

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ESTRESSORES IMPREVISÍVEIS SOBRE A
ESTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)

ANDRÉ FERNANDES GOMES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba – MG

Junho – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ESTRESSORES IMPREVISÍVEIS SOBRE A
ESTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)

André Fernandes Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Carla Patrícia Bejo Wolkers

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba – MG

Junho – 2021

RESUMO

A repetição crônica de estressores pode causar desequilíbrios em sistemas fisiológicos e promover alterações de humor, considerada uma precursora para transtornos psicológicos, como o transtorno de ansiedade. Em humanos, o alto nível de ansiedade reativa associado a situações de estresse foi correlacionado à instabilidade cromossômica, sugerindo que a ansiedade e o estresse sejam potenciais agentes genotóxicos. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da aplicação de estressores imprevisíveis associados à indução de quadros de ansiedade, sobre a estabilidade cromossômica em indivíduos adultos de *Danio rerio* (zebrafish). Para isto, foi aplicado um protocolo com o intuito de induzir e manter os animais do grupo experimental sob condições estressantes e, posteriormente, quantificar a presença de células micronucleadas, por meio do teste de micronúcleo (MN), em eritrócitos. A média das frequências de MNs foi calculada de acordo com o número de MN por 1000 eritrócitos. Os resultados indicaram que houve diferença significativa na indução de eritrócitos micronucleados nos animais do grupo experimental, quando comparados ao grupo controle. O presente estudo demonstrou que a aplicação dos estressores imprevisíveis associados à indução de quadros de ansiedade foi capaz de causar danos celulares (efeito clastogênico e/ou aneugênico) neste modelo biológico.

Palavras chave: Ansiedade; Estresse; Genotoxicidade; Micronúcleo.

ABSTRACT

The chronic repetition of stressors may cause imbalances in physiological systems and promote mood changes, considered a precursor to psychological disorders, such as anxiety disorder. In humans, the high level of reactive anxiety associated with stressful situations has been correlated with chromosomal instability, suggesting anxiety and stress as potential genotoxic agents. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of the application of unpredictable stressors associated with the induction of anxiety disorders, on chromosomal stability in adult *Danio rerio* (zebrafish) individuals. For this, a protocol was applied in order to induce and maintain the animals of the experimental group under stressful conditions and, subsequently, to quantify the presence of micronucleated cells, by means of micronucleus (MN) test, in erythrocytes. The average frequency of MNs was calculated according to the number of MNs per 1000 erythrocytes. The results indicated that there was a significant difference in the induction of micronucleated erythrocytes in the animals of the experimental group, when compared to the control group. The present study demonstrated that the application of unpredictable stressors associated with the induction of anxiety was able to cause cell damage (clastogenic and/or aneugenic effect) in this biological model.

Keywords: Anxiety; Genotoxicity; Micronucleus; Stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	OBJETIVO.....	9
3	METODOLOGIA.....	10
3.1	Animais	10
3.2	Procedimentos experimentais	10
3.3	Cronograma de aplicação dos estressores	11
3.4	Análise de micronúcleos	11
3.5	Análise dos dados	12
4	RESULTADOS	13
5	DISCUSSÃO.....	14
6	CONCLUSÃO	19
	REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

Entende-se como estresse a resposta dos organismos à percepção de estímulos que perturbam sua homeostasia e desencadeiam um processo de adaptação que se caracteriza, principalmente, pelo aumento da secreção das catecolaminas (CAs), adrenalina e noradrenalina, e dos corticosteroides, como cortisol, resultando em diversas reações sistêmicas que causam alterações fisiológicas e psicológicas com o objetivo de gerar respostas adequadas à situação em questão (MARGIS *et al.*, 2003).

De acordo com a revisão realizada por Wandelaar Bonga (1997), os estressores desencadeiam ações duplas nos organismos: eles produzem efeitos que desequilibram o mecanismo de controle homeostático e elicitam um conjunto coordenado de respostas comportamentais e fisiológicas, compensatórias e/ou adaptativas, de forma que o animal supere a ameaça. O estresse é considerado um fenômeno conservado durante a evolução, que tem a finalidade de garantir a sobrevivência dos indivíduos. Entretanto, dependendo da intensidade e cronicidade dos estímulos estressores, estes podem trazer prejuízos à saúde e ao bem-estar dos organismos (MARGIS *et al.*, 2003; MALTA, 2012).

As respostas integradas ao estresse são classificadas em: primárias, caracterizadas pela liberação de CAs diretamente nos órgãos, por meio da inervação simpática, e na corrente sanguínea, pela medula da glândula adrenal, e dos corticosteroides, como o cortisol, pelo córtex da adrenal; secundárias, definidas como os efeitos desencadeados pela ação destes neurotransmissores e hormônios, que incluem aumento no débito cardíaco, captação de oxigênio, mobilização de substratos de energia e perturbação do equilíbrio hidroeletrolítico; e terciárias, que incluem a inibição do crescimento, da reprodução, da resposta imune e capacidade reduzida de tolerar estressores subsequentes, tornando-se, portanto deletérias ao organismo (WANDELAAR BONGA, 1997).

Estudos defendem que o estresse crônico, além de afetar os sistemas fisiológicos desencadeando as respostas descritas anteriormente, pode promover alterações de humor, prejudicando a produtividade, a qualidade de vida e sendo considerado um precursor para transtornos mentais, como a depressão e a ansiedade (CHAKRAVARTY *et al.*, 2013). A ansiedade é um assunto bastante estudado em humanos e que ainda levanta muitas questões para a comunidade científica, sendo que não há um consenso acerca de sua definição. No entanto, a maioria dos autores aborda a ansiedade como um sentimento relacionado à apreensão e ao medo, que se caracteriza por uma tensão derivada da antecipação do perigo, de algo que é desconhecido ou estranho (CASTILLO *et al.*, 2000). Trata-se de um estado de alerta em resposta ao agente estressor, sendo considerada normal, quando logo após a fase de

excitação, acontece o retorno ao seu estado de equilíbrio. No entanto, se essa fase perdurar este estado pode se estabelecer como uma patologia como, por exemplo, os transtornos de ansiedade (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Embora não haja muitas evidências ligando quadros de estresse e ansiedade à potenciais efeitos genotóxicos para as células, em humanos, o alto nível de ansiedade reativa, associado a situações de estresse, foi correlacionado à instabilidade cromossômica (SOBOL *et al.*, 2008), sugerindo que a ansiedade e o estresse podem desencadear alterações fisiológicas e celulares causadoras de danos ao DNA. De acordo com a Organização Mundial da Saúde ([OMS], 2017) e a Organização Panamericana da Saúde ([OPAS], 2018) a saúde mental é uma das áreas mais negligenciadas com aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo que convivem com transtornos mentais, e o Brasil é considerado o país mais ansioso do mundo, onde 9,3% da população (18,6 milhões de brasileiros) é acometida pelo transtorno de ansiedade. Portanto, é de essencial importância o estabelecimento das relações entre estresse, ansiedade e suas consequências na estabilidade cromossômica, considerando que alterações no material genético estão diretamente relacionadas ao aparecimento de processos patológicos como a carcinogênese, a teratogênese e o aparecimento de doenças neurodegenerativas (ROSS; MARGOLIS, 2005; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015; VERRI *et al.*, 2017).

As células dos organismos eucarióticos contam com diversos recursos para manter a estabilidade genômica, prevenir mutações e mudanças permanentes no DNA. Estes mecanismos são imprescindíveis para garantir a homeostase celular, pois caso haja alguma falha durante esses processos, eles podem ocasionar o início da carcinogênese (CABRAL *et al.*, 2011; REIS, 2006). A formação de micronúcleos (MN) nas células é considerada um indicador de falha nestes processos de manutenção da estabilidade genômica e cromossômica. Os MNs são formados a partir do material genético (DNA), mais especificamente fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros, que não são integrados ao núcleo após a divisão celular, devido à lenta migração aos polos da célula durante a fase de anáfase (FLORES; YAMAGUSHI, 2009; DIETZ *et al.*, 2000).

A possibilidade de ocorrência de MNs após o término da divisão celular é conhecida há bastante tempo, sendo sua primeira descrição como um biomarcador de danos ao DNA apresentada na década de 1970, a partir de uma série de estudos com medula óssea de roedores tratados com compostos genotóxicos, considerada, a princípio, como uma alternativa aos métodos clássicos de citogenética (SCHMID, 1975; HEDDLE, 1973). A partir de sua primeira descrição, o teste se mostrou confiável para a avaliação da genotoxicidade por meio de um estudo *in vivo*, realizado em mamíferos, que identificou eritrócitos policromáticos na

medula óssea, visando detectar substâncias clastogênicas (quebra de cromossomos) ou que prejudicam a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (aneugênicos). Atualmente, o teste é utilizado para avaliação de substâncias com potencial genotóxico a partir da quantificação de MNs, permitindo relacionar o possível aumento na frequência dessas alterações com a exposição das células e/ou organismos (DIETZ *et al.*, 2000; FLORES; YAMAGUCHI, 2009; FAGUNDES, 2005) sendo considerado um dos métodos mais recomendados para indicar e avaliar danos nos cromossomos, devido, principalmente à facilidade dos procedimentos técnicos em comparação a outros ensaios.

O efeito genotóxico pode ser causado tanto por agentes exógenos quanto endógenos, sendo que estudos sugerem o estresse oxidativo celular como um importante agente indutor de genotoxicidade. O metabolismo do oxigênio molecular durante a respiração celular gera subprodutos tóxicos, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), que são naturalmente eliminados por agentes antioxidantes. Porém, quando em altas concentrações, em virtude de algum estímulo que aumente sua produção, as EROs desencadeiam o estresse oxidativo podendo causar problemas como a perda da função celular e disfunções em sistemas orgânicos, uma vez que essas substâncias são capazes de interagir com moléculas orgânicas como fosfolipídios, proteínas e DNA (BARBOSA *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo analisou o efeito da aplicação de estressores associados à indução de quadros de ansiedade sobre a estabilidade cromossômica, tendo sido utilizado como modelo biológico o *zebrafish* (*Danio rerio*). O *D. rerio* já é um modelo bem estabelecido para estudo de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro*. A análise de suas células em cultura tem sido utilizada para determinar genotoxicidade, citotoxicidade, teratogenicidade e embriotoxicidade em resposta a diversos tipos de agentes sendo um organismo eficiente para a substituição de modelos de avaliação de toxicidade em células de mamíferos (CIMBALUK, 2016).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de diversos estressores de maneira imprevisível sobre a estabilidade cromossômica, por meio da quantificação de MNs, utilizando *D. rerio* como modelo biológico.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados 12 juvenis de *D. rerio*, de ambos os sexos, obtidos a partir de criadores de peixes ornamentais. Antes do início dos experimentos os peixes foram mantidos em aquários de 12 L (1 peixe por litro). Três dias antes dos procedimentos experimentais os peixes foram transferidos para dois aquários de vidro de 12 L (6 animais por aquário), com as laterais e o fundo cobertos com papel pardo. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 h (dia subjetivo) e com temperatura de 27 °C, mantido com climatização ambiente. A iluminação foi promovida por sistema composto por temporizador e lâmpada fluorescente 20 W de intensidade luminosa 1200 lx. O oxigênio dissolvido, através de sistema aerador, foi mantido em ~ 8 mg/L e o pH da água na faixa de 6,5 a 8. O oxigênio dissolvido e pH foram mensurados diariamente por meio de oxímetro e pHmetro, respectivamente. Os níveis de amônia, nitritos e nitratos foram mensurados diariamente e mantidos abaixo de 0,002 mg/L e 0,5 ppm, respectivamente. A limpeza dos tanques e alimentação foram realizadas diariamente utilizando ração comercial contendo 28% de proteína bruta (PB) e 3.100 kcal de energia digestível (ED) por quilo. A alimentação foi interrompida 24 horas antes da realização da coleta de sangue.

3.2 Procedimentos experimentais

Após a aclimação às condições experimentais, seis peixes (n=6) foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível adaptado do estudo de Piatto *et al.* (2011) (Grupo Experimental), enquanto seis peixes (n=6) foram mantidos nas mesmas condições experimentais sem a aplicação dos estressores (Controle). O grupo experimental foi submetido, duas vezes ao dia, em horários com certo grau de aleatoriedade, no período da manhã e no período da tarde, a um dos seguintes estressores, durante 07 dias: (1) estresse de restrição: os animais foram mantidos com espaço de natação restrito por 90 min; (2) aquecimento da água: temperatura a 33 °C por 30 min; (3) isolamento social: os animais foram isolados uns dos outros por 45 min em Beckeres de 250 mL; (4) resfriamento da água: temperatura a 23 °C por 30 min; (5) aglomeração de 6 animais por 50 min em um Becker de 250 mL; (6) redução do nível da água até a exposição aérea de suas nadadeiras dorsais durante 2 min; (7) perseguição: foi utilizada rede de captura por 8 min; (8) troca de tanque: a cada 2 min os animais eram transferidos para aquários com volumes diferentes num total de 3 vezes. A ordem em que os estressores foram aplicados ocorreu de forma aleatória, escolhidos por meio de sorteio. Uma vez que os estressores foram aplicados por sete

dias, pela manhã e pela tarde (totalizando 14 eventos de aplicação de estressores) e a ordem e o estressor aplicado foi escolhida de forma aleatória (sorteio) os estressores 3 e 6 foram aplicados apenas uma vez ao longo do experimento, enquanto o restante dos estressores foi aplicado duas vezes (Tabela 1).

3.3 Cronograma de aplicação dos estressores

A aplicação dos estressores se procedeu conforme é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Ordem cronológica das aplicações diárias de estressores imprevisíveis.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8
Tipo de estressor e horário	6 09:30	2 08:30	7 10:00	3 08:00	8 09:00	4 09:30	5 08:30	Coleta 07:00
	1 16:00	4 17:00	8 17:30	7 16:30	2 17:00	5 16:00	1 15:30	

Fonte: os autores.

1. Estresse de restrição: 90 min;
2. Aquecimento da água a 33 °C: 30 min;
3. Isolamento social: 45 min;
4. Resfriamento da água a 23 °C: 30 min;
5. Aglomeração: 50 min;
6. Redução do nível da água: 02 min;
7. Perseguição: 08 min;
8. Troca de tanque (3 vezes): a cada 02 min.

3.4 Análise de micronúcleos

Para realização do teste de micronúcleos (MN) foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975) com algumas modificações, de acordo com Hooftman e Raat (1982). Após os 07 dias de exposição ao estresse, os peixes foram anestesiados em água resfriada a 10 °C. Em seguida foi retirada uma amostra de sangue por meio de escara branquial, utilizando seringas de insulina heparinizadas, sendo os peixes, em seguida, eutanasiados (solução de benzocaína a 100 mg/L). Cerca de 15 µL de sangue foram depositados sobre uma lâmina de microscopia limpa para realização do esfregaço. Após secarem ao ar, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 30 min e por fim, coradas em

uma solução de Giemsa (10%) diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 12 min. Foram confeccionadas 2 lâminas por indivíduo. A análise das lâminas foi realizada em microscopia ótica (imersão – 1000X) para identificação e quantificação de MNs. Foram analisados 2.000 eritrócitos por animal, conforme metodologia adaptada de Cestari *et al.* (2004). A identificação dos MNs seguiu os critérios de Tolbert, Shy e Allen (1992), segundo os quais os MNs possuem as seguintes características: a) estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca que a do núcleo principal; b) borda evidente, sugerindo membrana nuclear; c) formato arredondado; d) localização intracitoplasmática; e) diâmetro menor do que 1/5 e maior do que 1/10 do núcleo principal. Os dados de MN são apresentados como frequência de MN por 1000 células analisadas (%).

3.5 Análise dos dados

A média de frequências MN, expressas como o número de MNs por 1000 eritrócitos, foram calculadas. A diferença entre amostras de peixes submetidos ou não aos estressores foram submetidas a teste t ($P < 0,05$), utilizando o programa SigmaStat.

4 RESULTADOS

A frequência de eritrócitos micronucleados é apresentada na tabela 2. Foram contabilizadas 2.000 células por indivíduo, entretanto as lâminas de um dos peixes do grupo controle não apresentou qualidade adequada para análise após coloração, sendo, portanto, descartadas para evitar análises equivocadas. Dessa forma, foram contabilizadas 10.000 células no grupo controle (n=5) e 12.000 células no grupo experimental (n=6). Foi observada indução significativa de MNs nos eritrócitos de peixes submetidos ao protocolo de estresse imprevisível, quando comparados ao grupo controle ($t=-4,885$; GL: 9; $P<0,001$). A figura 1 apresenta um exemplo de MN.

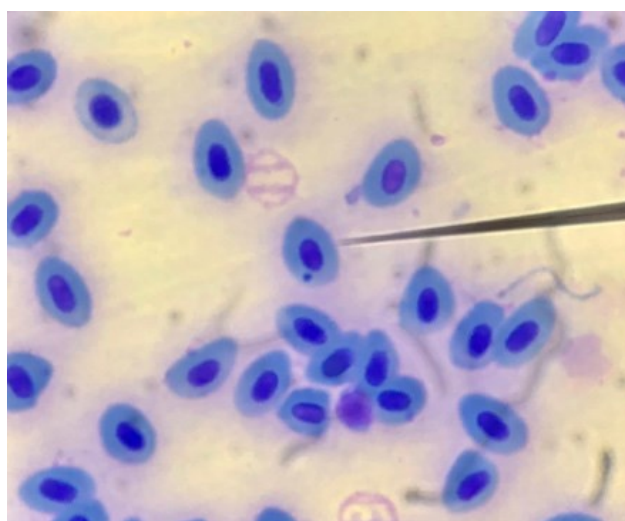
Tabela 2 - Frequência de eritrócitos com micronúcleos (MN) no grupo controle e no grupo exposto ao protocolo de estresse imprevisível

Tratamento	Número total de células contabilizadas	Total de células com MNs	
		N.º	% $\pm$ EP
Controle	10.000	5	0,50 $\pm$ 0,16
Estresse	12.000	19	1,58 $\pm$ 0,15*

* Indica diferença significativa ($P<0,001$). MNs: micronúcleos; EP: erro padrão.

Fonte: os autores

Figura 1 - Fotomicrografia dos eritrócitos de *D. rerio* corados com Giemsa em aumento de 1000X com óleo de imersão. A seta mostra um eritrócito micronucleado.



Fonte: os autores.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a aplicação por sete dias de estressores imprevisíveis em indivíduos adultos de *D. rerio* promoveu aumento na frequência de MNs eritrócitários, o que sugere que este protocolo estressor tenha efeito clastogênico e/ou aneugênico.

Os resultados obtidos mostraram que houve diferença significativa no número de eritrócitos micronucleados entre o grupo experimental, submetido ao protocolo de estressores imprevisíveis, e o grupo controle. Os animais estressados apresentaram frequência de MNs aproximadamente três vezes maior em seus eritrócitos (Tabela 1). Não há, na literatura, dados que permitam inferir a frequência normal de micronúcleos em *D. rerio* não submetidos à protocolos potencialmente genotóxicos (controle), sendo observadas frequências que variam desde zero (0) até quatro (4) MN por mil células analisadas (BONY *et al.*, 2010; ROCCO *et al.*, 2012; KOVÁCS *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2016; ALAK *et al.*, 2020a; ALAK *et al.*, 2020b). Os valores de frequência de MN observados no presente estudo para o grupo controle foi de 0,5 MN por mil células analisadas, estando dentro dos valores encontrados na literatura. É importante ressaltar que esta variação pode estar relacionada a uma série de fatores, como as condições de manutenção, a origem dos peixes, parâmetros de qualidade da água, clima, entre outros. Há, ainda, discrepâncias na forma de apresentação dos dados, o que dificulta uma comparação acurada entre os diferentes estudos.

Micronúcleos são corpos extranucleares pequenos originados de fragmentos de cromátides, cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que ficaram para trás na anáfase das células em divisão e não são incluídos no núcleo principal durante a telófase (LUZHNA *et al.*, 2013). Os MNs podem ser formados no processo de divisão celular e sua expressão ocorre em momentos diferentes após o evento de dano ao DNA e depende da cinética do ciclo de divisão celular e do mecanismo de indução. O teste para avaliação de indução de MN, originalmente desenvolvido com espécies de mamíferos (HEDDLE *et al.*, 1983), atualmente é aplicado em peixes e outros organismos aquáticos, como moluscos bivalves (ROCHA; ROCHA, 2016; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). A presença de micronúcleos é, portanto, um indicativo da ocorrência de aberrações cromossômicas que podem ser espontâneas ou induzidas por agentes genotóxicos, tornando o teste do MN uma importante ferramenta de biomonitoramento de genotoxicidade e mutagenicidade (CARRARD *et al.*, 2007). O aumento no número de eritrócitos micronucleados após a aplicação do protocolo de estressores imprevisíveis indica, nas condições experimentais

utilizadas no presente estudo, que situações estressantes repetitivas induzem efeitos genotóxicos.

Genotoxicidade é compreendida como uma ação nociva que compromete a integridade do material genético celular, afetando assim a integridade da célula, ao passo que os agentes genotóxicos ou as genotoxinas são fatores que possuem propriedades físico-químicas que os tornam capazes de interagir com os ácidos nucleicos, podendo causar modificações em suas estruturas e funções (MOHAMED *et al.*, 2017). O dano ao DNA pode ser causado por fatores exógenos, o que inclui produtos químicos, radiação ultravioleta e radiação ionizante; e por fatores endógenos, como as EROs, aldeídos, falhas durante a mitose e por enzimas que estão intimamente ligadas aos processos de reparo do DNA, além de outros fatores (ROSS; MARGOLIS, 2005; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015). Neste contexto, as possíveis alterações hormonais e metabólicas desencadeadas pelos estímulos estressores imprevisíveis utilizados no presente estudo podem ter levado o organismo a processos genotóxicos endógenos, ocasionados, por exemplo, pelo aumento no estresse oxidativo.

O termo “estresse oxidativo” foi definido pela primeira vez por Helmut Sies como “um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro”. Embora essa definição tenha sido amplamente aceita pela comunidade científica por muito tempo, ela tornou-se simples diante das ferramentas atuais de análise. Uma definição mais detalhada que define o estresse oxidativo como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular” é atualmente a mais aceita (POWERS *et al.*, 2020). O estresse oxidativo é, portanto, uma consequência do metabolismo do oxigênio durante o processo normal de respiração, quando há formação de subprodutos potencialmente tóxicos em altas concentrações, denominados EROs (SILVA; JASIULIONIS, 2014). Em condições normais, durante um único ciclo metabólico, apenas 3% do oxigênio molecular é responsável pela formação de EROs que são rapidamente eliminados por agentes antioxidantes (CAMPOS; LEME, 2017). Entretanto, quando este equilíbrio é perdido devido à fatores ambientais e/ou endógenos, o estresse oxidativo pode se estabelecer. Este distúrbio ocorre no momento em que a produção de EROs supera a capacidade antioxidante do organismo (FERREIRA; ABREU, 2007).

A principal causa da toxicidade das EROs é o fato destas serem energeticamente mais reativas que o oxigênio molecular. Em outras palavras, estes elementos atraem elétrons extras em sua camada de valência, o que garante a eles a capacidade de realizar ligações com componentes celulares via reações de oxirredução e, consequentemente, promoverem

alterações bioquímicas que levam a disfunções celulares (CRUZAT *et al.*, 2007). O radical hidroxila, por exemplo, é considerado uma espécie com alto potencial tóxico e o mais deletério ao organismo, por causar danos ao DNA, RNA, às proteínas, aos lipídios e membranas celulares tanto do núcleo quanto das mitocôndrias, sendo que no DNA ele ataca diretamente as bases nitrogenadas e a desoxirribose (BARREIROS *et al.*, 2006).

Neste contexto, é possível que os estressores aplicados no presente estudo tenham desencadeado o aumento na produção de EROs, resultando em uma condição de estresse oxidativo que pode estar associada ao aumento na frequência de MNs observados nos animais submetidos ao protocolo de estresse. De fato, dentre os estressores aplicados neste estudo encontram-se a perseguição, que exige exercício físico extenuante e prolongado; a exposição aérea (redução do nível de água), que induz uma situação de hipóxia e o aquecimento, que causa hipertermia, sendo estes estressores conhecidos por causarem estresse oxidativo. De acordo com Finkel e Holbrook (2000), uma série de estímulos ambientais favorece a produção de EROs nos organismos vivos, dentre os quais a hipertermia. Além disso, exercícios físicos agudos de alta intensidade também podem exercer efeitos similares, aumentando diretamente a produção de EROs (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Além do possível aumento da produção de EROs desencadeada de forma direta pelos estressores, o estresse oxidativo pode ter sido desencadeado indiretamente pelo aumento na produção e liberação das catecolaminas adrenalina e noradrenalina (RADAKOVIĆ *et al.*, 2018). Quando o organismo é submetido a uma situação estressante dois sistemas neuro-hormonais são ativados simultaneamente, sendo observada a ativação do sistema nervoso simpático, que, por meio de suas aferências às células interrenais, promove a liberação massiva de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea; ao mesmo tempo é ativado o eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (eixo HPI, em peixes), que culmina com a liberação do hormônio cortisol pelas células interrenais. O estresse causado pela aplicação de estressores similares aos utilizados no presente estudo, como a captura, o manuseio, o exercício forçado, a exposição à hipóxia, a aplicação de choques de temperatura, dentre outros, resultam em uma liberação massiva de catecolaminas pelas células cromafins (WANDELAAR BONGA, 1997), sendo plausível considerar que este protocolo promoveu um aumento nos níveis de catecolaminas circulantes, tornando possível que os efeitos genotóxicos observados tenham relação com estes hormônios.

Estudos indicam que as catecolaminas, especialmente a adrenalina, podem causar genotoxicidade quando em doses que excedem os níveis fisiológicos, pela produção de EROs, como ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio, ao serem metabolizadas (RADAKOVIĆ

et al., 2018). Djelić *et al.* (2015) demonstrou, em um estudo *in vitro*, que linfócitos humanos tratados com adrenalina em um intervalo de 0,00005 a 500 μM apresentaram aumento de dano ao DNA de forma dose dependente, avaliados pelo ensaio cometa. Apesar do teste de micronúcleo aplicado no referido estudo não ter detectado efeito genotóxico, foi possível verificar atraso no ciclo celular. Já o estudo realizado por Topalović *et al.* (2018) demonstrou que uma concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adrenalina foi capaz de causar dano ao DNA de células sanguíneas humanas, também avaliadas pelo ensaio cometa. Ambos estudos demonstraram, ainda, que a genotoxicidade causada pela adrenalina tem relação direta com um aumento no estresse oxidativo, já que o tratamento com o antioxidante quercetina, um flavonoide natural, foi capaz de reverter, de forma significativa, os danos ao DNA causados pela adrenalina.

Há, portanto, bases na literatura que indicam que a adrenalina exerce um papel importante quanto à genotoxicidade. É importante ressaltar que a genotoxicidade demonstrada por estes estudos foi avaliada pelo teste cometa, diferentemente do estudo aqui apresentado. O potencial genotóxico pode ser avaliado por diversos testes, utilizando diferentes *endpoints*, permitindo ou não a sua detecção. O ensaio cometa detecta danos ao DNA e permite a observação destas alterações causadas por exposições recentes e que ainda podem ser reparadas, ao passo que o teste de MN detecta danos cromossômicos permanentes, seja por clastogênese e/ou aneugênese (BORTOLOTTTO *et al.*, 2021). Em nosso estudo, os níveis de adrenalina não foram mensurados, entretanto, ao considerar o protocolo de estresse imprevisível ao qual os peixes foram submetidos, é esperado que os níveis deste hormônio tenham se elevado durante este período. Sendo assim, é possível que o aumento na frequência de micronúcleos observado neste estudo esteja relacionado a uma hiperatividade simpática em resposta ao estresse.

Durante eventos estressores, além da produção e liberação das catecolaminas anteriormente citadas, ainda há a produção e liberação de cortisol pelas células interrenais por meio da ativação do eixo HPI. O cortisol é um hormônio glicocorticoide da família dos esteroides e é considerado um dos principais hormônios de resposta ao estresse (WANDELAAR BONGA, 1997). Apesar de sua importância para funcionamento do organismo, quando os níveis de cortisol estão alterados, este pode ser um sinal de estresse crônico ou fadiga crônica (BORTOLOTTTO *et al.*, 2021). Além disso, há relatos na literatura que indicam que o cortisol também pode induzir danos significativos ao DNA e interferir em seu mecanismo de reparo. Na pesquisa realizada por Flint *et al.* (2007), foram demonstrados efeitos moleculares da exposição *in vitro* de curto prazo aos hormônios do estresse

(adrenalina, noradrenalina e cortisol) analisados em células 3T3 (murine cells) de roedores. Foi demonstrado que os três hormônios foram capazes de causar dano significativo ao DNA em poucos minutos e que as células 3T3 falharam em reparar completamente os danos induzidos pelo cortisol e pela noradrenalina. Embora os níveis de cortisol não tenham sido quantificados no presente estudo, é provável que o protocolo de estressores imprevisíveis tenha induzido aumento nos níveis de cortisol, se considerarmos os resultados de Piatto *et al.* (2011) que, utilizando um paradigma de estresse similar ao aqui aplicado, observaram aumento significativo nos níveis de cortisol, além de aumentos nos níveis do fator liberador de corticotrofina (CRF) e da expressão de receptores glicocorticoides (GR). Sendo assim, os efeitos genotóxicos observados também podem estar relacionados ao aumento nos níveis deste hormônio, conjuntamente à elevação nos níveis de catecolaminas e a um consequente estresse oxidativo desencadeado por eles.

O protocolo de estressores imprevisíveis aplicado no presente estudo foi, de fato, baseado na pesquisa desenvolvida por Piatto *et al.* (2011), que demonstrou que a aplicação deste tipo de estressor pode desencadear um quadro de ansiedade, avaliado por meio de mudanças comportamentais em testes específicos. Em seres humanos, quadros de alto nível de ansiedade reativa, associados a situações de estresse, estão correlacionados a instabilidade cromossômica (SOBOL *et al.*, 2008). Sendo assim, quadros de ansiedade desencadeados por estressores imprevisíveis podem causar, além dos danos já conhecidamente relacionados ao estresse crônico e dos efeitos neurais da ansiedade, alterações fisiológicas e metabólicas que podem levar à efeitos genotóxicos significativos, sugerindo que a ansiedade induzida pelo estresse pode ser um fator que predisponha a genotoxicidade.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a aplicação de estressores imprevisíveis associados à indução de quadros de ansiedade (PIATO *et al.*, 2011) podem promover genotoxicidade (aneugênese e/ou clastogênese), possivelmente associada às alterações hormonais induzidas pelo estresse, incluindo a elevação nos níveis de cortisol, adrenalina, noradrenalina e consequente estresse oxidativo. As evidências relacionando quadros de ansiedade, estresse e genotoxicidade ainda são incipientes e novos estudos são necessários para se avaliar o papel de cada hormônio nos resultados obtidos no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALAK, G. *et al.* Hematological and Hepatic Effects of Ulexite in *Zebrafish*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103496, 2020a.
- ALAK, G. *et al.* Oxidative and DNA damage potential of colemanite on *zebrafish*: brain, liver and blood. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 20, n. 8, p. 593-602, 2020b.
- ARAÚJO, S.R.C.; MELLO, M.T.; LEITE, J.R. Transtornos de ansiedade e exercício físico. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 164-171, 2007.
- BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.
- BONY, S.; GAILLARD, I.; DEVAUX, A. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in *zebrafish*. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3-6, p. 421-428, 2010.
- BORTOLOTTI, I. *et al.* DNA damage, salivary cortisol levels, and cognitive parameters in a nursing team. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 861, p. 503300, 2021.
- CABRAL, H.C.B. *et al.* O Processamento de uma Ontologia sobre a Integração de Dados de Vias de Interação Molecular Envolvidas em Câncer. **Revista Brasileira de Computação Aplicada**, v. 3, n. 1, p. 82-91, 2011.
- CAMPOS, M.T.G.; LEME, F.O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v. 12, p. 139, 2017.
- CARRARD, V.C. *et al.* Teste dos Micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.
- CASTILLO, A.R.G.L. *et al.* Transtornos de ansiedade. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, p. 20-23, 2000.
- CESTARI, M.M. *et al.* Genetic damage induced by trophic doses of lead evaluated by means of the comet assay and chromosomal aberrations in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n.2, p. 270-274, 2004.

CHAKRAVARTY, S. *et al.* Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a *zebrafish* model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63302, 2013.

CIMBALUK, G.V. Avaliação da genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae*. 2016.

CRUZAT, V.F. *et al.* Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, p. 336-342, 2007.

Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

DIETZ, J. *et al.* Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 207-11, 2000.

DJELIĆ, N. *et al.* Evaluation of cytogenetic and DNA damage in human lymphocytes treated with adrenaline *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 27-33, 2015.

DU, J. *et al.* Developmental toxicity and DNA damage to *zebrafish* induced by perfluorooctane sulfonate in the presence of ZnO nanoparticles. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 3, p. 360-371, 2016.

FAGUNDES, F.A. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, 2005.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 161, n. 2, p. 193-198, 1986.

FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLINT, M.S. *et al.* Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 470-479, 2007.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-192, 1973.

HEDDLE, J.A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews**

in **Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HOOFTMAN, R.N.; RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147–152, 1982.

KOVÁCS, R. *et al.* Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in *zebrafish* (*Danio rerio*) two-generation study. **Water research**, v. 77, p. 201-212, 2015.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 131, 2013.

MALTA, M.B. **Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico imprevisível nos receptores do fator liberador de corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema nervoso central de ratos**. 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

MARGIS, R. *et al.* Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. 1, p. 65-74, 2003.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483-1489, 2015.

MOHAMED, S.A.K.S. *et al.* Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 133-138, 2017.

Pan American Health Organization. The Burden of Mental Disorders in the Region of the Americas, 2018. Washington, D.C.: PAHO; 2018.

PIATO, A. L. *et al.* Unpredictable chronic stress model in *zebrafish* (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561-567, 2011.

POWERS, S.K. *et al.* Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?. **Journal of sport and health science**, v. 9, n. 5, p. 415-425, 2020.

RADAKOVIĆ, M. *et al.* Nitroso-oxidative stress, acute phase response, and cytogenetic damage in Wistar rats treated with adrenaline. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

REIS, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 39, n. 4, p. 577-586, 2006.

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.

ROCHA, S.M.; ROCHA, C.A.M. Micronucleus test in bivalve mollusks as an important tool for xenobiotic exposure risk assessment. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4, n.1, p. 70-79, 2016.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R.L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2005.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, No. 1, p. 9-15, 1975.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SOBOL, M.V.; AFANASIEVA, E.S.; BEZRUKOV, V.F. Correlation Between the Rate of Anxiety and the Level of Genome Instability of Participants of Ukrainian School Biological Olympiads. **Психофармакология и биологическая наркология**, v. 5, n. 2, p. 926–927, 2008.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. **Mutation Research**, v. 271, No. 1, p. 69-77, 1992.

TOPALOVIĆ, D. *et al.* Assessment of adrenaline-induced DNA damage in whole blood cells with the comet assay. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 304-308, 2018.

VERRI, A.M.; MOURA, A.A.; DE MOURA, V.M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 30, n. 1, 2017.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.