

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Franceli Aparecida da Cruz

**Proteção antioxidante do ácido ascórbico contra a genotoxicidade e citotoxicidade induzida pela cisplatina em *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Belo Horizonte  
2021

Franceli Aparecida da Cruz

**Proteção antioxidante do ácido ascórbico contra a genotoxicidade e citotoxicidade induzida pela cisplatina em *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador(a): Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior.

Co-orientador(a): Dr<sup>a</sup> Betânia Mara Alvarenga.

Belo Horizonte

2021

- 043 Cruz, Franceli Aparecida da.  
Genotoxicidade e clastogenicidade induzida por antimitótico em Danio rerio (Zebrafish) [manuscrito] / Franceli Aparecida da Cruz. – 2021.  
40 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador(a): Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior. Co-orientador(a): Dr<sup>a</sup> Betânia Mara Alvarenga.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
1. Biologia Celular. 2. Antineoplásicos. 3. Antimitótico. 4. Genotoxicidade. 5. Ácido Ascórbico. 6. Peixe-Zebra. I. Corrêa Junior, José Dias. II. Alvarenga, Betânia Mara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

FRANCELI APARECIDA DA CRUZ

339/2021  
entrada  
2º/2018  
2018717000

Às nove horas do dia 29 de janeiro de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "GENOTOXICIDADE E CLASTOGENICIDADE INDUZIDA POR ANTIMITÓTICO EM DANIO RERIO (ZEBRAFISH)", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. José Dias Corrêa Júnior, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADA
Dr. Betânia Mara Alvarenga	UFMG	APROVADA
Dra. Daniela Chemim M. Hoyos	UFMG	APROVADA
Dr. Ives Charlie Silva	USP	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de janeiro de 2021.

Dr. José Dias Corrêa Júnior (Orientador) \_\_\_\_\_

Dr. Betânia Mara Alvarenga (Coorientadora) Betânia Alvarenga

Drª. Daniela Chemim M. Hoyos Daniela Chemim

Dr. Ives Charlie Silva Ives charlie da silva

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

À ciência, que em tempos tão difíceis, mostra ser tão grande.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, sempre.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> José Dias Côrrea Júnior, por me conduzir na investigação científica.

Aos meus amigos de laboratório Betânia (também co-orientadora), Letícia e Igor, por toda ajuda e momentos agradáveis.

À todos que recorri para que esse trabalho fosse possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG, pela oportunidade de seguir a carreira científica.

À CAPES, por fazer a conclusão desse projeto possível.

## RESUMO

Fármacos antineoplásicos não são seletivos para atuar somente em células tumorais, alteram também o funcionamento das células saudáveis, podendo causar alterações genotóxicas, mutagênicas, citotóxicas e levar à morte celular. Os efeitos adversos observados na quimioterapia são consequências das ações indesejadas dos fármacos nas células normais. A cisplatina (CIS) é um dos fármacos mais utilizados em tratamentos quimioterápicos, tendo ótimos resultados, tanto na remissão quanto na sobrevida dos pacientes. Os efeitos adversos ocasionados pela CIS são consequências das lesões formadas no DNA e do aumento do estresse oxidativo. Antioxidantes são moléculas que mantêm o estado redox celular, através da oxidação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem induzir a ativação de mecanismos de reparo de danos ao DNA. O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante obtido exclusivamente através da dieta por alguns seres vivos e é capaz de diminuir a toxicidade ocasionada pela CIS. Avaliamos a resposta de indivíduos adultos de *zebrafish* tratados com a combinação de AA e CIS, através de análises de alterações nucleares e reciclagem de hemácias. Mostramos possível efeito protetivo do AA combinado à CIS após 96 h de tratamento. Esses dados auxiliarão nos possíveis desdobramentos na triagem de novas drogas, terapias e pré-avaliação terapêutica *in vivo*.

**Palavras-chave:** Alterações Nucleares Eritrocíticas. *Danio rerio*. Antimitótico. Hemocaterese. Regulação redox.

## ABSTRACT

Antineoplastic drugs are not selective to act only on tumor cells, and also alter the functioning of healthy cells, which can cause genotoxic, mutagenic, cytotoxic changes and lead to cell death. The adverse effects observed in chemotherapy are consequences of the drugs' unwanted actions on normal cells. Cisplatin (CIS) is one of the most widely used drugs in chemotherapy treatments, with excellent results, both in remission and in patient survival. The adverse effects caused by CIS are the consequences of lesions formed in DNA and increased oxidative stress. Antioxidants are molecules that maintain the cellular redox state, through the oxidation of reactive oxygen species (ROS) and can induce the activation of DNA damage repair mechanisms. Ascorbic acid (AA) is an antioxidant obtained exclusively through the diet by some living beings, and is able to decrease the toxicity caused by CIS. We evaluated the response of adult zebrafish individuals treated with the combination of AA and CIS, through analysis of nuclear changes and red blood cell recycling. We showed a possible protective effect of AA combined with CIS after 96 h of treatment. These data will assist in possible developments in the screening of new drugs, therapies and therapeutic pre-evaluation in vivo.

Keywords: Erythrocytic Nuclear Alterations. *Danio rerio*. Antimitotic. Hemocateresis. Redox regulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação da cisplatina-----	12
Figura 2. Estrutura de vários adutos produzidos no DNA pela cisplatina-----	13
Figura 3. Visão geral da via de sinalização sugerida para a disfunção metabólica induzida pela cisplatina em células HK-2-----	14
Figura 4. Mecanismos de ação propostos para a vitamina C em células de mamíferos-----	16
Figura 5. Alterações nucleares eritrocíticas em <i>D. rerio</i> -----	24
Figura 6. Marcação de hemossiderina e lipofucsina em <i>D. rerio</i> -----	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos parâmetros de pH e amônia obtidos no início e fim do experimento-----	23
Tabela 2. Frequência de cada alteração individual-----	26
Tabela 3. Matriz de coeficiente de Correlação de Spearman (R) entre as ENAs no mesmo grupo experimental-----	29
Tabela 4. Coloração de Pears mostrando marcação de hemossiderina e lipofucsina em <i>D. rerio</i> -----	30

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Total do número de ENAs em ensaio <i>in vivo</i> com <i>D. rerio</i> -----	24
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	ácido ascórbico
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BL</b>	bolha nuclear ( <i>blebbed</i> )
<b>BU</b>	broto nuclear ( <i>bud</i> )
<b>CIS</b>	cisplatina
<b>DHA</b>	dehidroascorbato
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EMGS</b>	<i>Environmental Mutagen and Genomic Society</i>
<b>ENA</b>	Erythrocytic Nuclear Alterations
<b>GLUT</b>	transportador de glicose
<b>GSH</b>	glutathiona
<b>GULO</b>	gene L- gulonolactona oxidase
<b>LO</b>	núcleo lobado ( <i>lobed</i> )
<b>MDHA</b>	monodehidroascorbato
<b>MN</b>	micronúcleo
<b>NO</b>	fissura nuclear ( <i>notched</i> )
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>SVTC1</b>	transportador dependente de sódio 1
<b>VA</b>	vacuolização nuclear ( <i>vacuolated</i> )

## SUMÁRIO

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	11
1 Toxicologia e Genotoxicidade .....	11
2 Cisplatina .....	11
3 Ácido Ascórbico.....	15
4 Teste de Micronúcleo e Alterações Nucleares Eritrocíticas (ENAs) .....	16
5 <i>Zebrafish</i> .....	18
HIPÓTESE.....	19
OBJETIVOS .....	19
1 Objetivo Geral.....	19
1.2 Objetivos Específicos.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
1 Ensaio <i>in vivo</i> .....	20
1.1 Animais de teste .....	20
1.3 Anestesia e eutanásia.....	20
1.4 Substâncias de teste .....	20
1.2 Parâmetros físico-químicos.....	21
1.5 Delineamento experimental.....	21
1.6 Alterações Nucleares Eritrocíticas (ENAs) .....	21
1.7 Histologia.....	21
1.7.1 Protocolo de inclusão em parafina .....	21
1.7.2 Análise histoquímica pela coloração de Pearls .....	22
2 Análise Estatística.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS .....	32

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 1 Toxicologia e Genotoxicidade

A toxicologia busca compreender os efeitos adversos de substâncias tóxicas (i.e agentes tóxicos, xenobióticos) nos seres vivos (EATON et al., 2018). Dos efeitos adversos visíveis de drogas e outros terapêuticos, a toxicologia buscou compreender como os agentes tóxicos atuavam à nível molecular e bioquímico (EATON et al., 2018). À toxicologia genética, cabe compreender como os agentes tóxicos afetam o material genético (BRUSICK, 1980). Estudos pioneiros nas áreas de biologia molecular e física foram essenciais para tal (MULLER, 1927; AVERY, MACLEOD, MCCARTY, 1943; AUERBACH, ROBSON, 1947; WATSON; CRICK, 1953a; CRICK, WATSON, 1953b)

A capacidade de agentes tóxicos de causar distorções e quebras no material genético em concentrações subletais é chamado de genotoxicidade (BRUSICK, 1980). Para tanto, podem atuar de duas formas simultâneas, seja ligando-se diretamente ao material genético (e.g. ligações intrafitas e entre fitas, quebras de fita simples, quebras de fita dupla); ou indiretamente, através da ligação com proteínas que mantêm a integridade do genoma (e.g. tubulinas, enzimas de reparo de DNA, proteínas envolvidas no controle do ciclo celular) (MATEUCA et al., 2006). As consequências da alteração da estabilidade e forma do DNA são a formação de alterações mutagênicas (alterações hereditárias) e carcinogênicas (causadoras de câncer), ou mesmo a morte celular (GUPTA, 2016; MATEUCA et al., 2006). Além do tipo de toxicidade induzida ao DNA, o quão genotóxico um agente pode ser depende, mas não somente, da extensão dos danos, de alterações no mecanismo de reparo de danos ao DNA, da temperatura e do tempo de exposição (ANITHA et al., 2000; DOAK et al., 2007; GAMSE, GORELICK, 2016; TIWARI, WILSON, 2019).

O DNA é a molécula responsável pela hereditariedade (AVERY, MACLEOD, MCCARTY, 1943). E a compreensão de como o material genético é alterado por genotóxicos, através de testes preditivos de toxicidade são, nada menos, que essenciais (GUPTA, 2016).

### 2 Cisplatina

Nos anos 60, em estudo sobre os possíveis efeitos do campo elétrico na divisão celular de *Escherichia coli*, foi observado a inibição da divisão celular da bactéria, com a manutenção de seu crescimento filamentosos, uma consequência de danos ao DNA

(ROSENBERG, VAN CAMP, KRIGAS, 1965a). A molécula de cisplatina ( $cis\text{-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ ) (Figura 1) que compunha os eletrodos era o que ocasionava a o arrasto no ciclo celular (ROSENBERG et al., 1967). A inibição da mitose em *E. coli* pelo isômero *cis* da platina levou à investigação de sua possível ação antineoplásica, que foi demonstrada na inibição do crescimento de sarcomas em camundongos (ROSENBERG et al., 1969). Em 1978 a CIS foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de cânceres de testículo e bexiga (KELLAND, 2007). Seu uso se expandiu para o tratamento de diversos tipos de cânceres (TAGUCHI et al., 2005).

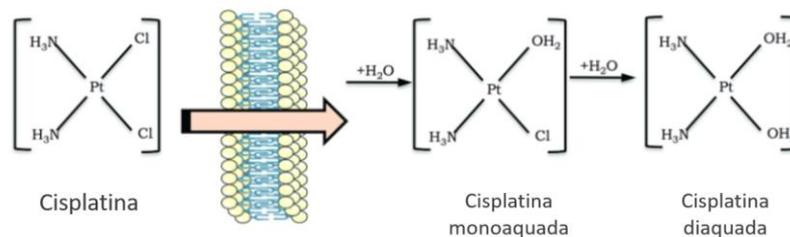


Figura 1 . Ativação da cisplatina. O processo de ativação da cisplatina ocorre pela troca de um ou dois de seus cloretos por moléculas de água (monoaquadas e diaaquadas, respectivamente). (Adaptado de Rocha et al., 2018).

A CIS liga-se à lipídios, proteínas (e.g. glutatona) e ao DNA e esse é seu alvo preferencial (EASTMAN, 1987; MATEUCA et al., 2006). A CIS pode atuar tanto em célula em  $G_0$  quanto durante a divisão celular, e esse mecanismo de ação a define como um antineoplásico ciclo-celular não específico (ALMEIDA et al., 2005). À nível celular, seu influxo ocorre através de difusão simples e transporte ativo (BINKS; DOBROTA, 1990; ISHIDA et al., 2002). Para ser ativada e formar ligações com as moléculas alvo, a CIS reage com a água e perde um ou dois de seus íons cloro (DAVIES et al., 2000).

Em sua interação com o DNA, a CIS forma preferencialmente ligações intrafitas (*crosslinks intrastrands*), mas também ligações entre fitas (*crosslinks interstrands*), ligações (*crosslinks*) DNA-proteína e monoadutos (Figura 2) (EASTMAN, 1987). Essas lesões ao DNA podem ser reparadas pelos mecanismo de reparo por excisão

de nucleotídeo (NER) ou pelo mecanismo de reparo por incompatibilidade de bases (MMR) (MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008). Quando não reparadas, a célula morre por apoptose (BARRY et al., 1990).

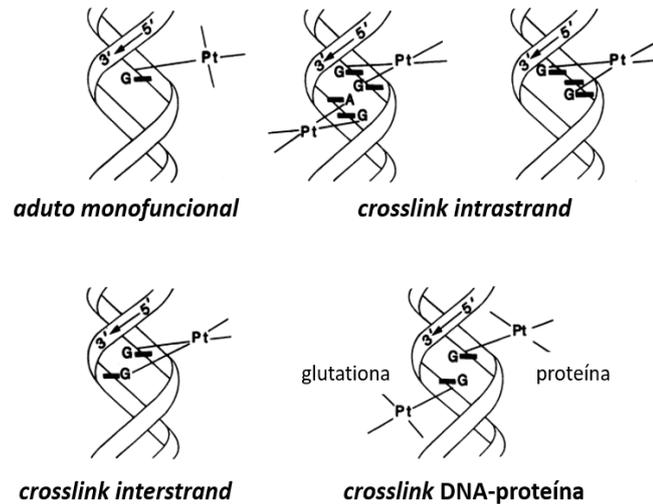


Figura 2. Estrutura de vários adutos produzidos no DNA pela cisplatina. Em sua ligação ao DNA, a cisplatina forma adutos monofuncionais, *crosslinks* DNA-proteína (e.g. glutatona), *crosslinks interstrands* e, principalmente, *crosslinks intratrands*, em que cerca de 65% são formados pela ligação da cisplatina com guaninas vizinhas, enquanto 25% são ligações entre guanina e adenina, e 7% são entre guaninas separadas por uma ou mais base. (Adaptado de Eastman, 1987).

A genotoxicidade induzida pela CIS leva à inibição da replicação, com o arrasto em G<sub>2</sub> e a inibição da transcrição (SORENSEN; EASTMAN, 1988; WANG; LIPPARD, 2005). A exposição ao antimitótico durante o ciclo celular está associada com a formação de alterações cromossômicas estruturais em células somáticas e germinativas e a formação de aberrações cromossômicas em células da medula óssea (ADLER, EL-TARRAS, 1989; CHOUDHURY et al., 2000; KLIESCH; ADLER, 1987).

O aumento de ROS ocasionado pela CIS gera estresse oxidativo nas mitocôndrias, alterando a permeabilidade da membrana interna da organela, com consequente desregulação da cadeia transportadora de elétrons (Figura 3). Leva à desregulação do ciclo de Krebs e induz o aumento da produção de ROS pela

mitocôndria, ambas alterações diminuem a produção de ATP (Figura 3) Essas alterações tem como consequência a morte celular (Figura 3) (CHOI et al., 2015).

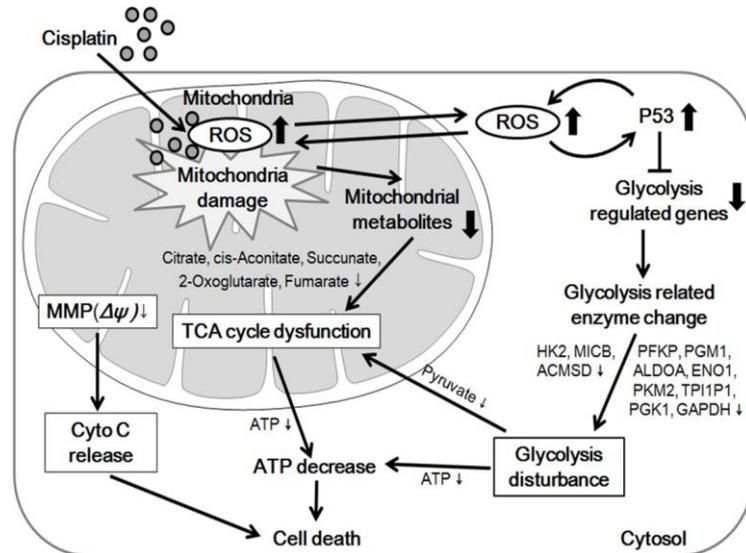


Figura 3. Visão geral da via de sinalização sugerida para a disfunção metabólica induzida pela cisplatina em células HK-2. A cisplatina induz disfunção mitocondrial por meio de espécies reativas mitocondriais de oxigênio (mROS) que também interferem no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e na estabilidade mitocondrial, ao inibir a expressão de enzimas e proteínas essenciais para as vias de produção de energia e a viabilidade da mitocôndria, respectivamente. Além disso, o colapso do potencial de membrana mitocondrial (MMP) devido ao mROS levou ao bloqueio da cadeia transportadora de elétrons (ETC). Por outro lado, o mROS aumentou a transcrição e ativação da proteína supressora de tumor p53, que suprimiu a glicólise e, em última análise, reduziu o nível de piruvato. O p53 ativado também estimulou a geração de mROS, que teve um efeito sinérgico nas funções de ambos, p53 e mROS. A redução do piruvato diminuiu a funcionalidade do ciclo do TCA, que já estava prejudicada pelo mROS. Portanto, as necessidades de energia celular não seriam atendidas. Ao todo, essas mudanças resultam na ativação de vias apoptóticas e necróticas. CHOI et al., (2015).

Apesar de ótimos resultados no tratamento do câncer, os compostos de platina apresentam toxicidade elevada e por não atuar somente nas células tumorais, mas também em células e tecidos saudáveis, estão associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade, mielosupressão, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, anemia, perda de cabelo, ototoxicidade, infertilidade e mucosite (TAGUCHI et al., 2005). Por esse motivos, a toxicidade do composto está à meio termo de seus efeitos terapêuticos e colaterais (SANCHO-MARTÍNEZ et al., 2012).

### 3 Ácido Ascórbico

A vitamina C (i.e ácido ascórbico - AA) foi descoberta nos anos 20 em estudos acerca de processos de oxidação biológica, com o isolamento do composto do suco de laranja, da água de repolho e da glândula adrenal de bovino (SZENT-GYÖRGYI, 1928). Durante a evolução, os primatas, juntamente com outros grupos de seres vivos, como os peixes, aves e répteis, perderam a capacidade de sintetizar o AA, devido à perda da função do gene L- gulonolactona oxidase (*GULO*), que transcreve para a enzima de mesmo nome, essencial na via final de síntese da vitamina C (CHATTERJEE, 1973; NISHIKIMI, M., YAGI, 1991). A mutação não foi letal, já que a vitamina pôde ser obtida através da dieta (KING, J. L., JUKES, 1969; CHATTERJEE, 1973).

O AA possui diferentes funções biológicas. Atua como cofator de vias metabólicas, como na síntese do colágeno e do neurotransmissor norepinefina (PADH, 1990). Em altas concentrações farmacológicas, atua como pró-oxidante, induzindo a formação de peróxido de hidrogênio, explorado na clínica para o tratamento do câncer (CHEN et al., 2005; DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; DRISKO et al., 2018; WELSH, 2013). A sua função antioxidante é responsável pela eliminação de ROS e radicais livres (e.g., radical hidroxila e o ácido hipocloroso) (CADET; RICHARD WAGNER, 2013). O uso de vitamina C em concentrações fisiológicas mostra auxiliar na diminuição dos efeitos colaterais induzidos por quimioterápicos (BAZZAN et al., 2018; ABDEL-DAIM et al., 2019).

O AA é solúvel em água e em pH fisiológico a forma predominate é o monoânion AsC<sup>-</sup>H (ascorbato) e a forma oxidada do ascorbato é o dehidroascorbato (Figura 4) (DU et al., 2012). A vitamina C entra na célula com auxílio dos transportadores dependentes de sódio (SVTC1) e da proteína transportadora de glicose (GLUT) (Figura 4). Na meio intracelular restaura o equilíbrio redox e induz a transcrição de genes que codificam proteínas que atuam em resposta ao aumento do estresse oxidativo (Figura 4).

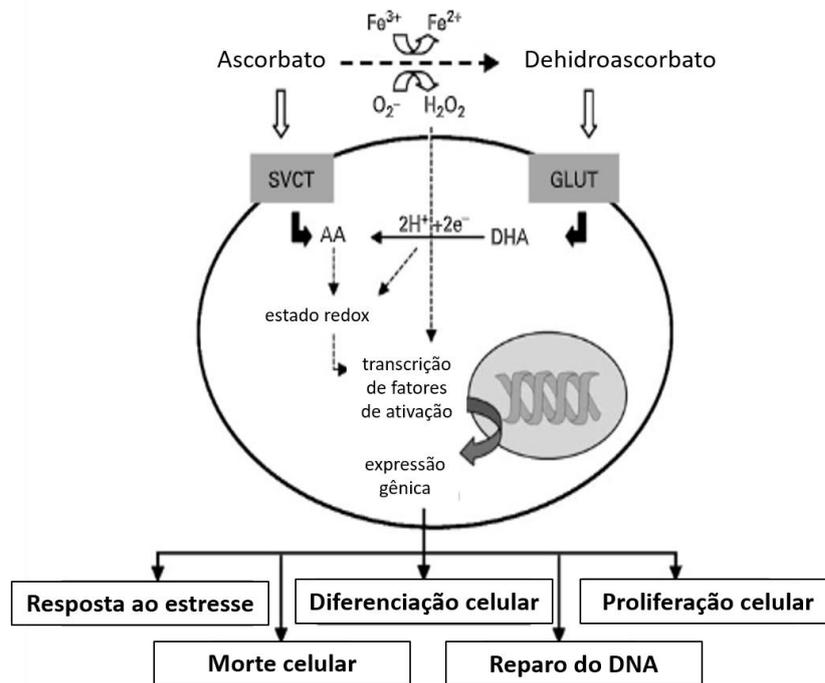


Figura 4. Mecanismos de ação propostos para a vitamina C em células de mamíferos. A vitamina C dietética pode ser transportada para a célula por meio de transportadores dependentes de sódio (SVCT). O SVCT1 tem uma afinidade maior, mas menor capacidade de transporte para a vitamina C do que o SVCT2. O produto oxidado da vitamina C, é o dehidroascorbato (DHA), que é transportado para a célula via GLUT. O DHA pode ser reduzido de volta ao ascorbato. A produção de ROS é inerente ao metabolismo aeróbio. Está se tornando cada vez mais claro que os ROS são parte integrante da função e defesa celular. ROS são moléculas de sinalização celular importantes e podem refletir o ambiente redox da célula. A vitamina C auxilia na manutenção do ambiente redox celular estável. (Adaptado de Beva et al., 2010).

Estudos mostram o efeito protetivo do AA em baixas concentrações contra o estresse oxidativo, danos genômicos e apoptose (CHENG et al., 2018; GHAZANFAR; SHAHID; QURESHI, 2018; DE JESUS, 2018; CASTELO-BRANCO et al., 2019; KOOHIAN et al., 2020). E quando associado à quimioterápicos não interfere na ação do antineoplásico (SIDDIQUE; BEG; AFZAL, 2007).

#### 4 Teste de Micronúcleo e Alterações Nucleares Eritrocíticas

Xenobióticos podem ser clastogênicos, quando levam à quebras na molécula de DNA, e/ou aneugênicos, se afetam a segregação cromossômica e levam à perda de parte do material genético (EVGENIEVA et al., 2016). Quando os danos não são reparados, uma das consequências é a formação de alterações nucleares, que

são preditivas de toxicidade (CARRASCO et al. 1990; GOMES et al., 2015; FARAG; ALAGAWANY, 2018; HANDA; JINDAL, 2020; SHAHJAHAN, 2020).

Das alterações nucleares, a mais compreendida é o micronúcleo (MN) (Figura 5), um pequeno núcleo extranumerário de até um terço do tamanho do núcleo principal (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1976; MÜLLER; STREFFER, 1994). A origem do MN é a partir de cromossomos inteiros, cromossomos acêntricos (sem o centrômero) ou fragmentos cromossômicos que não segregaram durante a anáfase e foram envolvidos pela membrana nuclear na telófase (SCHMID, 1976; MÜLLER; STREFFER, 1994). Como necessita de ao menos uma divisão celular para ser formado, somente é possível de ser observado em células que, além de se dividirem, possuem cinética da divisão celular compreendida, ou que pode ser controlada (FENECH, 2008). Seja em células da medula óssea, assim como em eritrócitos do sangue periférico, o teste de micronúcleo é um dos mais bem estabelecidos ensaios citogenéticos (FENECH, 2008). A análise dessa alteração nuclear em eritrócitos anucleados é possível porque os MNs permanecem no citoplasma mesmo após a expulsão do núcleo principal (SCHMID, 1975). Da análise clássica em mamíferos, a partir dos anos 1980 o teste de micronúcleo começou a ser utilizado para avaliar a clastogenicidade de carcinogênicos em peixes (AL-SABTI, 1986a; AL-SABTI, 1986b; METCALFE, 1988).

Outras alterações nucleares induzidas por genotoxinas foram descritas, contudo, os mecanismos responsáveis pelas suas formações são menos conhecidos comparados ao MN (CARRASCO et al., 1990). O núcleo *blebbed* (Figura 5C) é uma evaginação da membrana nuclear, que forma uma modificação semelhante à uma protusão, como consequência de alterações na estrutura da lâmina nuclear (CARRASCO et al., 1990; FUNKHOUSER et al., 2013). O núcleo chamado de *bud* (Figura 5D), apresenta uma alteração na forma de brotos, e é formado pela quebra em um local, de pontes que unem os cromossomos durante a segregação na anáfase, ou mesmo pela expulsão do excesso de DNA pelo núcleo (LINDBERG et al., 2007; PAMPALONA et al., 2010; GOMES et al., 2015). O núcleo *notched* (Figura 5E), exibe uma invaginação bastante profunda da membrana nuclear e é uma aneuploidia resultante da falha na polimerização da tubulina que forma o fuso mitótico (CARRASCO et al., 1990; FERNANDES et al., 2007). O núcleo *lobed* (Figura 5F), possui evaginação maior que o núcleo *bud*, e sua formação semelhante à alteração

anterior, é decorrente da eliminação de DNA amplificado do núcleo (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). O núcleo *vacuolated* (Figura 5G) possui uma região da cromatina que não é corada, provavelmente causa da dissociação de cromátides (CASTOLDI; MITUS, 1968; CARRASCO et al., 1990). Os núcleos arredondados e intensamente corados são chamados de condensado (Figura 5H), com morfologia semelhante a de células apoptóticas e de núcleos com alterações epigenéticas (OBERHAMMER et al., 1994; FURUSAWA et al., 2015; GOMES et al., 2015; DAMODARAN et al., 2018).

## 5 Zebrafish

Estudos correlacionais, como análises toxicológicas, não podem ser realizadas diretamente em seres humanos por questões éticas, portanto, faz-se necessário muitas vezes, a utilização de animais não-humanos para avaliar as consequências da exposição à agentes tóxicos (BRUSICK, 1980). Os mamíferos são os modelos biológicos mais comumente utilizados na toxicologia, ea escolha de qual modelo animal utilizar (e.g., rato, camundongo, cachorro, coelho), depende da semelhança genética com os seres humanos, o que está relacionado às respostas aos agentes tóxicos ou possivelmente tóxicos, e também o custo do animal (BRUSICK, 1980). Insetos (*Drosophila melanogaster*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*), crustáceos (*Daphnia*) e peixes (*Danio rerio*) são alternativas aos roedores em análises toxicológicas (SHAW et al., 2008; GIACOMOTTO; SÉGALAT, 2010).

O *zebrafish* (*D. rerio*) é um peixe de pequeno porte, que atinge cerca de 5 cm, e de fecundação externa, com vida útil que varia entre 42-66 meses (ZHANG; WILLET; FREMGEN, 2003; ZFIN). Natural da região tropical e subtropical que compreende o sul da Ásia (SOLA; GORNUNG, 2001). O uso de um modelo biológico adequado é respaldado por análises evolutivas, que mostram o quão conservado os mecanismos biológicos são entre as espécies, possibilitando a realização de estudos correlacionais (KIM, KOO, KNOBLICH; 2020). Setenta por cento do genoma do *zebrafish* é homólogo ao de seres humanos, e mais de 80% dos genes associados à doenças humanas tem seu equivalente na espécie (HOWE et al., 2013). Adiciona-se orápido desenvolvimento embrionário de órgãos e tecidos, que são semelhantes aos de mamíferos, no que refere à anatomia, fisiologia e características moleculares, o

*zebrafish* permite transpor testes que comumente seriam realizados somente *in vitro* para o *in vivo* (MCGRATH; LI, 2008; GAMSE; GORELICK, 2016).

Análises toxicológicas com *zebrafish* começaram nos anos 50, na investigação da toxicidade de compostos naturais e sintéticos (BATTLE; HISAOKA, 1952; HISAOKA, K. K., HOPPER, 1957). E análises com os eritrócitos nucleados presentes em peixes, aves e anfíbios são comumente utilizados para a análise de anormalidades nucleares induzidas por xenobióticos (FARAG; ALAGAWANY, 2018; FENECH et al., 2011; HARABAWY; MOSLEH, 2014). As análises hematológicas possibilitam a avaliação da citotoxicidade, em análises que consideram parâmetros como tamanho e morfologia celular, genotoxicidade, estresse oxidativo, atividade antioxidante, alterações no estado energético e morte celular (FARAG; ALAGAWANY, 2018). Danos genômicos que ocasionam alterações na morfologia do núcleo e a perda de material genético forma observados em eritrócitos de *zebrafish* (ROCCO; PELUSO; STINGO, 2012; LE BIHANIC et al., 2016; SHAHJAHAN et al., 2019; SHAW et al., 2020).

## HIPÓTESE

H0: O ácido ascórbico não diminui os danos ao DNA e o estresse oxidativo causado pela cisplatina.

H1: O ácido ascórbico diminui os danos ao DNA e o estresse oxidativo causado pela cisplatina.

## OBJETIVOS

### 1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do pré- tratamento de ácido ascórbico combinado ao tratamento com cisplatina em indivíduos adultos de *zebrafish*.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o *zebrafish* como modelo experimental em análise toxicológica;
- Identificar a presença de ENAs em eritrócitos do sangue periférico de *zebrafish* em diferentes tempos e tratamentos
- Avaliar a frequência total de ENAs, bem como suas frequências relativas e possíveis correlações nos diferentes tempos e tratamentos;

- Observar a formação de pigmentos celulares em resposta à possível alteração na reciclagem de ferro no maior tempo de tratamento.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 Ensaio *in vivo*

#### 1.1 Animais de teste

O protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) detém o número 53/2020. Os animais foram obtidos do LAQUA (Laboratório de Aquicultura da Escola de Veterinária-UFMG). Noventa e seis animais foram utilizados. Indivíduos machos e fêmeas adultos de *D. rerio* com tamanhos aproximados foram aclimatados em aquários de 40 L (polipropileno, poliestireno e isento de bisfenol A), com água dechlorada, à 24°- 28° C, com pH 7,0-8,0, fotoperíodo 10h claro/14h escuro, e alimentados duas vezes ao dia com ração específica para peixes de pequeno porte (CONCEA, 2017). Os animais que apresentaram alterações visíveis na superfície externa (i.e. machucados, alterações de coloração) não foram utilizados para os experimentos. Os animais de teste foram mantidos em ambiente com sistema de recirculação de água e foi monitorada a sua sobrevivência durante o período de experimento. Os animais não foram alimentados durante o período de teste.

#### 1.3 Anestesia e eutanásia

A anestesia foi realizada através de banho de imersão em eugenol (GRUSH; NOAKES; MOCCIA, 2004, adaptado). Os animais somente foram imobilizados para obtenção da amostra de sangue periférico através de punção caudal, após os movimentos operculares diminuírem, ocorrer perda total do equilíbrio e apresentarem incapacidade de reagir à estímulos (CONCEA, 2017). Após a retirada da amostra, os animais foram eutanasiados com banho de imersão em sobredose de eugenol até os parâmetros responsivos mencionados acima serem observados (CONCEA, 2018).

#### 1.4 Substâncias de teste

O ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) foi utilizado na concentração de 1mM (PUTY et al., 2014). A concentração de cisplatina foi de 1,4 µg/g (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 1999, com adaptação).

## 1.2 Parâmetros físico-químicos

Parâmetros de qualidade da água (pH e amônia) foram avaliados para cada tempo experimental durante o início e fim do experimento (do momento do pré-tratamento ao tempo final). Utilizamos o kit da Alcon Kit Test (labconTest).

## 1.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os tempos de tratamento foram de 4h, 24h e 96h de exposição à cisplatina. O pré-tratamento de AA foi feito 24h antes (PUTY et al., 2014).

## 1.6 Alterações Nucleares Eritrocíticas (ENAs)

Oito animais por grupo experimental foram utilizados para a avaliação conjunta de micronúcleo e ENAs. Cada animal é uma replicata. Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e colocados numa cama de espuma umidecida com água do aquário. Foi retirado um pequeno volume de sangue através de punção caudal, com auxílio de seringa contendo anticoagulante ( $\text{Na}^2$  - EDTA 0,5 M) (GOMES et al., 2015). A amostra foi espalhada sobre uma lâmina com auxílio de lâmina extensora, e os esfregaços foram secos ao ar por 12h. As células foram fixadas e coradas com May-Grunwald diluído em metanol 100% pelo tempo de 1 min 30s. Após, 1 mL de água destilada foi depositada sobre a lâmina. Após 1 min, o corante foi removido e as células foram coradas com Giemsa 10% (1 gota de corante Giemsa para cada 1mL de água destilada) por 13 min. O excesso de corante foi removido com auxílio de pequena quantidade de água destilada, e deixada secar em posição vertical. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas permanentes foram montadas e observadas em microscópio de luz Primo Star (ZEISS), em objetiva de 100X com óleo de imersão. Foram avaliados 2.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 16.000 eritrócitos por grupo experimental. As células analisadas apresentavam membrana celular intactas, e as alterações avaliadas foram reportadas anteriormente (CARRASCO et al. 1990; GOMES et. al, 2015).

## 1.7 Histologia

### 1.7.1 Protocolo de inclusão em parafina

Quatro animais de cada grupo experimental da análise anterior foram fixados em formaldeído 10% para a histologia. As amostras dos animais foram desidratados em série alcoólica (85%,90%,95% e álcool absoluto I, II, III) pelo tempo de 30 min. Em

seguida foram diafanizadas em xilol (I, II e II) por 30 min. E infiltradas em parafina (I e II) pelo mesmo tempo. As amostras emblocadas foram cortadas em espessura de 7  $\mu\text{m}$  (YOUSIF; QASEM, 2016).

### 1.7.2 Análise histoquímica pela coloração de Pearls

Para cada uma das quatro amostras emblocadas, uma lâmina foi corada pela método de Perls (RIBEIRO et al., 2011).

As lâminas foram desparafinadas com xilol (I e II) por 3 min, hidratadas em etanol (Absoluto I e II, 95° I e II) também pelo tempo de 3 min e lavadas em água destilada. Foram então coradas pelo método de Pearls por 20 min. Posteriormente foram lavadas em água destilada e em seguida em água corrente, hidratadas em etanol (95° I, II e II, absoluto I, II e III) por 3 min, seguida de diafanização em xilol (I, II e III) por 3 min. Ao fim foram montadas com bálsamo. Uma seção por animal foi analisada em microscópio de luz Primo Star (ZEISS) em objetiva de 40x com ocular reticulada (Olympus, 10X).

## 2 Análise Estatística

Os resultados foram obtidos usando o *software* GraphPad Prism Versão 5.1 (San Diego, CA, USA). Para os dados não-paramétricos, utilizamos o teste de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). A correlação foi determinada através da Correlação de Spearman ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Parâmetros da água e sobrevivência**

A Tabela 1 mostra os valores de parâmetros da água avaliados no início do experimento (pré-tratamento) e fim de cada tempo experimental.

Tabela 1. Valores dos parâmetros de pH e amônia obtidos no início e fim do experimento.

	4h		24h		96h	
	pH	Amônia (ppm)	pH	Amônia (ppm)	pH	Amônia (ppm)
<b>Início</b>	7,4	0,034	6,9	0,009	7,6	0,014
<b>Fim</b>	7,4	0,004	7,5	0,017	7,4	0,034

Os animais foram mantidos em água à temperatura de 24°-28° (SCHAEFER; RYAN, 2006). Os parâmetros de pH e amônia estiveram de acordo com o recomendado para *D. rerio* (EMERSON et al., 1975; LAWRENCE, 2007).

Apenas um animal não sobreviveu até o fim dos períodos de teste (tratamento com CIS em T24).

### **Análises de genotoxicidade**

As ENAs encontradas foram micronúcleo (MN), *blebbed* (BL), *bud* (BU), *notched* (NO), *lobed* (LO), *vacuolated* (VA) e *condensed* (CO) (Figura 5) (HEDDLE, 1973; CARRASCO et al., 1990; GOMES et al., 2015).

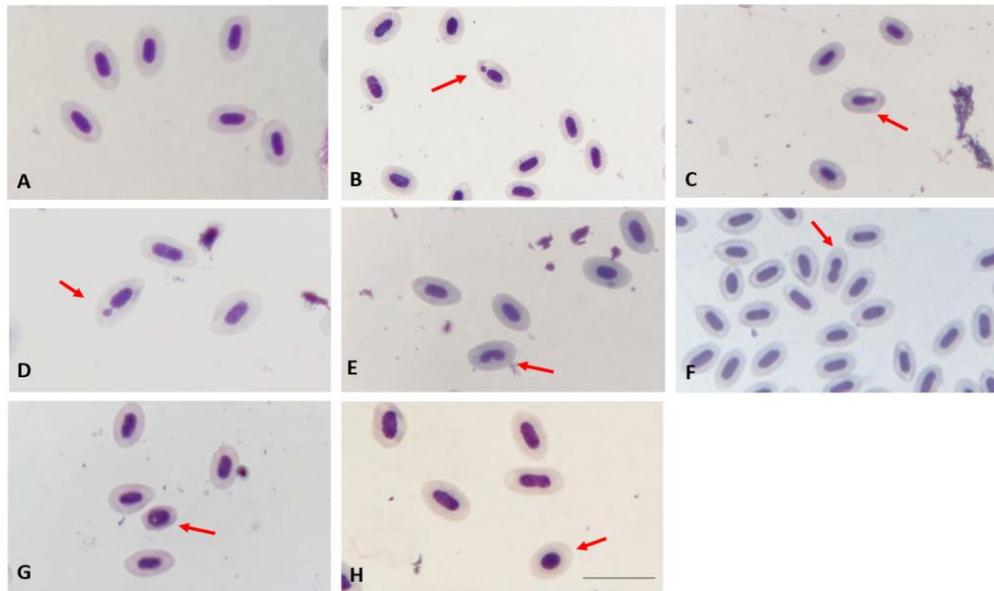


Figura 5. Alterações nucleares eritrocíticas em *D. rerio*. São mostradas em A eritrócitos com núcleos com morfologia normal; B- Micronúcleo; C- *Blebbed*; D- *Bud*; E- *Notched*; F- *Lobed*; G- *Vacuolated* e H- núcleo condensado. Aumento de 100X. Foto: Do autor.

O número total de ENAs observadas entre as variáveis tempo de exposição (T4, T24 e T96) e tratamento (CT, AA, AA+CIS e CIS) são mostrados no Gráfico 1.

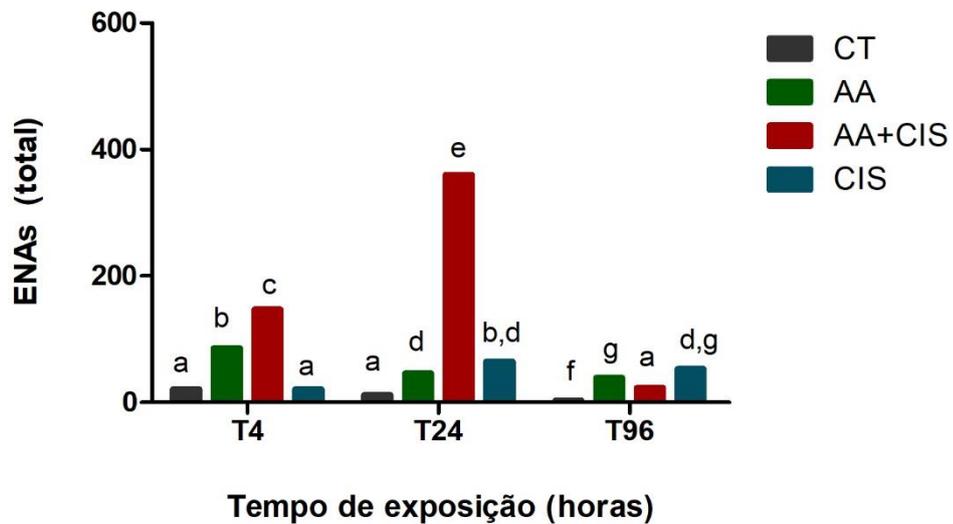


Gráfico 1. Total do número de ENAs em ensaio *in vivo* com *D. rerio*. Os valores com letras diferentes diferem pelo teste de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

Em T4, o total de ENAs aumentaram nos tratamentos com AA e AA+CIS, diferindo dos grupos CT e CIS (Gráfico 1). Segundo Bevan e colaboradores (2010) aumento da concentração de AA em pouco tempo, pode causar lesões ao DNA. O aumento de ENAs talvez possa ser somado a saturação dos mecanismo de reparo de danos ao DNA. O baixo total de alterações no grupo tratado com CIS em nesse tempo pode ser consequência de sua inativação pela glutathiona (GSH), um antioxidante endógeno que está envolvida com a resistência à CIS (FUERTES; ALONSO; PÉREZ, 2003). O efeito da inativação da CIS pela GSH é bastante evidente na redução da dose letal do fármaco de 70  $\mu\text{mol/kg}$  para 45  $\mu\text{mol/kg}$  em camundongos tratados com um inibidor seletivo da via de síntese do GSH (SAUFI, 1990).

Em T24 o total de ENAs se assemelham nos grupos AA e CIS, diferindo do CT e do grupo AA+CIS. O grupo tratado com a combinação de AA+CIS mostra um pico considerável no total de alterações (Gráfico 1). Os mecanismos de reparo de danos ao DNA parecem ainda estarem saturados em T24.

Nos grupos tratados por 96h, o CT diferiu dos demais grupos nesse tempo, assim como o grupo AA+CIS. O total de ENAs foi semelhante nos grupos AA e CIS (Gráfico 1). Utilizamos a concentração de 1 mM de AA, igualmente à Puty e colaboradores (2014), no mesmo modelo experimental e via de administração. Os autores mostraram efeito protetivo da vitamina C contra a ação semelhante à ansiogênica do metilmercúrio.

Quando analisamos o cinética de alterações, observamos o aumento constante no total de ENAs nos dois primeiros tempos de exposição, com notável pico de alterações nos tratamentos com AA+CIS) (Gráfico 1). Em T96, segue-se uma diminuição considerável das alterações, tanto para o tratamento com AA, que reduziu o total de alterações ao longo dos tempos, quanto para o grupo combinado AA+CIS (Gráfico 1). O comportamento de aumento seguido de redução das alterações foi igualmente observado em outros trabalhos (CAVAS; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005; YADAV; TRIVEDI, 2009; ÖZKAN et al., 2011).

O total de ENAs maior no grupo AA+CIS em T4 e T24 pode ser consequência do sinergismo entre os compostos. Longchar e Prasad (2015), estudaram o efeito dessa combinação em ascite de murino. Observaram que o AA aumentava o efeito genotóxico da cisplatina, quando comparado ao tratamento com o antineoplásico

somente. Mas, ao mesmo tempo, o AA desempenhava um efeito protetivo, melhorando alterações histopatológicas no fígado, rins e testículos, juntamente com melhoras em testes de função renal, teste de função hepática e anormalidade do esperma. Em síntese, ao mesmo tempo em que o AA aumentou a genotoxicidade da CIS, teve efeito protetivo dos tecidos contra os efeitos colaterais do antineoplásico (LONGCHAR; PRASAD, 2015).

Os danos causados pela CIS levam à ativação da proteína Mut L homólogo-1 (MLH1), um dos componentes dos mecanismo de reparo por incompatibilidade de bases, que corrige erros que ocorrem durante a replicação e a recombinação do DNA, e também erros induzidos por danos à molécula (KOLODNER; MARSISCHKY, 1999). A MLH1 ativa a tirosina quinase c-Abl, que pode fosforilar ou estabilizar, dependendo do causador de danos ao DNA e o tipo celular, a proteína p73, um homólogo de p53, que para o ciclo celular (GONG et al., 1999; AGAMI et al., 1999). O ácido ascórbico também ativa MLH1 (KOLODNER; MARSISCHKY, 1999). A MLH1, juntamente com o fator de transcrição p53 promove o arrasto do ciclo celular e a apoptose (VIKHANSKAYA et al., 1999).

A manutenção no total de ENAs no grupo tratado com CIS em T24 e T96 (Gráfico 1), sugere efeito remissivo nos grupos de AA+CIS, e o estabelecimento de dano gênomico de longo prazo no grupo CIS.

A Tabela 2 mostra a frequência relativa de ENAs em cada tempo e tratamento.

Tabela 2. Frequência de cada alteração individual (%).

Tratamento	Frequência de ENAs (%)		
	4h	24h	96h
<b>CT</b>	<b>NO&gt;BL&gt;MN = VA&gt;BU = LO = CO</b> 76>14>5 = 5>0 = 0 = 0	<b>NO&gt;BL&gt;BU&gt;MN = LO&gt;CO = VA</b> 42>25>17>8 = 8>0 = 0	<b>NO = BU = LO &gt; MN = BL = CO = VA</b> 33= 33 = 33>0 = 0 = 0 = 0
<b>AA</b>	<b>CO&gt;NO&gt;MN&gt;BL=LO&gt;BU=VA</b> 88>6>4>1 = 1 > 0=0	<b>CO&gt;NO&gt;MN = BU &gt; BL = LO&gt; VA</b> 70>18>4 = 4 > 2 = 2 >0	<b>CO&gt;NO&gt;MN&gt;LO&gt;BL = VA&gt;BU</b> 44>33>13>5>3 = 3>0
<b>AA+CIS</b>	<b>CO&gt;VA&gt;NO&gt;BU&gt;MN = BL = LO</b> 89>3 = 3 >2> 1=1 = 1	<b>CO&gt;NO&gt;BU = LO&gt; MN = BL&gt;VA</b> 90>4>2=2>1 = 1>0	<b>CO&gt;MN&gt;NO = LO = VA&gt;BL = BU</b> 74>13>4 = 4 = 4 >0 =0
<b>CIS</b>	<b>NO&gt;BL&gt;MN&gt;LO&gt;BU&gt;CO = VA</b> 52>19>14>10>5>0 = 0	<b>CO&gt;NO&gt;BL&gt;VA&gt;MN&gt;BU&gt;LO</b> 75>9>6>5>3>2>0	<b>NO&gt;BL&gt;MN&gt;VA&gt;CO&gt;BU&gt;LO</b> 36>19>15>13>9>8>0

A análise incluiu 16.000 células por grupo experimental. A alteração mais frequente foi núcleo CO, seguido de núcleo NO. As ENAs menos frequentes foram núcleos LO e VA.

Nos grupos AA e AA+CIS em T4 e AA, AA+CIS e CIS em T24 a presença marcante de núcleos CO sugerem que os danos ao DNA foram tão críticos que, por não terem sido reparados, as células entraram em apoptose. O efeito do AA e o sinergismo da combinação AA+CIS aumentou a apoptose em células de carcinoma de cérvix humano (SiHa), células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e em ascite induzida em murino, no qual o AA levou à superexpressão da proteína p53, e a geração de peróxido de hidrogênio, com consequente aumento da morte celular (LONGCHAR; PRASAD, 2015; LEEKHA et al., 2016; GHAVAMI; SARDARI, 2020). A apoptose foi mais frequente quando as células AGS foram expostas somente ao AA e à combinação com cisplatina (GHAVAMI; SARDARI, 2020). O metabolismo dos compostos após T96 parece conduzir à um nível de danos próximo ao basal (Gráfico 1, Tabela 2).

Gomes e colaboradores (2015) mostraram a presença considerável de núcleos NO em eritrócitos de *O. niloticus* tratadas com cádmio. No trabalho de Harabawy e Mosleh (2014) as variações de núcleo NO também estiveram entre as ENAs mais comuns.

O MN teve frequência relativa considerável em alguns grupos (Tabela 2). De todas as alterações nucleares, o MN é a mais bem compreendida. (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013; EVGENIEVA; SUTIAGINA; ONISHCHENKO, 2016). O MN é um biomarcador de danos genômicos induzidos por genotoxinas (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013). Contudo em peixes, parece não ser suficiente para avaliar as consequências de exposição a genotóxicos da exposição. Para Carrasco e colaboradores (1990), à exemplo do teste de micronúcleo performado em mamíferos (e. g. camundongo), a análise de MNs em peixes deve indicar a presença, e não necessariamente a ausência de atuação do genotóxico. Isso indica que a frequência das demais ENAs pode ser utilizada como indicativo de potencial genotóxico quando a frequência de MNs for baixa. Considerando o pico de eritrócitos com MN no sangue periférico de peixes teleósteos, evidentemente ocorre uma variação interespecífica, mas ocorre em cerca de 1-5 dias após exposição, e mais comumente após 2-3 dias

(UDROIU, 2006). Isso porque o MN é formado durante a divisão celular, e sua frequência é dependente da proporção de células em divisão e do número de divisões após o tratamento (TERRADAS et al, 2010). Nesse mesmo tempo de tratamento com CIS, o pré-tratamento com AA dez minutos antes, inibiu em até 70% as aberrações cromossômicas em células da medula óssea de ratos (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 1999). A menor frequência de núcleos VA também foi observado por Handa e Jindal (2020) em *Ctenopharyngodon idellus* exposta ao cádmio.

Estudos mostraram que algumas ENAs podem estar correlacionadas (SERRANO-GARCA; MONTERO-MONTOYA, 2001; GOMES et al., 2015). A Tabela 3 mostra a correlação entre as ENAs em cada tratamento ( $p < 0,005$  e  $p < 0,001$ ).

No grupo CT em T24 os núcleos BU e LO estiveram correlacionados ( $p < 0,001$ ). No mesmo tratamento em T96 houve correlação entre MN e BU, MN e LO e LO e BU ( $p < 0,001$ ). No tratamento AA+CIS em T24, a correlação foi entre MN e CO ( $p < 0,05$ ). No grupo tratado com CIS em T4, MN e BL estiveram correlacionados ( $p < 0,001$ ). No mesmo tratamento em T24 a correlação presente foi entre BL e VA ( $p < 0,05$ ) e em T96 entre BU e CO ( $p < 0,05$ ). Nossos dados parecem indicar que o maior número de correlação no CT demonstram ENAs que possuem origem em comum.

Tabela 3. Matriz de coeficiente de Correlação de Spearman (R) entre as ENAs no mesmo grupo experimental.

	4 h						24 h						96 h									
	MN	BL	BU	LO	NO	CO	VA	MN	BL	BU	LO	NO	VA	MN	BL	BU	LO	NO	VA			
<b>CT</b>																						
BL	-0,22							0,54														
BU							-0,14	-0,22	**					**	**	**	1,00	-0,14				
LO							-0,14	-0,22	1,00	**					**	**	1,00					
NO	0,43	0,13					0,09	-0,29	0,13	0,67	0,67					-0,14						
CO																						
VA	-0,14	0,76																				
<b>AA</b>																						
BL	0,54							0,65							-0,22							
BU							-0,33	-0,22														
LO	-0,22	-0,14					-0,22	-0,14	-0,22					-0,33	-0,22							
NO	-0,43	-0,29	0,57				-0,26	-0,43	0,53	0,09					-0,45	0,26	0,39					
CO							-0,44	0,45	0,50	-0,19	0,50	-0,14					-0,06	0,34	0,13	-0,44	-0,43	
VA	0,66	0,25													0,65	-0,14	-0,22		-0,09			
<b>AA+CIS</b>																						
BL	-0,22							0,61														
BU	0,75	-0,29					0,23	0,49														
LO	-0,22	-0,14	-0,29				0,12	0,12	-0,39					-0,22								
NO	0,29	-0,29	0,07	-0,29			0,50	0,89	0,52	-0,08					0,54	-0,14						
CO	0,38	-0,41	0,28	0,58	0,07			* 0,03	-0,65	-0,06	-0,13	-0,54					-0,54	0,58	-0,17	-0,50		
VA	-0,44	-0,29	-0,20	0,57	-0,07	0,58							-0,22	-0,14		-0,14						
<b>CIS</b>																						
BL	** 0,99							0,07							0,29							
BU	0,54	0,65					-0,22	-0,29					0,36	0,06								
LO	-0,33	-0,33	-0,22																			
NO	0,82	0,80	0,38	0,07			0,66	-0,28					0,67	0,82	0,49							
CO							-0,25	0,21	0,41	-0,05	0,30					-0,08	-0,43	0,01	-0,32	-0,43		
VA							0,00	* 0,01	0,76	0,07						0,14	-0,06	0,06	-0,11			

\*Indica  $p < 0,05$

\*\*Indica  $p < 0,001$

Em T96 o total de ENAs parece ser devido a alteração na reciclagem de hemácias (GOMES et al., 2015). As hemácias são degradadas nos anfíbios, répteis e peixes nos centros melanomacrofágicos (MMCs), encontrados no rim, baço, timo e fígado, que são constituídos por agregados de macrófagos (WOLKE, 1992; RUND; CHRISTIANSEN; JOHNSON, 1998; LOUMBOURDIS; VOGIATZIS, 2002; BLAZER, 2002; AGIUS; ROBERTS, 2003; FISHELSON, 2006).

A hemocaterese nos peixes ocorre principalmente no baço (BORGIOLO; FRANGIONI, 1997). Esse órgão apresenta o mais alto nível de hemossiderina em relação aos outros tecidos hematopoiéticos de peixes (AGIUS, 1981). A hemossiderina é um pigmento azul-esverdeado que contém ferro férrico, derivado da degradação da hemoglobina (Figura 6) (AGIUS; ROBERTS, 2003; KRANZ, 1989; BLAZER, 2002).

A Tabela 4 mostra os resultados da análise qualitativa para hemossiderina e lipofucsina após 96h de exposição aos tratamentos.

Tabela 4. Marcação de hemossiderina e lipofucsina em *D. rerio*.

	<b>HEMOSSIDERINA</b>	<b>LIPOFUCSINA</b>
<b>CT</b>	+++ -	++++
<b>AA</b>	++ - -	++ - -
<b>AA+CIS</b>	++ - -	++ - -
<b>CIS</b>	- - - -	- - - -

+ indica presença de marcação

- ausência de marcação

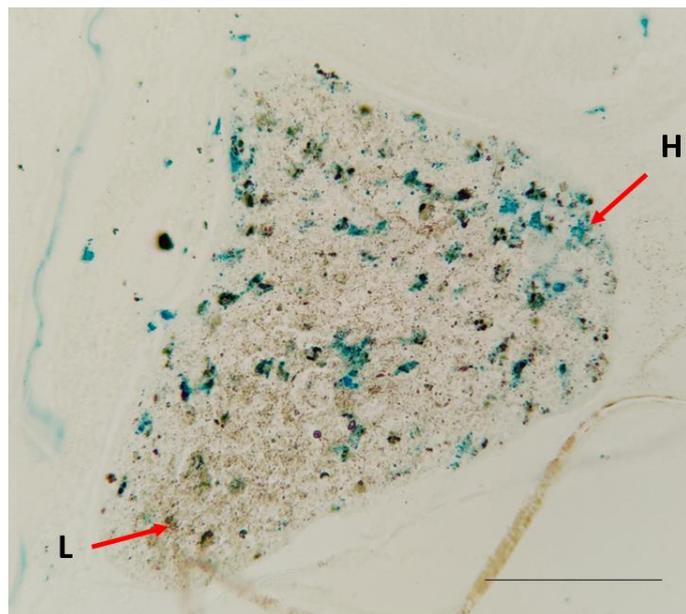


Figura 6. Coloração de Pearls mostrando marcação de hemossiderina e lipofucsina em *D. rerio*. Aumento de 40X. Foto: Do autor.

A hemossiderina estava presente na maioria dos animais do grupo CT, menos frequente nos grupos AA e AA+CIS, e ausente no grupo tratado com CIS (Tabela 4).

A elevação do total de ENAs nos grupos tratados com AA e sua redução em T96 (Gráfico 1), e a marcação de hemossiderina nos grupos AA e AA+CIS parece indicar comprometimento na via de formação da hemossiderina. A ausência de hemossiderina no grupo CIS sugere um comprometimento da população de macrófagos, ou mesmo, a morte celular das hemácias por necrose. De fato, a exposição à alguns agentes tóxicos como o cádmio, levam à uma variação numérica da população rica em linfócitos, sendo reduzida principalmente após período de 48 horas (GOMES et al., 2021).

A lipofuscina foi observada em todos os animais do grupo CT, menos frequente nos grupos AA e AA+CIS e no grupo tratado com CIS não foi houve marcação (Tabela 4). A lipofuscina é um pigmento resultante da oxidação de lipídios ou lipoproteínas insaturadas, como resultado da atividade lisossomal dos macrófagos e exibe coloração marrom-amarelado (Figura 6) (AGIUS, 1985, BLAZER, 2002). A diminuição ou mesmo ausência nos tratamentos com CIS indicam o comprometimento no processo de desintoxicação celular. A ausência de marcação nos grupos CIS e em comparação com o CT e os tratamentos com AA e AA+CIS para ambos os pigmentos sugerem efeito antioxidante do AA, entretanto devem ser realizado ensaios para confirmar essa hipótese. No mais, os mecanismos pelo qual o AA reduz a ação oxidante de genotóxicos ainda permanecem incertos (KURBACHER et al., 1996).

## CONCLUSÕES

- O *zebrafish* mostrou ser um bom modelo para detectar efeitos genotóxicos da cisplatina *in vivo*;
- A análise de ENAs permitiu observar alterações genotóxicas através da determinação das frequências totais;
- A análise da frequência relativa de ENAs permitiu observar os tipo de ENAs associados aos tratamentos com AA e CIS;
- O AA não exerceu efeito protetivo precoce em 4h e 24 hs de exposição à CIS;

- O AA exerce efeito protetivo após exposição à CIS por 96h.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M. et al. The nephroprotective effects of allicin and ascorbic acid against cisplatin-induced toxicity in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 13, p. 13502–13509, 2019.
- ADLER, I. D., EL-TARRAS, A. Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum: I. Induction of chromosomal aberrations in somatic and germinal cells of mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 211, n. 1, p. 131–137, 1989.
- AGAMI, R. et al. Interaction of c-Abl and p73 $\alpha$  and their collaboration to induce apoptosis. **Nature**, v. 399, n. 6738, p. 809–812, 1999.
- AGIUS, C. The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melano-macrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 18, n. 1, p. 41–44, 1981.
- AGIUS, C. The Melano-Macrophage Centres of Fish: a Review. **Fish Immunology**, p. 85-105, 1985.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 9, p. 499–509, 2003.
- AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative**, v. 85, n. 1, p. 5–9, 1986a.
- AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, v. 47, n. 190–191, p. 147–154, 1986b.
- ALMEIDA, V. L. D., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., & LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ANITHA, B. et al. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 469, n. 1, p. 1–8, 2000.
- ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. DE L. P. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin in vivo. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 415–417, 1999.
- AUERBACH C, ROBSON JM, C. J. The chemical production of mutations. **Science**, n. 105, p. 243–247, 1947.
- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M., MCCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. **The Journal of experimental medicine**, v. 79, n. 2, p. 137–158, 1943.

- BARRY, M. A.; BEHNKE, C. A.; EASTMAN, A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2353–2362, 1990.
- BATTLE, H. I.; HISAOKA, K. K. Effects of Ethyl Carbamate (Urethan) on the Early Development of the Teleost *Brachydanio rerio*. **Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 334–340, 1952.
- BAZZAN, A. J. et al. Retrospective Evaluation of Clinical Experience With Intravenous Ascorbic Acid in Patients With Cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 3, p. 912–920, 2018.
- BEVAN, R. J. et al. Can vitamin C induce nucleotide excision repair? Support from in vitro evidence. **British journal of nutrition**, v. 103, n. 5, p. 686–695, 2010.
- BINKS, S. P.; DOBROTA, M. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 1329–1336, 1990.
- BLAZER, V. S. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 85–101, 2002.
- BORGIOLI, G.; FRANGIONI, G. Blood and splenic respiratory compensation in larval newts. **Italian Journal of Zoology**, v. 64, n. 3, p. 221–226, 1997.
- BRUSICK, D. **Principles of genetic toxicology**. 1980.
- CADET, J.; RICHARD WAGNER, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, p. a012559, 2013.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 3, p. 2123–2136, 1990.
- CASTELO-BRANCO, P. V. et al. Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* without decreasing its antileishmanial activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 9, p. 8–15, 2019.
- CASTOLDI, G.; MITUS, W. J. Chromosome Vacuolization and Breakage. **Archives of Internal Medicine**, v. 121, n. 2, p. 177–179, 1968.
- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, n. 1, p. 64–70, 2005.
- CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 569–574, 2005.
- CHATTERJEE, I. B. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. **Science**, v. 182, n. 4118, p. 1271–1272, 1973.

CHENG, C. H. et al. The protective effects of vitamin C on apoptosis, DNA damage and proteome of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 71, p. 128–135, 2018.

CHOI, Y. M. et al. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation, **PLoS ONE**, 2015.

CHOUDHURY, R. C.; JAGDALE, M. B.; MISRA, S. Cytogenetic toxicity of cisplatin in bone marrow cells of Swiss mice. **Journal of Chemotherapy**, v. 12, n. 2, p. 173–182, 2000.

CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2018.

CRICK, F.; WATSON, J. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.

DAMODARAN K. et al.. Compressive force induces reversible chromatin condensation and cell geometry–dependent transcriptional response. **Molecular biology of the cell**, v. 29, n. 25, p. 3039–3051, 2018.

DAVIES, M. S.; BERNERS-PRICE, S. J.; HAMBLEY, T. W. Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: Improved understanding of sequence selectivity and the roles of mono-aquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 25, p. 5603–5613, 2000.

DE JESUS, L. C. L. ET AL. Genistein and ascorbic acid reduce oxidative stress-derived DNA damage induced by the antileishmanial meglumine antimoniate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 9, 2018.

Diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos-DBCA. Anexo I. Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. **CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-CONCEA**, 2017.

DOAK, S. H. et al. Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3904–3911, 2007.

DRISKO, J. A. et al. Treatment of pancreatic cancer with intravenous Vitamin C: A case report. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 4, p. 373–379, 2018.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 443–457, 2012.

EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 2, p. 155–166, 1987.

EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P.; VANDIVORT, T. C. General Overview of Toxicology. In: **Comprehensive Toxicology**. [s.l: s.n.]. p. 1–38.

EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379–2383, 1975.

EVGENIEVA, O. P. K.; SUTIAGINA, O. I.; ONISHCHENKO, G. E. Biogenesis of Micronuclei. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 5, p. 453–464, 2016.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Interactions Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73–83, 2018.

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Environmental Genomics**. p. 185–216, 2008.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FERNANDES, T.C. C;et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FISHELSON, L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. **Journal of Morphology**, v. 267, n. 1, p. 57–69, 2006.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 645–662, 2003.

FUNKHOUSER, C. M. et al. Mechanical model of blebbing in nuclear lamin meshworks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3248–3253, 2013.

FURUSAWA, T. et al. Chromatin decompaction by the nucleosomal binding protein HMGN5 impairs nuclear sturdiness. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–10, 2015.

GAMSE, J. T., & GORELICK, D. A. Mixtures, metabolites, and mechanisms: understanding toxicology using zebrafish. **Zebrafish**, v. 13, n. 5, p. 377–378, 2016.

GHAVAMI, G., SARDARI, S. Synergistic Effect of Vitamin C with Cisplatin for Inhibiting Proliferation of Gastric Cancer Cells. **Iranian Biomedical Journal**, v. 24, n. 2, p. 119, 2020.

GHAZANFAR, M.; SHAHID, S.; QURESHI, I. Z. Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 43–52, 2018.

GIACOMOTTO, J.; SÉGALAT, L. High-throughput screening and small animal models, where are we? **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 204–216, 2010.

GOMES, J. M. M. et al. What the Erythrocytic Nuclear Alteration Frequencies Could Tell Us about Genotoxicity and Macrophage Iron Storage ? **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–22, 2015.

GOMES, J. M. M. et al. Flow cytometry in the analysis of hematological parameters of tilapias: applications in environmental aquatic toxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 20–26, 2021.

- GONG, J. G. et al. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. **Nature**, v. 399, n. 6738, p. 806–809, 1999.
- GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v. 1, n. 1, p. 46–53, 2004.
- GUPTA, P. K. Genotoxicity. **Fundamentals of Toxicology: essential concepts and applications**. 2016.
- HANDA, K.; JINDAL, R. Genotoxicity induced by hexavalent chromium leading to eryptosis in *Ctenopharyngodon idellus*. **Chemosphere**, v. 247, p. 125967, 2020.
- HARABAWY, A. S. A.; MOSLEH, Y. Y. I. The role of vitamins A , C , E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium , copper , lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia , *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 28–35, 2014.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.
- HISAOKA, K. K., HOPPER, A. F. Some effects of barbituric and diethylbarbituric acid on the development of the zebra fish, *Brachydanio rerio*. **The Anatomical Record**, v. 129, n. 3, p. 297–307, 1957.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- ISHIDA, S. et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14298–14302, 2002.
- KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.
- KIM, J.; KOO, B. K.; KNOBLICH, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1–14, 2020.
- KING, J. L., JUKES, T. H. Non-darwinian evolution. **Science**, v. 164, n. 3881, p. 788–798, 1969.
- KLIESCH, U.; ADLER, I. D. Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2-nitropropane and cisplatin. **Mutation Research Letters**, v. 192, n. 3, p. 181–184, 1987.
- KOLODNER, R. D.; MARSISCHKY, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. **Current opinion in genetics & development**, v. 9, n. 1, p. 89–96, 1999.
- KOOHIAN, F. et al. The Radioprotective Effect of Ascorbic Acid and Kefir against Genotoxicity Induced by Exposure in Mice Blood Lymphocytes. **Nutrition and Cancer**, p. 1–7, 2020.
- KRANZ, H. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of aquatic organisms**, v. 6, n. 3, p. 167–173, 1989.

- KURBACHER, C. M. et al. Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. **Cancer Letters**, v. 103, n. 2, p. 183–189, 1996.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007.
- LE BIHANIC, F., et al. *In vivo* micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. **Mutagenesis**, v. 31, n. 6, p. 643–653, 2016.
- LEEKHA, A. et al. Vitamin C in synergism with cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling and p53 upregulation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2503–2514, 2016.
- LINDBERG, H. K. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 617, n. 1–2, p. 33–45, 2007.
- LONGCHAR, A.; PRASAD, S. B. Biochemical changes associated with ascorbic acid-cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 489–503, 2015.
- LOUMBOURDIS, N. S.; VOGIATZIS, A. K. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 1, p. 52–58, 2002.
- LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment : from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 131, 2013.
- MARTIN, L. P.; HAMILTON, T. C.; SCHILDER, R. J. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways: Clinical Cancer Research. **American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1291-1295, 2008..
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes : induction , detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, 2006.
- MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9–10, p. 394–401, 2008.
- METCALFE, C. D. Induction of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in the Erythrocytes of Mudminnows (*Umbra limi*) and Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*). **New York**, p. 489–495, 1988.
- MÜLLER, W.-U.; STREFFER, C. **Micronucleus assays**, p. 1-134, 1994.
- MULLER, H. J. Artificial Transmutation of the Gene. **Science**, v. 66, n. 1699, p. 84–87, 1927.
- NISHIKIMI, M., YAGI, K. Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 6, p. 1203S-1208S, 1991.
- OBERHAMMER, F. A. et al. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. **Journal of Cell Biology**, v. 126, n. 4, p. 827–837, 1994.

- ÖZKAN, F. et al. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia , *Oreochromis niloticus* , following exposure to sublethal cadmium doses. **Turkish Journal of Zoology**, v. 35, n. 4, p. 585–592, 2011.
- PADH, H. Cellular functions of ascorbic acid. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, n. 10, p. 1166–1173, 1990.
- PAMPALONA, J. et al. Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 683, n. 1–2, p. 16–22, 2010.
- PUTY, B. et al. Ascorbic acid protects against angiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: Action on the serotonergic system. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 365–370, 2014.
- RIBEIRO, H. J. et al. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. **Cell and Tissue Research**, v. 346, n. 3, p. 417–425, 2011.
- ROCCO, L.; PELUSO, C.; STINGO, V. Micronucleus Test and Comet Assay for the Evaluation of Zebrafish Genomic Damage Induced by Erythromycin and Lincomycin. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 10, p. 598–604, 2012.
- ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1965.
- ROSENBERG, B., VANCAMP, L., TROSKO, J. E., & MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385–386, 1969.
- ROSENBERG, B. et al. Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 716–721, 1967.
- RUND, C. R.; CHRISTIANSEN, J. L.; JOHNSON, J. C. *In Vitro* Culture of Melanomacrophages from the Spleen and Liver of Turtles: Comments on Melanomacrophage Morphology. **Pigment Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 114–119, 1998.
- SANCHO-MARTÍNEZ, S. M. et al. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 35–55, 2012.
- SAUFI, M. Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester 1. **The FASEB journal**, v. 4, n. 14, p. 3251–3255, 1990.
- SCHAEFER, J.; RYAN, A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 3, p. 722–734, 2006.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.
- SCHMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. **Chemical mutagens**, p. 31–53, 1976.
- SERRANO-GARCA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds

are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2001.

SHAHJAHAN, M., et al. Increase in water temperature increases acute toxicity of sumithion causing nuclear and cellular abnormalities in peripheral erythrocytes of zebrafish *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 36, p. 36903–36912, 2019.

SHAHJAHAN, M. ET AL. Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 543, 2020.

SHAW, J. R. et al. Daphnia as an emerging model for toxicological genomics. **Advances in Experimental Biology**, v. 2, n. 08, p. 165–328, 2008.

SHAW, P. et al. Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 135622, 2020.

SIDDIQUE, Y. H.; BEG, T.; AFZAL, M. Anticlastogenic effects of ascorbic acid against the genotoxic damage induced by norethynodrel. **Adv Environ Biol**, v. 1, n. 1, p. 27–32, 2007.

SOLA, L.; GORNUNG, E. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): An overview. **Genetica**, v. 111, n. 1–3, p. 397–412, 2001.

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Influence of cis-Diamminedichloroplatinum(II) on DNA Synthesis and Cell Cycle Progression in Excision Repair Proficient and Deficient Chinese Hamster Ovary Cells. **Cancer Research**, v. 48, n. 23, 1988.

SOUZA, S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1–2, p. 87–93, 2006.

SZENT-GYÖRGYI, A. Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: {D}escription of a new carbohydrate derivative. **Biochem Journal**, v. 22, n. 6, p. 1387–1409, 1928.

TAGUCHI, T. et al. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. **Cellular Stress Responses in Renal Diseases**, v. 148, p. 107–121, 2005.

TERRADAS, M., MARTÍN, M., TUSELL, L., & GENESCÀ, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

TIWARI, V.; WILSON, D. M. DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging. **American Journal of Human Genetics**, v. 105, n. 2, p. 237–257, 2019.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 201–204, 2006.

VIKHANSKAYA, F. et al. Cooperation between p53 and hMLH1 in a human

colocarcinoma cell line in response to DNA damage. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 4, p. 937–941, 1999.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 307–320, 24 abr. 2005.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 18, p. 123–131, 1953.

WELSH, J. L. ET AL. Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 765–775, 2013.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: A review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 91–108, 1992.

YADAV, K. K.; TRIVEDI, S. P. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. **Chemosphere**, v. 77, n. 11, p. 1495–1500, 2009.

YOUSIF, M. Q.; QASEM, S. A. Tissue Processing and Staining for Histological Analyses. In: **Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [ p. 49–59, 2016.

**ZFIN The Zebrafish Information Network**. Disponível em: <<http://zfin.org/>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ZHANG, C.; WILLET, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. **Current protocols in toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2003.