AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de *Danio rerio* irradiados com radiação gama

KELME CARDOSO DAMASCENO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de *Danio rerio* irradiados com radiação gama

KELME CARDOSO DAMASCENO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão corrigida

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DAMASCENO, K.C. ***Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de Dan o rerio irradiados com radiação gama***. 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Damasceno, Kelme Cardoso
Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de Danio rerio irradiados com radiação gama / Kelme Damasceno; orientador José Roberto Rogero. -- São Paulo, 2019.
92 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Efeitos biológicos da radiação gama. 2. Substâncias radiomodificadoras. 3. Danio rerio como modelo animal para avaliação dos efeitos biológicos da radiação. I. Rogero, José Roberto, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais João e Eli, a minha irmã Alba e meu cunhado Leonardo pela paciência, ajuda e compreensão durante os momentos difíceis.

Ao Dr. José Roberto Rogero pela confiança e orientação e a Sizue Ota Rogero por todo o apoio e ajuda durante o trabalho.

Ao Vitor por toda a ajuda, paciência e compreensão.

Meus amigos e companheiros de laboratório Adriana, Fernanda, Gisela, Joana, Matheus, Isa e Bia por todas as conversas, ajuda, conselhos, torcida, caronas e amizade.

E também do CQMA Tati, Joice, Lucas, Caio, Camila, Mainara, Sâmia, Karol e Giovana por todos os momentos de descontração, conselhos e desabafos.

Também aos amigos que fiz durante o período das disciplinas obrigatórias Felipe, Juliana e Dione, obrigada por toda a ajuda, risadas e os agradáveis cafés.

A Elisabeth Somessari, Carlos e Heitor do Centro de Radiações e Tecnologia do Ipen por sempre me receberem tão bem e ajudarem com as irradiações.

A plataforma Zebrafish do Instituto Butantan pelo fornecimento dos embriões, em especial, a Dra Monica Waldyrce e a Gleide Sanges por me receberem bem, pelas dicas e incentivo.

Ao William Viveiros da Cetesb por toda ajuda ao longo do trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

Das habilidades que o mundo sabe, essa anda é a que faz melhor: Dar voltas.

José Saramago

RESUMO

DAMASCENO, K.C. ***Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de Danio rerio irradiados com radiação gama***. 2019. 92 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

O resveratrol, encontrando principalmente sob as formas trans-3,5,4',5-trihidroxiestilbeno e cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno é uma substância que possui muitas propriedades benéficas a saúde, entre elas, vasodilatação, metabolismo de lipoproteínas, inibição da agregação de plaquetas e até mesmo possui ação terapêutica e preventiva de câncer. Um importante destaque é a sua capacidade de agir como antioxidante, o tornando atraente para uso como substância radiomodificadora. A radiação ionizante (RI), que é utilizada na radioterapia, pode ocasionar diversos danos a células saudáveis, seus componentes e estruturas moleculares, dependendo da dose absorvida e do tipo de célula. O *Danio rerio* é um modelo animal ideal para avaliação dos efeitos biológicos da RI. Neste trabalho, o resveratrol foi avaliado como potencial radiomodificador em ensaios com embriões de *Danio rerio* expostos em diferentes horas pós fertilização(hpf), com e sem o córion, a radiação gama. Todos os ensaios foram baseados no protocolo da OECD 236. Para entender os efeitos na mortalidade dos embriões expostos ao resveratrol a radiação separados, foram obtidos valores de CL_{50} e DL_{50}, respectivamente. Os resultados foram: CL_{50} de 154 µM (para embriões de 2hpf), 283 µM (para embriões de 12hpf), 699 µM (para embriões de 24 hpf sem córion). E DL_{50} de 11,50Gy e 12,18Gy (embriões de 4 e 6hpf), 24,8Gy (embriões de 24hpf com córion) e 16,99(embriões de 24 hpf sem o córion). A partir destes resultados foram escolhidas as concentrações de 15, 30 e 60 µM de resveratrol e as doses 5 e 15 Gy (para embriões de 4 e 6 e 24 hpf sem córion) 10 e 20 Gy (para embriões de 24hpf com córion) de radiação gama para observar a atividade radiomodificadora do resveratrol em ensaios com duração de 144 horas, a cada 24 horas foram contabilizados os embriões mortos para comparação estatística por meio do teste Z. Houve diferença na porcentagem de mortalidade em todos os ensaios, mas para embriões expostos a radiação com 24hpf sem córion na presença de 30µM de resveratrol essa diferença foi estatisticamente significativa apontando um indício de radioproteção. Nos embriões de 24hpf sem córion irradiados na presença de 60µM a mortalidade dos embriões irradiados é foi maior quando comparada apenas aos irradiados, indicando que em concentrações mais altas o resveratrol pode exercer a função de radiosensibilizador, embora neste caso não tenha sido estatisticamente significativo, o resultado corrobora com dados na literatura que indicam ação sensibilizadora do composto em células expostas a radiação nessa mesma concentração.

Palavras chave: Radiação ionizante, *Danio rerio*, substância radiomodificadora.

ABSTRACT

DAMASCENO, K.C. **Evaluation of resveratrol radiomodifier effect using *Danio rerio* embryos irradiated with gamma radiation.** 2019. 92 p. Dissertation (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Resveratrol, mainly found in the forms trans-3,5,4 ', 5-trihydroxystilbene and cis-3,5,4'-trihydroxystilbene is a substance that has many beneficial health properties, among them, vasodilation, lipoprotein metabolism, inhibition of platelet aggregation and even has therapeutic and preventive action of cancer. An important highlight is its ability to act as an antioxidant, making it attractive for use as a radiomodifying substance. Ionizing radiation (IR), which is used in radiotherapy, can cause various damage to healthy cells, their components and molecular structures, depending on the absorbed dose and the cell type. *Danio rerio* (paulistinha)is an ideal animal model to evaluate the biological effects of IR. In this work, resveratrol was evaluated as a potential radiomodifier in assays with embryos exposed at different hours post-fertilization (hpf), with and without the chorion, to different doses of gamma radiation. All assays were based on the protocol of OECD 236. To understand the effects on mortality of embryos exposed to resveratrol and radiation apart, values of LC_{50} and LD_{50}, respectively, were obtained. The results were: LC_{50} of 154 µM (for 2hpf embryos), 283 µM (for 12hpf embryos), 699 µM (for embryos of 24 hpf without chorion). And DL_{50} of 11.50Gy and 12.18Gy (embryos of 4 and 6hpf), 24.8Gy (embryos of 24hpf with chorion) and 16.99 (embryos of 24 hpf without the chorion). From these results, concentrations of 15, 30 and 60 µM of resveratrol and doses 5 and 15 Gy (for embryos of 4 and 6 and 24 hpf without chorion) 10 and 20 Gy (for 24hpf embryos with chorion) were chosen from gamma radiation to observe the radiomodifying activity of resveratrol in trials with a duration of 144 hours, the dead embryos were counted every 24 hours and these results were compared with a Z test. There was difference in the percentage of mortality in all the trials, but for the exposed to radiation with 24hpf without chorion in the presence of 30µM of resveratrol the number of dead embryos was less and statistically significant indicating radioprotection of resveratrol. In the 24hpf embryos irradiated in the presence of 60µM, the mortality of irradiated embryos was higher when compared to irradiated embryos, indicating that in higher concentrations resveratrol may exert the radiosensitizer function, although in this case it was not statistically significant, these result corroborates with data in the literature that indicate the sensitizing action of the compound in cells exposed to radiation in this same concentration.

Key words: Ionizing radiation, *Danio rerio*, radiomodifier substance.

Lista de Tabelas

TABELA 1 RESUMO DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE. 39
TABELA 2 ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EM QUE OS EMBRIÕES DOS GRUPOS 1 E 2 FORAM EXPOSTOS AO RESVERATROL. 41
TABELA 3 INDICADORES DE LETALIDADE DE ACORDO COM O TEMPO DE EXPOSIÇÃO. 43
TABELA 4 REQUISITOS E CONDIÇÕES PARA O ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DANIO RERIO.....44
TABELA 5 HORA PÓS FERTILIZAÇÃO QUE OS EMBRIÕES DOS GRUPOS 1 E 2 FORAM IRRADIADOS. 45
TABELA 6 INDICADORES DE LETALIDADE DE ACORDO COM O TEMPO DECORRIDO DO ENSAIO. 46
TABELA 7 RESUMO DAS CONDIÇÕES DO ENSAIO DE DL50 DA RADIAÇÃO ɣ. 47
TABELA 8: GRUPO 1 – ORGANISMOS NÃO IRRADIADOS (CONTROLE, EMBRIÕES EM MEIO MS DURANTE O PERÍODO DA IRRADIAÇÃO DAS OUTRAS PLACAS). 48
TABELA 9: GRUPO 2 – ORGANISMOS IRRADIADOS. 48
TABELA 10: GRUPO 3 – ORGANISMOS IRRADIADOS NA PRESENÇA DO RESVERATROL.....49
TABELA 11:PORCENTAGEM DA VIABILIDADE CELULAR.....50
TABELA 12: IC50 DO RESVERATROL EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES. 52
TABELA 13: VALORES DE DOSE RESPOSTAS OBTIDAS NOS TRÊS ENSAIOS COM O RESVERATROL. 53
TABELA 14: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 1 EM EMBRIÕES DE 2HPF COM CÓRION APÓS 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 54
TABELA 15: PERCENTUAL DE ECLOSÃO DOS EMBRIÕES DO ENSAIO 1.....55
TABELA 16: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 2 EM EMBRIÕES DE 12HPF APÓS O PERÍODO DE 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 55
TABELA 17: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 3 EM EMBRIÕES DE 24 HPF SEM O CÓRION DEPOIS DE UM PERÍODO DE 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 56
TABELA 18: VALORES OBTIDOS DE DOSES LETAIS DE RADIAÇÃO ɣ. 62
TABELA 19: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 1 EM EMBRIÕES DE 4HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 62
TABELA 20: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 2 EM EMBRIÕES DE 6HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 63
TABELA 21: PORCENTAGEM DE ECLOSÃO DOS EMBRIÕES VIVOS DO ENSAIO 1 COM

EMBRIÕES DE 4HPF. 64
TABELA 22: PORCENTAGEM DE ECLOSÃO DOS EMBRIÕES VIVOS DO ENSAIO 2 EM EMBRIÕES DE 6HPF. 64
TABELA 23: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 3 QUE FOI REALIZADO EM EMBRIÕES DE 24HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 64
TABELA 24: PORCENTAGEM DE ECLOSÃO DOS EMBRIÕES VIVOS DO ENSAIO 3 COM EMBRIÕES DE 24HPF. 65
TABELA 25: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DO ENSAIO 4 EM EMBRIÕES DE 24HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 66
TABELA 26: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 4 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (15μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 69
TABELA 27: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 4 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (30μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 69
TABELA 28: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 6 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (15μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 71
TABELA 29: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 6 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (30μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 71
TABELA 30: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 24 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (15μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 73
TABELA 31: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 24 HPF IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (30μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 73
TABELA 32: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 24 HPF SEM CÓRION IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (30μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 75
TABELA 33: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES DE 24 HPF SEM CÓRION IRRADIADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA RESVERATROL (60μM) DURANTE O PERÍODO DE 144 HORAS. 75

Lista de figuras

FIGURA 1 ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DO RESVERATROL NA FORMA TRANS (TRANS-3,5,4',5-TRIHIDROXIESTILBENO) E CIS (CIS-3,5,4'-TRIHIDROXIESTILBENO). 16
FIGURA 2: BIOSSÍNTESE DE RESVERATROL. 21
FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DE MOLÉCULAS DE TRANS E CIS RESVERATROL, TRANS E CIS PICEIDO E TRANS- VINIFERINAS. 23
FIGURA 4:ESPÉCIES DE PLANTAS QUE CONTÉM RESVERATROL EM SUA COMPOSIÇÃO. ... 24
FIGURA 5: CASAL DE DANIO RERIO (PAULISTINHA) ADULTOS. 27
FIGURA 6: CICLO DE VIDA DO DANIO RERIO. 28
FIGURA 7:AÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADOS COMO RADIOPROTETORES. 34
FIGURA 8: ESTANTE COM OS AQUÁRIOS ONDE SÃO MANTIDOS OS PEIXES ADULTOS. 35
FIGURA 9: AQUÁRIO UTILIZADO PARA REPRODUÇÃO DOS ORGANISMOS..... 36
FIGURA 10: MICROPLACA DE 96 POÇOS COM AS CÉLULAS ADERIDAS AO FUNDO EXPOSTAS AS SOLUÇÕES DE RESVERATROL E CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO AO FINAL DO ENSAIO. 38
FIGURA 11: LEITOR DE ELISA UTILIZADO PARA LEITURA DAS MICROPLACAS. 39
FIGURA 12: ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES, HPF (HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO): A= 4HPF; B: 6HPF; C: 11.5 HPF D: 24HPF. 40
FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE RESVERATROL NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE DANIO RERIO. 42
FIGURA 14: INDICADORES DE LETALIDADE: (A) OVO COAGULADO; (B) NÃO DESTACAMENTO DA CAUDA; (C) AUSÊNCIA DE SOMITOS; (D) AUSÊNCIA DE BATIMENTOS. 43
FIGURA 15: FONTE DE CO-60, GAMMACELL 220. 46
FIGURA 16: CURVAS DE VIABILIDADE CELULAR OBTIDAS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO..... 51
FIGURA 17: ABSORÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO: (A) A MAIORIA DAS CÉLULAS QUE SOFRERAM LISE CELULAR E NÃO ABSORVERAM O CORANTE VERMELHO NEUTRO NA CONCENTRAÇÃO DE 100% DO ESTRATO. (B) CÉLULAS VIVAS QUE ABSORVERAM O CORANTE VERMELHO NEUTRO NA CONCENTRAÇÃO DE 6,25% DO EXTRATO. MAGNIFICÊNCIA DE 10X. 52
FIGURA 18: LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO NO ENSAIO 1 APÓS 96 HORAS

DE EXPOSIÇÃO AO RESVERATROL. 54
FIGURA 19: LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO NO ENSAIO 2 APÓS 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO RESVERATROL. 56
FIGURA 20: LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO NO ENSAIO 3 APÓS 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO RESVERATROL. 57
FIGURA 21: (A) LARVA NORMAL (MAGNIFICÊNCIA 20X); (B) ; LARVA DA CONCENTRAÇÃO DE 300 µM QUE ECLODIU DE MANEIRA INADEQUADA, ONDE SOMENTE A CAUDA SAIU DO OVO (MAGNIFICÊNCIA DE 20X).(C)LARVA DA CONCENTRAÇÃO DE 438,15 ,QUE NÃO ECLODIU E ONDE É POSSÍVEL OBSERVAR EDEMA NO PERICÁRDIO. MAGNIFICÊNCIA DE 40X. 58
FIGURA 22: LARVAS DE DANIO RERIO (A) CONTROLE; (B) CONCENTRAÇÃO DE 500 µM DO ENSAIO 2; (C) CONCENTRAÇÃO DE 625 µM EM EMBRIÕES EXPOSTOS COM 24 HPF. TODAS AS FOTOS FORAM TIRADAS NA MAGNIFICÊNCIA DE 20X. 59
FIGURA 23:LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO DOS ENSAIOS 1 E 2 IRRADIADOS COM 4 E 6 HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 63
FIGURA 24: LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO DO ENSAIO 3 IRRADIADOS COM 24 HPF APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 65
FIGURA 25: LETALIDADE DOS EMBRIÕES DE DANIO RERIO DO ENSAIO 4 IRRADIADOS COM 24 HPF SEM O CÓRION APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS DE EXPOSIÇÃO. 66
FIGURA 26: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OCASIONADAS POR DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA: (A) LARVA DO CONTROLE; (B) LARVA IRRADIADA COM 10 GY; (C) LARVA IRRADIADA COM 20GY E (D) (LARVA IRRADIADA COM 30 GY). 67
FIGURA 27: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 4HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (15UM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 70
FIGURA 28: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 4HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (30UM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 70
FIGURA 29: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 6HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (15UM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 72
FIGURA 30: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 6HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (30UM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 72
FIGURA 31: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 24HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (15µM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS.....74
FIGURA 32: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 24HPF NA PRESENÇA RESVERATROL (30µM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS.....74

FIGURA 33: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 24HPF SEM O CÓRION NA PRESENÇA DO RESVERATROL (30μM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 76
FIGURA 34: LETALIDADE DE EMBRIÕES DE DANIO RERIO IRRADIADOS COM 24HPF SEM O CÓRION NA PRESENÇA RESVERATROL (60μM) APÓS O PERÍODO DE 144 HORAS. 76
FIGURA 35: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LARVAS IRRADIADAS. 77
FIGURA 36: LARVA DO CONTROLE; (B) LARVA NA CONCENTRAÇÃO DE 60 UM DE RESVERATROL; (C) LARVA IRRADIADA COM 10 GY; (D) LARVA IRRADIADA COM 10 GY+30 μM DE RESVERATROL;(E) LARVA IRRADIADA COM 15 GY; (F) LARVA IRRADIADA COM 15GY+30 μM DE RESVERATROL; (G) LARVA IRRADIADA COM 20 GY E (H) LARVA IRRADIADA COM 20 GY+30 μM DE RESVERATROL.(MAGNIFICÊNCIA 20X). 78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 19

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

3.1 Histórico do resveratrol 20

3.1.2 Biossíntese 21

3.1.3 Estrutura química do resveratrol 22

3.1.4 Fontes de resveratrol 24

3.1.5 Atividade biológica do resveratrol 25

3.2 Danio rerio 27

3.3 Radiação ionizante (ɣ) 29

3.3.1 Efeitos biológicos da radiação 30

3.3.2 Radioprotetores 32

4 MATERIAIS E MÉTODOS 35

4.1 Substância teste 35

4.2 Organismo teste 35

4.3 Índice de citotoxicidade (IC50) 36

4.4 Toxicidade aguda do resveratrol em embriões de *Danio rerio* 40

4.5 DL_{50} da radiação gama (ɣ) 44

4.6 Ensaio da atividade radiomodificadora do resveratrol em embriões de *Danio rerio* 47

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

5.1 IC_{50} (Citotoxicidade do resveratrol) 50

5.1 Toxicidade do resveratrol em embriões de *Danio rerio* para obtenção da CL_{50}..... 53

5.2 Ensaio de toxicidade aguda da radiação gama em embriões de *danio rerio* para obtenção da DL_{50}. 61

5.3 Efeito radiomodificador do resveratrol em embriões de *Danio rerio.* 69

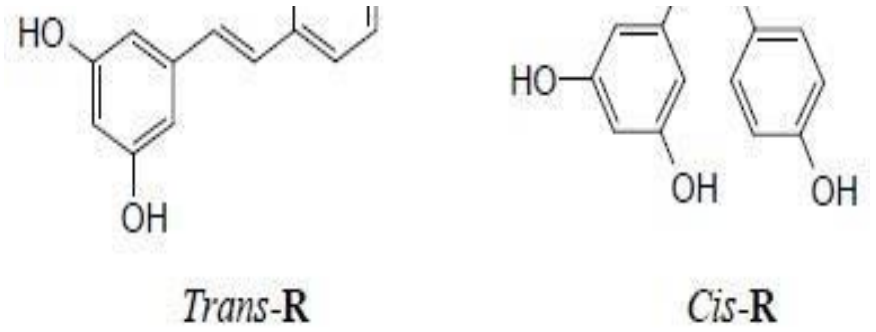
6 CONCLUSÕES..... 84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85

1 INTRODUÇÃO

O resveratrol é classificado como um polifenol, pertence à classe das fitoalexinas e possui ação antimicrobiana em plantas e frutos. É produzido como resposta ao estresse físico, químico e biológico através de estímulos de agentes denominados elicitores, que podem ser bióticos ou abióticos. Encontra-se, principalmente, sob a forma de dois isômeros, trans-resveratrol (trans-3,5,4',5-trihidroxiestilbeno) e cis- resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Sautter et al., 2008).

Figura 1 Estrutura dos isômeros do resveratrol na forma trans (trans-3,5,4',5-trihidroxiestilbeno) e cis (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno).



Fonte: Anisimova et al., 2008.

Possui propriedades benéficas a saúde, como a capacidade de prevenir ou retardar a progressão de doenças, com destaque, para as cardiovasculares, lesões isquêmicas e até mesmo o câncer. Além disso, é capaz de estender o tempo de vida de diferentes organismos, desde leveduras até vertebrados (Baur e Sinclair 2006).Outra propriedade muito importante é a sua ação como antioxidante , associada à sua estrutura molecular, sendo o grupo fenol presente o responsável pela capacidade de ligar-se aos radicais livres presentes no meio celular (Moreno, 2009).

A radiação ionizante gama (ɣ), pode ser utilizada para diversos fins, como terapias relacionadas ao câncer ou até mesmo em aplicações industriais. Os efeitos conhecidos relacionados à exposição humana incluem a indução da morte celular, mutações genéticas, carcinogênese e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos, superóxidos, entre outros. As ERO são formadas quando a radiação é absorvida pelas moléculas, principalmente pela água contida no meio, ocasionando reações

que podem atingir e ocasionar danos ao DNA, proteínas e moléculas de importância biológica (Smith et al., 2017).

Devido a exposição à radiação, seja planejada em tratamentos médicos como a radioterapia ou por conta de acidentes, existe um grande interesse em substâncias que sejam potenciais radioprotetoras com capacidade de agir como antioxidantes, uma vez que a formação de radicais livres é uma das consequências da irradiação nas células (Weiss e Landauer, 2003).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que o resveratrol apresenta efeito radiomodificador. De acordo com Moreno (2009), as células de tecido conectivo de camundongo expostas a radiação gama apresentaram maior resistência quando irradiadas na presença do resveratrol. Já Magalhães (2012) mostrou que o resveratrol pode exercer efeito protetor na concentração de 15µM.L^{-1} e efeito sensibilizador na concentração de 60µM.L^{-1}, em células de Rabdomiossarcoma humano (RD).

Em estudo *in vivo* com camundongos, Carsten et al., (2008) demonstraram dados inéditos de um experimento com duração de 30 dias , onde os organismos foram divididos em quatro grupos (A) Controle; (B) Camundongos tratados com resveratrol 100 mg/kg; (C)Camundongos expostos a dose de 3Gy de radiação; (D) Camundongos previamente tratados com resveratrol (100mg/kg) por um período de dois dias e posteriormente expostos a dose de 3Gy de radiação. Após a irradiação foi feita a análise de células da medula óssea, onde foi constatado que houve uma redução significativa de aberrações cromossômicas nos animais do grupo D em comparação ao grupo C.

O *Danio rerio* (paulistinha), é uma espécie de peixe utilizada como modelo em diversos estudos e é considerado ideal para avaliação dos efeitos ocasionados pela radiação ionizante. Por meio de observações em microscópio é possível acompanhar o seu desenvolvimento e a mortalidade (Geiger et al., 2006).

É fácil mantê-lo em laboratório e, em condições adequadas, após ocorrer o acasalamento, são gerados ovos transparentes onde os embriões desenvolvem-se muito rápido, em 48 horas pós fertilização(hpf) órgãos importantes como olhos, cérebro, coração, músculos, rins e trato gastrointestinal já estão evidentes. A embriogênese fora do corpo da mãe permite a manipulação sem que seja necessário sacrifício parental e após um período de 4 dias é possível estender o estudo para avaliação mutagênica (Hwang et al., 2007).

Com o conhecimento a respeito das propriedades benéficas do resveratrol e

seu uso como potencial radioprotetor, utilizar embriões de *Danio rerio* como modelo animal a fim de investigar os efeitos ocasionados pela radiação gama é de extrema importância e possui diversas vantagens, uma vez que existem poucas informações sobre os efeitos biológicos ocasionados neste organismo e nenhuma sobre o efeito radiomodificador do resveratrol.

2 OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo observar a ação radiomodificadora do resveratrol em embriões de *Danio rerio*.

Objetivos específicos**:**

- Obter a DL_{50} da radiação gama em embriões de *Danio rerio*;
- Realizar ensaio de citotoxicidade do resveratrol para a obtenção da IC_{50};
- Obter a CL_{50} do resveratrol em embriões de *Danio rerio*;
- Observar a ação modificadora do resveratrol em embriões de Danio rerio irradiados com radiação gama nas concentrações determinadas com base nos ensaios anteriores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico do resveratrol

Os primeiros registros do isolamento do resveratrol ocorreram em 1940 e 1963, onde ele foi encontrado nas raízes de duas plantas *Veratrum grandiflorum O. Loes e Polygonum cuspidatum* (utilizada na medicina chinesa e japonesa), respectivamente. Nos dois casos, apenas foi classificado como uma fitoalexina e não despertou grande interesse (Baur, 2006).

A presença do trans resveratrol em frutos teve seu primeiro registro em 1976 por Langckae e Pryce, que relataram a presença do composto na casca de uvas da espécie Vitis vinífera como resposta à infecção por fungos ou exposição a luz ultravioleta (Frémont, 2000).

Na época do Egito antigo o vinho era utilizado para fins medicinais devido as suas propriedades em unguentos para curar problemas na pele. E, na Grécia antiga, também existiram registros do uso de vinho para o tratamento de ferimentos local e sistêmicos. Outro registro importante foi feito por Hipócrates em seu tratado de medicina, onde ele descreve as propriedades terapêuticas do vinho quando administrado em dosagens adequadas (Pickeleman,1990).

No início da década de 90 foram realizados diversos estudos epidemiológicos com o intuito de entender como os hábitos da população na França e em outros locais do mediterrâneo que, na grande maioria, incluía uma alimentação rica em gordura e um estilo de vida sedentário, eram controversos aos baixos índices de incidência de doenças cardíacas. O grande consumo de vinho poderia explicar esta controvérsia (Orallo et al., 2002).

Após a descoberta de que o efeito protetor não era relacionado somente a presença do álcool, mas de outra substância, mais estudos foram realizados na intenção de isolar os seus componentes (Orallo et al., 2002). Foi em 1992 que Siemman e Creasy sugeriram que o resveratrol era o componente biológicamente ativo do vinho e, a partir daí, ele passou a ser largamente estudado (Frémont, 2000).

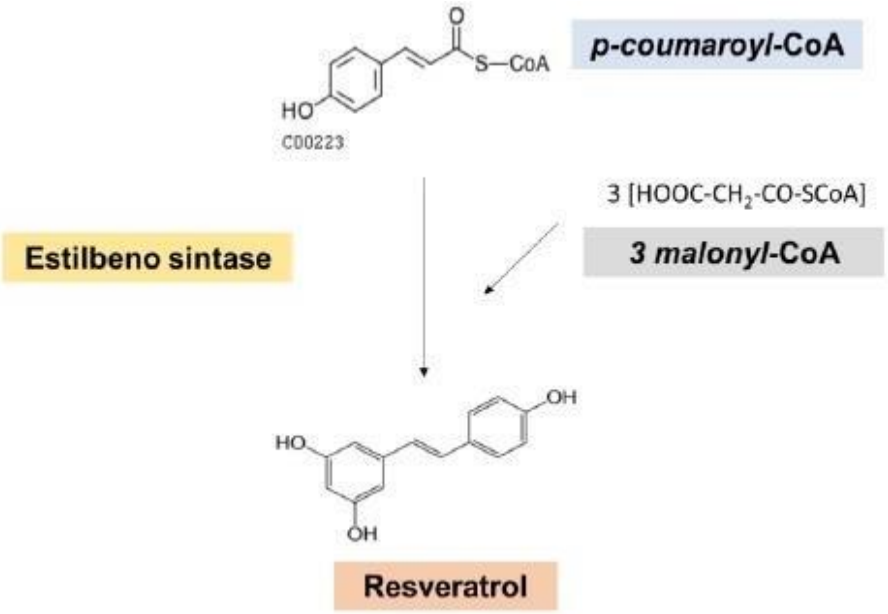
3.1.2 Biossíntese

A síntese da molécula ocorre por meio de um sinal químico que induz a expressão do gene estilbeno sintetase que desencadeia no acúmulo de mRNA e a formação da enzima também denominada estilbeno sintetase que tem como função catalisar uma reação química das coenzimas p-coalmaroyl- CoA e três de malonyl-CoA que são os substratos que darão origem ao resveratrol na área afetada (Jeandet et al., 2002).

Em condições normais, a enzima estilbeno sintetase está presente em baixas concentrações nas paredes celulares de plantas e em menor concentração nos cloroplastos, o acúmulo ocorre na película dos frutos ao longo de seu desenvolvimento (Pan et al., 2009).

Figura 2: Biossíntese de resveratrol.

.



Fonte: Cavalcante, 2017.

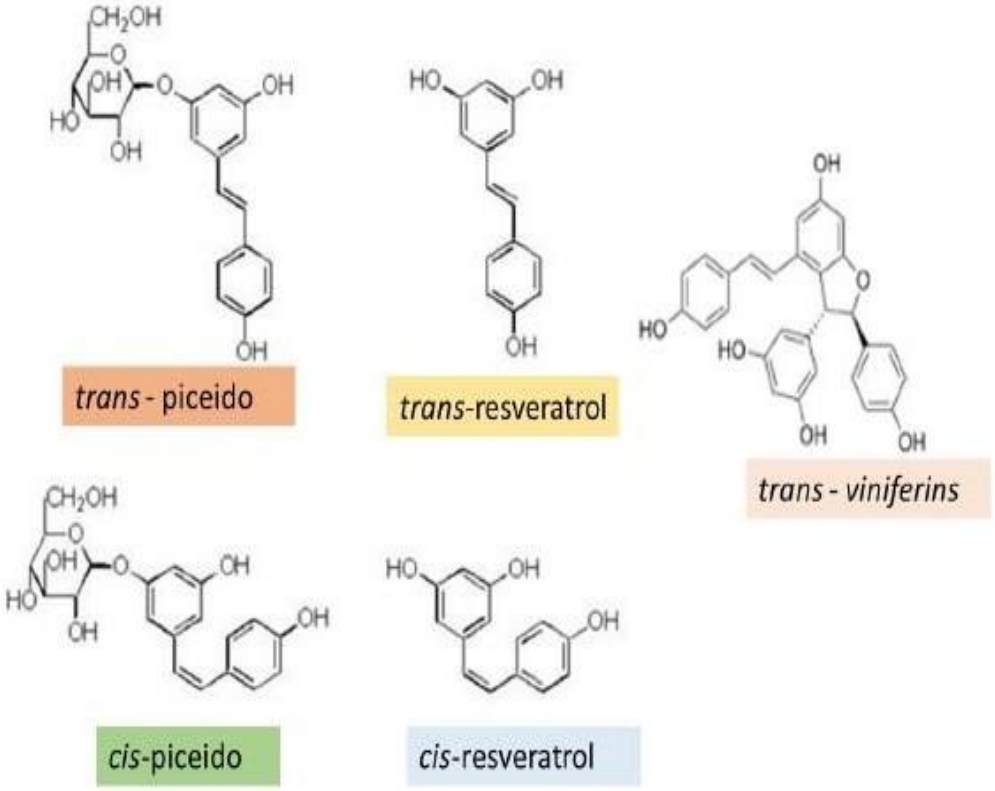
3.1.3 Estrutura química do resveratrol

A molécula de resveratrol contém três anéis aromáticos que ficam unidos por uma ponte de (-CH2-). Diversos compostos possuem essa base molecular, o que os diferencia é o número e a posição das hidroxilas ou até mesmo a substituição de algumas por outros radicais como açúcares, grupos metoxila, metil, formação de dímeros, trímeros, até mesmo longos polímeros e o isomerismo (Trans e cis) (Soleas, et al., 1997).

Existem diversos relatos descrevendo estes compostos na literatura, entretanto, as duas formas mais evidenciadas são o trans-3,5,4',5-trihidroxiestilbeno, o cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, trans e cis piceido e viniferinas. Biologicamente, o isômero trans é mais ativo que o cis hipoteticamente devido a sua forma não planar. Além disso, o trans resveratrol é mais estável quimicamente. Também é possível converter a molécula do trans resveratrol em cis resveratrol através da exposição à radiação ultravioleta e em soluções de pH ácido pode acontecer o inverso (Cavalcante, 2017).

Em condições de pH elevado e expostas à radiação ultravioleta, as duas formas são degradadas e para que permaneçam estáveis é preciso abrigá-los da incidência de luz, de preferência com o trans resveratrol em pH ácido e o cis em pH neutro. Quando ocorre a glicosilação da molécula de resveratrol é formado o piceido, dessa forma, a molécula torna-se mais resistente a degradação enzimática e processos de oxidação. Já os viniferinas são formadas por meio dos processos de dimerização oxidativa da molécula (Cavalcante,2017).

Figura 3: Estrutura química de moléculas de trans e cis Resveratrol, trans e cis Piceido e trans-viniferinas.

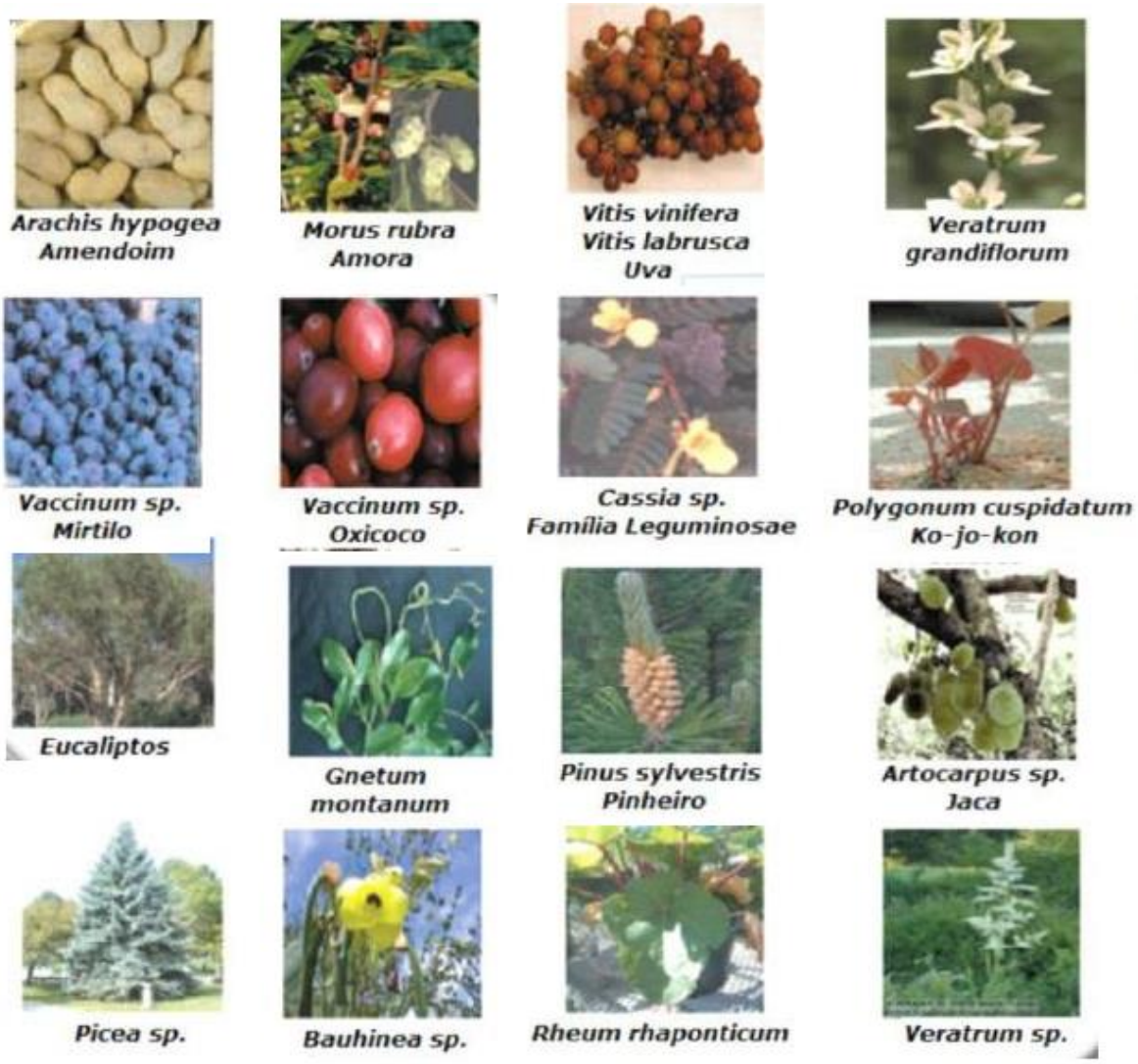


Fonte: Cavalcante, 2017.

3.1.4 Fontes de resveratrol

O resveratrol já foi encontrado e identificado em 12 famílias de plantas, 37 gêneros e 72 espécies, entre elas, o amendoim (*Arachis hypogacea*) o eucalipto (*Eucalyptus wandoo*), kon-jo-kon (Polygonum cuspidatum e a uva (*Vitis vinífera*).

Figura 4:Espécies de plantas que contém resveratrol em sua composição.



Fonte: Adaptado de Magalhães (2012).

As espécies de videira têm a maior capacidade de sintetizá-lo e, por este motivo, as uvas e seus compostos são considerados importantes fontes de resveratrol. Em análises feitas com diferentes amostras de uva, foi identificado que a maior concentração do composto se encontra na película do fruto (27,5 µg/g), todavia, o bagaço, caules, cascas e sementes apresentaram uma concentração menor (6,0µg/g) (Perez et al., 2007). Em estudo feito apenas com a película foram identificados o trans resvertrol e o trans e cis piceido (Perez et al., 2007).

Souto et al. (2001) mostra que os valores médios de resveratrol em vinhos de diferentes países, sendo no Canadá, 0,77 $mg.L^{-1}$, EUA, 0,998 $mg.L^{-1}$, Grécia, 0,873 $mg.L^{-1}$, Japão, 0,157 $mg.L^{-1}$, Portugal, 1,00 $mg.L^{-1}$, Chile e Argentina, 1,21 $mg.L^{-1}$. A concentração de resveratrol depende muito da localização geográfica, das condições climáticas e das práticas enológicas. Ainda que no Brasil existam poucos estudos com as concentrações de resveratrol, em vinhos da região sul do país de uva Cabernet Sauvignon, a média dos valores foi de 1,78 mg.L1 de trans-resveratrol.

3.1.5 Atividade biológica do resveratrol

Sabe-se que o trans-resveratrol é que apresenta atividade biológica e vários estudos demonstraram que ele também pode trazer muitos benefícios à saúde, como a vasodilatação, auxílio no metabolismo de lipoproteínas, inibição da agregação de plaquetas e até mesmo ação terapêutica e preventiva de câncer (Juan et al., 2005). É capaz de desencadear uma série de reações celulares e moleculares e um dos destaques é a resposta do sistema estrogênico, que ocorre devido a semelhança da sua molécula com a de estradiol e do dietilestilbestrol, devido a essa propriedade ele também é classificado como um fitoestrógeno (Juan et al., 2005).

De acordo com Frémont (2000) em organismos vivos a resposta pode variar de acordo com a biodisponibilidade e já foi comprovado que o intestino é capaz de absorver o resveratrol quando ele é administrado oralmente.

Em ratos cuja a dieta era capaz de induzir hiperlipidemia o resveratrol e o piceido inibiram o acúmulo hepático de triacilglicerol e colesterol. Além disso, os estilbenos foram capazes de proteger o fígado de ratos alimentados com óleo peroxidado (Frémont, 2000). Outro estudo demonstrou que o resveratrol presente em vinhos foi absorvido por ratos. Ensaios onde uma dose aguda de 26 µM ou uma

dose diária de 13 µM por um período de 15 dias demonstraram que o composto estava presente na corrente sanguínea e foi encontrado em quantidades significativas no plasma e em alguns órgãos. (Frémont, 2000).

De acordo com Pardal et al. (2014) as principais vias metabólicas para absorção e metabolismo do resveratrol em larvas de paulistinha são muito semelhantes às dos mamíferos e os principais processos são a glicuronidação e sulfatação, onde o monosulfato do resveratrol é o metabólito mais abundante. Após feita a exposição de organismos por um período de 1 hora foram encontrados metabólitos demonstrando que sua absorção e metabolismo ocorrem de maneira rápida.

A degradação da molécula do resveratrol ocorre em até 20% após a incubação *in vitro,* já os derivados sulfatados são mais estáveis. (Hoshino et al., 2010), enquanto a excreção ocorre com auxílio da bile e pela urina (Wang e Yuerong, 2008).

A intensidade dos efeitos do trans-resveratrol é associada à sua estrutura molecular, sendo o grupo fenol presente que é o responsável pela sua atuação como antioxidante, ou seja, sua capacidade de ligar-se aos radicais livres presentes no meio celular. (Moreno,2009).

De acordo com Basso et al. (2016) ele possui capacidade de evitar a morte celular decorrida da exposição à radiação e pela mediação do apoptose em células cancerígenas e de aumentar a comunicação intercelular em células de glioma humano. Dessa maneira, ele promove a propagação dos danos e da morte celular ou até mesmo sinais de controle do ciclo celular de células tratadas para células adjacentes. Com relação às células humanas normais, foi demonstrado que o resveratrol mitiga a correção por meio do apoptose de células irradiadas e previne a parada do ciclo celular na fase G2 induzido por raio x (Basso et al., 2016).

Além disso, já foi demonstrado que ele reduz a indução de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de camundongos irradiados. Por se tratar de um composto relativamente não tóxico com muitos alvos moleculares, também tem potencial de agir como radioprotetor em células normais expostas a radiação ionizante (Carsten et al., 2008).

Em estudos *in vitro* Moreno (2009) demonstrou que células de tecido conectivo de camundongos apresentaram maior sobrevida quando irradiadas na presença do resveratrol nas concentrações entre 12,5 e 25 $\mu M.L^{-1}$. Magalhães

(2012), demonstrou que a ação do resveratrol pode ser protetora na concentração de 15µM.L-1 e sensibilizadora na concentração de 60µM em células de rabdomiosarcoma humano (RD).

3.2 Danio rerio

O *Danio rerio* é um peixe teleósteo que pertence à classe dos ciprinídeos. Natural do sul asiático, os adultos medem cerca de 3 a 5 cm e pesam em média 1,5g. É omnívoro, consome diversos crustáceos bentônicos e planctônicos e é resistente a uma grande variação de temperatura, apesar disso, em laboratório é recomendado que seja mantido em temperaturas de 24 a 30°C (Santos, 2012).

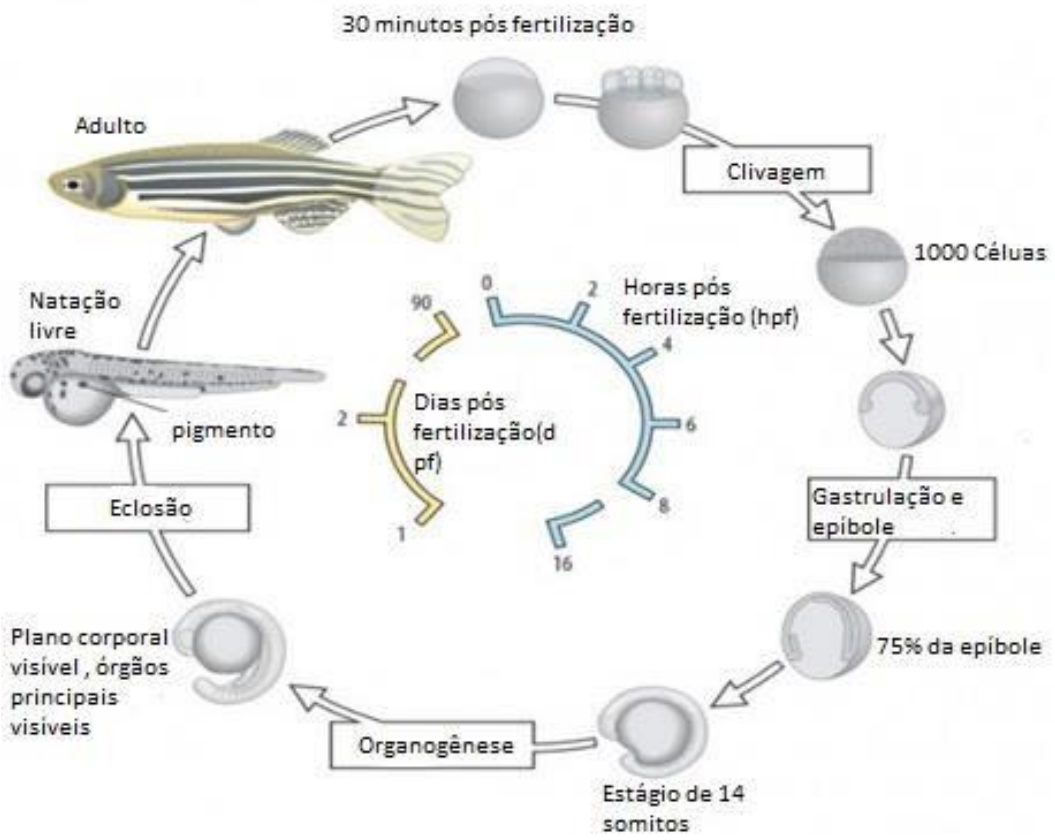
Figura 5: Casal de Danio rerio (paulistinha) adultos.

Fonte: Brauneck e Lamar, 2006.

O custo de manutenção de peixes adultos é baixo e quando são formados casais para desova, eles produzem uma grande quantidade de ovos (Santos, 2012).

A embriogênese ocorre de uma maneira muito rápida e órgãos importantes como o cérebro, olhos, coração, rins e trato gastrointestinal, podem ser observados em um período de até 48 hpf (Geiger et al., 2006).

Figura 6: Ciclo de vida do *Danio rerio*.



Fonte: Adaptado de Rezende, 2013

O genoma do *Danio rerio* e do ser humano apresentam uma semelhança muito grande e nele há conservação de muitos genes relacionados ao reparo de DNA, essa característica importante faz dele um organismo ideal para avaliações genotóxicas assim como estudos relacionados a ação da radiação (Geiger et al., 2006). Apresenta divergência evolucionária com mamíferos de cerca de 445 milhões de anos e isso faz com que a sensibilidade a determinadas substâncias seja parecida (Ali et al., 2011).

O uso da espécie como modelo de estudo é predominante nas áreas de biologia do desenvolvimento e genética molecular e até mesmo em estudos toxicológicos (Hill et al., 2005).

No caso da avaliação toxicológica, a identificação de "*endpoints*" ou indicadores de toxicidade facilitam o entendimento da relação dose resposta e também os mecanismos de toxicidade afim de determinar a toxicodinâmica da

substância a ser testada. Por se tratar de um organismo bastante estudado, existem muitos dados com relação a morfologia, informações fisiológicas em todos os estágios de desenvolvimento de ambos os sexos (Hill, 2005).

Com o uso de embriões, é possível que exposição seja feita em microplacas de cultura celular, em diversas condições experimentais, onde são montadas várias réplicas de uma só vez e com isso conseguir uma variedade de resultados relacionados a toxicidade. Também é possível acompanhar a resposta de más formações no desenvolvimento embriolarval. Os embriões sobrevivem por vários dias obtendo nutrientes do saco vitelínico dentro dos poços destas microplacas (Hill et al., 2005).

O desenvolvimento rápido também facilita experimentos que ocorrem de entre gerações, em alguns casos são requeridos para entender a mutagênese, o estabelecimento de linhagens transgênicas e a avaliação da ação de produtos químicos (Hill et al., 2005).

Geiger et al. (2006) mostram que a paulistinha é um modelo animal ideal para avaliação dos efeitos ocasionados pela radiação ionizante. Por meio das observações em microscópio é possível acompanhar o desenvolvimento dos organismos assim como a mortalidade.

3.3 Radiação ionizante (ɣ)

A radiação ionizante (RI) é representada por ondas e partículas que tem potencial de remover elétrons de um átomo ou molécula contida em algum meio pelo qual ela é propagada. A emissão de radiação ocorre em um processo natural de decaimento de um núcleo instável ou após a excitação de um átomo e/ou de seu núcleo em reatores nucleares, cíclotrons e outros instrumentos (United Nations, 2000).

As fontes de energia ionizante normalmente são provenientes de feixes de elétrons ou raios X gerados em aceleradores e também de fontes radioativas como ^{60}Co ou ^{137}Cs (Shehata et al., 2011).

É possível encontrar radionuclídeos naturalmente como isótopos de Urânio ou até mesmo liberados no ambiente por meio de atividades humanas como instalações de combustíveis nucleares, descarte controlado de materiais provenientes da indústria ou até mesmo atividades médicas, depósitos de testes

nucleares ou em casos de acidentes como os de Fukushima e Chernobyl (Gagnaire et al., 2015).

Quando ocorre exposição a compostos químicos, os efeitos biológicos geralmente são avaliados de acordo com a concentração absorvida e no caso da radiação ionizante a dose é associada a energia absorvida pelo organismo (Gagnaire et al., 2015).

A utilização da radiação gama em alimentos tem efeitos positivos, é capaz de auxiliar na prevenção da decomposição e de eliminar microrganismos afim de melhorar a segurança sem prejudicar a qualidade nutricional. (Lee et al., 2009). Também é amplamente utilizada para esterilização de materiais devido a capacidade de penetração e, na medicina, é o segundo método mais importante de esterilização sem a utilização de calor, inativando células vegetativas de bactérias e esporos (Lee et al., 2009).

O uso da radiação como tratamento clínico obteve muitos avanços e mudanças, principalmente no caso da radioterapia, mas ainda assim tecidos e órgãos normais acabam afetados com a toxicidade exercida pela irradiação (Greenberger,2009).

3.3.1 Efeitos biológicos da radiação

As células e moléculas de água passam pelo processo de ionização pela interação de elétrons ou radicais livres em movimento produzidos pela incidência da radiação (United Nations, 2000).

A ação nos organismos depende de fatores como a dose de radiação, a taxa e distribuição da dose, a concentração inicial dos produtos estudados, o tipo de organismo e a composição do meio irradiado. A distância da fonte radioativa pode fazer com que a dose varie (Moreno, 2009).

Devido ao sucesso em casos de tratamentos de câncer, ainda que exista controle da dose em pacientes nos rins, esôfago, pâncreas etc algumas malignidades são associadas a toxicidade aguda da radiação durante o tratamento. O efeito agudo pode comprometer tecidos além da área afetada ocasionando sintomas como esofagite, pneumonia, diarreia e dores abdominais, por exemplo, desaparecendo algumas semanas após a conclusão do tratamento ou dependendo

de como são esses efeitos pode ser que pacientes não consigam chegar ao final do tratamento conforme o planejado. Além disso, também existe preocupação com os efeitos tardios relacionados a toxicidade, que podem surgir meses e até mesmo anos após a exposição à radiação. É comum que efeitos tardios ocorram no tecido exposto e não afetem a sobrevivência, entretanto, dependendo do volume de tecido exposto durante o tratamento, é possível que haja desenvolvimento de fibrose que leva a falha na função do órgão (Greenberger, 2009).

As complicações em tecidos após a irradiação dependem do órgão atingido e do tipo celular. Em reações agudas há aumento do inchaço em células endoteliais, ocorrem alterações na permeabilidade vascular e edemas além de adesão e infiltração de linfócitos. A apoptose em células endoteliais é um mecanismo de proteção importante para as alterações agudas induzidas pela radiação. Com isso o sistema vascular responde com o aumento de morte celular e regeneração das células sobreviventes. Nos efeitos tardios que são resultado da depleção dependente da radiação, as células que darão início a um tecido específico podem levar a fibrose e consequentemente a disfunção e necrose do órgão. Os mecanismos iniciais de sinalização molecular inter e intracelular que resultem em manifestações tardias têm início logo após a exposição à radiação. Os eventos celulares e modificações no tecido provocados por estes eventos ocorrem de maneira lenta ao longo do tempo (Rodemann e Blaese, 2007).

Independente da reação aguda ou tardia em tecidos normais expostos a radiação, os processos celulares e moleculares de remodelação do tecido são guiados a partir de diversas cascatas de reações que regulam a progressão do ciclo celular, assim como, a sobrevivência das células (Rodemann e Blaese, 2007).

Quando a radiação incide nas células, podem ocorrer reações que são denominadas diretas e indiretas. Nas diretas, os danos à célula são fatais, pois neste caso uma grande quantidade de energia á depositada e consequente destruição das estruturas celulares (Magalhães, 2012).

Já no caso da incidência indireta, ocorre a interação entre a radiação com diversas moléculas dentro da célula, com destaque para as moléculas de água e oxigênio, neste processo produtos primários que são altamente reativos e interagem com outras moléculas do meio por meio de recombinações são gerados e, consequentemente, é desencadeada uma série de reações tóxicas dentro da célula ocasionando alterações químicas e biológicas. Quando estas alterações

levam a mudanças nos DNA ou RNA pode ocorrer a morte celular ou mutações que vão afetar gerações futuras. A água é uma substância abundante no meio celular e por isso é o alvo prioritário da radiação. O processo de interação é constituído por algumas etapas e é denominado radiólise da água. A equação a seguir resume o que é chamado de reação dos produtos primários da radiólise da água:

$$(H_2O + \text{radiação} = H^{\circ} + OH^{\circ} + e_{aq} + H_2 + H_2O_2 + H_3O^{+})$$

Como resposta, são gerados antioxidantes naturais (incluindo superóxidos dismutase, glutationa e a catalase) nas células para minimizar ou eliminar os danos induzidos às estruturas celulares por estes produtos altamente reativos. A glutationa peroxidase primeiro catalisa a conversão de íons de hidróxido em água. A superóxidodismutase pode converter os íons de superóxidos em peróxido de hidrogênio que depois é convertido em água e oxigênio pela catalase (Smith et al., 2017).

A superóxido dismutase existe em diversas isoformas, onde cada uma é especializada em áreas específicas da célula. Quando ocorre a exposição aumentando as doses da radiação ionizante as células aumentam a expressão de enzimas antioxidantes. Entretanto, quando os níveis de produtos tóxicos sobrecarregam os mecanismos de defesa, ocorre o dano celular que pode levar a carcinogênese, teratogênese, apoptose e necrose (Smith et al., 2017).

As lesões no DNA constituem os danos mais comuns ocasionados pela RI em células e tecidos, porém alguns outros efeitos foram observados em organismos expostos a radiação induzida por trítio ou emissores gama. Interrupção da resposta do sistema imune e dos mecanismos anti-inflamatórios, efeitos hormonais, podem aparecer os mecanismos de defesa do estresse oxidativo, desintoxicação e o metabolismo em geral pode ser comprometido. Estes vários efeitos podem levar a consequências na sobrevivência, particularmente em estágios iniciais, do desenvolvimento, fecundidade e até mesmo comportamento dos organismos (Gagnaire, 2015).

3.3.2 Radioprotetores

Com a grande preocupação sobre os danos ocasionados pela radiação

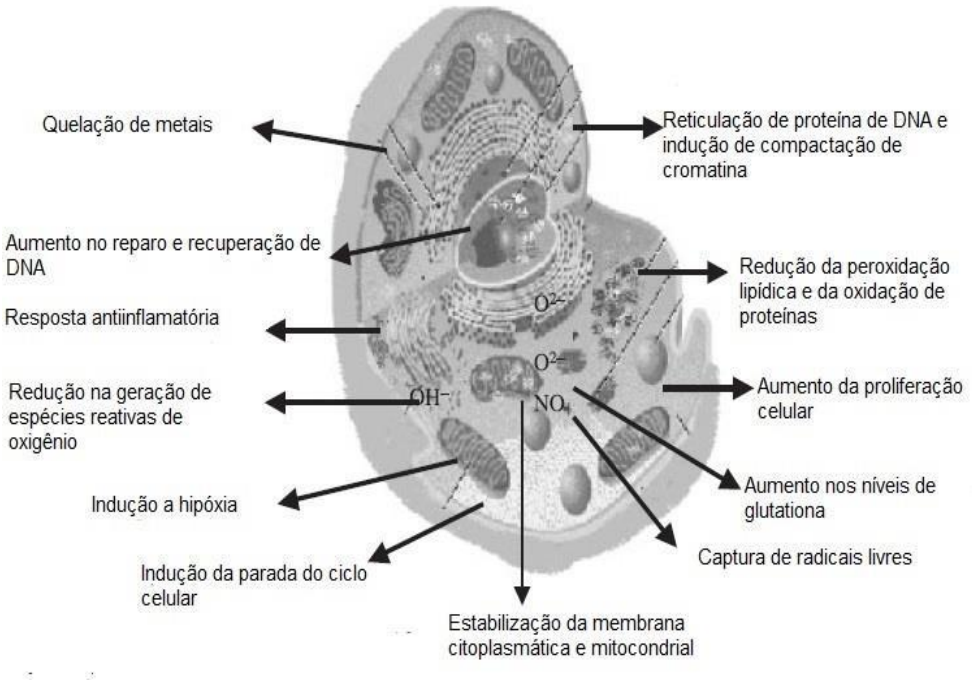
em tecidos normais pela exposição ocupacional, terapêutica ou em acidentes, surgiu a necessidade de utilização de compostos não tóxicos com potencial radioprotetor. Devido s suas propriedades benéficas, o interesse em compostos que fazem parte da dieta e de plantas medicinais aumentou (Carsten et al.,2008).

Os estudos relacionados ao uso de substâncias com potencial radioprotetor ocorrem desde o início da era nuclear, devido a exposição planejada e até mesmo no caso de acidentes envolvendo radiação. Além disso, existe grande interesse no assunto devido a exposição terapêutica para tratamento de câncer, por exemplo, pois é necessário proteger células do tecido normal que também sofrem as consequências desta exposição. A irradiação de organismos a doses e taxas de doses baixas demonstra que existe uma série de mecanismos que podem ser auxiliados com substâncias, com o propósito de proteger e reparar os danos excessivos causados pela radiação. Algumas investigações voltadas para o uso de radioprotetores ajudam a elucidar os mecanismos de interação da radiação com moléculas de importância biológica. (Weiss e Landauer, 2003).

O uso de substâncias que tenham propriedades antioxidantes como potenciais radioprotetores teve início por volta de 1949, onde foi demonstrado que a substância thiol-aminoácido cisteína, protegeu ratos durante a exposição a dose letal de raios X. A partir daí diversas discussões surgiram acerca dos efeitos da radiação em células e como substâncias químicas com potencial radioprotetor poderiam ajudar elucidar os mecanismos de interação da radiação moléculas de importância biológica. A hipótese é que os danos causados pela radiação e o envenenamento do oxigênio aconteciam durante a formação de espécies reativas de oxigênio (Weiss e Landauer, 2003).

Diversas plantas que foram testadas como potenciais radioprotetoras demonstraram efeitos protetores contra os danos ocasionados pela radiação. Os extratos das plantas que foram eficazes contêm diversos compostos incluindo antioxidantes, imuno estimulantes, estimulantes de proliferação celular, agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos, alguns com potencial de agir de maneira isolada assim como em combinação com outros constituintes da mesma planta (Fig 7). A maioria dos estudos desta natureza com plantas utilizam diversos extratos ou várias plantas na formulação, existe grande necessidade de entender os mecanismos de radioproteção destes compostos (Arora et al., 2005).

Figura 7:Ação de extratos de plantas utilizados como radioprotetores.



Fonte: Adaptado de Arora, 2005.

Para que a radioproteção aconteça de maneira bem-sucedida é importante que os agentes radioprotetores estejam presentes no interior da célula até o momento da irradiação ou logo após, dessa maneira é possível que os radicais livres gerados sejam capturados. Além disso, compostos que apresentem baixo potencial de toxicidade são de grande importância e podem contribuir muito com essa finalidade (Moreno, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substância teste

O resveratrol (3, 4', 5- trihidroxiestilbeno), com a fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$ e massa molar de 228 g mol^{-1}, utilizado neste estudo foi adquirido da empresa Iberoquímica Margistral, fabricado e importado da empresa Shaanxi jiahe phytochem cq,ltd localizada na China.

4.2 Organismo teste

Os peixes adultos utilizados na reprodução pertencem ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. Os aquários são mantidos em uma estante onde os parâmetros de pH, condutividade e temperatura são controlados automaticamente pelo sistema da empresa ALESCO (Fig. 8).

Figura 8: Estante com os aquários onde são mantidos os peixes adultos.

Fonte: Cavalcante, 2017.

De acordo com a ABNT (2007), a água utilizada na manutenção dos organismos pode ser reconstituída, de fonte natural ou até mesmo da rede de abastecimento, uma vez que seja desclorada. É importante que as características físico químicas propiciem o cultivo adequado, mantendo índices de sobrevivência sem causar estresse aos organismos. Os parâmetros físico químicos devem ser mantidos com pH entre 6,5 e 7,0, temperatura de 23 a 27 °C e teor de oxigênio

acima de 5 mg L^{-1}. Além disso, é indicado que a dureza da água seja mantida entre 10 e 60 mg de $CaCO_3$ L^{-1}.

A alimentação deve ser fornecida, pelo menos, duas vezes ao dia com ração apropriada, é muito importante conhecer a composição e origem da mesma. Alimentos vivos como artêmias e cladoceras também podem ser fornecidos (ABNT, 2007).

Para a desova, os organismos devem ter entre 4 e 24 meses de idade. Os machos e as fêmeas devem permanecer separados por um período de 7 a 14 dias antes do acasalamento e, um dia antes, colocados em aquário de reprodução que deve ser mantido em ambiente sem incidência de luz. A reprodução ocorre no período da manhã, quando há iluminação simulando a luz do dia, os ovos são depositados ao fundo do aquário (ABNT, 2007).

Figura 9: Aquário utilizado para reprodução dos organismos.

Fonte: Cavalcante, 2017.

4.3 Índice de citotoxicidade (IC_{50})

Para determinação do índice de citotoxicidade (IC_{50}) foi utilizado o protocolo da ISO 10993-5. Este ensaio foi realizado pelo método de incorporação do vermelho neutro que é um corante solúvel em água capaz de atravessar a membrana plasmática celular e se concentrar nos lisossomas de células vivas. Quando substâncias são capazes de danificar tanto as membranas celulares quanto as lisossomais ocorre o decréscimo na captura do vermelho neutro e por

isso é possível distinguir entre células vivas e mortas através da medida de intensidade de cor ao final do ensaio.

O processo de cultura celular e preparo das microplacas foi realizado no Instituto Adolfo Lutz (Núcleo de Culturas Celulares), onde as células de tecido conectivo de camundongo da linhagem NCTC clone 929 (CCIAL 020) foram cultivadas em garrafa de cultura celular utilizando-se meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio e permaneceram em estufa a 37 °C até a formação de uma monocamada celular. Não foram adicionados antibióticos ao meio de cultura.

Em prosseguimento, a cultura celular foi tratada com tripsina 0,20% e solução de EDTA 0,02% para a dispersão da monocamada de células. Após o destaque das mesmas, com o auxílio do hemocitômero (câmara de contagem de Neubauer), as células foram contadas e a suspensão celular foi acertada para $3{,}5 \times 10^5$ células por mL. Um volume de 0,2 mL desta suspensão celular foi distribuído em cada orifício da microplaca de cultura celular de 96 poços. A seguir, as microplacas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 para a formação e adesão da monocamada celular na microplaca.

Os procedimentos de preparo das soluções e de distribuição das mesmas na microplaca constituem a fase asséptica do ensaio e, por este motivo, foram realizados em laboratório esterilizado por luz ultravioleta (UV) e todos os materiais e soluções estéreis foram manuseados dentro de uma câmara de fluxo laminar.

Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelas soluções de resveratrol em diluição seriada (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %), 0,2 mL nos poços correspondentes. No controle de células, foi adicionado somente um volume de 0,2 mL de meio de cultura celular. No ensaio, além do controle de células, foram testados um controle negativo (polietileno de alta densidade) e um controle positivo (látex de borracha natural) com os extratos preparados desses compostos para a realização do ensaio.

Figura 10: Microplaca de 96 poços com as células aderidas ao fundo expostas as soluções de resveratrol e controles positivo e negativo ao final do ensaio.

Fonte: Sizue Ota Rogero.

Concluída a distribuição das soluções, a microplaca foi mantida por mais 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2. Após a incubação, as soluções contidas na microplaca foram substituídas por 0,2 mL de solução de vermelho neutro em meio MEM e a microplaca foi incubada novamente por um período de 3 horas para que ocorresse a incorporação do corante pelas células vivas. Decorrido este período, a microplaca foi lavada duas vezes com a solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 e em seguida com solução de lavagem (cloreto de cálcio 1% em formaldeído 0,5%). Após o processo de lavagem foi utilizado 0,2 mL de solução de extração constituída por ácido acético glacial 0,2% em etanol (1:1). A solução de extração é responsável pela lise celular ocasionando a liberação do corante contido no interior das células vivas.

Na tabela 1 é apresentado o esquema do ensaio de citotoxicidade.

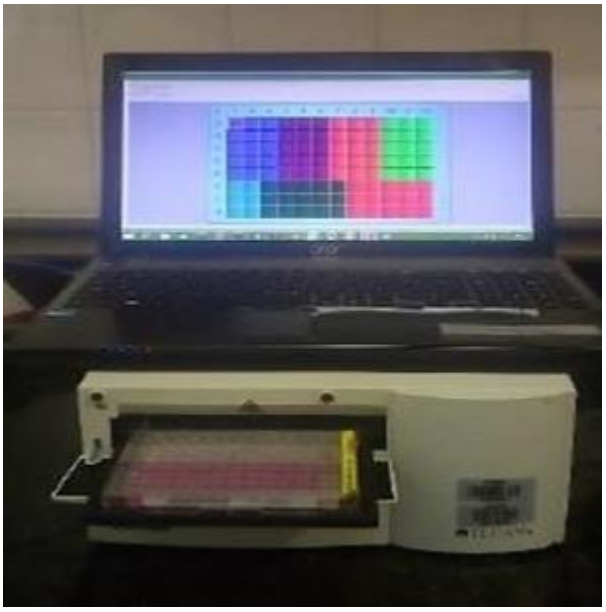
Tabela 1 Resumo do ensaio de citotoxicidade.

Resumo dos procedimentos
1- Adição da monocultura de células da proporção de $3,5x10^5$ células por mL de meio MEM e incubação a 37° C em estufa com 5% de CO_2 por um período de 24 horas;
2- Remoção do meio de cultura;
3- Adição das diluições das concentrações de resveratrol e controles positivo e negativo e novamente incubação da microplaca em estufa com 5% de CO_2 por um período de 24 horas;
4- Remoção do meio, lavagem e adição do corante vermelho neutro. Procedimento de incubação novamente em estufa a a 37° C em estufa com 5% de CO_2 por um período de 3 horas;
5- Descarte do corante vermelho neutro, lavagem com PBS e adição de solução de extração;
6- Agitação da microplaca por 10 minutos;
7- Leitura da densidade óptica no leitor ELISA.

Fonte: A autora.

A microplaca foi agitada por 10 minutos e submetida à leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da Tecan em 540 nm e 620 nm como referência.

Figura 11: Leitor de Elisa utilizado para leitura das microplacas.



Fonte: Cavalcante, 2017.

Com medidas de DO foram calculadas a porcentagem de viabilidade celular com o respectivo coeficiente de variação, pelo software do leitor de ELISA. Esses valores foram adicionados em um gráfico com a porcentagem da viabilidade celular em função da concentração de resveratrol para obtenção do IC_{50} no programa estatístico ORIGIN 8.0 utilizando a função de dose resposta.

4.4 Toxicidade aguda do resveratrol em embriões de *Danio rerio*

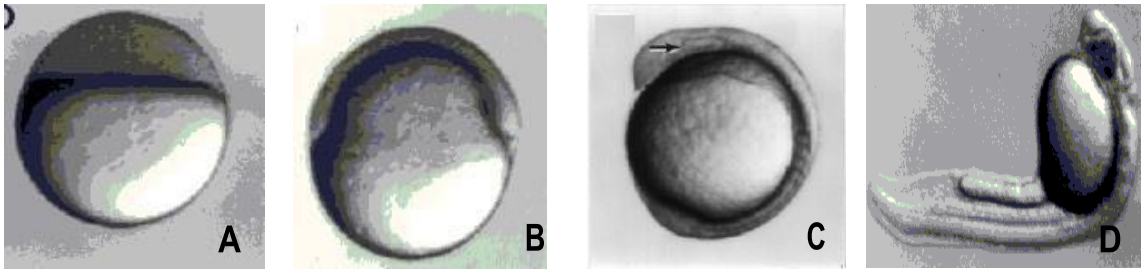
Com base no resultado de IC_{50} foram escolhidas as concentrações de resveratrol para utilização no ensaio de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio*, baseado no protocolo OECD nº 236 (Guideline on Fish Embryo Toxicity Test-FET).

Para garantir a validade dos ensaios foram considerados lotes onde a taxa de fertilização foi ≥70% e a mortalidade dos organismos nos controles do meio e de solvente foi ≤10%.

Ainda não se sabe ao certo o tempo e os mecanismos de absorção do reveratrol pelos embriões e, por este motivo, foram utilizados organismos de diferentes horas pós fertilização (hpf) que, consequentemente, estavam em diferentes estágios de desenvolvimento. Com base no protocolo descrito em Westerfield (2007) foi utilizada uma solução de Pronase na concentração de $1mg/mL^{-1}$.

Na Figura 12 são apresentados diferentes estágios de desenvolvimento de embriões de *Danio rerio.*

Figura 12: Estágio de desenvolvimento dos embriões, hpf (horas pós fertilização): A= 4hpf; B: 6hpf; C: 11.5 hpf D: 24hpf.



Fonte: zfin.org

Além disso, os embriões foram divididos em dois grupos, o grupo (1) de organismos expostos com córion e o grupo (2) de organismos expostos sem o córion (Tabela 2).

Tabela 2 Estágio de desenvolvimento em que os embriões dos grupos 1 e 2 foram expostos ao resveratrol.

GRUPO	HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO	ESTÁGIO
1- Organismos com o córion.	4 hpf	Figura 12-a
	6 hpf	Figura 12-b
	24 hpf	Figura 12-d
2- Organismos sem o córion.	12hpf	Figura 12-c
	24 hpf	Figura 12-d

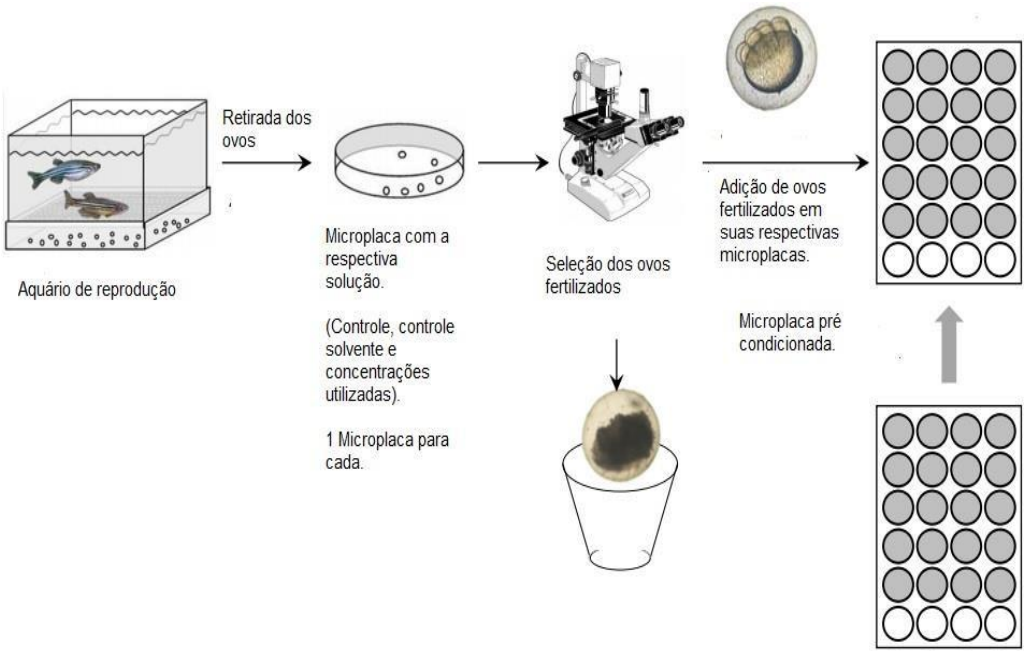
Fonte: A autora.

No ensaio foram preparadas cinco concentrações de resveratrol partindo de uma solução estoque de resveratrol diluído em DMSO, na concentração de 1000 µM. Para a diluição seriada foi utilizado o meio MS com fator de diluição de 1,5. Os parâmetros físico químicos: pH, oxigênio dissolvido (OD) e condutividade foram medidos no controle e na maior concentração utilizada no ensaio.

Para cada concentração foi utilizada uma microplaca de 24 poços contendo 2mL de meio MS em quatro poços (controle de placa) e nos outros 20 poços foram adicionados 2 mL em cada um com a respectiva solução de resveratrol e em todos os poços foi adicionado 1 embrião.

Durante o período de exposição as microplacas permaneceram em incubadora na temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 14h luz/12h escuro.

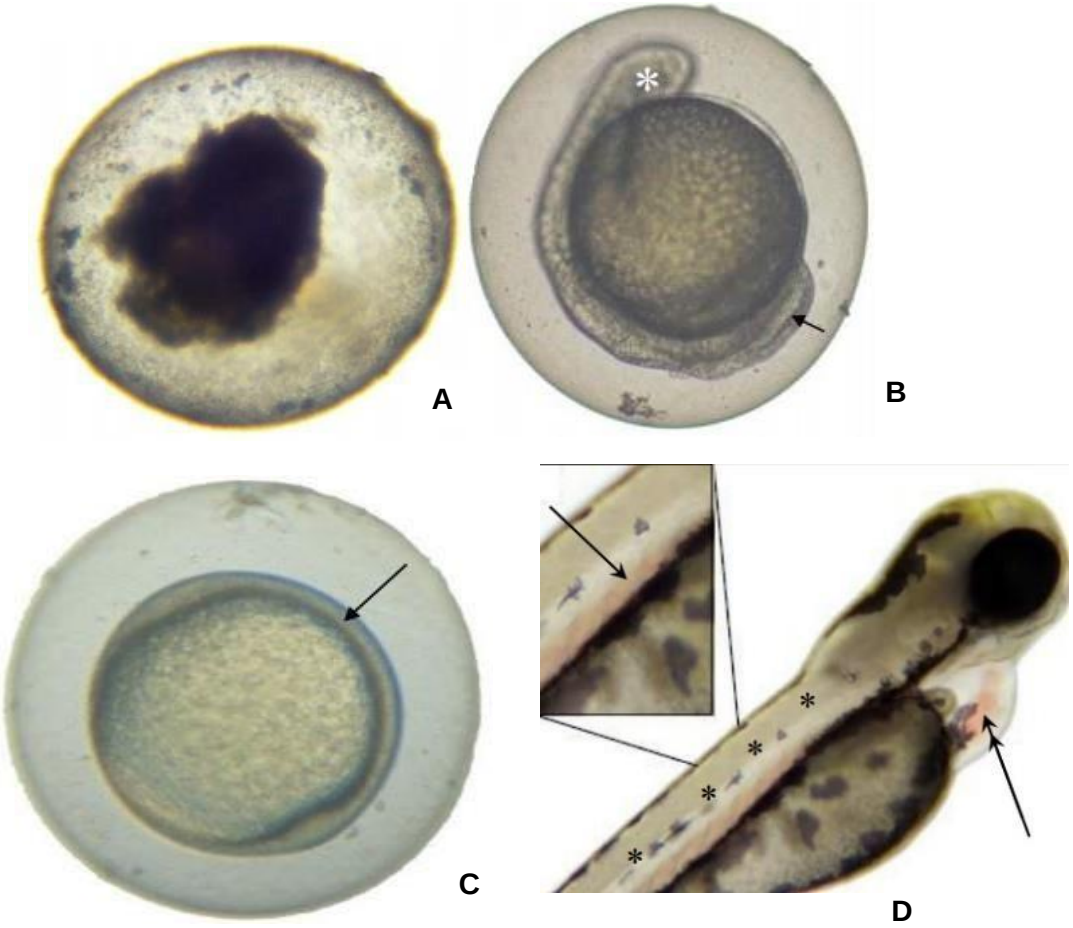
Figura 13: Ilustração da distribuição das soluções de resveratrol no ensaio de toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio*.



Fonte: Adaptado de OECD 236.

Após a exposição, foram observados os indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação de somitos, a ausência de batimentos cardíacos e o não destacamento do saco vitelínico por um período de 96 horas.

Figura 14: Indicadores de letalidade: (A) Ovo coagulado; (B) Não destacamento da cauda; (C) Ausência de somitos; (D) Ausência de batimentos.



Fonte: Adaptado de OECD, 236.

Para a confirmação da ausência de batimentos cardíacos os embriões foram observados por um período de um minuto e magnificação de 80X.

Os indicadores observados a cada 24 horas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 Indicadores de letalidade de acordo com o tempo de exposição.

	Tempo de exposição			
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
Embriões coagulados	+	+	+	+
Ausência de somitos	+	+	+	+
Não destacamento da cauda	+	+	+	+
Ausência de batimento cardíaco		+	+	+

Fonte: Adaptado de OECD, 236.

No final do período de exposição, foram contabilizados os organismos mortos e adicionados em uma planilha para o cálculo da % de mortalidade por concentração, depois estes valores foram adicionados no ORIGIN 8.0 e feitos os gráficos de mortalidade, além do cálculo da CL_{50} na função de dose resposta.

Tabela 4 Requisitos e condições para o ensaio de toxicidade aguda com embriões Danio rerio.

REQUISITOS	CONDIÇÕES
Ensaio	Estático
Água	Meio MS
Ovos	≥70% dos ovos coletados devem ser fertilizados
Concentrações	5 Concentrações + Controle MS+ Controle (DMSO)
Temperatura	26±1
Efeitos observados	Letalidade
Expressão dos resultados	CL_{50}

Fonte: o autor

4.5 DL50 da radiação gama (ɣ)

O ensaio para a obtenção da Dose letal que ocasiona a mortalidade de 50% dos organismos (DL_{50}) da radiação gama em embriões de *Danio rerio* também foram baseados no protocolo OECD nº 236 (Guideline on Fish Embryo Toxicity Test-FET).

Os procedimentos iniciais dos ensaios levaram em consideração os critérios de validade dos ensaios propostos pelo protocolo, onde somente foram utilizados lotes onde a taxa de fertilização foi ≥70%. Durante o período de exposição dos organismos, a temperatura utilizada foi de 26±1°C e a taxa de sobrevivência dos organismos utilizados no controle com o meio MS, foi ≥ 90%. As taxas de eclosão dos organismos com o córion foi de, no mínimo, 80% no final do período de exposição. Além disso, a saturação do oxigênio ao final do ensaio foi ≥80%. (OECD,

236).

Nas microplacas apenas o meio MS foi utilizado, foram preparadas cinco microplacas de 24 poços, sendo uma para cada dose de radiação em organismos de diferentes fases de desenvolvimento, 4,6, 12 e 24hpf (Fig 12).

Para a obtenção da DL50, os organismos também foram divididos em 2 grupos, grupo (1) de organismos irradiados com o córion e grupo (2) organismos irradiados sem o córion, mostrado na tabela 5.

Tabela 5 Hora pós fertilização que os embriões dos grupos 1 e 2 foram irradiados.

GRUPO	HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO	ESTÁGIO
1- Organismos com o córion.	4 hpf	Figura 12-a
	6 hpf	Figura 12-b
	24 hpf	Figura 12-d
2- Organismos sem o córion.	24 hpf	Figura 12-d

Fonte: A autora.

Para cada ensaio os embriões foram irradiados em cinco doses diferentes de radiação e para cada dose foi utilizada uma microplaca de 24 poços contendo 2mL de meio MS em quatro poços (controle de placa) e nos outros 20 poços foram adicionados 2 mL em cada um com a respectiva solução de resveratrol e em todos os poços foi adicionado 1 embrião.

Durante o período de exposição as microplacas permaneceram em incubadora na temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 14h luz/12h escuro.

A irradiação aconteceu na fonte de Cobalto 60, Gammacell 220 (Fig 14), onde durante o período dos ensaios a taxa de dose era de 0.773 $kGy.h^{-1}$, o equipamento fica localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Figura 15: Fonte de Co-60, Gammacell 220.

Fonte: Moreno, 2009.

O ensaio teve duração de 144 horas (seis dias) e os organismos foram acompanhados através de um microscópio óptico (Olympus CK40). Os parâmetros verificados para a letalidade pós-irradiação estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 Indicadores de letalidade de acordo com o tempo decorrido do ensaio.

Efeitos observados	24 horas	48 horas	72 horas
Coagulação	X	X	
Ausência de Somitos	X	X	
Não destacamento da cauda.	X	X	
Ausência de Batimentos cardíacos.		X	X

Fonte: Adaptado de OECD 236.

Após o período de exposição, foram contabilizados os organismos mortos e adicionados em uma planilha e os dados e foram adicionados no programa estatístico ORIGIN 8.0 onde foram preparados os gráficos e o cálculo das DL_{50} utilizando a função dose-resposta.

O resumo e requisitos dos procedimentos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 Resumo das condições do ensaio de DL50 da radiação ɣ.

REQUISITOS	CONDIÇÕES
Ensaio	Semi estático (Com troca a cada 72 horas)
Água	Meio MS
Ovos	≥70% dos ovos coletados devem ser fertilizados
Concentrações	5 Doses + Controle MS
Temperatura	26±1
Efeitos observados	Letalidade
Expressão dos resultados	DL_{50}

Fonte: A autora.

4.6 Ensaio da atividade radiomodificadora do resveratrol em embriões de *Danio rerio*

A exposição dos organismos neste ensaio também teve como base o protocolo da OECD 236, onde os requisitos básicos que garantem a validade do ensaio foram a taxa de fertilização, para o lote de organismos utilizado, foi ≥70%. Durante o período de exposição os organismos a temperatura utilizada foi de 26±1°C e a taxa de sobrevivência dos organismos utilizados no controle com o meio MS, foi ≥ 90%. As taxas de eclosão dos organismos com o córion foi de, no mínimo, 80% no final do período de exposição. Além disso, a saturação do oxigênio ao final do ensaio foi ≥80% (OECD, 236).

Foram utilizados organismos em diferentes momentos do desenvolvimento 4,6,12 e 24 hpf (Tabela 5).

Neste ensaio, os embriões foram decorionados com 12hpf e após o processo foram lavados três vezes em meio MS e adicionados nas microplacas de

resveratrol e permaneceram em incubadora durante a noite por mais 12 horas em contato com a substância. Além disso, também foram preparadas placas de controle. Na manhã seguinte quando os embriões estavam com 24 hpf foram irradiados no Gammacell220 localizado no Centro de Tecnologia das radiações (Figura 15).

Os organismos foram divididos em três grupos: (1) Organismos não irradiados;(2) Organismos irradiados e (3) Organismos irradiados após o tratamento com o resveratrol. A escolha das doses da radiação e concentrações de resveratrol foi baseada nos resultados da CL_{50} do resveratrol e da DL_{50} da radiação ɣ.

Tabela 8: Grupo 1 – Organismos não irradiados (Controle, embriões em meio MS durante o período da irradiação das outras placas).

GRUPO	HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO	MEIO UTILIZADO
Com córion	4 hpf	MS
	6 hpf	MS
	24 hpf	MS
Sem córion	24 hpf	MS

Fonte: A autora.

Tabela 9: Grupo 2 – Organismos irradiados.

GRUPO	HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO	DOSE DE RADIAÇÃO (GY)
Com córion	4 hpf	5,10,15,20,25
	6 hpf	5,10,15,20,25
	24 hpf	10,20,30,40,50
Sem córion	24 hpf	5,10,15,20,25

Fonte: A autora.

Tabela 10: Grupo 3 – Organismos irradiados na presença do resveratrol.

GRUPO	HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO	DOSE DE RADIAÇÃO (GY)	RESVERATROL	TEMPO EM CONTATO
Com córion	4 hpf	5,10,15,20,25	15 e 30 µM	3 hs
	6 hpf	5,10,15,20,25	15 e 30 µM	5 hs
	24 hpf	10,20,30,40,50	15 e 30 µM	24 hs
Sem córion	24 hpf	5,10,15,20,25	30 e 60 µM	12 hs

Fonte: A autora.

O ensaio teve duração de 144 horas (seis dias) e os organismos foram acompanhados através de um microscópio óptico (Olympus CK40). Os parâmetros verificados para a letalidade pós-irradiação estão apresentados na tabela 6, assim como foi no ensaio para obtenção da DL_{50}.

Para verificação das diferenças entre as mortalidades de organismos irradiados na presença e ausência do resveratrol foi aplicado um teste Z (Vuolo,1996), que é utilizado para determinar a compatibilidade de dois resultados experimentais, através do cálculo da diferença entre os dois resultados com relação à incerteza combinada de ambos. Definindo um nível de significância de 3%, isto é, probabilidade de apenas 3% do resultado não indicar compatibilidade, consideramos os dados compatíveis para valores de Z menores do que 3.

Após o período de exposição, foram contabilizados os organismos mortos e adicionados em uma planilha do Excel onde foi feito um teste Z para comparação das médias de mortalidade a cada 24 horas e os dados e foram adicionados no programa estatístico ORIGIN 8.0 onde foram preparados os gráficos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IC50 (Citotoxicidade do resveratrol)

O IC_{50} obtido neste ensaio foi de 28% e corresponde a concentração de 69 µM, uma vez que as diluições foram feitas com a concentração de 250 µM como 100% de extrato.

Este valor está próximo aos valores encontrados na literatura, como Moreno (2009), onde o IC_{50} foi de 50 µM, Cavalcante (2017) que obteve um IC_{50} de 78% correspondente a concentração de 192 µM. Já Magalhães (2012) obteve um IC_{50} 150 µM em células de rabdomiossarcoma humano.

Na tabela 11 estão os valores de porcentagem de viabilidade celular correspondente a cada concentração utilizada.

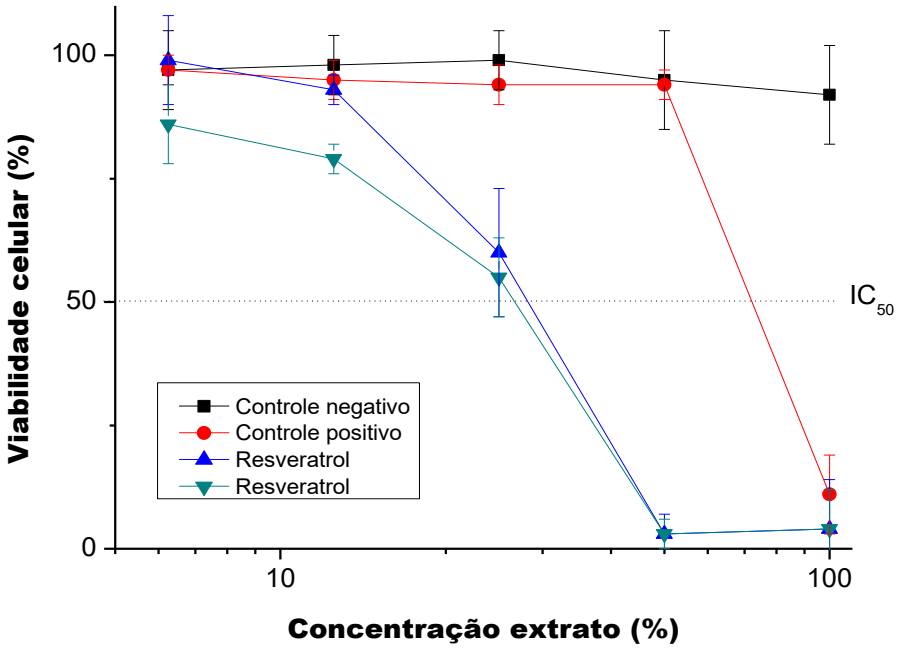
Tabela 11:Porcentagem da viabilidade celular.

Concentração do extrato (%)	Viabilidade celular (%)			
	Controle (-)	Controle (+)	Resveratrol	Resveratrol
100	92±10	11±8	4±10	4±8
50	95±10	94±3	3±4	3±3
25	99±6	94±4	60±13	55±8
12,5	98±6	95±4	93±3	79±3
6,25	97±8	97±3	99±9	86±8

Fonte: A autora.

Além disso, a diminuição do número celular expostas ao resveratrol foi semelhante à descrita por Sgambato et al. (2001), de maneira dose dependente em diversas linhagens de células, onde os índices de citotoxicidade podem corresponder de 22 a 109 µM (Tabela 12).

Figura 16: Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.



Fonte: A autora.

Os controles positivo e negativo foram utilizados para garantir a qualidade do ensaio. Os índices de viabilidade projetados acima da linha de 50% são considerados não citotóxicos e as amostras com índices que cruzam a linha do IC_{50} são consideradas citotóxicas, como o controle positivo.

As curvas obtidas para o resveratrol foram semelhantes as curvas do controle positivo e o resultado obtido serviu como base para a escolha das concentrações utilizadas no ensaio *in vivo* com embriões de *Danio rerio.*

Sgambato et al. (2001), utilizaram diversas linhagens celulares afim de obter concentração do resveratrol que inibe o crescimento celular em 50% (IC_{50}) entre elas fibroblastos de roedores, células normais do tecido epitelial de ratos e células cancerígenas, sendo três de mama, três de cólon e duas da próstata e todas as células foram expostas por um período de 48 horas.

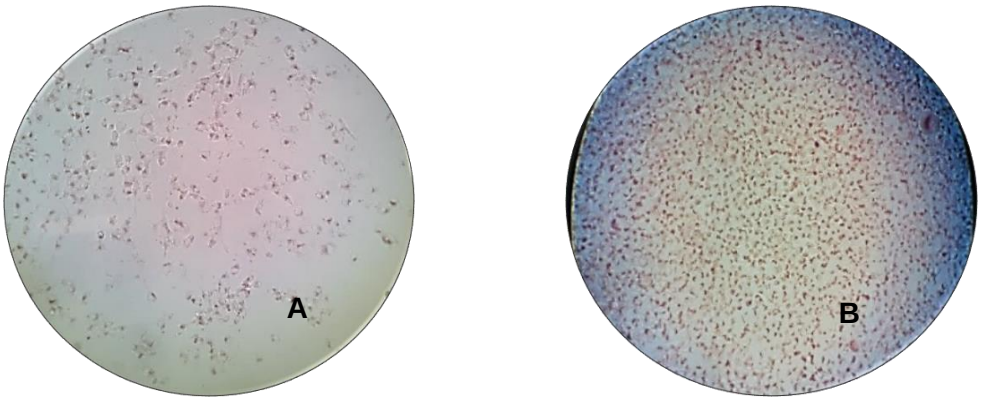
Tabela 12: IC50 do resveratrol em diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	Origem	IC_{50}[a] (μM)
Rat-1	Fibroblastos de ratos	90.12 ± 5
HC11	Epitélio mamário de ratos	22.85 ± 5
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humana	101.48 ± 11
T47-D	Adenocarcinoma de mama humana	69.08 ± 5
BT-549	Adenocarcinoma de mama humana	72.19 ± 9
HCT116	Adenocarcinoma de cólon humano	89.13 ± 4
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	94.52 ± 3
SW-620	Adenocarcinoma de cólon humano	109.06 ± 10
PC3	Adenocarcinoma de próstata humana	67.11 ± 2
DU145	Adenocarcinoma de próstata humana	51.12 ± 3
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix humano	82.60 ± 6

Fonte: Adaptado de Sgambato (2001).

De acordo com Repetto et al. (2008), quando ocorre a morte celular ou redução no gradiente de pH das células o corante não consegue ser retido. Por este motivo, a quantidade de corante é proporcional ao número de células viáveis e a distinção é feita com base na capacidade de absorção. Na figura 16, onde é possível observar poços com células viáveis que conseguiram abosorver o corante.

Figura 17: Absorção do corante vermelho neutro: (A) A maioria das células que sofreram lise celular e não absorveram o corante vermelho neutro na concentração de 100% do estrato. (B) Células vivas que absorveram o corante vermelho neutro na concentração de 6,25% do extrato. Magnificência de 10x.



Fonte: A autora.

O método de incorporação do vermelho neutro (vn) tem como base a capacidade das células que não sofreram injúria absorver e ligar-se ao corante, este processo ocorre através da difusão passiva, onde o VN fica concentrado nas lisossomas através de ligações eletrostáticas e aniônicas ou grupos de fosfatos da própria matriz lisossomal (Repetto et al., 2008).

Para que ocorra essa absorção, a célula precisa ser capaz de manter o gradiente de pH além da produção de ATP. Em pH normal, o corante apresenta uma carga muito próxima de zero, o que possibilita a penetração na membrana celular. Dentro das lisossomas existe um gradiente de prótons que mantem o pH mais baixo que o citoplasma. Quando o VN atravessa a membrana a carga de elétrons aumenta e assim ele é retido dentro das lisossomas (Repetto et al., 2008).

5.1 Toxicidade do resveratrol em embriões de *Danio rerio* para obtenção da CL_{50}.

Os resultados de CL_{50} obtidos realizados em organismos com e sem o córion em diferentes momentos pós fertilização por um período de 96 horas são apresentaos na tabela 13.

Tabela 13: Valores de dose respostas obtidas nos três ensaios com o resveratrol.

Ensaio	Horas pós fertilização (hpf)		CL_{50}
1	Com córion	2hpf	154 µM
2	Sem córion	12hpf	283 µM
3		24hpf	699 µM

Fonte: A autora.

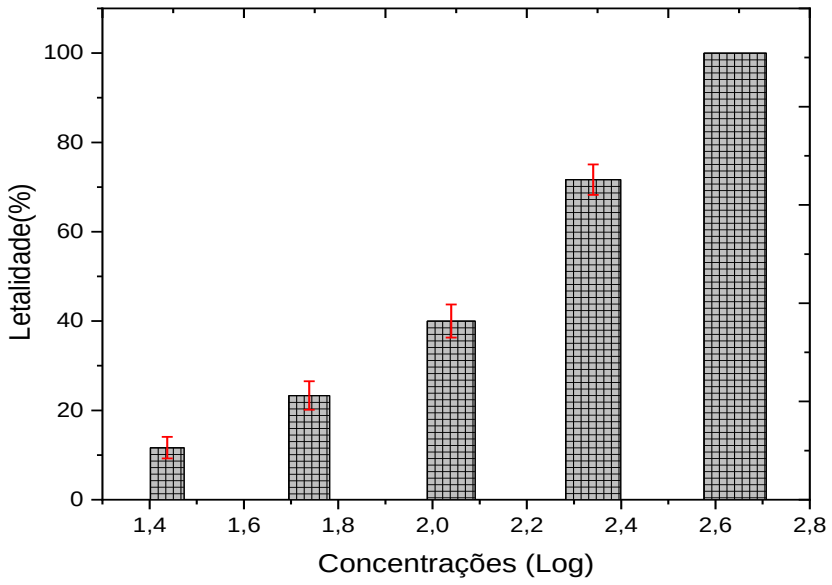
Todos os ensaios foram realizados em triplicata, entretanto, para os ensaios 2 e 3 a última réplica foi desconsiderada, pois a mortalidade dos organismos controle ultrapassou 10% que é o limite recomendado pela OECD 236 para garantir a qualidade e a validade dos resultados.

Tabela 14: Porcentagem de mortalidade do ensaio 1 em embriões de 2hpf com córion após 96 horas de exposição.

Concentração (µM)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
DMSO	0	0,0
27,38	11,67	4,1
54,76	23,33	5,5
109,5	40	6,3
219	71,67	5,8
438	100	0,0

Fonte: A autora.

Figura 18: Letalidade dos embriões de Danio rerio no ensaio 1 após 96 horas de exposição ao resveratrol.



Fonte: A autora.

Tabela 15: Percentual de eclosão dos embriões do ensaio 1.

Concentração (µM)	Eclosão		
	48 horas	72 horas	96 horas
0	80	100	100
DMSO	72	96	100
27,38	50	98	100
54,76	27	99	100
109,5	50	97	100
219	22	65	100
438	7	42	95

Fonte: A autora.

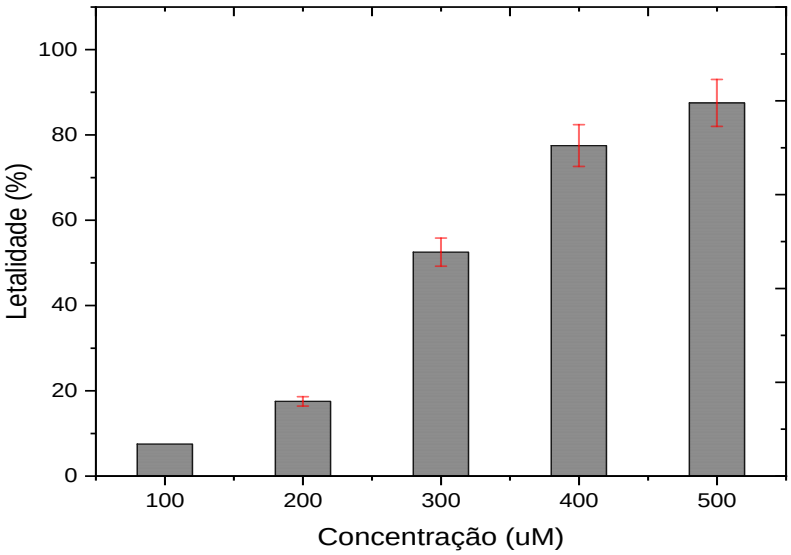
A taxa de eclosão dos embriões, onde ao final do período de 96 horas 5% das larvas não eclodiram na última concentração foi semelhante aos dados reportados por Cavalcante (2017).

Tabela 16: Porcentagem de mortalidade do ensaio 2 em embriões de 12hpf após o período de 96 horas de exposição.

Concentração (µM)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
DMSO	0	0,0
27,38	7,5	0,5
54,76	17,5	1,1
109,5	52,5	3,3
219	77,5	4,9
438	87,5	5,5

Fonte: A autora.

Figura 19: Letalidade dos embriões de Danio rerio no ensaio 2 após 96 horas de exposição ao resveratrol.



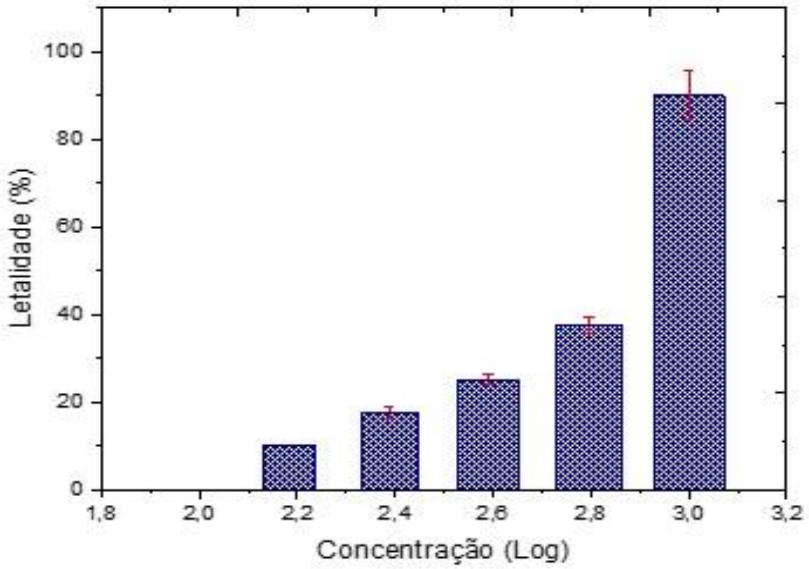
Fonte: A autora.

Tabela 17: Porcentagem de mortalidade do ensaio 3 em embriões de 24 hpf sem o córion depois de um período de 96 horas de exposição.

Concentração µM	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
DMSO	0	0,0
152	10	0,6
244	17,5	1,1
390	25	1,6
625	37,5	2,4
1000	90	5,7

Fonte: A autora.

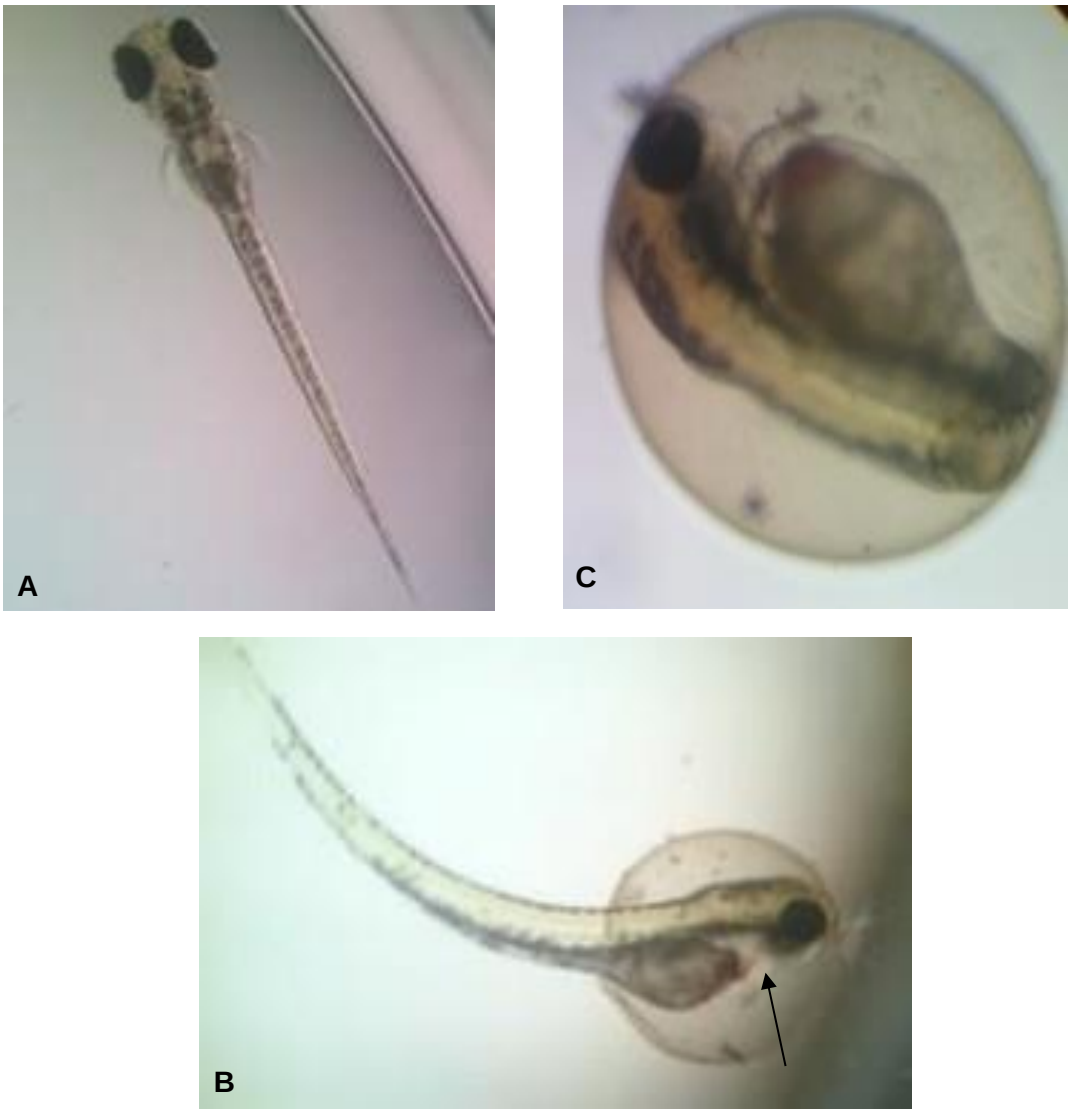
Figura 20: Letalidade dos embriões de Danio rerio no ensaio 3 após 96 horas de exposição ao resveratrol.



Fonte: A autora.

Algumas alterações morfológicas foram encontradas em larvas no ensaio 1 (na presença do córion no momento da exposição). Entretanto, a alteração na Figura 21(A) foi encontrada em apenas duas larvas e na figura 21 (C) nos 5% de larvas não eclodidas na última concentração após o período de 96 horas. Não se pode afirmar que estes efeitos foram ocasionados pelo resveratrol.

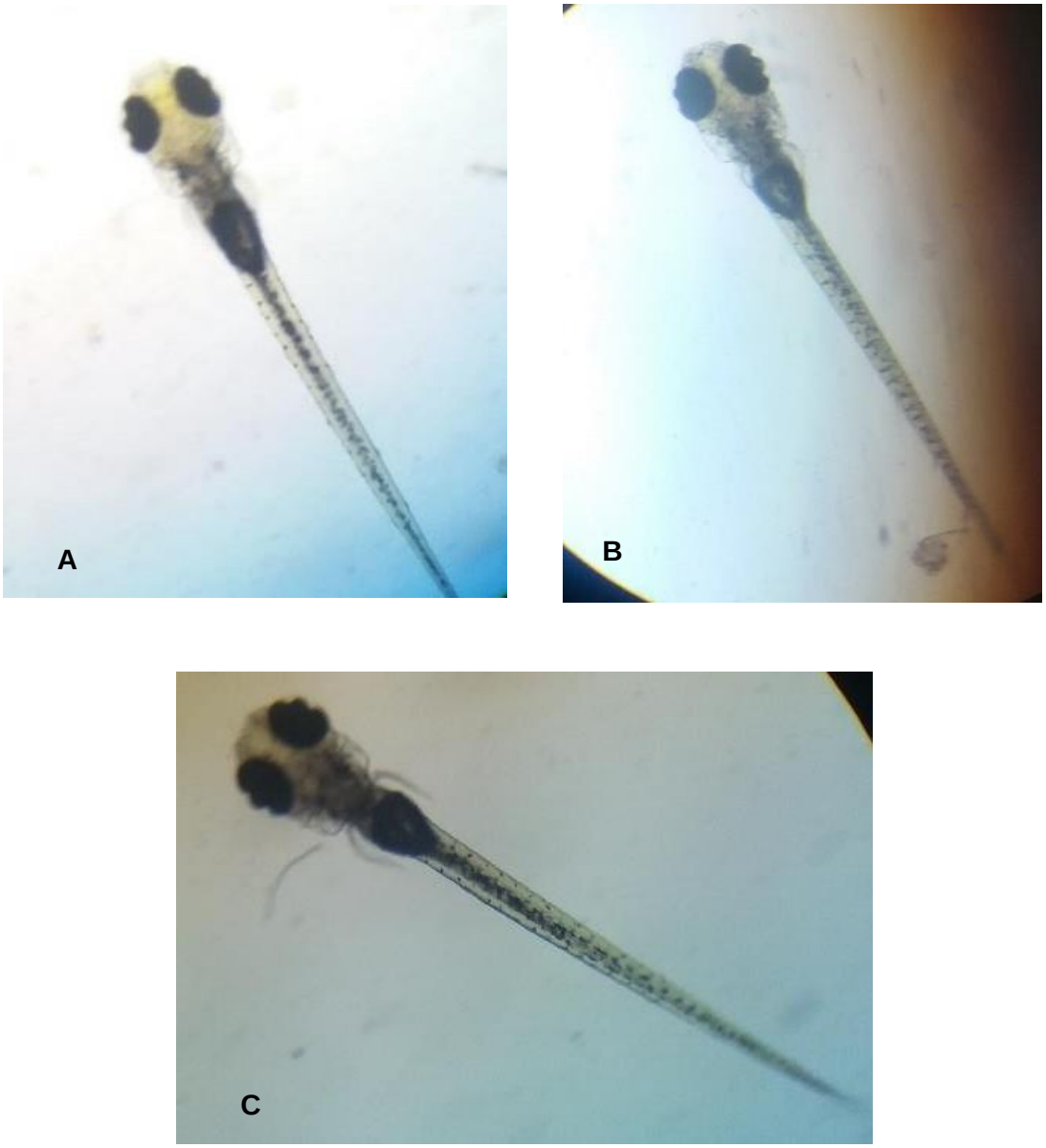
Figura 21: (A) Larva normal (Magnificência 20x); (B) ; Larva da concentração de 300 µM que eclodiu de maneira inadequada, onde somente a cauda saiu do ovo (Magnificência de 20x).(C)Larva da concentração de 438,15 ,que não eclodiu e onde é possível observar edema no pericárdio. Magnificência de 40X.



Fonte: A autora.

Nos ensaios 2 e 3 não foram encontradas alterações morfológicas em larvas vivas, sendo que em todas as concentrações os fenótipos dos sobreviventes estavam semelhantes aos do grupo controle mesmo nas maiores concentrações.

Figura 22: Larvas de Danio rerio (A) Controle; (B) Concentração de 500 µM do ensaio 2; (C) Concentração de 625 µM em embriões expostos com 24 hpf. Todas as fotos foram tiradas na



Fonte: A autora.

De acordo com Henn e Braunbeck (2011), o uso da pronase para decorionização dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento não é bem sucedida, pois ocorre mortalidade de um grande número de organismos. Entretanto, a decorionização a partir de 8hpf permite que haja uma taxa maior de sobrevivência dos embriões, não ultrapassando os 10% de mortalidade, uma vez que este é um critério para validade do ensaio no protocolo 236 da OECD. Outro ponto importante é que algumas substâncias só exercem efeito tóxico quando

entram em contato com o embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento, como é o caso do uso da concentração de 3,7 $mg.L^{-1}$ de 3,4 Dicloroanilina utilizada como controle positivo como indicação da norma, quando embriões decorionados com 24hpf são expostos a substância, não ocorre nenhuma alteração morfológica ou até mesmo mortalidade de , no mínimo , 20 a 80% dos organismos como é o caso dos embriões expostos com córion nos estágios iniciais.

Cavalcante (2017) em estudo sobre a toxicidade do resveratrol em *Danio rerio* expôs embriões por um período de 96 horas e obteve uma CL_{50} de 75 $mg.L^{-1}$. Na exposição crônica de curta duração de larvas recém eclodidas por um período de 168 horas a CL_{50} obtida foi de 51,37 $mg.L^{-1}$, onde a diferença nos resultados foi explicada pela hipótese de que o córion serviu como uma barreira. Porém, um fator importante foi a diferença com relação ao momento de desenvolvimento e o tempo de exposição.

No presente estudo a CL_{50} obtida para embriões sem córion foi maior (283 µM e 699 µM), indicando que o embrião pode absorver o resveratrol na presença do córion, o que não se sabe ao certo é o tempo levado para que ocorra este processo.

Vallverdú-Queralt et al. (2015), consideram que uma das limitações quanto ao uso de embriões é que eles necessitam absorver substâncias através do córion e de outras membranas , porque as guelras ainda não foram desenvolvidas e , por este motivo, é importante entender a biodisponibilidade e a capacidade das substâncias de produzir efeito e para entenderem como funciona a absorção do vinho expuseram os embriões de *Danio rerio* por um período de 24 horas e, após este período, eles foram decorionados, lavados e homogeneizados para leitura em HPLC, onde foram encontradas 43 substâncias somente no vinho e nos embriões 19 substâncias, entre elas o resveratrol.

Pardal et al. (2014) fizeram a comparação da capacidade do resveratrol e do piceido de reduzir a gordura em embriões e larvas de *Danio rerio* e demonstraram que o vitelo é consumido em, no mínimo, 5 dias pós fertilização. Como o saco vitelínico é largo, tem um volume considerável de massa e é considerado um depósito de lipídios nos embriões, além de servir como fonte de nutriente até que a larva seja capaz de alimentar-se de fontes exógenas, foi escolhido para entender este mecanismo com a utilização do corante Nilo (Nile red) que é capaz de exibir fluorescência em ambiente lipofílico sem ocasionar

deformações nos tecidos onde foi absorvido. Houve redução na fluorescência do saco vitelínico na presença do resveratrol e piceido. Isso confirma que o resveratrol é capaz de induzir a lipólise em larvas de zebrafish de maneira similar à que acontece com ratos e camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras.

De acordo com Calabrese et al. (2010) o resveratrol é capaz de induzir respostas horméticas em diversos modelos biológicos e pode afetar vários parâmetros de importância biomédica e terapêutica. Em linhas de células tumorais humanas que afetam mama, próstata, cólon, pulmão, útero e leucemia, concentrações baixas de resveratrol são capazes de aumentar a proliferação de células tumorais, enquanto concentrações mais altas de inibir, o que também foi observado em várias doenças parasitárias, incluindo leishmaniose e triquinela. Outros efeitos também foram relatados em modelos animais para lesão cardiovascular induzida, lesões gástricas, acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Alzheimer e osteoporose, indicando que houve frequentemente um efeito protetor em doses baixas e um efeito adverso em doses mais elevadas, exacerbando o processo e a incidência da doença. Os dados indicam que muitos efeitos induzidos pelo resveratrol são dependentes da dose e que os efeitos opostos ocorrem em doses baixas e altas, sendo indicativos de uma resposta à dose hormética. Entretanto, estudos epidemiológicos e clínicos são necessários para avaliar a natureza de sua dose-resposta.

O que indica a necessidade de mais estudos para entender os mecanismos de toxicidade e absorção de resveratrol em embriões e larvas de *Danio rerio*.

5.2 Ensaio de toxicidade aguda da radiação gama em embriões de *Danio rerio* para obtenção da DL_{50}.

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados em triplicata e em embriões de diferentes momentos pós fertilização, com e sem o córion (Tabela 18).

Tabela 18: Valores obtidos de doses letais de radiação ɣ.

Ensaio	Horas pós fertilização (hpf)		DL50
1	Com córion	4hpf	11,50 Gy
2		6hpf	12,18 Gy
3	Sem córion	24 hpf	24,80 Gy
4		24 hpf	16,99 Gy

Fonte: A autora.

O meio MS foi utilizado para preenchimento dos poços das microplacas e nos lotes de organismos utilizados a mortalidade não ultrapassou os 10% que é um critério para validade dos ensaios pela OECD 236.

Tabela 19: Porcentagem de mortalidade do ensaio 1 em embriões de 4hpf após o período de 144 horas de exposição.

Dose (Gy)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
10	11,67	1,6
15	48,33	3,6
20	70	5,4
25	100	7,1
30	100	7,4

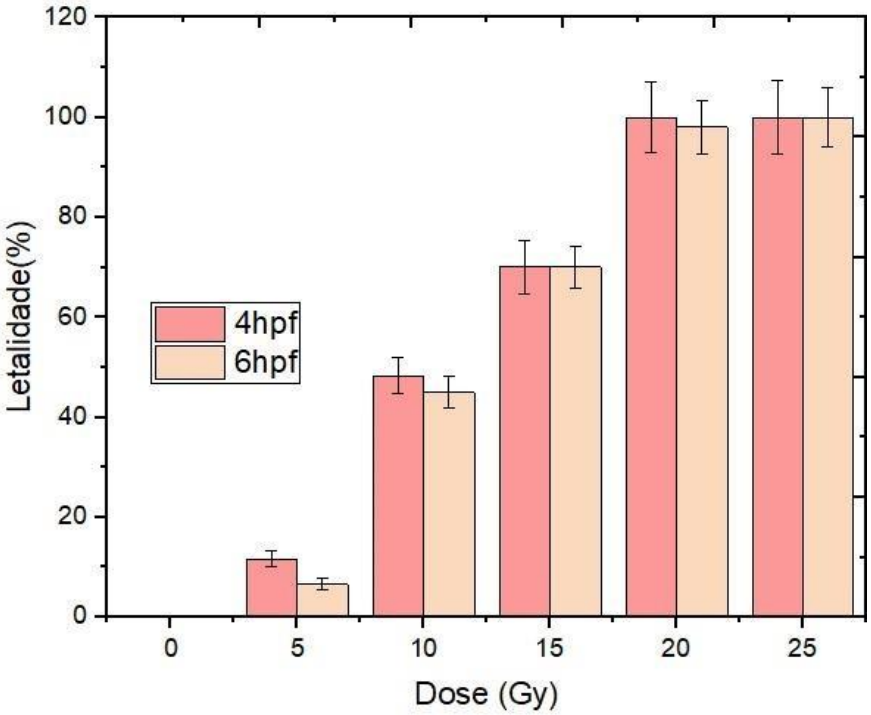
Fonte: A autora.

Tabela 20: Porcentagem de mortalidade do ensaio 2 em embriões de 6hpf após o período de 144 horas de exposição.

Dose (Gy)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
10	6,67	1,2
15	45	3,3
20	70	4,3
25	98,33	5,4
30	100	5,9

Fonte: A autora.

Figura 23:Letalidade dos embriões de *Danio rerio* dos ensaios 1 e 2 irradiados com 4 e 6 hpf após o período de 144 horas de exposição.



Fonte: A autora.

Tabela 21: Porcentagem de eclosão dos embriões vivos do ensaio 1 com embriões de 4hpf.

Concentração (µM)	Eclosão %		
	48 horas	72 horas	96 horas
0	75	100	100
10	72	96	100
15	68	98	100
20	69	99	100
25	70	97	100
30	71	96	100

Fonte: A autora.

Tabela 22: Porcentagem de eclosão dos embriões vivos do ensaio 2 em embriões de 6hpf.

Concentração (µM)	Eclosão		
	48 horas	72 horas	96 horas
0	70	100	100
10	75	95	100
15	69	97	100
20	66	95	100
25	72	99	100
30	69	98	100

Fonte: A autora.

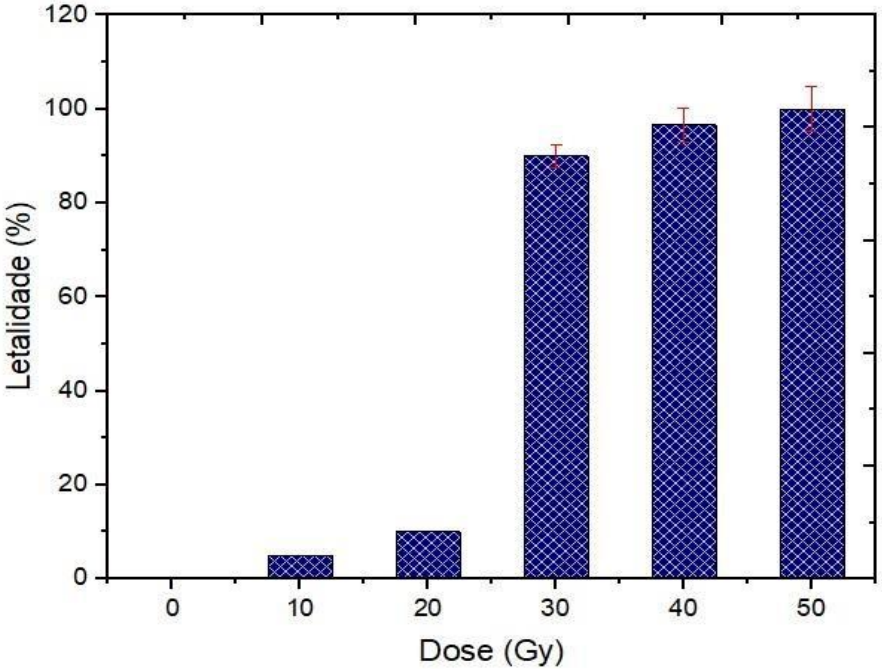
Tabela 23: Porcentagem de mortalidade do ensaio 3 que foi realizado em embriões de 24hpf após o período de 144 horas de exposição.

Dose (Gy)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0,0
10	5	0,0
20	10,00	0,0
30	90,00	2,5
40	96,67	3,7
50	100,00	4,9

Fonte: A autora.

Figura 24: Letalidade dos embriões de Danio rerio do ensaio 3 irradiados com 24 hpf após o período de 144 horas de exposição.

.



Fonte: A autora.

Tabela 24: Porcentagem de eclosão dos embriões vivos do ensaio 3 com embriões de 24hpf.

Concentração (μM)	Eclosão		
	48 horas	**72 horas**	**96 horas**
0	72	96	100
10	75	99	100
20	69	97	100
30	70	96	100
40	69	98	100
50	71	97	100

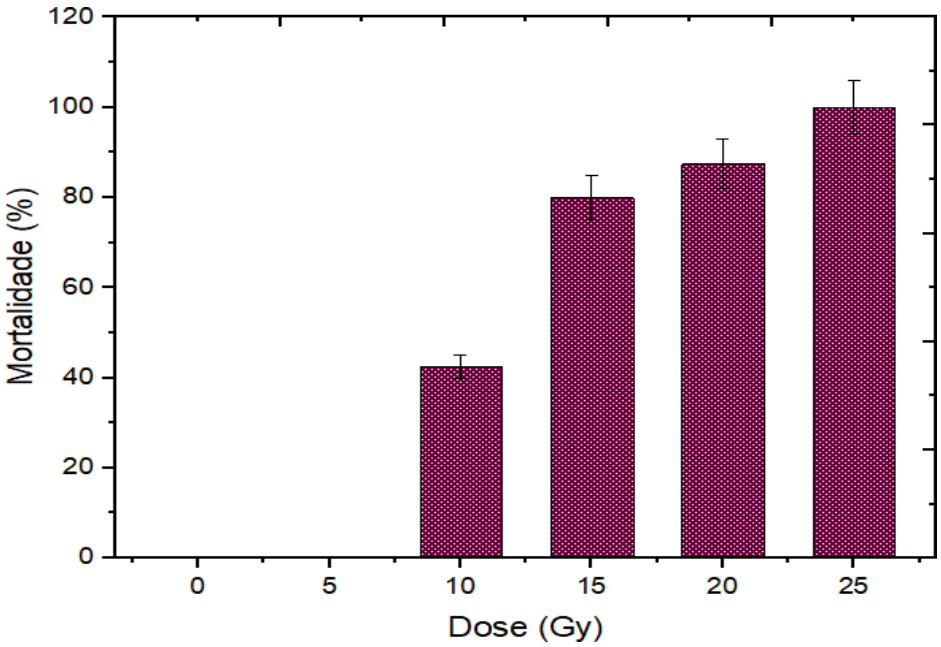
Fonte: A autora.

Tabela 25: Porcentagem de mortalidade do ensaio 4 em embriões de 24hpf após o período de 144 horas de exposição.

Dose (Gy)	Mortalidade %	Incerteza
0	0	0
10	15	0,9
20	20	1,3
30	25	1,6
40	100	6,3
50	100	6,3

Fonte: A autora.

Figura 25: Letalidade dos embriões de Danio rerio do ensaio 4 irradiados com 24 hpf sem o córion após o período de 144 horas de exposição.

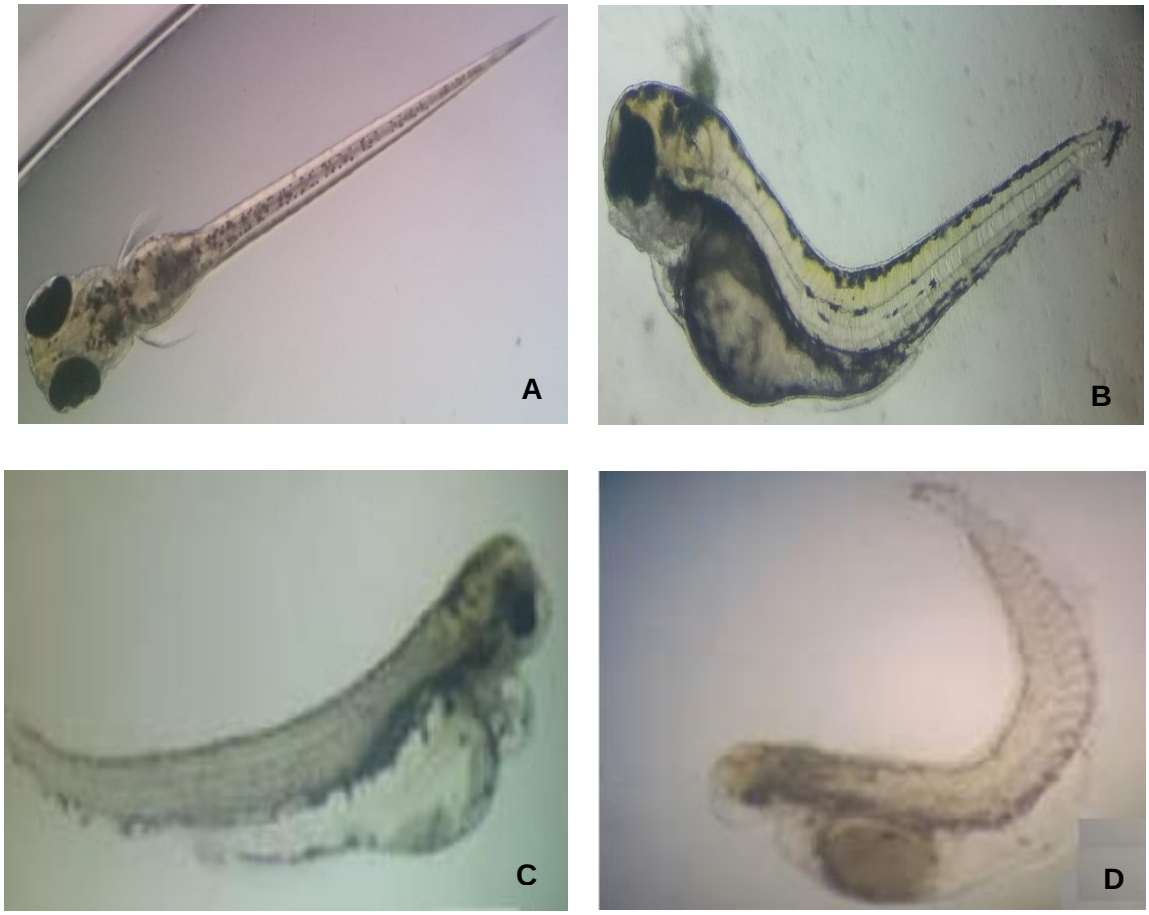


Fonte: A autora.

.

Além da mortalidade e da taxa de eclosão também foram observadas alterações morfológicas como diminuição no tamanho da cabeça que pode indicar microcefalia, diminuição no tamanho dos olhos que pode indicar microftalmia, edema do pericárdio e do saco vitelínico e curvatura da coluna vertebral em todos os organismos irradiados, com e sem o córion, mesmo nas menores doses utilizadas. Quanto maior a dose mais acentuados eram estes efeitos (Figura 26).

Figura 26: Alterações morfológicas ocasionadas por diferentes doses de radiação gama: (A) Larva do controle; (B) Larva irradiada com 10 Gy; (C) Larva irradiada com 20Gy e (D) (Larva irradiada com 30 Gy).



Fonte: A autora.

A mortalidade dos organismos em todos os ensaios também foi de maneira dose dependente e houve aumento na taxa de mortalidade dos organismos a partir de 72hpf.

Os dados encontrados na literatura estão de acordo com estes resultados, como o trabalho de Kumar et al. (2017) que apontam aumento da taxa de mortalidade de embriões irradiados com radiação gama indicando a toxicidade nestes organismos, assim como estudos relacionados a exposição a substâncias químicas até mesmo metais, onde é comum porcentagens maiores de mortalidade conforme há aumento da dose. Além disso, os embriões irradiados com radiação gama, com idade de 3hpf, em diferentes doses de radiação (De 1 a 10 Gy) já apresentaram um aumento significativo de mortalidade nas primeiras 24 hpf.

Entretanto, Geiger et al. (2006) irradiaram embriões de 2hpf na dose de 5Gy e a mortalidade também teve um aumento significativo no período de 72hpf onde apenas <25% dos embriões ainda estavam vivos.

A idade dos embriões no momento da irradiação e a dose utilizada é que determinam a sobrevivência e morfologia subsequentes e os efeitos da radiação na sobrevivência (Geiger et al., 2006). E isso explica as diferenças nos valores de DL_{50} para embriões irradiados com 4,6 e 24hpf (com e sem o córion), onde nos estágios iniciais de desenvolvimento os organismos demonstraram maior sensibilidade. Contudo, para organismos de 24 hpf sem o córion o valor obtido de DL_{50} foi menor do que os valores obtidos para embriões com córion, indicando maior sensibilidade quando há a remoção do córion nesta condição.

Não foram encontrados dados na literatura para comparação dos efeitos da radiação em embriões irradiados na presença e ausência do córion, mas, de acordo com Simon (2011), quando ocorre aceleração no processo de eclosão é desencadeado um mecanismo de consumo precoce de energia de reserva levando a diminuição da biomassa corporal das larvas em um período de 7 dias, a hipótese é de que a sensibilidade dos organismos pode ter sido alterada por este motivo.

Além disso, Simon et al. (2011) demonstraram que a exposição crônica de embriões e larvas de *Danio rerio* também resultou em efeitos significativos relacionados a toxicidade, influenciando principalmente o tempo de eclosão, a resistência à inanição e a massa corporal. O ensaio com duração de 20 dias mostrou maior resistência larval à inanição (somente após exposição crônica) e uma aceleração do tempo de eclosão após a exposição à irradiação g (de baixas a altas taxas de dose, 1 mGy/d 1 a 1000 mGy/d).

Além da mortalidade também foi obtida a taxa de eclosão em embriões irradiados com 4,6 e 24 hpf, que para todos organismos irradiados foi muito semelhante ao grupo do controle, não foi observado adianto ou atraso no processo.

As alterações morfológicas (Figura 26) também estão de acordo com os dados encontrados na literatura, como no trabalho de Geiger et al. (2006) e McAller et al. (2005), e os indicadores teratogênicos são consistentes com o conceito de que as proteínas necessárias para reparar os danos induzidos pela radiação não estão presentes no embrião antes da blástula quando o desenvolvimento é dirigido por proteínas maternas preexistentes presente no saco vitelínico. Por outro lado, existem evidências de que o embrião é capaz de expressar genes adequados ao

reparo afim de corrigir os danos ocasionados no DNA pela radiação após a MDB (4hpf), mas este processo precisa ser melhor investigado.

Todos os resultados obtidos foram suficientes para a escolha das doses de radiação utilizadas na etapa seguinte do trabalho onde os embriões foram irradiados na presença e na ausência do resveratrol.

5.3 Efeito radiomodificador do resveratrol em embriões de *Danio rerio.*

Em organismos de 4hpf a mortalidade dos embriões irradiados na presença do resveratrol (15 ou 30 µM) foi numericamente menor, entretanto, quando estes resultados foram comparados estatisticamente não apresentaram diferença, como demonstram os valores de Z obtidos.

Tabela 26: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 4 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (15µM) durante o período de 144 horas.

Horas	5 Gy		5 Gy+15 µM		Z	15 Gy		15 Gy+15 µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
48	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
72	8	0,5	10	1	1,79	50	3	50	5	0,00
96	10	0,5	12	1,2	1,54	65	4	65	6,5	0,00
120	10	0,6	12	1,2	1,49	72,5	4,5	69	6,9	0,42
144	12,5	0,8	12	1,2	0,35	72,5	4,5	69	6,9	0,42

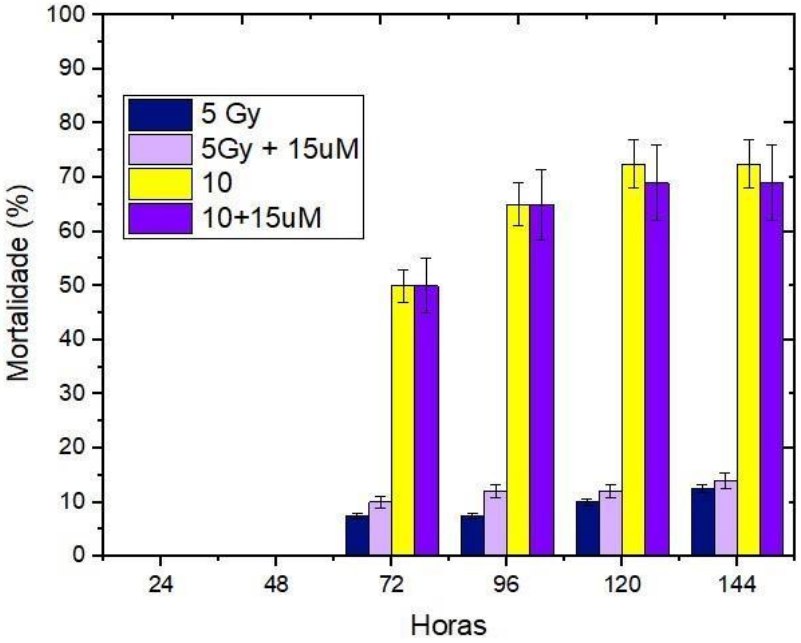
Fonte: A autora.

Tabela 27: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 4 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (30µM) durante o período de 144 horas.

Horas	5 Gy		5 Gy+30 µM		Z	15 Gy		15 Gy+30 µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
48	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
72	8	0,5	10	1	1,79	50	3	48	4,8	0,35
96	9,5	0,5	12	1,2	1,92	65	4	52	5,2	1,98
120	10	0,6	12	1,2	1,49	72,5	4,5	65	6,5	0,95
144	12,5	0,8	14	1,4	0,93	72,5	4,5	66	6,6	0,81

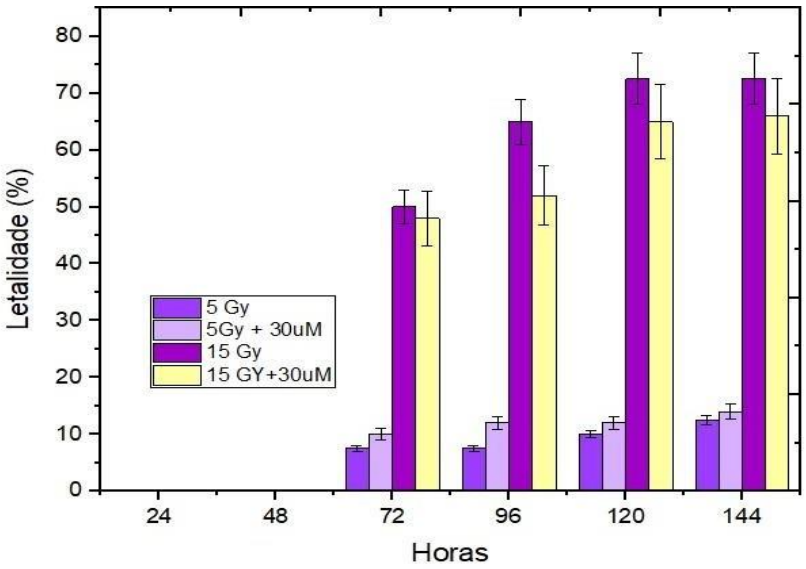
Fonte: A autora.

Figura 27: Letalidade de embriões de *Danio rerio* irradiados com 4hpf na presença resveratrol (15uM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Figura 28: Letalidade de embriões de *Danio rerio* irradiados com 4hpf na presença resveratrol (30uM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Nos embriões de 4hpf a mortalidade dos irradiados na presença do resveratrol (15 ou 30 µM) também foi numericamente menor, entretanto, quando estes resultados foram comparados estatisticamente não apresentaram diferença, como demonstram os valores de Z obtidos (Tabelas 28 e 29).

Tabela 28: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 6 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (15µM) durante o período de 144 horas.

Horas	5 Gy		5 Gy+30 µM		Z	15 Gy		15 Gy+30 µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
72	25,0	1,9	25,0	1,5	0,00	62,5	4,0	62,5	4,0	0,00
96	28,3	2,2	25,0	1,5	1,25	72,5	4,6	72,5	4,6	0,00
120	31,7	2,5	30,0	2,0	0,53	77,5	4,9	72,5	4,6	0,74
144	35,0	2,7	35,0	2,0	0,00	80,0	5,1	75,0	4,7	0,72

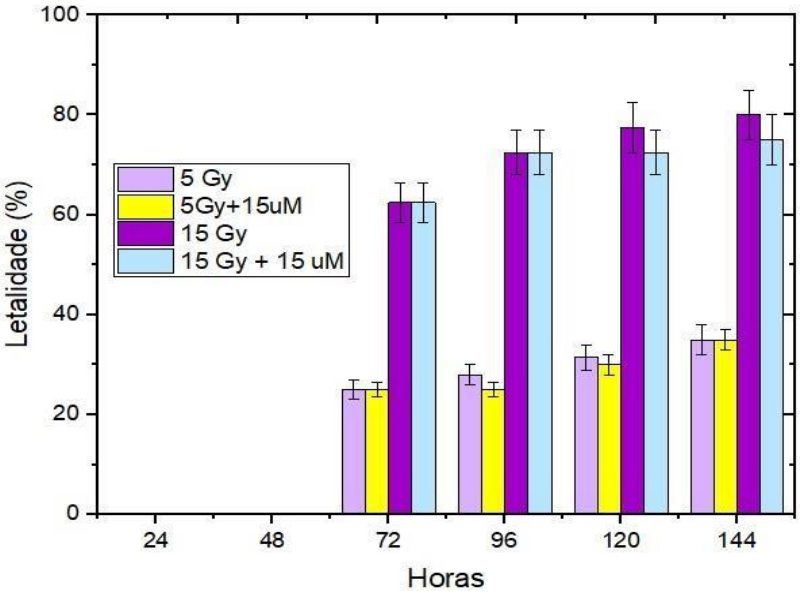
Fonte: A autora.

Tabela 29: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 6 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (30µM) durante o período de 144 horas.

Horas	5 Gy		5 Gy+30 µM		Z	15 Gy		15 Gy+30 µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	7,5	3,2	2,30
72	25,0	1,9	22,5	1,4	1,04	62,5	4,0	65,0	4,1	0,44
96	28,3	2,2	25,0	1,6	1,23	72,5	4,6	70,0	4,4	0,39
120	31,7	2,5	25,0	1,6	2,28	77,5	4,9	70,0	4,4	1,14
144	35,0	2,7	30,0	1,9	1,51	80,0	5,1	75,0	4,7	0,72

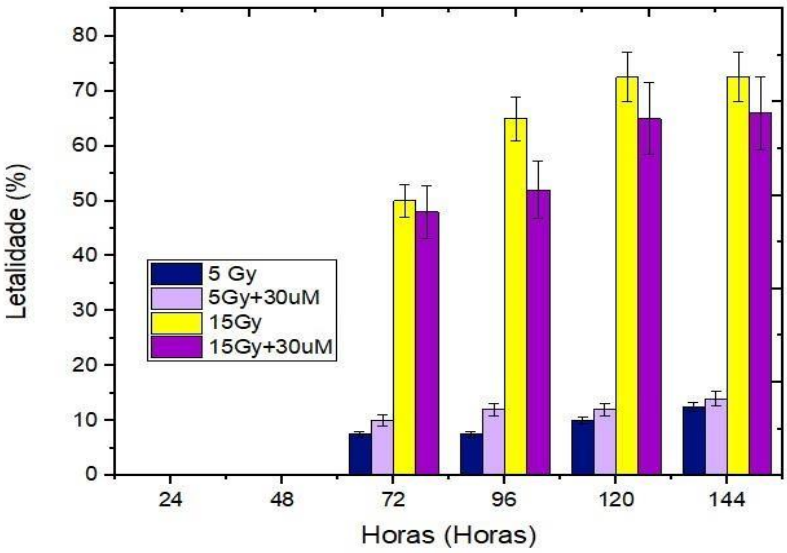
Fonte: A autora.

Figura 29: Letalidade de embriões de Danio rerio irradiados com 6hpf na presença resveratrol (15uM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Figura 30: Letalidade de embriões de *Danio rerio* irradiados com 6hpf na presença resveratrol (30uM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Nos embriões de 24 hpf a mortalidade dos irradiados na presença e ausência do resveratrol (15 ou 30 µM) também apresentou diferenças e, novamente, quando estes resultados foram comparados estatisticamente essa diferença não foi significante, como demonstram os valores de Z obtidos (Tabelas 30 e 31).

Tabela 30: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 24 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (15µM) durante o período de 144 horas.

Horas	**10 Gy**		**10+15 µM**		**Z**	**20 Gy**		**20+15 µM**		**Z**
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	15	1,5	13	1,3	1,01	30	3	29	2,9	0,24
96	18	1,8	19	1,9	0,38	36	3,6	33	3,3	0,61
120	23	2,3	21	2,1	0,64	40	4	42	4,2	0,34
144	27	2,7	25	2,5	0,54	45	4,5	46	4,6	0,16

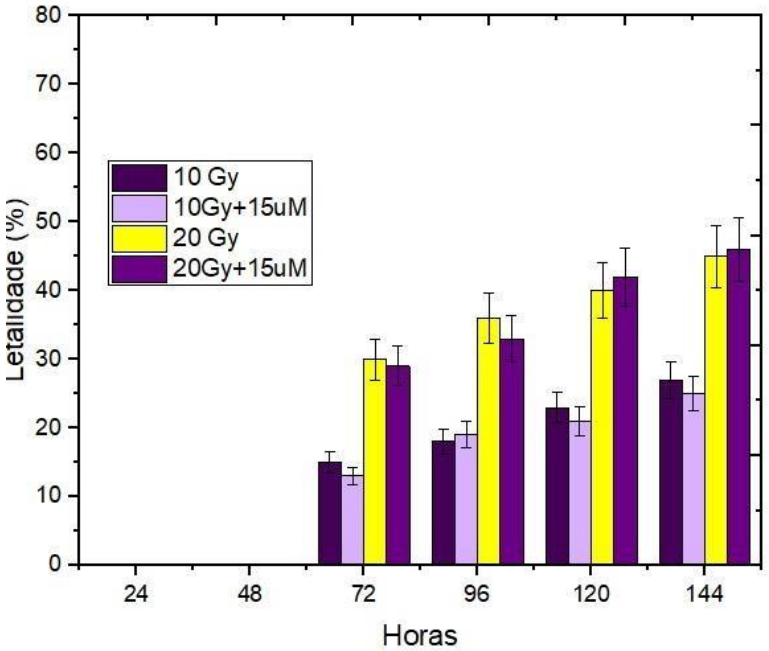
Fonte: A autora.

Tabela 31: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 24 hpf irradiados na presença e ausência resveratrol (30µM) durante o período de 144 horas.

Horas	**10 Gy**		**10+30 µM**		**Z**	**20 Gy**		**20+30 µM**		**Z**
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	15	1,5	17	1,7	0,88	30	3	30	3	0
96	18	1,8	22	2,2	1,41	36	3,6	39	3,9	0,57
120	23	2,3	22	2,2	0,31	40	4	43	4,3	0,51
144	27	2,7	26	2,6	0,27	45	4,5	48	4,8	0,46

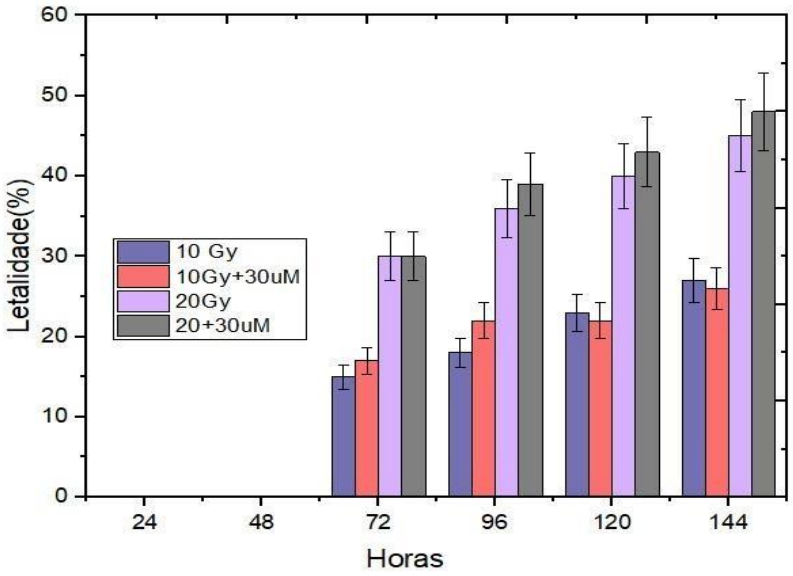
Fonte: A autora.

Figura 31: Letalidade de embriões de *Danio rerio* irradiados com 24hpf na presença resveratrol (15µM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Figura 32: Letalidade de embriões de Danio rerio irradiados com 24hpf na presença resveratrol (30µM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

Já no ensaio com de 24 hpf sem o córion a mortalidade dos embriões irradiados na presença do resveratrol apresentou diferenças numéricas, e a mortalidade nas doses de 10 Gy e 10Gy+30 µM foi significativa, onde o valor obtido de Z foi 5,86 indicado que há diferença entre as médias e pode indicar proteção do resveratrol nesta condição (Tabelas 32 e 33).

Tabela 32: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 24 hpf sem córion irradiados na presença e ausência resveratrol (30µM) durante o período de 144 horas.

Horas	10Gy		10+30 µM		Z	15 Gy		30+ µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0	0,00	0	0,0	0	0,0	0,00
48	0	0	0	0	0,00	0	0,0	0	0,0	0,00
72	17,5	1	12,5	0,8	**3,90**	20	1,3	17,5	1,1	1,49
96	17,5	1	12,5	0,8	**3,90**	20	1,3	20	1,3	0,00
120	20	1	12,5	0,8	**5,86**	25	1,6	25	1,6	0,00
144	20	1	12,5	0,8	**5,86**	25	1,6	25	1,6	0,00

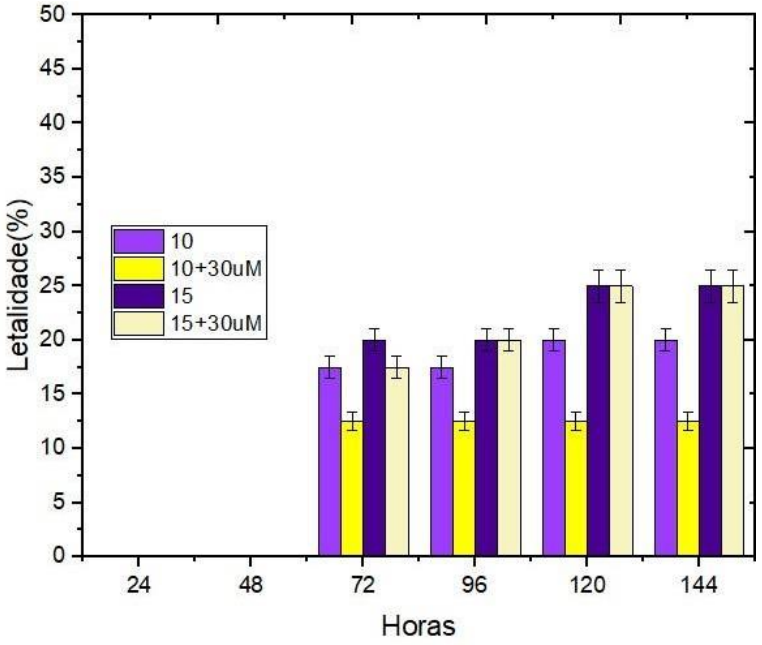
Fonte: A autora.

Tabela 33: Porcentagem de mortalidade dos embriões de 24 hpf sem córion irradiados na presença e ausência resveratrol (60µM) durante o período de 144 horas.

Horas	10 Gy		10+60 µM		Z	15 Gy		15+60 µM		Z
	%	Incerteza	%	Incerteza		%	Incerteza	%	Incerteza	
24	0	0	0	0,0	0,00	0	0,0	0	0,0	0
48	0	0	0	0,0	0,00	0	0,0	0	0,0	0
72	17,5	1	15	0,9	1,81	20	1,3	25	1,6	2,47
96	17,5	1	17,5	1,1	0,00	20	1,3	25	1,6	2,47
120	20	1	17,5	1,1	1,68	25	1,6	27,5	1,7	1,06
144	20	1	20	1,3	0,00	25	1,6	30	1,9	2,02

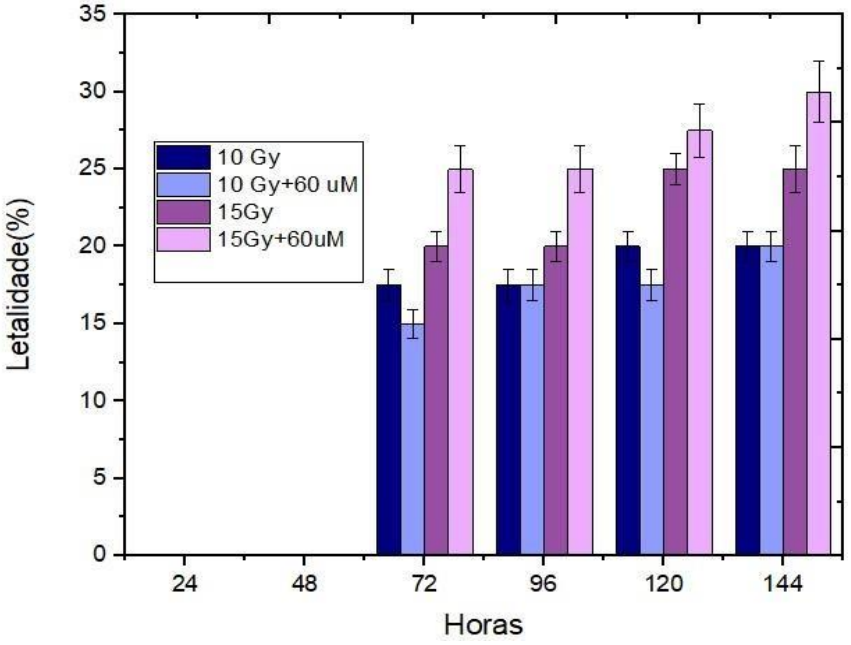
Fonte: A autora.

Figura 33: Letalidade de embriões de Danio rerio irradiados com 24hpf sem o córion na presença do resveratrol (30µM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

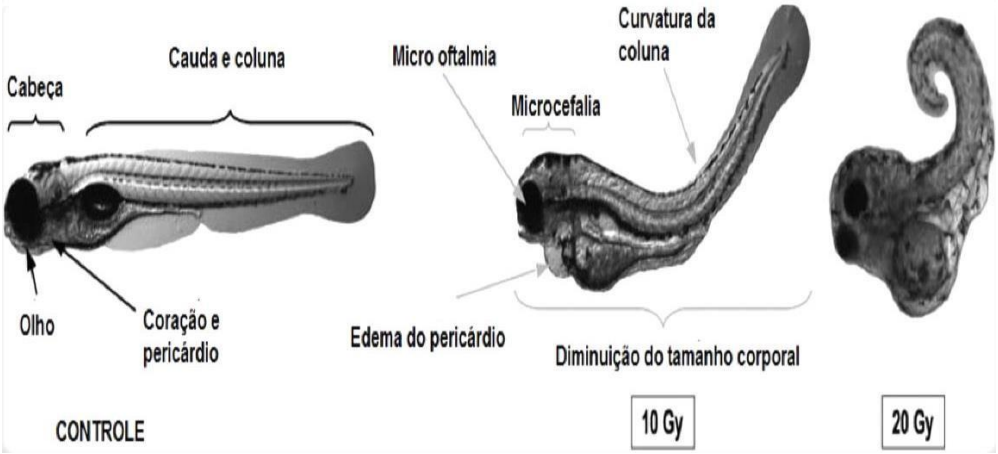
Figura 34: Letalidade de embriões de Danio rerio irradiados com 24hpf sem o córion na presença resveratrol (60µM) após o período de 144 horas.



Fonte: A autora.

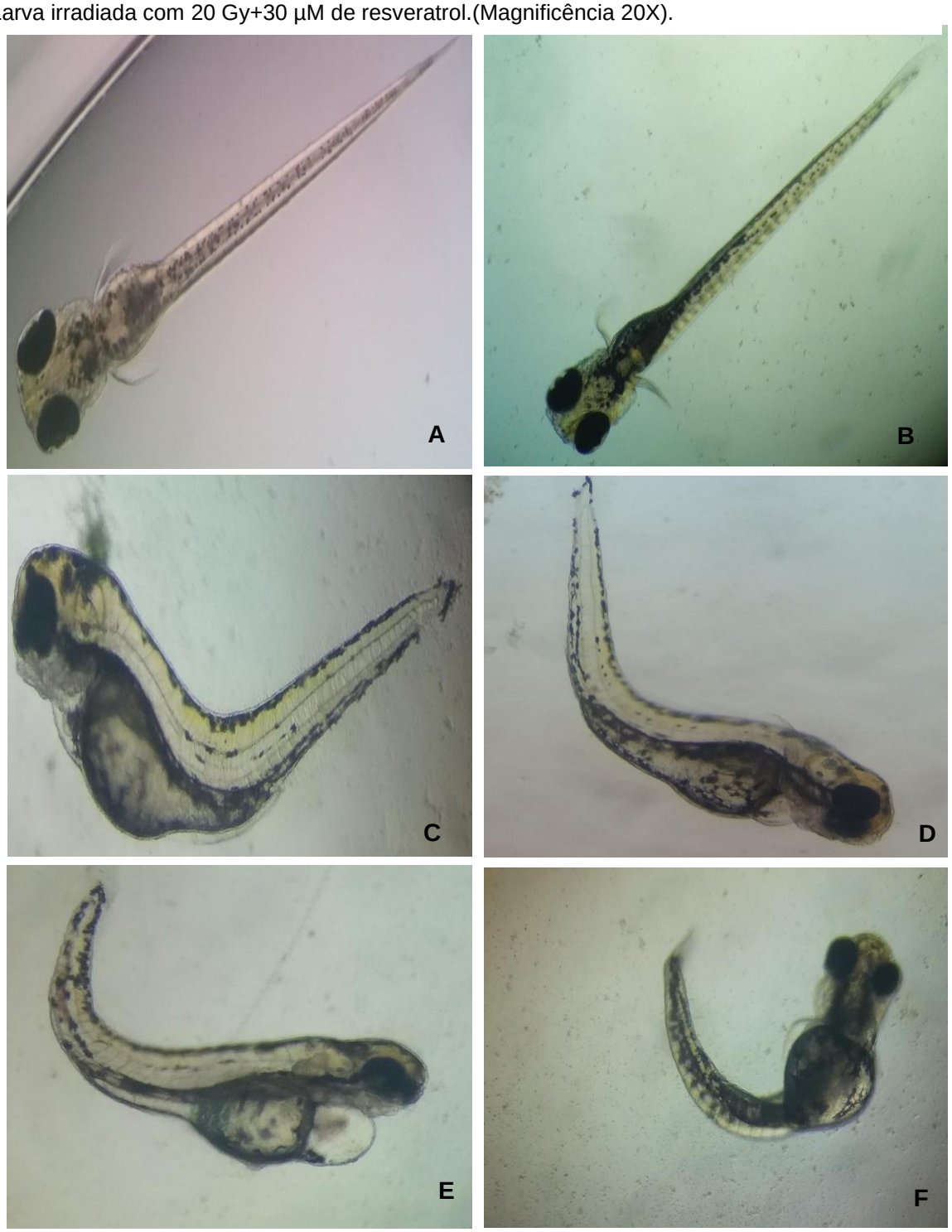
As alterações morfológicas: curvatura da coluna vertebral, diminuição do tamanho da cabeça e dos olhos, presença de edema no pericárdio e do saco vitelínico foram observadas em todas as larvas vivas de todos os ensaios. As alterações encontradas (Figura 36) as estão de acordo com aquelas descritas por Geiger (2006) e McAleer (2005) (Figura 35).

Figura 35: Alterações morfológicas em larvas irradiadas.



Fonte: Geiger (2006).

Figura 36: Larva do controle; (B) Larva na concentração de 60 uM de resveratrol; (C) Larva irradiada com 10 Gy; (D) Larva irradiada com 10 Gy+30 µM de resveratrol;(E) Larva irradiada com 15 Gy; (F) Larva irradiada com 15Gy+30 µM de resveratrol; (G) Larva irradiada com 20 Gy e (H) Larva irradiada com 20 Gy+30 µM de resveratrol.(Magnificência 20X).



Fonte: A autora.

Os resultados com relação a mortalidade dos embriões no decorrer dos dias de ensaio foram de maneira dose dependente mesmo na presença do resveratrol em embriões com e sem o córion. Somente no ensaio com com embriões sem córion irradiados com 24hpf após um período de 12 horas em exposição ao resveratrol é que se observa um indício de radioproteção na dose de 10 Gy e 10 Gy+ 15µM.

Em estudo sobre efeitos da aminofostina em embriões de *Danio rerio* irradiados de Geiger et al. (2006) descrevem que a radioproteção de substâncias depende do tipo de célula, tecido e do tipo de organismo, assim como a capacidade dos diferentes tipos de células tolerar a radiação que pode ser afetada pela amifostina ou outros radiomodificadores devido a diferenças na capacidade de reparação, nas vias intracelulares afetadas ou na capacidade de absorver agente radiomodificante. Em um nível de tecido ou órgão, pode haver diferenças na perfusão, no pH ou hipóxia, sendo que somente um ou a junção de fatores pode influenciar a eficácia da amifostina. Também pode haver uma dose limite de radiação, além da qual a substância radiomodificadora é amplamente ineficaz e é possível que os mecanismos de proteção sejam diferentes em organismos de diferentes fases de desenvolvimento.

De acordo com McAller et al. (2005) a irradiação de embriões de paulistinha antes da midblástula (MBT), aproximadamente 4hpf, induz múltiplos defeitos morfológicos, incluindo microcefalia, microoftalmia, micrognatia, distal

notocordal, anormalidades segmentares, pericárdicas edema e inibição da reabsorção do saco vitelino, que podem ser consideradas comuns, manifestações inespecíficas de mutagênese nos embriões. Neste caso sabe-se que as proteínas necessárias para reparar os danos induzidos pela radiação não estão presentes no embrião e o desenvolvimento é guiado através de proteínas maternas preexistentes presente no vitelo. Por outro lado, a transcrição de maneira adequada pelo embrião iniciada após este período parece ser necessária para expressar os genes de reparo necessários para corrigir os danos causados por radiação no DNA. São necessários mais estudos para entender estes mecanismos.

De acordo com Geiger et al. (2006) os embriões recém fertilizados parecem mais suscetíveis aos efeitos letais da radiação e o desenvolvimento e a suscetibilidade parece diminuir após a gastrulação, onde ocorre o desenvolvimento dos órgãos e, geralmente, é descrita como ocorrendo em cerca de 5 a 7 hpf, o que apoiaria a hipótese de que eventos que ocorrem antes deste período são particularmente mais radiossensíveis. No entanto, as causas da morte podem ser multifatoriais.

Os estudos onde o resveratrol apresenta efeito protetor como o de Moreno (2009) em células de tecido conectivo de camundongo expostas a radiação gama e de Magalhães (2012) que houve efeito protetor na concentração de 15µM e efeito sensibilizador na concentração de 60µM, em células de rabdomiossarcoma humano (RD) os ensaios foram realizados *in vitro.* E o estudo do efeito radioprotetor do resveratrol *in vivo* conduzido em camundongos realizado por Carsten et al. (2008) onde o tratamento com resveratrol (100 mg / kg por dia) iniciado 2 dias antes da irradiação e após por um período de 30 dias foi capaz de reduzir a frequência da média total de aberrações cromossômicas por metáfase pós-irradiação tanto no grupo de irradiados com resveratrol quanto de organismos apenas irradiados com uma dose de 3 Gy.

Em embriões de zebrafish os ensaios de seis dias as curvas de sobrevivência são descritas de maneira breve e é possível que doses mais baixas de radiação levem a diminuição da sobrevida e leve a alterações de

comportamento ou capacidade de resposta ao ambiente como impedir a capacidade de se alimentar, o que pode não imediatamente resultar em morte, mas sim em um letal fracasso em prosperar (Geiger et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos é necessário aprofundar-se com relação a ação do resveratrol em embriões de *Danio rerio, os* mecanismos de absorção e sensibilidade aos efeitos causados no DNA e como é a ação através da exposição crônica. Outro ponto importante é avaliar as diferenças na absorção de embriões e larvas para entender se não houve proteção nos estágios iniciais devido a forma de absorção já que no momento da irradiação o vitelo ainda era a principal fonte de alimento.

As alterações morfológicas como a curvatura da coluna vertebral, indício de diminuição no tamanho da cabeça e dos olhos, presença de edema no pericárdio e saco vitelínico foram observadas em todas as larvas vivas de todos os ensaios.

Os resultados com relação a mortalidade dos embriões no decorrer dos dias de ensaio mostram que a mortalidade ocorreu de maneira dose dependente na presença e ausência do resveratrol em embriões com e sem o córion. Somente na ausência do córion em embriões irradiados com 24hpf após um período de 12 horas em exposição ao resveratrol é que se observa um indício de radioproteção na dose de 10 Gy e 10 Gy+ 15µM.

Geiger et al. (2006), demonstra que a radioproteção de substâncias depende do tipo de célula, tecido e do tipo de organismo, assim como a capacidade dos diferentes tipos de células tolerar a radiação que pode ser afetada pela amifostina ou outros radiomodificadores devido a diferenças na capacidade de reparação, nas vias intracelulares afetadas ou na capacidade de absorver agente radiomodificante. Em um nível de tecido ou órgão, pode haver diferenças na perfusão, no pH ou hipóxia, sendo que somente um ou a junção de fatores pode influenciar a eficácia da amifostina. Também pode haver uma dose limite de radiação, além da qual a substância radiomodificadora é amplamente ineficaz e é possível que os mecanismos de proteção sejam diferentes em organismos de diferentes fases de desenvolvimento.

De acordo com McAller et al. (2005) a irradiação de embriões de zebrafish antes da midblástula (MBT), aproximadamente4 hpf, induz múltiplos defeitos morfológicos, incluindo microcefalia, microoftalmia, micrognatia, dist

notocordal e anormalidades segmentares, pericárdicas edema e inibição da reabsorção do saco vitelino. Neste caso sabe-se que as proteínas necessárias para reparar os danos induzidos pela radiação não estão presentes no embrião antes MBT quando o desenvolvimento guiado através de proteínas maternas preexistentes presente no vitelo. Por outro lado, a transcrição de maneira adequada pelo embrião é iniciada após a MBT parece ser necessária para expressar os genes de reparo necessários para corrigir os danos causados por radiação no DNA. São necessários mais estudos para entender estes mecanismos.

De acordo com Geiger et al. (2006) os embriões recém fertilizados parecem mais suscetíveis aos efeitos da radiação e isso parece diminuir após a gastrulação, onde ocorre o desenvolvimento dos órgãos e, geralmente, é descrita como ocorrendo em cerca de 5 a 7 hpf no embrião de zebrafish, o que apoiaria a hipótese de que eventos ocorrendo na ou antes da gastrulação são particularmente mais radiossensíveis. No entanto, as causas da morte podem ser multifatoriais.

Em estudos onde o resveratrol apresenta efeito radioprotetor como o de Moreno (2009), onde as células de tecido conectivo de camundongo expostas a radiação gama apresentaram maior resistência quando irradiadas na presença do composto e Magalhães (2012) demostrou efeito protetor na concentração de 15µM e efeito sensibilizador na concentração de 60µM, em células de Rabdomiossarcoma humano (RD) os ensaios foram realizados *in vitro.* Em contrapartida, o estudo do efeito radioprotetor do resveratrol *in vivo* em camundongos realizado por Carsten et al (2008) demonstrou que, o tratamento com resveratrol (100 mg / kg por dia) iniciado 2 dias antes da irradiação e após por um período de 30 dias foi capaz de reduzir a frequência da média total de aberrações cromossômicas por metáfase pós-irradiação tanto no grupo de irradiados com resveratrol quanto de organismos apenas irradiados com uma dose de 3 Gy.

Em embriões de paulistinha os ensaios de seis dias as curvas de sobrevivência são descritas de maneira breve e é possível que doses mais baixas de radiação levem a diminuição da sobrevida e leve a alterações de

comportamento ou capacidade de resposta ao ambiente, desta forma pode impedir a capacidade de se alimentar, o que pode não imediatamente resultar em morte, mas sim em um letal fracasso em prosperar. Alguns outros efeitos como no sistema gastrointestinal como perturbações na absorção capacidade ou motilidade gastrointestinal podem requerer ensaios ou períodos de observação mais longos e podem ser importantes para entender os mecanismos de absorção de substâncias (Geiger et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos é necessário aprofundar-se com relação a ação do resveratrol em embriões de *Danio rerio, os* mecanismos de absorção e sensibilidade aos efeitos causados no DNA e como é a ação através da exposição crônica. Outro ponto importante é avaliar as diferenças na absorção de embriões e larvas para entender se não houve proteção nos estágios iniciais devido a forma de absorção já que no momento da irradiação o vitelo ainda era a principal fonte de alimento.

6 CONCLUSÕES

O índice de citoxicidade (IC_{50}) do resveratrol foi de 70 µM e serviu como base para a escolha das concentrações a serem utilizadas no ensaio de toxicidade *in vivo.*

A CL_{50} do resveratrol nos embriões com córion (2 hpf) foi 154 µM e sem o córion (12 hpf) foi 283 µM, estes resultados serviram como base no ensaio da atividade radiomodificadora do resveratrol.

A DL_{50} da radiação gama em embriões (4 hpf) foi 11,50 Gy e 12,18 Gy em embriões com 6 hpf. Em embriões com 24 hpf, com córion foi 24,8 Gy e 16,99 Gy em embriões sem o córion, estes resultados também foram utilizados como base para a escolha das doses no ensaio da atividade radiomodificadora.

No ensaio de atividade radiomodificadora do resveratrol os resultados demonstraram que a mortalidade nos embriões de 4 e 6hpf irradiados na dose de 15Gy nas concentrações de 15 e 30 µM do resveratrol foi menor quando comparado ao grupo de organismos irradiados na ausência de resveratrol. Houve também redução da mortalidade dos embriões de 24hpf com o córion na presença de resveratrol 15 e 30 µM e irradiados na dose de 10Gy, entretanto em nenhum destes casos a diferença de mortalidade não foi estatisticamente significativa.

Houve diminuição da mortalidade dos embriões estatisticamente significativa ($Z>3$) no ensaio de embriões sem o córion (24hpf) irradiados na dose de 10 Gy e na concentração de resveratrol de 30 µM, o que é um indício de atividade radioprotetora do resveratrol.

Já nos embriões de 24hpf sem o córion, irradiados na dose de 20Gy na concentração de resveratrol de 60 µM, houve aumento da mortalidade dos embriões, sugerindo comportamento radio sensibilizador, corroborando com dados encontrados na literatura, apesar de estatisticamente não significativos.

Este trabalho proporcionou dados inéditos sobre o uso do resveratrol como potencial radiomodificador em embriões de *Danio rerio.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. et al. Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. ***Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews***, v. 93, n. 2, p.115-133, 2011.

ANISIMOVA, N. Y. et al. Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. ***Chemistry Central Journal***, v. 5, n. 1, p. 88, 2011.

ARORA, R. et al. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. ***Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives***, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ***Ecotoxicologia aquática, toxicidade crônica de curta duração, método de ensaio com peixes*****:** ABNT 2007. (ABNT NBR 15499).

BASSO, E. et al. Resveratrol affects DNA damage induced by ionizing radiation in human lymphocytes in vitro. ***Mutationc Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 806, p. 40-46, 2016.

BASTOS, G.S.M. ***Avaliação da eficiência da radiação gama na desinfecção de esgoto doméstico bruto e esgoto tratado em reator UASB***. 2006. Dissertação (Mestrado em Saneamento, meio ambiente e recursos hídricos) UFMG, Minas Gerais.

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. ***Nature reviews Drug discovery***, v. 5, n. 6, p. 493, 2006.

CALABRESE, E.J.; MATTSON, M.P.; CALABRESE, V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. ***Human & experimental toxicology***, v. 29, n. 12, p. 980- 1015, 2010.

CARSTEN, R. E. et al. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrowcells. ***Radiation research***, v. 169, n. 6, p. 633-638, 2008.

CAVALCANTE, A., K.; ***Avaliação da ecotoxicidade do resveratrol no estágio embriolarval de peixes da espécie Danio rerio***. 2017. Dissertação (Mestrado em tecnologia nuclear) Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo.

DAROCZI, B. et al. In vivo radioprotection by the fullerene nanoparticle DF-1 as assessed in a zebrafish model. ***Clinical Cancer Research***, v 12, n. 23, p. 7086-7091, 2006.

REZENDE, V.B. ***Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos***. 2013.Tese (Doutorado em medicina molecular) UFMG, Minas Gerais.

EMÍLIA, J.M. et al. Trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. ***The Journal of Nutrition: American Society for Nutrition***, v 135, n.4, p.757-760, 2005.

FARAJ, K.A. et al. Effect of X-and Gamma Rays on DNA in Human Cells. ***European Journal of Scientific Research***, v. 53, n. 3, p. 470-476, 2011.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. ***Life sciences***, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

GAGNAIRE, B. et al. External gamma irradiation-induced effects in early- life stages of zebrafish, *Danio rerio*. ***Aquatic Toxicology***, v. 169, p. 69- 78, 2015.

GEIGER, G.A. et al. Zebrafish as a “biosensor”? Effects of ionizing radiation and amifostine on embryonic viability and development. ***Cancer research***, v. 66, n. 16, p. 8172-8181, 2006.

GREENBERGER, J.S. ***Radioprotection***. *In Vivo*, v. 23, n. 2, p. 323-336, 2009.

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013 - (OECD 236).

HENN, K.; BRAUNBECK, T. Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***, v. 153, n. 1, p. 91-98, 2011.

HILL, A.J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. ***Toxicological sciences***, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HOSHINO, J. et al. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. ***Journal of medicinal chemistry***, v. 53, n. 13, p. 5033-5043, 2010.

ISO (International Organization for Standardization). ***Biological Evaluation of Medical Devices***. Geneva, Switzerland. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5), 2009.

JEANDET, P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. ***Journal of Agricultural and food chemistry***, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, 2002.

JUAN, M.E. et al. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. ***The Journal of nutrition***, v. 135, n. 4, p. 757-760, 2005.

KUMAR, MK.P. et al. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (Danio rerio). ***Ecotoxicology and environmental safety***, v. 142, p. 95-101, 2017.

LEE, J.W. et al. Effect of gamma irradiation on microbial analysis, antioxidant activity, sugar content and color of ready-to-use tamarind juice during storage. ***LWT-Food Science and Technology***, v. 42, n. 1, p. 101- 105, 2009.

MAGALHÃES, V. D. ***Efeito radiomodificador do resveratrol em cultura de células de rabdomiossarcoma humano (RD) aplicando o teste do cometa***. 2012.Tese (Programa de doutorado em tecnologia nuclear). Universidade de São Paulo. São Paulo.

MCALEER, M.F. et al. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. ***International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics***, v. 61, n. 1, p. 10-13, 2005.

MCALEER, M. F. et al. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. ***International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics***, v. 61, n. 1, p. 10- 13, 2005.

MORENO, C.S. ***Estudo do efeito radioprotetor do resveratrol***. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ORALLO, F et al. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. ***Molecular pharmacology***, v. 61, n. 2, p. 294-302, 2002.

PAN, Q.H.; WANG, L.; LI, J-M. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. ***Plant science***, v. 176, n. 3, p. 360-366, 2009.

PARDAL, D. et al. Resveratrol and piceid metabolites and their fat- reduction effects in zebrafish larvae. ***Zebrafish***, v. 11, n. 1, p. 32-40, 2014.

PICKLEMAN, J. " A glass a day keeps the doctor..." ***The American surgeon***, v. 56, n. 7, p. 395-397, 1990.

REPETTO, G.; DEL P., Ana; Z., Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. ***Nature protocols***, v. 3, n. 7, p. 1125, 2008.

RODEMANN, H. P.; BLAESE, M. A. Responses of normal cells to ionizing radiation. *In:* ***Seminars in radiation oncology***. WB Saunders, 2007. p. 81-88.

ROGERO, S.O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. ***Mat. Res.****, São Carlos*, v. 6, n. 3, p. 317-320, June 2003.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. ***Journal of agricultural and food chemistry***, v. 47, n. 4, p. 1533-1536, 1999.

SANTOS, D.C. ***Disrupção endócrina em embriões de peixe-zebra (Danio rerio), análises de expressão génica e do desenvolvimento embrionário****.* 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, 2012.132p.

SAUTTER, C.K. et al. Síntese de trans-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. ***Pesq. Agropec***. Bras. Brasília, v. 43, n.9, p.1097-1103, Sept.2008.

SCHIRMER, H. ***Análise do padrão transcricional de sirtuínas influenciado por trans-resveratrol, etanol e restrição calórica utilizando modelo de zebrafish (Danio rerio)***. 2011. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre***.*** 168 p.

SGAMBATO, A. et al. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 496, n. 1, p. 171-180, 2001.

SHEHATA, M.K.; GOMAA, F. A. M.; HELAL, Z. H. Effects of gamma and electron beam irradiation on viability and DNA elimination of *Staphylococcus aureus*. ***Archives of Clinical Microbiology***, v. 2, n. 6, 2011.

SIMON, O. et al. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of γ irradiation on zebrafish eggs. ***Journal of environmental radioactivity***, v. 102, n. 11, p. 1039-1044, 2011.

SMITH, T.A. et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. ***Journal of translational medicine***, v. 15, n. 1, p. 232, 2017.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? ***Clinical biochemistry***, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOUTO, A. et al. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. ***Journal of food composition and analysis***, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2001.

UNITED NATIONS. SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. ***Sources and effects of ionizing radiation: sources***. United Nations Publications, 2000.

VALLVERDÚ-QUERA LT, A. et al. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC- ESI-LTQ-Orbitrap-MS. ***Food chemistry***, v. 181, p. 146-151, 2015.

VUOLO, J. H. ***Fundamentos da teoria dos erros***. E. Blucher, 1996.

WANG, D.; XU, Y.; LIU, W. Tissue distribution and excretion of resveratrol in rat after oral administration of *Polygonum cuspidatum* extract (PCE). ***Phytomedicine***, v. 15, n. 10, p. 859-866, 2008.

WEISS, J. F.; LANDAUER, M.R. Radioprotection by antioxidants. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v. 899, n. 1, p. 44-60, 2000.

WESTERFIELD M. **The Zebrafish Book**: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*) 5th ed University of Oregon Press; Eugene: 2007

Anexo -1

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO RADIOMODIFICADORA DO RESVERATROL EM EMBRIÕES DE *Danio rerio* IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS COM RADIAÇÃO GAMA."** protocolo **nº 167/16** sob a responsabilidade de **JOSÉ ROBERTO ROGERO** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (**CEUAIPEN**) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), em reunião de 03/02/2016 **.**

Vigência do Projeto	**Maio/2016 a Junho/2017**
Espécie/linhagem	**Peixe/ *Danio rerio* (embriões)**
Nº de animais	**432**
Peso/Idade	**Idade: 24h**
Sexo	**Macho ou fêmea**
Origem	**Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan.**

São Paulo, 05 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora da CEUA-IPEN

Prof. Dr. Patrick J. Spencer
Vice coordenador

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: ceuaipen@ipen.br

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.