos experimentais, são apenas apresentados os resultados dos grupos de exposição periódica de 1mg/L NaOCl e exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl, pois foram os únicos que apresentaram diferenças significativas relativamente ao seu controlo (Figuras 25 e 26).

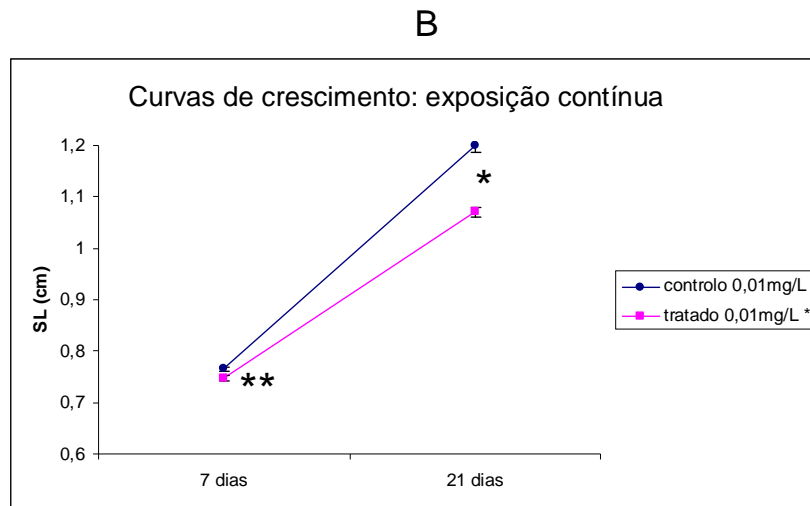
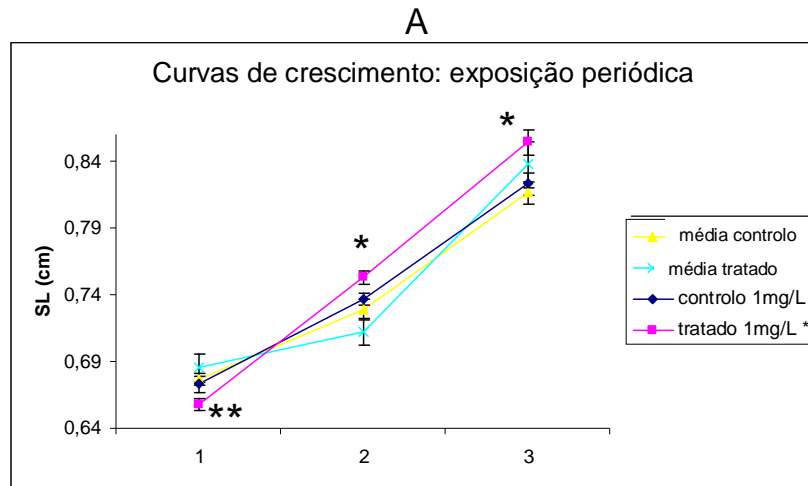


Figura 25: Curvas de crescimento de larvas (*Oreochromis mossambicus*). A= curva de crescimento médio dos grupos controlo (n=15) e tratado (n=15) (exposição periódica 0,5mg/L; 0,1mg/L; 0,01mg/L NaOCl) e a curva de crescimento do grupo controlo e tratado (1mg/L NaOCl) (n=15). B= grupo controlo e tratado (n=30) (exposição contínua de 0,01mg/L de NaOCl). * p < 0,001; **p = 0,031

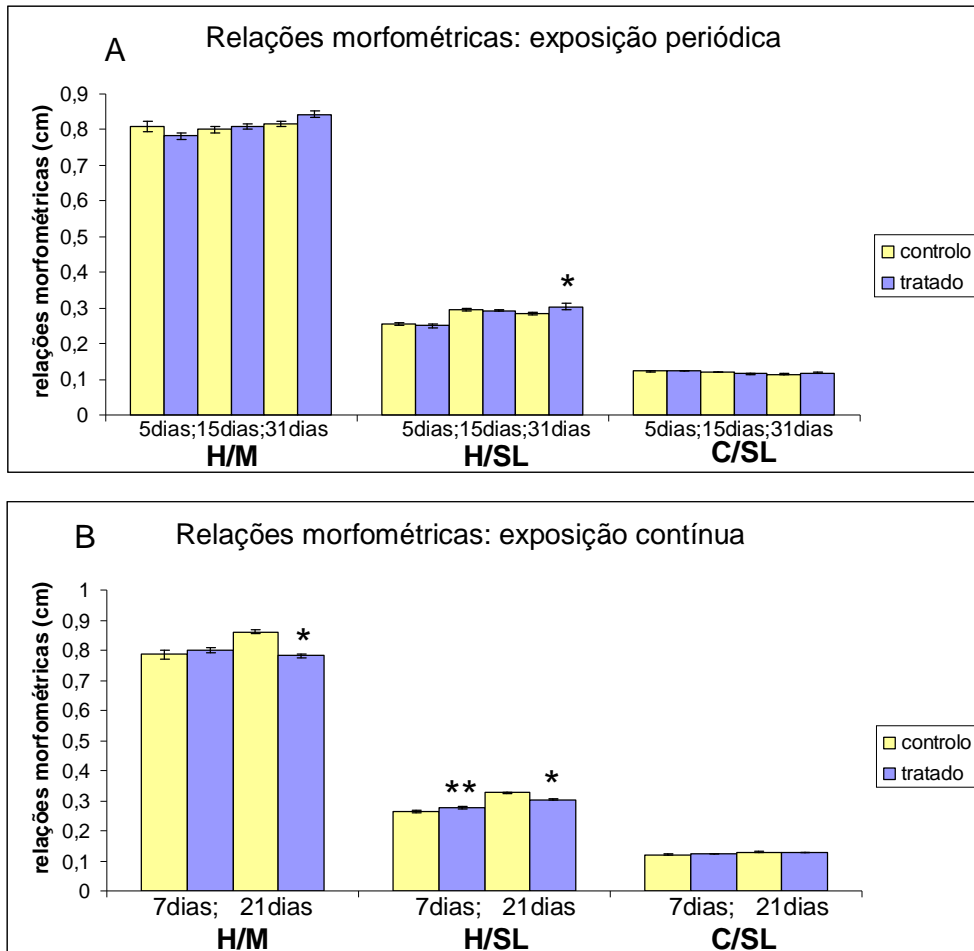


Figura 26: Relações morfométricas de larvas (*Oreochromis mossambicus*). A= grupo controlo e tratado (1mg/L de NaOCl), exposição periódica. B= grupo controlo e tratado (0,01mg/L de NaOCl), exposição contínua. H/M = rácio entre altura da cabeça e a distância do maxilar ao cleitrum. H/SL = rácio entre altura da cabeça e o comprimento padrão. C/SL = rácio entre a altura da região caudal e comprimento padrão. * o grupo tratado é significativamente inferior ao grupo controlo ($p < 0,001$). ** o grupo tratado é significativamente superior ao grupo controlo ($p = 0,027$).

As observações sugerem que uma exposição periódica de 1mg/L NaOCl e uma exposição contínua de 0,01mg/L logo após a eclosão afectam o crescimento e a morfometria desta espécie, durante esta fase do desenvolvimento larvar.

Nesta fase do estudo houve no entanto uma observação intrigante. Num dos tanques de tratamento de 0,1mg/L NaOCl (exposição periódica), após a análise estatística efectuada aos parâmetros morfométricos obtiveram-se diferenças significativas ($p < 0,001$) entre o grupo tratado e o grupo controlo e entre os próprios grupos de tratamento aos 5 dias e 15 dias. Estes indivíduos não sobreviveram à idade de 31 dias, foram morrendo gradualmente até aos 18 dias.

Após investigação pessoal sobre a origem dos tanques, conclui-se que as diferenças significativas encontradas na morfologia externa dos indivíduos expostos a 0,1mg/L NaOCl poderiam dever-se a uma contaminação por sulfato de cobre. É possível que tenha ocorrido um efeito combinado do sulfato de cobre com o NaOCl. Os indivíduos acabaram por morrer exibindo grandes deformações na cabeça, especificamente nos maxilares que os impedia de se alimentarem, apresentavam um aspecto mirrado (Figuras 27). Observações visuais destes indivíduos mostraram que estes indivíduos não conseguiam fechar os maxilares, o que os impedia de se alimentarem.

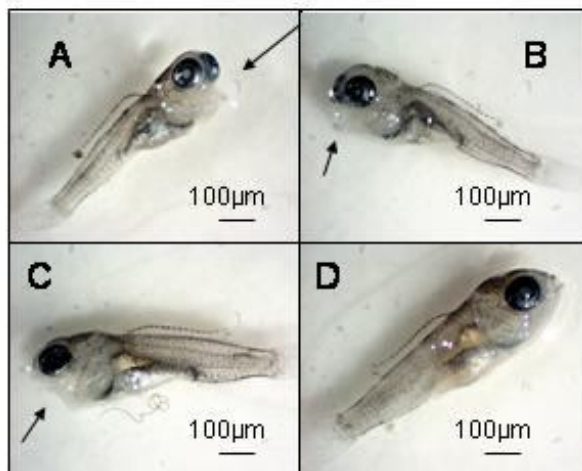


Figura 27: As figuras A e B e C são exemplos de larvas do tanque com a possível contaminação por sulfato de cobre e sujeitas ao tratamento de 0,1mg/L NaOCl. A figura D é um exemplo de uma larva do respectivo grupo controlo. Todas com a idade de 15 dias após eclosão. As setas indicam as deformações nos maxilares. Ampliação: 20x

3.3 Análise morfológica interna do esqueleto

A análise morfológica interna foi realizada através da observação das estruturas do esqueleto dos indivíduos corados com a coloração *whole mount* (cartilagem/ osso: azul de alcian/vermelho de alizarina) do grupo controlo e tratado nos vários tratamentos. Nos indivíduos sujeitos a uma exposição periódica (1mg/L; 0,5mg/L; 0,1mg/L e 0,01mg/L NaOCl), as observações foram feitas com larvas com 15 dias após eclosão. Efectuaram-se colorações aos 31 dias, mas devido a um problema experimental não foi possível fazer as observações das estruturas. Nos indivíduos sujeitos a uma exposição contínua (0,01mg/L NaOCl), as observações foram feitas nos dois pontos de amostragem aos 7 e 21 dias após eclosão.

As estruturas do esqueleto observadas estão indicadas na tabela 1 (secção 1, introdução). Apenas os indivíduos sujeitos à exposição periódica de 1mg/L NaOCl e os indivíduos sujeitos à exposição contínua de 0,01mg/L apresentaram diferenças no desenvolvimento da estrutura esquelética.

No desenvolvimento normal aos 15 dias após eclosão, larvas de *Oreochromis mossambicus*, estruturas na coluna vertebral já estão a ossificar, incluindo o corpo das vértebras, os arcos e espinhas hemais e neurais. Na cabeça estão a ossificar o opérculo, dentes e o cleitrum. Em fase de transição da cartilagem para o osso encontram-se os pterigóferos das barbatanas dorsal e anal e o uróstilo. As restantes estruturas ainda não iniciaram o processo de ossificação. Estas observações foram encontradas em todos os grupos controlo (Figura 28) e nos grupos de tratamento de exposição periódica com concentrações inferiores a 1mg/L NaOCl.

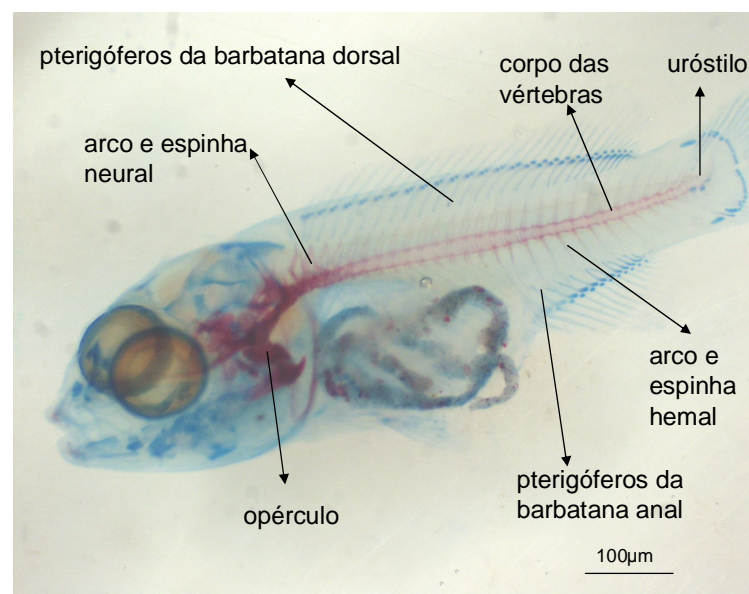


Figura 28: Dupla coloração *whole mount* da cartilagem – osso de larva *Oreochromis mossambicus* do grupo controlo com 15 dias após eclosão. As estruturas identificadas na imagem estão calcificadas ou em estado de transição da cartilagem para o osso. Ampliação 20X.

As larvas tratadas com 1mg/L NaOCl exposição periódica apresentaram um atraso na ossificação em relação ao seu controle. Nas larvas tratadas apenas o cleitrum, opérculo, dentes e a primeira vértebra estavam ossificadas. As restantes estruturas ainda não tinham iniciado o processo de ossificação (Figura 29).

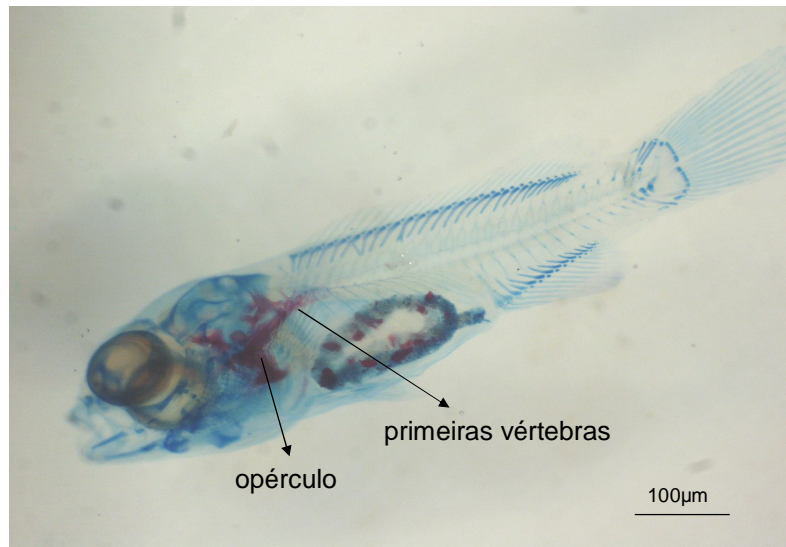


Figura 29: Dupla coloração *whole mount* da cartilagem – osso de larva *Oreochromis mossambicus* do grupo tratado 1mg/L NaOCl com 15 dias após eclosão. As estruturas identificadas na imagem estão calcificadas. Ampliação 20X.

No que respeita ao tratamento de exposição contínua (0,01mg/L) também se verificou um atraso na ossificação aos 21 dias. Aos 7 dias em ambos os grupos controle e tratado todas as estruturas ainda estavam em cartilagem, nenhuma tinha iniciado o processo de ossificação. Aos 21 dias no grupo controle toda a coluna vertebral estava ossificada, incluindo o corpo das vértebras, os arcos e espinhas hemais e neurais e as costelas pleurais. Outras estruturas como os pterigióferos das barbatanas anal e dorsal, cleitrum, opérculo e dentes também estavam ossificadas (Figura 30). No entanto, no grupo tratado apenas o cleitrum, opérculo, dentes e as 4 primeiras vértebras da coluna vertebral estavam ossificadas (Figura 31).

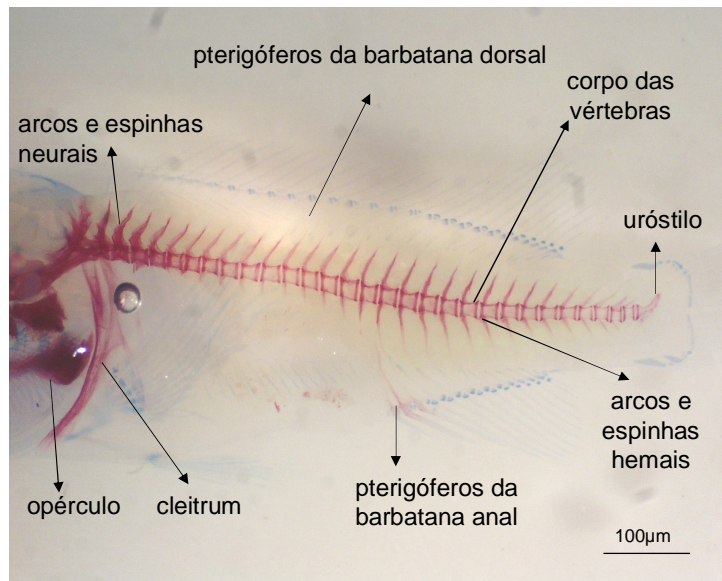


Figura 30: Dupla coloração *whole mount* da cartilagem – osso de larva *Oreochromis mossambicus* do grupo controle com 21 dias após eclosão. As estruturas identificadas na imagem estão calcificadas. Ampliação 20X

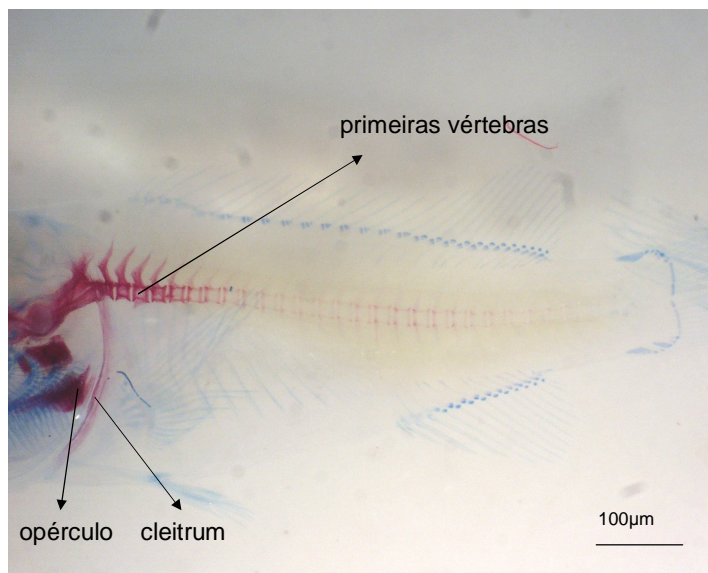


Figura 31: Dupla coloração *whole mount* da cartilagem – osso de larva *Oreochromis mossambicus* do grupo tratado (0,01mg/L NaOCl) exposição contínua com 21 dias após eclosão. As estruturas identificadas na imagem estão calcificadas. Ampliação 20X

O atraso na ossificação foi observado em ambos os grupos experimentais (exposição periódica e contínua). Os animais do grupo tratado da exposição periódica eram significativamente maiores que os do grupo controle aos 15 dias. Enquanto que os animais do grupo tratado da exposição contínua eram significativamente mais pequenos que os do grupo controle aos 21 dias. O fenótipo observado parece ser independente do crescimento. As diferenças na ontogenia do esqueleto nos dois tratamentos foram representadas graficamente pela origem do tecido ósseo, endocondral e dermal (Figura 32), e pela localização corporal (Figura 33). Os resultados indicam que os tratamentos, quer a exposição periódica de 1mg/L NaOCl, como a exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl tiveram um maior efeito no tecido de origem endocondral (Figura 32) e na parte do corpo entre a cabeça e a barbatana caudal (Figura 33). Sendo de salientar o atraso na ossificação da coluna vertebral.

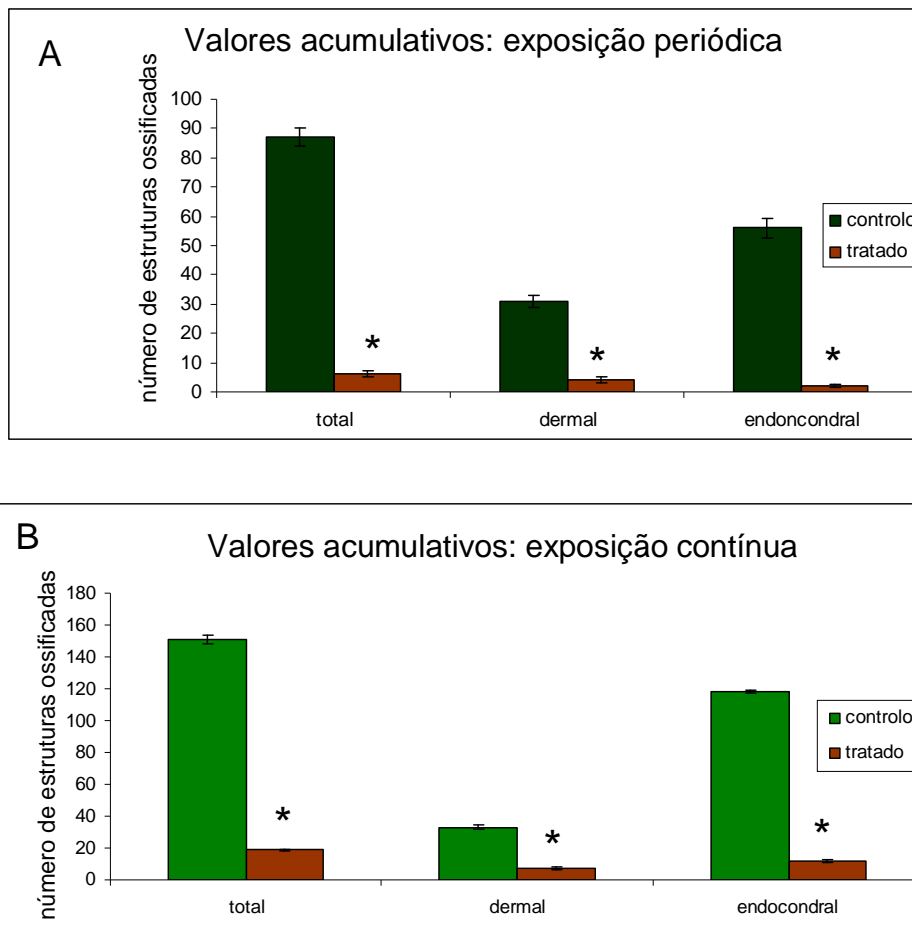


Figura 32: Valores acumulativos do número de estruturas ossificadas em larvas de *Oreochromis mossambicus*. O número das estruturas ossificadas representa uma média da contagem efectuada em 6 indivíduos do grupo controlo e 6 indivíduos do grupo tratado. As contagens são distribuídas pela sua origem: origem dermal, origem endocondral e o somatório das duas (número total de estruturas ossificadas nos indivíduos). No gráfico A, as larvas sujeitas a uma exposição periódica (1mg/L NaOCl) tinham a idade de 15dias. No gráfico B, as larvas sujeitas a uma exposição contínua (0,01mg/L NaOCl) tinham a idade de 21dias. * $p < 0,001$

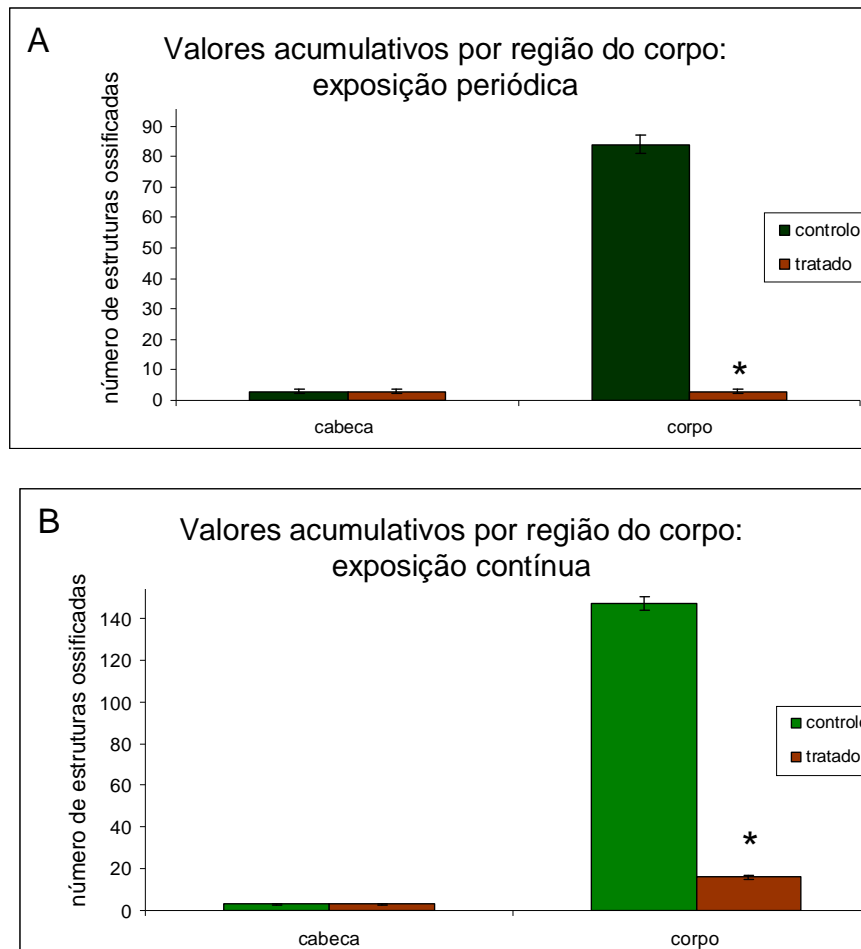


Figura 33: Valores acumulativos por região do corpo do número de estruturas ossificadas em larvas de *Oreochromis mossambicus*. O número das estruturas ossificadas representa uma média da contagem efectuada em 6 indivíduos do grupo controlo e 6 indivíduos do grupo tratado. As contagens são distribuídas pela sua localização no corpo: cabeça e restante parte do corpo (entre a cabeça e a barbatana caudal). No gráfico A, as larvas sujeitas a uma exposição periódica (1 mg/L NaOCl) tinham a idade de 15 dias. No gráfico B, as larvas sujeitas a uma exposição contínua (0,01 mg/L NaOCl) tinham a idade de 21 dias. * $p < 0,001$.

3.4 Análise histológica

Nesta fase do trabalho pretendeu-se saber se os tratamentos efectuados poderiam ter algum efeito no tecido tiróide. A medição de parâmetros como altura do tirócito, altura do núcleo do tirócito e área total dos folículos da tiróide, deram uma indicação do estado de actividade da glândula tiróide.

Cortes histológicos do tecido da tiróide de indivíduos sujeitos a uma exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl foram cuidadosamente observados. A observação macroscópica dos tecidos de ambos os grupos não permitiram observar qualquer diferença entre si. Os folículos eram pequenos, apresentavam muito colóide e havia um baixo número de folículos por corte (3 a 4 em média) (Figura 34). No entanto, com base na análise estatística efectuada aos valores obtidos das medições efectuadas, verificou-se que a altura dos tirócitos e a altura dos respectivos núcleos era significativamente mais pequena no grupo tratado que no grupo controlo (Figura 35). Enquanto que a área total dos folículos não apresentou diferenças significativas. Estes resultados indicam por um lado uma hipotrofia do epitélio dos folículos da tiróide, por outro lado, redução da actividade da tiróide sem provocar uma alteração no volume dos folículos.

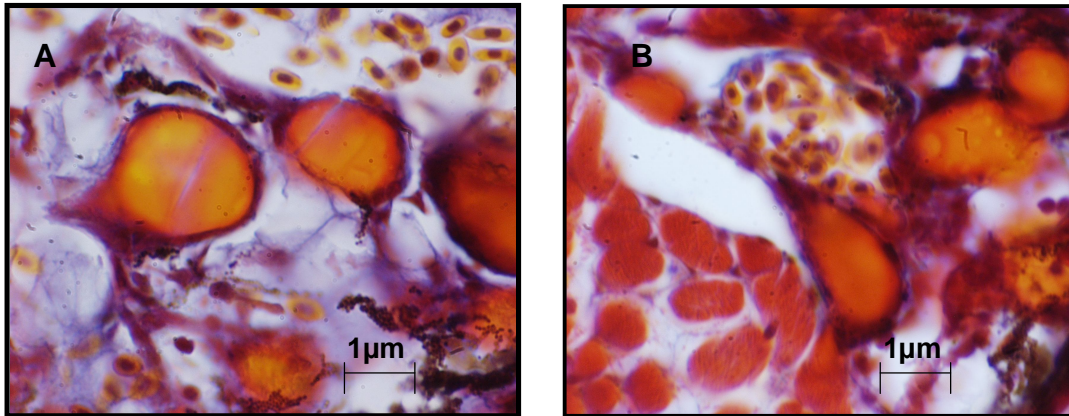


Figura 34: As imagens são secções do tecido da tiróide, com representação dos folículos, de larvas de *Oreochromis mossambicus* com 21 dias após eclosão. **A** é um corte de um peixe controlo; **B** é um corte de um peixe tratado (exposto a 0,01mg/L contínuo de NaOCl). Ampliação 1350X A coloração utilizada foi a Cleveland –Wolfe.

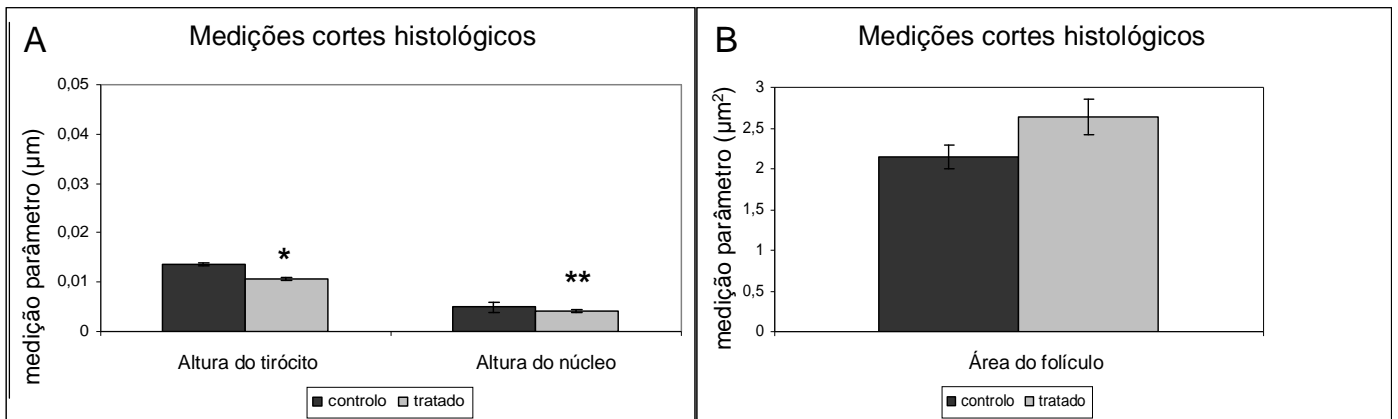


Figura 35: Medição da actividade da tiróide em larvas de *Oreochromis mossambicus*. Medição da altura dos tirócitos, da altura do núcleo dos tirócitos e da área dos folículos de secções da tiróide dos indivíduos controlo e tratado sujeitos a 0,01mg/L NaOCl com 21 dias após eclosão. n=4 para cada grupo controlo e tratado. * p <0,001; ** p= 0,039

3.5 Análise molecular

A análise molecular envolveu a quantificação da expressão por qPCR do gene BMP2, uma vez que é um gene que está envolvido no desenvolvimento do ósseo. Foi efectuada a extracção do ARNt de larvas com 15 dias sujeitas á exposicao periódica (1mg/L NaOCl) e de larvas com 21 dias sujeitas à exposição contínua (0,01mg/L), uma vez que foram os grupos experimentais onde verificaram-se alterações morfológicas significativas. No entanto, após análise da qualidade do ARNt por electroforese em gel de agarose, verificou-se que o ARNt, extraído dos animais tratados com exposição contínua, tinha degradado. Assim procedeu-se com a análise molecular do gene a partir de larvas sujeitas à exposição periódica. Os valores de expressão foram comparados com o respectivo grupo controlo. Com base na análise estatística efectuada, verificou-se que o tratamento não causou diferenças significativas na expressão deste gene nos indivíduos analisados (Figura 36).

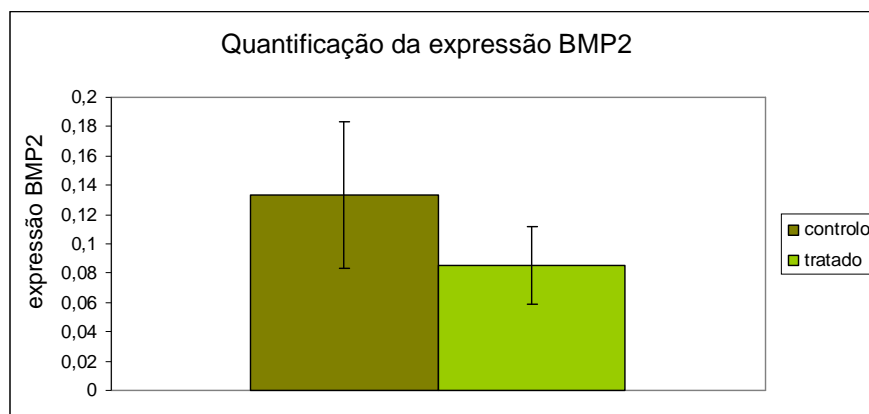


Figura 36: O gráfico representa a expressão do gene da BMP2 por qPCR em larvas de *Oreochromis mossambicus* com 15 dias após eclosão. A expressão é apresentada para o grupo tratado (exposição periódica 1mg/L NaOCl) e respectivo grupo controlo. A expressão do gene da BMP2 foi padronizada pela expressão do gene 18s, pelo que os valores apresentados são um rácio da expressão destes dois genes (BMP2/18s).

4. Discussão

4.1 Efeito do NaOCl na sobrevivência

Durante o presente estudo os indivíduos foram sujeitos a várias concentrações de NaOCl de forma a saber a consequência de diversas concentrações na sobrevivência da espécie. O NaOCl está descrito como sendo altamente tóxico para humanos, mamíferos e animais aquáticos (www.pesticideinfo.org). Para os humanos, a ingestão de uma concentração igual ou acima dos 10mg/L NaOCl é mortalmente tóxica (www.pesticideinfo.org). Para a maioria dos peixes uma concentração acima das 2,5mg/L NaOCl é mortalmente tóxica (www.pesticideinfo.org).

A exposição periódica de larvas recém eclodidas de tilápia moçambicana a concentrações superiores ou iguais a 2mg/L NaOCl comprometeu a sobrevivência das larvas. Concentrações iguais ou superiores a 5mg/L NaOCl foram mortais e a exposição à concentração de 2mg/L apresentou uma taxa de sobrevivência significativamente diferente dos animais controlo. Por outro lado, concentrações iguais ou inferiores a 1mg/L (exposição periódica) neste estudo não tiveram qualquer efeito na sobrevivência dos indivíduos. Nas larvas que estiveram expostas continuamente a uma concentração de 0,01mg/L NaOCl a sua sobrevivência não foi comprometida.

4.2 Efeito da exposição ao NaOCl na morfologia externa e no desenvolvimento do esqueleto

Os resultados obtidos demonstraram que os indivíduos tratados com NaOCl apresentaram alteração significativa na morfologia externa e na morfologia do esqueleto das larvas expostas a este composto imediatamente após a eclosão. Registou-se atraso no crescimento, alteração na morfometria corporal e atraso no processo de ossificação do tecido ósseo.

Estes resultados são semelhantes com resultados obtidos em outro trabalho, que estudou o efeito da exposição de efluentes clorados em duas espécies de peixes (Weis *et al*, 1989). Embriões de *Fundulus heteroclitus* e *Pseudopleuronectes americanus* foram expostos a efluentes tratados com cloro. Após a eclosão, as observações feitas demonstraram anomalias no tecido ósseo e um atraso no crescimento das larvas. Em mamíferos as observações são semelhantes. Foi conduzido um estudo para avaliar o efeito do HOCl em embriões de ratos, em que fêmeas grávidas ingeriram água para consumo tratada com HOCl. Ainda durante a gestação as fêmeas foram sacrificadas, os resultados demonstraram uma ossificação incompleta do esqueleto dos embriões (Abdel-Rahman *et al*, 1982). Estudos feitos com outros compostos clorados apresentaram resultados idênticos. El-Makawy *et al* (2008), estudou o efeito do cloreto de estanho (SnCl_2) em fetos de ratos. O SnCl_2 foi administrado no alimento das fêmeas grávidas, durante a gestação as fêmeas foram sacrificadas, os fetos apresentaram anomalias morfológicas externas e um atraso na ossificação do esqueleto. Em outros estudos em que embriões de rato foram expostos a um composto clorado, cloreto de tributil estanho, apresentaram também um atraso na ossificação do seu esqueleto (Harazono *et al*, 1986;

Adeeko *et al*, 2003). Em humanos houve um estudo que comparou o comprimento do corpo e morfometria da cabeça de recém nascidos cujas mães pertenciam a uma população que bebia água tratada com NaOCl e outra população que bebia água que não era tratada com cloro. Os bebés cujas mães bebiam água tratada com NaOCl apresentaram comprimento do corpo e circunferência da cabeça significativamente menores que os bebés da outra população (Källén e Robert, 2000).

4.3 Efeito da exposição do NaOCl na tiróide

Existem inúmeros compostos clorados que têm sido descritos como *disruptores* da tiróide. A exposição a vários tipos de PCBs reduziu os níveis em circulação da hormona T₄ em vários animais (Goldley *et al*, 1995; Bastomsky, 1997a,b; Zoeller *et al*, 2000) e tem causado estados de hipotiroidismo (Brouwer *et al*, 1999; Crofton *et al*, 2000; Crofton, 2004). A exposição ao perclorato, na forma de sal ou perclorato de amónia, também causou hipotiroidismo em vários animais (Bradford *et al*, 2005; Mukhi *et al*, 2007; Chen *et al*, 2008). No caso do NaOCl, (como mencionado na secção 1, introdução), alguns estudos demonstraram que mamíferos expostos a este desinfectante, na água ingerida, apresentaram um estado de hipotiroidismo (Bercz *et al*, 1981; Revis *et al*, 1985; Revis *et al* 1986). No entanto, apesar de existirem indícios de que este composto actue como disruptor da tiróide, não existem ainda estudos suficientes que incluam este contaminante na lista de *disruptores* endócrinos (www.pesticideinfo.org).

Neste estudo nas larvas tratadas com 0,01mg/L NaOCl (exposição contínua) a altura das células e dos respectivos núcleos (tirócitos) dos folículos da tiróide foi significativamente mais pequena que nos indivíduos do grupo controlo, indicando uma hipotrofia das

células. Estes dois parâmetros (altura das células e dos núcleos) estão correlacionados positivamente com o nível de estimulação por parte da hormona estimuladora da tiróide (TSH) sob condições em que a produção das hormonas da tiróide é alterada (Payenter *et al*, 1988; Hadley, 2000; Capen *et al*, 2001). Uma redução da concentração das hormonas da tiróide em circulação resulta num aumento da secreção da TSH. O inverso, um aumento da concentração das hormonas da tiróide em circulação resulta numa diminuição da secreção da TSH, processo denominado *feedback* negativo (Payenter *et al*, 1988; Capen *et al*, 2001; Bradford *et al*, 2005). Concentrações elevadas de TSH causam hipertrofia dos tirócitos, enquanto que concentrações baixas de TSH causam hipotrofia dos tirócitos (Hadley, 2000; Bradford *et al*, 2005).

As modificações morfológicas na tiróide que o tratamento causou resultaram numa hipotrofia das células dos folículos da tiróide, o que indicam um aumento na concentração das hormonas da tiróide em circulação. No entanto, as modificações morfológicas externas e no tecido ósseo estão de acordos com outros estudos que relacionam a exposição ao NaOCl a estados de hipotiroidismo (Bercz *et al*, 1981; Revis *et al*, 1985; Revis *et al* 1986), uma vez que o hipotiroidismo tem sido associado a atrasos no crescimento e no processo de ossificação do tecido ósseo de vários animais (Orme *et al*, 1985; Bassett *et al*, 2008; Marino *et al*, 2008). Salientando-se o facto da importância das hormonas da tiróide na fase do desenvolvimento larvar (Power *et al*, 2001), será de esperar que um decréscimo das mesmas provoquem um significativo atraso no desenvolvimento dos indivíduos. Por outro lado, estudos têm demonstrado que o cloro (em forma de ião hipoclorito ou ácido hipocloroso) pode oxidar o iodeto a iodo molecular (Lister e Rosenblum, 1963; Burger e Liebhafsky, 1973; Palmer e Lietzke, 1980; Tian e

Dasgupta 2000). Uma vez que a tiróide apenas tem capacidade para utilizar este composto para a síntese das hormonas da tiróide na forma de iodeto, um decréscimo deste poderá levar a um decréscimo da produção das hormonas da tiróide, resultando num estado de hipotiroidismo. Por outro lado, existe a possibilidade do cloro reagir com moléculas orgânicas que contenham o iodo, afectando a libertação do ião iodeto e substituir o iodeto na molécula (Burger e Liebhafsky, 1973; Palmer e Lietzke, 1980; Revis *et al*, 1986). Se ocorresse uma substituição nas hormonas da tiróide do iodo pelo cloro, poderia resultar em moléculas não funcionais, ou menos activas se baixasse a sua afinidade aos respectivos receptores nucleares, resultante de uma alteração na conformação da molécula. No entanto, a forma como o NaOCl actua de forma a provocar este efeito ainda permanece desconhecida.

Conhecidos *disruptores* da tiróide como o perclorato, inibem a síntese das hormonas da tiróide, pela supressão da captação do iodeto por parte do simporte iodo/sódio (NIS), o que leva a um aumento da produção de TSH (Wolff, 1998; Capen, 2001). Este efeito causa hiperplasia das células dos folículos da tiróide (Bradford *et al*, 2005; Mukhi *et al*, 2006), o que indica que a presença do contaminante está por um lado a provocar diminuição das hormonas da tiróide, no entanto o organismo está reagir para contrariar esta diminuição com um aumento da secreção da TSH. O que estimula a glândula tiróide a produzir mais hormonas.

O tratamento com o NaOCl causou um atraso no crescimento e um atraso na ossificação do tecido ósseo, o que são indicações do estado de hipotiroidismo dos animais. Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que este contaminante provoca estados de hipotiroidismo. Seria assim de esperar uma hiperplasia das células dos folículos da

tiróide, devido ao aumento da secreção da TSH induzida pela diminuição do nível de hormonas da tiróide em circulação (hipotiroidismo). Contudo, o tratamento com NaOCl causou uma hipotrofia das células dos folículos da tiróide. Estas observações sugerem que o NaOCl não só é um disruptor da tiróide, como é provavelmente um disruptor do eixo hipotálamo – hipófise – tiróide, interrompendo ou inibindo de alguma forma o *feedback* negativo da TSH. A forma como este mecanismo se processa permanece desconhecido.

4.4 Atraso na ossificação do tecido ósseo, efeito directo ou indirecto?

As hormonas da tiróide apresentam um papel fundamental no desenvolvimento do tecido ósseo quer de origem dermal, quer de origem endocondral, em humanos e animais (Marians *et al*, 2003; O'Shea *et al*, 2005; Bassett *et al*, 2007; Bassett *et al*, 2008). Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado a importância do eixo hipotálamo – hipófise – tiróide no desenvolvimento do tecido ósseo, nomeadamente o papel da TSH neste processo (Sampath *et al*, 2007; Bassett *et al*, 2008). O hipotiroidismo causa um atraso na ossificação do tecido ósseo, por outro lado, uma concentração normal da TSH é importante para um desenvolvimento adequado do esqueleto, pois a TSH inibe a diferenciação dos osteoblastos (Abe *et al*, 2003; O'Shea *et al*, 2005; Bassett *et al*, 2007; Bassett *et al*, 2008). Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a exposição ao NaOCl pode ter interferido com o eixo hipotálamo – hipófise – tiróide e que houve uma provável diminuição do nível das hormonas da tiróide. Fica por se perceber se o atraso na ossificação do tecido ósseo dos indivíduos expostos ao NaOCl foi resultado de um efeito

tóxico que o NaOCl teve no tecido esquelético. Ou em alternativa, causado devido ao efeito que este contaminante provocou na tiróide.

Importa salientar que os mecanismos pelos quais este contaminante actuou de forma a causar as alterações na morfologia destes animais permanecem desconhecidos, sendo necessário que se efectuem trabalhos futuros que possam responder a estas questões.

Numa tentativa de se perceber qual o mecanismo fisiológico pelo qual o NaOCl poderá ter provocado um efeito directo, atraso no processo de ossificação do osso, foi estudada a expressão do gene da BMP2, afim de saber se a expressão deste gene importante neste processo foi afectada pelo tratamento. Este gene está envolvido no processo de ossificação do tecido ósseo (Wan e Cao, 2004; Cao e Chen 2005; Leboy, 2006) e não é conhecido que seja regulado pela glândula tiróide. No entanto, no momento em que os animais foram sacrificados a expressão deste gene nos animais tratados não foi significativamente diferente dos animais controlo. Sugerindo que por um lado, o atraso na ossificação não ocorreu pelo mecanismo que envolve esta proteína. Ou por outro lado, no momento em que estes animais foram sacrificados a expressão deste gene já estava estabilizada. É de salientar que o estudo da expressão deste gene foi analisado em animais expostos a uma concentração de 1mg/L NaOCl de exposição periódica. Como o tratamento foi administrado uma única vez, os animais podem ter apresentando o fenótipo, mas ao nível molecular os sinais podiam já ter estabilizado. Concluindo-se que neste estudo, este gene não foi um bom marcador do processo de ossificação.

Será importante o estudo da expressão do gene da fosfatase alcalina e da osteocalcina, pois são genes que regulam processos envolvidos na ossificação do tecido ósseo posteriores à diferenciação nos osteoblastos. Estão envolvidos respectivamente no

processo de produção da matriz óssea e na mineralização desta matriz (Stein e Lian, 1993; Junqueira et al, 1995). O estudo da expressão destes genes poderia indicar se o atraso da ossificação observada ocorreu durante a produção da matriz óssea ou durante a sua mineralização. Por outro lado, estes dois genes são regulados pela hormona da tiróide T_3 (Harvey *et al*, 2003). Se houver diferenças na expressão destes genes, isto pode indicar que o fenótipo observado no osso pode ter sido um efeito indirecto, resultado do efeito que o NaOCl causou na tiróide.

Por último, o estudo da expressão do gene da TSH poderá ajudar na compreensão de como o eixo hipotálamo – hipófise – tiróide está a responder ao efeito causado pela exposição do NaOCl na glândula tiróide (hipotrofia dos tirócitos: redução da actividade da tiróide). E poderá dar uma indicação se este gene está envolvido no fenótipo observado no osso, dada a sua importância no desenvolvimento do esqueleto.

4.5 Enquadramento ambiental

No trabalho realizado verificou-se que a exposição a concentrações iguais ou acima das 2mg/L NaOCl comprometeram significativamente a sobrevivência dos indivíduos. Por outro lado, uma exposição periódica de 1mg/L e uma exposição contínua de 0,01mg/L NaOCl causaram alterações morfológicas significativas que podem vir a comprometer o desenvolvimento, maturação e reprodução dos animais.

Exemplos de valores legislativos para a concentração de cloro residual são:

- Para as águas de consumo humano, no Brasil em alguns estados recomenda-se um valor de cloro residual de 2mg/L (www.sgc.goias.gov.br).
- Em Portugal para as águas de consumo humano, o valor mínimo recomendado é de 0,2mg/L e o máximo de 0,6mg/L de cloro residual (Decreto – Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto). Em piscinas públicas o valor mínimo de cloro residual é de 0,5mg/L e o máximo de 2mg/L (Decreto – Lei nº 121/02 de 3 de Maio);
- No governo Canadiano, os valores máximos de exposição contínua directa por lei permitidos para os organismos aquáticos é de 0,003mg/L de cloro residual, enquanto que para os organismos marinhos o valor máximo permitido é de 0,002mg/L de cloro residual, enquanto que para águas de irrigação o valor máximo de exposição periódica é de 1mg/L de cloro residual (www.env.gov.bc.ca).

Estes valores sugerem que mundialmente a amplitude de valores que pode ser encontrada é elevada. Na União Europeia a indústria do cloro representa 55% da produção de toda a indústria química (www.euractiv.com). A regulamentação que melhore a sustentabilidade ambiental deste sector, que passa pela redução das emissões de efluentes para ambientes aquáticos, não está ainda definida, devido à complexidade do sector (www.euractiv.com).

É por isso muito provável que várias populações de animais possam estar expostas ao intervalo de valores testado neste trabalho que causou modificações importantes nestes animais. Este estudo poderá então contribuir para a regulamentação deste composto.

5. Conclusões

No presente estudo verificou-se que a exposição precoce ao NaOCl provocou efeitos no desenvolvimento larvar desta espécie. Os efeitos observados foram: alterações na morfometria dos animais, atraso no crescimento e na ossificação do tecido ósseo e redução da actividade da tiróide, indicando que o NaOCl poderá ser considerado um potencial disruptor endócrino em peixes.

Ficou por se perceber se o atraso na ossificação do tecido ósseo dos indivíduos expostos ao NaOCl foi resultado de um efeito tóxico que o NaOCl teve no tecido esquelético. Ou se o fenótipo observado no desenvolvimento pode ter sido um efeito indirecto de origem endócrina. Por outro lado, importa realçar que os mecanismos fisiológicos pelos quais este contaminante actuou de forma a causar as alterações observadas permanecem desconhecidos, sendo necessário que se efectuem trabalhos futuros que possam responder a estas questões.

Em última abordagem salienta-se que a concentração mínima de cloro residual que deve ser mantida em águas de piscinas indicada por vários países é de 1mg/L. Foi importante observar que uma única exposição numa fase precoce do desenvolvimento larvar de 1mg/L NaOCl provocou um atraso tão significativo no desenvolvimento do esqueleto. Será de prever que facilmente águas tratadas com cloro sejam directamente descarregadas para sistemas aquáticos devido à falta de legislação específica existente para este assunto. Podendo este estudo contribuir para regulamentação deste composto, no que respeita a exposição do mesmo a organismos aquáticos.

6. Trabalho Futuro

Os efeitos observados no desenvolvimento do esqueleto e na tiróide, poderão comprometer o desenvolvimento em fases posteriores. Tornando-se necessários estudos futuros mais prolongados para se perceber se estes efeitos poderão afectar a sobrevivência na fase adulta e a reprodução destes animais. Em particular, acompanhamento do desenvolvimento até à idade adulta de animais expostos periodicamente ao NaOCl.

Seria importante efectuar estudos da expressão dos genes da osteocalcina, fosfatase alcalina e TSH, numa tentativa de entender quais os mecanismos no processo de ossificação que são afectados pela exposição ao NaOCl. E de que forma o eixo hipotálamo – hipófise – tiróide responde ao efeito causado por este composto na tiróide. O estudo da expressão destes genes também poderia ajudar a responder se os efeitos observados no tecido ósseo foram resultado de um efeito tóxico do NaOCl, ou se poderá ter sido um efeito indirecto, resultado do efeito que o NaOCl causou na tiróide.

A quantificação das hormonas da tiróide também seria um trabalho importante a realizar, pois permitiria entender se de facto, a hipotrofia observada nos tirócitos, que indicam uma redução na actividade da hormona tiróide, tinha resultado de facto num estado de hipotirodismo nos animais expostos ao NaOCl. A identificação destas hormonas por espectrometria de massa também permitirá saber se houve uma transformação química destas moléculas, resultado de uma possível substituição do iodo pelo cloro.

7. Referências Bibliográficas

- Abdel-Rahman M. S., Berardi M. R. and Bull R. J. (1982), Effect of chlorine and monochloramine in drinking water on the developing rat fetus, Journal of Applied Toxicology , Pages156-159;
- Abe E., Mariani R. C., Yu W., Wu X., Ando T., Li Y., Iqbal J., Eldeiry L., Rajendren G., Blair H. C., Davies T. F., Zaidi M. (2003) TSH is a Negative Regulator of Skeleton Remodeling. Cell 115: 151-162;
- Abe T., Suzuki T., Unno M., Tokui T., Ito S. (2002) Thyroid hormone transporters: recent advances. Trends in Endocrinology and Metabolism 13: 215-220;
- Adeeko A., Li D., Forsyth S. D., Casey V., Cooke M. G., Barthelemy J., Cyr G. D., Trasler M. J., Robaire B., Hales F. B. (2003) Effects in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. Toxicol. Sci. 74: 407-415;
- Agrawala N., Dixit R. K. (1979). Seasonal variations in the pharyngeal and pronephric thyroid tissues of the fresh water teleost *Puntius sophore* (Ham). Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 93:138 -146;
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1994) Molecular Biology of the Cell, 3rd Edition. Garland Publishing, Inc. New York, USA;
- Araya M., Siah A., Mateo D., Markham F., McKenna P., Johnson G., Berthe F. C. J. (2008) Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-

- shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. Journal of Invertebrate Pathology 99: 326-331;
- Bardach J. E., Ryther J. H., McLarney W. O. (1972) Aquaculture, the farmind and husbandry of freshwater and marine organisms. Wiley Interscience. New York, USA;
 - Barnes C. S., Kennedy K., Garde L., Forrest E., Johnson L., Pacheco F., Hu, F., Amado M., Portnoy J. M. (2008) The impact of home cleaning on quality of life for homes with asthmatic children. [Allergy and Asthma Proceedings](#), Volume 29, Number 2, pp. 197-204;
 - Bartlett J. M. S., Stirling D. (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction. [Methods Molecular Biology](#) 226: 3-6;
 - Bassett J. H. D., Nordström K., Boyde A., Howell P. G.T., Kelly S., Vennström B., Williams G. R. (2007) Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. [Molecular Endocrinology](#) 10: 60-71;
 - Bassett J. H., Williams A. J., Murphy E., Boyde A., Howell P. G., Swinhoe R., Archanco M., Flamant F., Samarut J., Costaqliola S., Vassart G., Weiss R. E., Refetoff S., Williams G. R. (2008) A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism. [Molecular Endocrinology](#), 22(2):501-12;
 - Bastomsky C. H. (1997a) Goiters in rats fed polychlorinated biphenyls. [Can. J. Physiology](#) 55: 288-292;

- Bastomsky C. H. (1997b) Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiters in rats after single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin. Endocrinology 101: 292-296;
- Bauman D. (1999) How to decided when to remove chloramines. Water Technology Magazine 22;
- Bercz J. P., Jones L., Garner L., Murray D., Luwing D. A., Boston J. (1981) Subchronic toxicity of Chlorine Dioxide and related compounds in drinking water in the nonhumane primate. Presented at International Symposium on the Health Effetcs of Drinking Water Disinfectants and Disinfection By-products, Cincinnati, Ohio;
- Bercz P. J., Jones L. L., Harrington R., Bawa R., Condle L. (1986) Mechanistic Aspects of Ingested Chlorine Dioxide on Thyroid Function: Impact of Oxidants on Iodide Metabolism. Environmental Health Perspectives 69: 249-255;
- Berends W., Stoppelenburg D. (1990) From common salt to poison cocktail. Amsterdam Milieudefensie 60pp;
- Bhattacharya S., Das R. H., Datta, A. G. (1976). Iodine metabolism in dispersed pharyngeal and head kidney teleostean thyroid cells obtained by continuous trypsinization. Gen. Comp. Endocrinol 30: 128 -130;
- Birboim HC, Doly J Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23;
- Bogra P., Nikhil V., Singh S. V., Makkar S. (2003) Study of Dimercapto of succinic acid, Sodium hypochlorite and their combination used as irrigant in root canals – An in vitro study. Endodontology Volume 15: 19-25;
- Bradford C. M., Rinchar J., Carr J. A., Theodorakis C. (2005) Perchlorate Affects Thyroid Function in Eastern Mosquitofish (Gambusia holbrooki) at

- Environmentally Relevant Concentrations. Environment Science and Technology 39: 5190-5195;
- Brouwer A., Longnecker M. P., Birnbaum L. S., Cogliano J., Kostyniak P., Moore J., Schantz S., Winneke G. (1999) Characterization of potential endocrine-related health effects at low dose levels of exposure to PCBs. Environ. Health Perspect. 107: 639-649;
 - Bucking C., Wood C. M. (2006) Gastrointestinal processing of Na⁺, Cl⁻, and K⁺ during digestion: implications for homeostatic balance in freshwater rainbow trout. American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, Volume 291: R1764-R1772;
 - Burger J. D., Liebhafsky H. A. (1973) Thermodynamic data for aqueous iodine solutions at various temperatures. Analytical Chemistry 45: 600-602;
 - Burkhard A., Reibe S., Feitosa N., Elsalini O. A., Wendl T., Rohr K. B. (2006) Analysis of Origin and Growth of the Thyroid Gland in Zebrafish. Developmental Dynamics 235: 1872-1883;
 - Campinho M. (2001), A influência da temperatura de incubação no crescimento e desenvolvimento esquelético e muscular em *Oreochromis mossambicus*, tilápia moçambicana, Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Biotecnológica, Universidade do Algarve;
 - Cao X., Chen D. (2005) The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene 357: 1-8;

- Capen C. C. (2001) Toxic response of endocrine system. In: Klaassen, C. D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th ed. McGraw-Hill, New York 711-759;
- Chen Y., Sible J. C., McNabb F.M. A.(2008) Effects of maternal exposure to ammonium perchlorate on thyroid function and the expression of thyroid-responsive genes in Japanese quail embryos. General and Comparative Endocrinology 159: 196-207;
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-9;
- Crofton K. M. (2004) Development disruption of thyroid hormone: correlations with hearing dysfunction in rats. Risk Anal. 24: 1665-1671;
- Crofton K. M., Kovadanti P. R., Derr-Yellin E. C., Casey A. C., Kehn L. S. (2000) PCBs, thyroid hormones, and ototoxicity in rats: cross-fostering experiments demonstrate the impact of postnatal lactation exposure. Toxicol. Sci. 57: 131-140;
- Dingerkus, G; Uhler, LD. (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technol. 52:229–232;
- Dorit R. L., Walker W. F., Barnes R. D. (1991) Zoology, International Edition. Saunders College Publishing. Philadelphia, USA;

- El-Makawy A., Girgis M. S., Khalil K. B. W (2008) Developmental and genetic toxicity of stannous chloride in mouse dams and fetuses. Mutation Research 657: 105-110;
- Elsalini O. A., Gartzzen J., Cramer M., Rohr K. R. (2003) Zebrafish *hhex*, *nk2.1a* and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. Dev. Biol. 263: 67-80;
- EPA: U.S. Environmental Protection Agency. (1999) [Integrated Risk Information System \(IRIS\) on Chlorine](#). National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC;
- Frisé L., Frisé M. (1967). Analysis of the topographic distribution of thyroid activity in a teleost fish: *Carassius carassius* L. Acta Endocrinol. 56: 533 -546;
- Geven E. J. W., Nha-Khanh N., Boogaart M. F. A., Spanings F. A. T., Flik G., Klaren P. H. M (2007) Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) Journal of Experimental Biology 210, 4005-4015;
- Ginzinger D.G. (2002) Gene Quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp. Hematol. 30: 135-140;
- Goldley E. S., Khen L. S., Lau C., Rehnberg G. L., Crofton K. M., (1995) Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. Toxicology Appl. Pharmacology 135: 77-88;
- Hadley M. E. (2000) Endocrinology. Princet Hall: Upper Saddle River NY;

- Hadley M.E. (1992) Endocrinology (3rd ed.), Prentice-Hall International, London;
- Harazono A., Ema M., Ogawa Y. (1986) Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. Toxicol. Lett. 89: 185-190;
- Harrington R. M., Shertzer H. G., Bercz J. P. (1986) Effects of chlorine dioxide on thyroid function in the African green monkey and the rat. Environmental Health Perspectives 19(2):235-42;
- Harvey C. B., Stevens D. A., Williams A. J., Jackson D. J., O'Shea P., Williams G. R. (2003) Analysis of thyroid hormone responsive gene expression in osteoblastic cells. Molecular and Cellular Endocrinology 213: 87-97;
- Helbing C. C., Ovaska K., Lan Ji (2006) Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. Aquatic Toxicology [Volume 80, Issue 1](#), 25 October 2006, Pages 42-51;
- IJC International Joint Commission (1992) Sixth Biennial Report on Great Lakes Water Quality. Ottawa and Washington, D.C., 60pp;
- IJC International Joint Commission (1993) A Strategy for Virtual Elimination of Persistent Toxic Substances. Volume 1 e 2, Windsor, Ontario, 72pp e 102pp;
- Jenkins J. (2000) The Humanure Handbook: A Guide to Composting Human Manure, 2nd Edition. Chelsea Green Publishing USA;
- Johnston P., McCrea I. (1992) Death in small doses. The effects of organochlorines on Aquatic ecosystems. Amsterdam, Greenpeace, 28pp;
- Junqueira C., Carneiro J., O.Kelley R. (1995) Basic Histology. 8^o Edition, Appleton e Lange, USA;

- Källén B. A. J., Robert E. (2000) Drinking water chlorination and delivery outcome—a registry-based study in Sweden. *Reproductive Toxicology* 14: 303-309;
- Kleijn R., E. van der Voet (1998) Chlorine in Western Europe. A MacTempo Case study. Summary Report. EC Environment and Climate Research Program (1994 – 1998). Center of Environmental Science, Leiden University, The Netherlands;
- Klymkowsky M.W., Hanken J. (1991) Whole-mount staining of Xenopus and other vertebrates. *Methods Cell Biol.* 36: 419–441;
- Le Dourain N., Fontaine J., Le Lievre C. (1974) New studies on the neural crest origine of the avian ultimobranchial glandular cells – interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amineprecursors. *Histochemistry* 38: 297-305;
- Leatherland J. F.(1994), Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind. *Guelph Ichthyol Rev* 2:1-67;
- Leboy P. S. (2006) Regulating Bone Growth and Development with Bone Morphogenetic Proteins. *Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease, and Aging* 1068: 1-575;
- Lister M. W., Rosenblum P. (1963) Rates of reaction of hypochlorite ions with sulphite and iodide ions. *Canadian Journal of Chemistry* 41;

- Marino R., Hegde A., Barnes K. M., Schrier L., Emons J. A., Nilsson O., Baron J. (2008) Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence. *Endocrinology* 149(4):1820-8;
- Mayeno A. N., Curran A. J., Roberts R. L., Foote C. S. (1989) Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents. *Biol. Chem.* 264: 5660-5668;
- Mukhi S., Torres L., Patiño R. (2007) Effects of larval-juvenile treatment with perchlorate and co-treatment with thyroxine on zebrafish sex ratios. *General and Comparative Endocrinology* 150: 486-494;
- Nussey S., Whitehead S.A. (2001) Endocrinology: an integrated approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd;
- O' Shea P. J., Sriskantharajah S., Yao H., Suzuki H., Cheng S. Y., Chassande O., Samarut J., Williams G. R. (2005) Thyroid hormone (T3) activates GH/IGF-1 signalling during skeletal development. *British Endocrine Societies Joint Meeting* 9: P149;
- Orme J., Taylor D. H., Laurie R. D., Bull R. J. (1985) Effects of chlorine dioxide on thyroid function in neonatal rats. [Journal of Toxicological Environment Health](#), 15(2):315-22;
- Palmer D. A., Lietzke M. H. (1980) The fifth trihalomethane: Dichloriodomethane, its stability and ocurrentes in chlorinated drinking water. *Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects* 3: 161-168;

- Payenter O. E., Burin G. J., Jaeger R. B., Gregorio C. A. (1988) Goitrogens and thyroid follicular cell neoplasia: evidence for a threshold process. Regul. Toxicology Pharmacology 8: 102-119;
- Phillips M. L., Spotts S. (1995) Chlorine and Chloramine Analysis Methods. Water Technology, Volume 18 Issue 11;
- Porterfield S. P., Henderson C. E. (1993) The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development – current perspectives. Endocr. Rev. 14: 94-106;
- Power D. M., Llewellyn L., Faustino M., Nowell M. A., Björnsson B. Th., Einarsdottir I. E, Canario A. V. M., Sweeney G. E. (2001) Thyroid hormones in growth and development of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Volume 148, Issue 3, Pages 195-292;
- Qureshi T. A., Belsare D. K., Sultan R. (1978). Head-kidney thyroid in some Indian teleosts. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 92: 352 -358;
- Raine J. C., Leatherland J. F. (2000) Morphological and functional development of the thyroid tissue in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) embryos. Cell tissue Res 301: 235-244;
- Revis N. W., McCauley P., Holdsworth G. (1986) Relationship of Dietary Iodide and Drinking Water Disinfectants to Thyroid Function in Experimental Animals. Environmental Health Perspectives 69: 243-248;
- Revis N. W., Osborne T. R., McCauley P., Bull R., Holdsworth G., (1985) The effect of drinking water containing chlorine on cholesterol metabolism in the White Carneau pigeon and New Zealand rabbit. Environmental Health Perspectives;

- Rousset, B, Dunn, J. (2004). Thyroid Synthesis and Secretion. Thyroid Manager.org. Accessed December 6, 2008, Website: <http://www.thyroidmanager.org/Chapter2/2-frame.htm>;
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press;
- Sathyanesan A. G. (1963). Functional renal thyroid follicles in wild specimens of the freshwater teleost *Barbus stigma* Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 59,530 -534;
- Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocrin Rev 1993;14:424-42;
- Tacon, A.G.J. (1987) The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. 2. Nutrient sources and composition. FAO Field Document, Project GCP/RLA/075/ITA Field Document No. 5, Brasilia, Brazil. 129 pp;
- Thornton J. (1991) Chlorine, human Health, and the environment. The breast cancer warning. Washington D.C., 67pp;
- Tian K., Dasgupta K. P. (2000) Simultaneous fluor-injection measurement of hydroxide, chloride, hypochlorite and chlorate in Chlor-alkali effluents. Talanta 52: 623-630;
- Turner C. D., Bagnara J. T. (1976) General Endocrinology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA ;

- Vandesompele J., Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real time RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3: 1-12;
- Wan M., Cao X. (2004) BMP signaling in skeletal development. Biochemical and Biophysical Research Communications 328: 651-657;
- Weis P., Weis J.S., Greenberg A. (1989) Treated municipal wastewaters: effects on development and growth of fishes. Marine Environmental Research. 28:527-532;
- Weisser M., Haferlach T., Schoch C., Hiddemann W., Schnittgger S. (2004) The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. Leukemia 18: 1551-1553;
- Wendl T., Lun. K., Mione M., Favor J., Brand M., Wilson S. W., Rohr K. B. (2002) pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. Development 129: 3751-3760;
- Wolff J. (1998) Perchlorate and the thyroid gland. Pharmacology Rev. 50, 89-105;
- www.allergreen.com;
- www.biocat.com;
- www.dbc.uem.br;
- www.e-biolearnig.com/bbs/attachments;
- www.env.gov.bc.ca;
- www.euractiv.com;

- www.health.alberta.ca/documents/Standards-Pools;
- www.healthyswimming.org;
- www.inra.fr/internet/Centres/toulouse/pharmacologie;
- www.lenntech.com;
- www.mindfully.org;
- www.nap.edu;
- www.pesticideinfo.org;
- www.policontrol.com.br;
- www.sgc.gioas.gov.br;
- www.spdem.org;
- www2.dpi.qld.gov.au/extra/aquaticinvaders/add_noxious_nonindigenous.html;
- www2.dpi.qld.gov.au/extra/aquaticinvaders/add_noxious_nonindigenous.html;
- Yamano K., Miwa S. (1998) The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. Aquaculture 135: 87-98;
- Yen, Chin (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. Trends Endocrinology Metab 5: 65-72;
- York R. G., Funk K. A., Girard M. F., Mattie D., Strawson J. E. (2003) Oral (drinking water) developmental toxicity study of ammonium perchlorate in Sprague-Dawley rats. [International Journal of Toxicology](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12720000), 22(6):453-64;
- Zoeller R. T., Dowling A. L., Vas A. A. (2000) Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression

of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. Endocrinology 141: 181-189.

8. Anexos

Anexo 1: Tratamento das lâminas com APES

O tratamento das lâminas com APES é um método alternativo que melhora a adesão das lâminas aos tecidos.

As lâminas foram colocadas em suportes e imergidas durante 30min em ácido/álcool 1% (1% v/v HCl concentrado, 70% etanol, 29% água) o que permitiu a limpeza das lâminas. Após esta imersão as lâminas foram lavadas em água da torneira corrente, seguida de uma imersão em água destilada. Deixou-se secar as lâminas à temperatura ambiente.

Novamente os suportes com as lâminas foram imergidos em acetona durante 10min, seguido de uma imersão de 5min em 2% (v/v) APES em acetona. Passaram-se as lâminas 2X rapidamente por água destilada e deixou-se secar. Uma vez secas as lâminas foram removidas dos suportes e guardados num recipiente limpo.

Anexo 2: Células competentes

Para a obtenção de células de bactérias competentes, uma colônia da estirpe *Escherichia coli* XL-1 Azul, foi isolada de uma placa com meio LB (30mg/ml tetraciclina) e usada para inocular 5ml de meio LB. As células foram incubadas durante 12 a 16h a 30°C a 250 rpm. 1 ml da cultura foi inoculada em 250ml de meio SOB e incubada com agitação a 18°C até atingir 0,6nm. As bactérias foram suspensas e incubadas em gelo durante 10min, para parar o crescimento e transferidas para um Falcon de 50ml e centrifugadas a 1200g durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi deitado fora e o pellet foi ressuspenso em 16ml de tampão de transformação (TB), uma solução de CaCl₂ incubado no gelo por mais 10min e centrifugado como anteriormente. Foi adicionado DMSO, um agente de criopreservação até ser atingida uma concentração final de 7%. Depois as bactérias foram

incubadas durante 10min em aliquotas de 100 μ l e congeladas de imediato em azoto líquido e guardadas a -80°C até o seu uso.

SOB meio (250 mL):

2% Bacto triptone (5g);

1,5% extracto de levedura (1,25g);

10mM NaCl (500 μ L solução stock 5M);

2,5mM KCl (625 μ L solução stock 1M);

10mM MgCl₂ (2,5mL solução stock 1M);

10mM MgSO₄ (2,5mL solução stock 1M);

Depois de preparar autoclavar

TB tampão (100 mL):

10mM PIPES (Piperazina N' N' -bis (ácido-2 etanossulfônico) (0.30 g);

15mM CaCl₂ (1,5 mL stock 1M);

250mM KCl (25 mL stock 1M);

Ajustar o PH até 6,7 com KOH 1M. Depois de dissolvido e o pH ajustado adicionar 55mM MnCl₂. Não autoclavar e guardar a 4 °C.

Anexo 3: Vector pGEM-TEasy

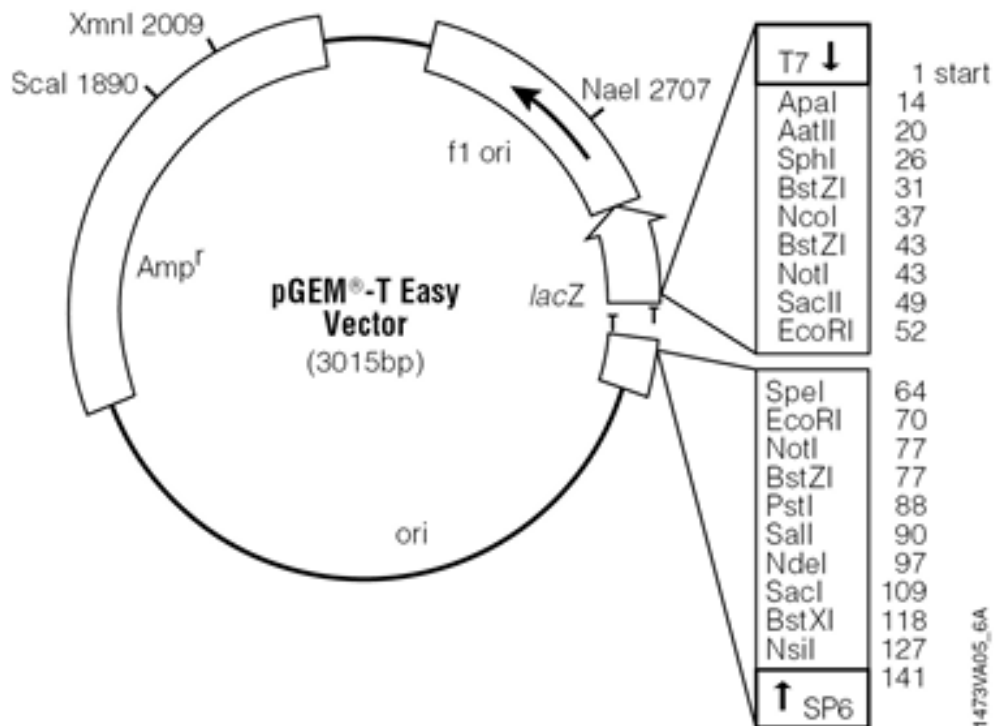


Figura A 3: Mapa do vector pGEM -T Easy e os seus pontos de referencia. (www.promega.com)

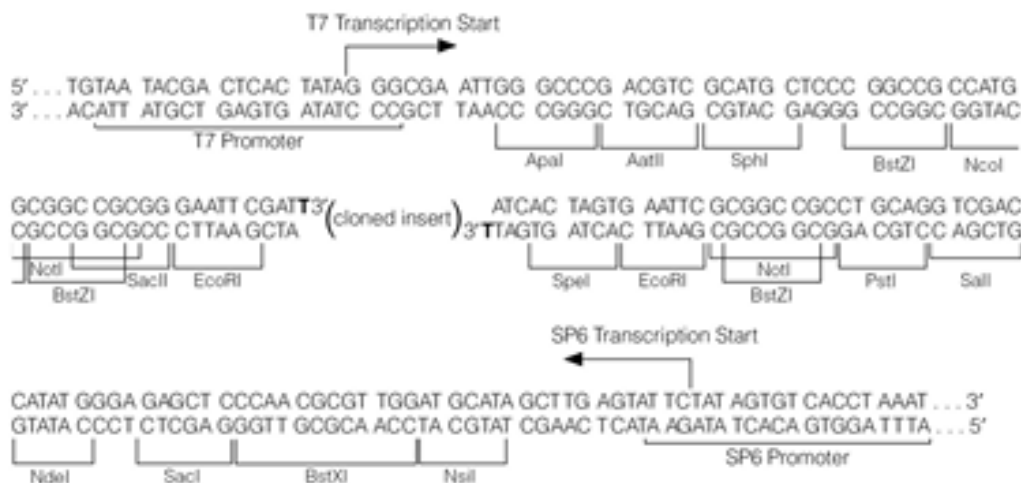


Figure A 1: O promotor e o local de múltipla clonagem do vector pGEM[®]-T Easy. A parte da sequência de cima corresponde ao ARN sintetizado pela T7 ARN polimerase. A parte da sequência de baixo corresponde ao ARN sintetizado pela SP6 ARN polimerase.

Anexo 4: Primers utilizados

Gene	Primer	Tamanho previsto (bp)
BMP4	FW: 5' ATTACGGGCTGGCTGTGGAG 3' (real time) RV: 5' CGAGCGGCTTATGCGAACG 3' (real time)	80
BMP2	FW: 5' GCACCAAACGACCCAAGAG 3' (real time) RV: 5' GGAATAGAAGTGAGATTAAGTAGAAC 3' (real time)	158
OSC	FW: 5' ACGGTGGTGAGGCAGAAGAG 3' (real time) RV: 5' CAGTGTAGGCGGCGATGATG 3' (real time)	173
	FW: 5' AGGGGTTGTTTGTGGAGAGG 3' (clonagem) RV: 5' TACATGCTGGTGTGGTTT 3' (clonagem)	332
TSH	FW: 5' CCACGCTTCCTTGTCCAGAG 3' (real time) RV: 5' ACAGGGTTGGCTTCAATGGG 3' (real time)	92
	FW: 5' AACACACCACCATCTGCATGGG 3' (clonagem) RV: 5' TGTGGGCACATTCATCACTGT 3' (clonagem)	155

Anexo 5: Soluções

Paraformaldeído (PFA) 4%

Para 250mL:

A 225mL de água estéril adicionar 10.0 g de PFA (Sigma) e 25L de NaOH 5M. Aquecer com agitação a 65°C até dissolver completamente. Deixar arrefecer à temperatura ambiente e adicionar 25mL de KPO 1M. Acertar o pH a 7.4 e guardar, no máximo 2 semanas, no frigorífico. Usar frio.

“Tris Buffered Saline” (TBST)

Para 300mL:

1,8g Tris-base (Sigma)

2,62g NaCL (Sigma)

280L Triton X- 100 (Riedel-de-Haen)

Dissolver tudo em 250mL de água destilada. Acertar o pH a 7.4 e perfazer com água destilada para 300mL.

Guardar, no máximo 2-3 semanas, no frigorífico.

Etanol 95%

Para 100mL:

95mL de EtOH 100%

5mL de água bidestilada

Etanol 75%

Para 100mL:

75mL 100%

25mL de água bidestilada

Etanol 70%

Para 100mL:

70mL de EtOH 100%

30mL de água bidestilada

Etanol 50%

Para 100mL:

50mL de EtOH 100%

50mL de água bidestilada

Etanol 40%

Para 100mL:

40mL de EtOH 100%

60mL de água bidestilada

Etanol 25%

Para 100mL:

25mL de EtOH 100%

75mL de água bidestilada

Etanol 15%

Para 100mL:

15mL de EtOH 100%

85mL de água bidestilada

Alcian blue 8GX

Para 100mL:

20mg de Alcian blue 8GX (Sigma)

70mL de EtOH 100%

30mL de ácido acético glacial

Guardar, no máximo 6 meses, no frigorífico.

Hidróxido de Potássio (KOH) 1%

Para 250mL

2,5g NaOH em “pellets” (Sigma)

250mL de água destilada

Solução stock de Alazarin red S 1% (solução alcalina)

Para 100mL

1 g de Alazarín red S (Sigma)

100mL de KOH 1%

Solução KOH 0.5%/glicerol 3:1

Para 100mL:

75mL de KOH 0.5%

25mL de glicerol

KOH 0.5%/glicerol 1:1

Para 100 mL:

50mL de KOH 0.5%

50mL de glicerol

Solução KOH 0.5%/glicerol 1:3

Para 100mL:

25mL de KOH 0.5%

75mL de glicerol

Marcador 1Kb (1:20)

Água sigma 380µl

Marcador 20µl

“Loading buffer” (10µl)

Água tratada com DEPC

200 µl de dietilpirocarbonato (100µl DEPC / L de água)

Água sigma para 2L

Agitar e esperar 24h

Autoclavar 121°C pelo menos 40 min

dNTPs

Diluições de cada nucleótido 1:10

Para 1ml:

100µl dATP

100µl dTTP

100µl dCTP

100µl dGTP

600µl água sigma

Soluções Mini-prep

(P1)- 50mM Tris HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A

5ml Tris HCl pH 8 1M

2ml EDTA 0.5M

100µl RNase A 100mg/ml

Até 100ml de H₂O

RNase A 100mg/ml

Dissolver 100mg RNase A em pó em 1ml de H₂O

Ferver durante 5min para destruir a DNase

Aliquotar e guardar a -20°C

P2 - 200mM NaOH, 1% SDS

10ml NaOH1M

5ml SDS 10%

35ml água

P3 - 3.0 M KOAc, pH 5.5

29,5g KOAc em 100ml água,

Ajustar o pH com ácido acético glacial

Solução stock PBS 10x

75,97g NaCl

12,46g Na₂HPO₄.2H₂O

4,80g NaH₂PO₄.2H₂O

Dissolver em 800mL de água MilliQ. Ajustar o pH a 7,0. Completar o volume até 1L.

Autoclavado.

A solução 1xPBS é preparada por diluição com o dobro da água destilada.

TBE (Tris - Borate Tampão) 0.5x

200ml 5x TBE

800ml Elix H₂O