



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

Bacharelado em Física Médica



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**JOÃO MIGUEL BARBOZA**

**EFEITOS PRODRÔMICOS DA EXPOSIÇÃO DE BAIXA DOSE À RADIAÇÃO  
IONIZANTE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA E TRATO  
GASTRINTESTINAL DE ZEBRAFISH**

**BOTUCATU-SP**

**2023**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

Bacharelado em Física Médica



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**JOÃO MIGUEL BARBOZA**

**EFEITOS PRODRÔMICOS DA EXPOSIÇÃO DE BAIXA DOSE À RADIAÇÃO  
IONIZANTE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA E TRATO  
GASTRINTESTINAL DE ZEBRAFISH**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do  
título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Helton Carlos Delicio

**BOTUCATU-SP**

**2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barboza, João Miguel.

Efeitos prodrômicos da exposição de baixa dose à radiação ionizante na musculatura esquelética e trato gastrointestinal de zebrafish / João Miguel Barboza. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Helton Carlos Delicio  
Capes: 20904002

1. Peixe. 2. Zebrafish. 3. Trato gastrointestinal.  
4. Músculo esquelético. 5. Radiação ionizante.

Palavras-chave: Alterações morfofisiológicas; Músculo esquelético; Radiação ionizante; Trato gastrointestinal; Zebrafish.

*“As above, so below. As within, so without. As the universe, so the soul.”*

**O Caibalion**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço profundamente à Ilustre Grande Obra, por me permitir operá-la, me guiar pela jornada, pelo conforto proporcionado ao meu coração em tempos complexos e ambíguos e por Tudo!

Agradecimentos especiais à minha genitora, Lília, e demais parentes e familiares que me acompanharam até aqui!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Helton Carlos Delicio por me proporcionar os meios possíveis para a execução desse projeto de pesquisa!

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e todos os seus servidores!

Por último, não menos importante, aos amigos com quem convivi por toda uma trajetória de graduação, entre eles Bruno G. dos Santos, Pedro Pelicano, Erick G. Stoppa, Lucas E. Jensen, Ueslen S. da Silva, Vinícius Barco, Lucas G. Piato, Vitor M. Brandão, Fernando H. B. Gonçalves, Mateus Padilha, Maria Gabriela J. Carra e Júlia Bucci, meu sincero Muito Obrigado!

## RESUMO

O pequeno teleósteo *Danio rerio*, também conhecido como zebrafish, tem se mostrado um excelente modelo experimental para o estudo de diversas patologias como câncer, distrofia muscular e estresse. No que se diz respeito à radiação ionizante, esta é definida como capaz de ionizar um meio, produzindo radicais livres ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo essas interações capazes de quebrar ligações químicas e danificar membranas celulares, podendo causar estresse oxidativo e danos ao DNA. Foram escolhidos aleatoriamente 60 zebrafish adultos, que foram divididos em 5 grupos experimentais, Controle, R1, R3, R7 e R15, sendo os últimos quatro expostos à radiação ionizante na dose única e de corpo inteiro de 2Gy. O tempo de eutanásia e coleta das peças do intestino delgado e da musculatura esquelética foram realizadas 1, 3, 7 e 15 dias após a exposição à radiação ionizante e, posteriormente analisadas histologicamente quanto ao número de células intestinais, comprimento das vilosidades intestinais, diâmetro das fibras musculares. Foi possível constatar que a radiação ionizante de baixas doses promove alterações morfofisiológicas significativas no tecido intestinal e na musculatura esquelética e que ambos possuem grande capacidade regenerativa.

**Palavras-chave:** radiação ionizante; zebrafish; alterações morfofisiológicas; musculatura esquelética; trato gastrointestinal.

## ABSTRACT

The small teleost *Danio rerio*, also known as zebrafish, has proven to be an excellent experimental model for the study of various pathologies such as cancer, muscular dystrophy, and stress. About ionizing radiation, this is defined as capable of ionizing a medium, producing free radicals or reactive species of oxygen and nitrogen, and these interactions are capable of breaking chemical bonds and damaging cell membranes, which can cause oxidative stress and damage to the body. DNA. Sixty adult zebrafish were randomly chosen and divided into 5 experimental groups, Control, R1, R3, R7 and R15, the last four being exposed to ionizing radiation at a single and whole-body dose of 2Gy. The time of euthanasia and collection of parts of the small intestine and skeletal muscle were carried out 1, 3, 7 and 15 days after exposure to ionizing radiation, and subsequently analyzed histologically for the number of intestinal cells, length of intestinal villi, diameter of muscle fibers. We found that low dose ionizing radiation promotes significant morphophysiological changes in intestinal tissue and skeletal muscle, and that both have great regenerative capacity.

**Keywords:** ionizing radiation; zebrafish; morphophysiological changes; skeleton muscle; gastrointestinal tract.

## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

Gy – Gray

TGI – Trato Gastrointestinal

K – Kelvin

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica

HE – Hematoxilina e Eosina

ANOVA – Análise estatística de variâncias

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Disposição dos aquários no isocentro do Alcyon II .....	14
Figura 2 Imagem representativa do intestino delgado de zebrafish .....	15
Figura 3 Imagem representativa do zebrafish fixado na placa de petri .....	15
Figura 4 Imagem ilustrativa: vilosidades intestinais de zebrafish .....	17
Figura 5 Imagem ilustrativa: vilosidades e núcleos celulares intestinais. ....	18
Figura 6 Imagem ilustrativa: fibras musculares esqueléticas. ....	19
Gráfico 1 Comprimento das vilosidades intestinais. ....	17
Gráfico 2 Número de núcleos celulares intestinais.....	18
Gráfico 3 Diâmetro das fibras musculares esqueléticas.....	19
Tabela 1 Especificações da unidade de telecobaltoterapia Alcyon II .....	14

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
Modelo Experimental.....	12
Manutenção dos Peixes .....	13
Delineamento Experimental .....	13
Exposição à Radiação Ionizante .....	14
Dissecação.....	15
Análise Histológica .....	16
Análise Estatística .....	16
RESULTADOS .....	16
DISCUSSÃO .....	20
REFERÊNCIAS.....	27
ANEXO 1.....	32

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento industrial na atualidade, os organismos vivos estão cada vez mais expostos a diferentes formas de radiação ionizante e não ionizante. Normalmente as radiações de fontes naturais são de baixa energia e não ionizantes, como ondas eletromagnéticas, raios solares, relâmpagos e trovões. No entanto, existem também fontes naturais de radiação ionizante, com energia o suficiente para remover elétrons dos átomos ou moléculas, ou seja, capazes de ionizar um meio (1, 2).

As principais fontes naturais de radiação ionizante são os raios cósmicos e os radionuclídeos provenientes da crosta terrestre, já as fontes utilizadas em terapia (tratamento de câncer), diagnóstico de enfermidades (radiografias e tomografias) e produção de energia (usinas nucleares) são antropogênicas, ou seja, artificiais (3-5).

A radiação pode interagir com a matéria em diferentes níveis dependendo da quantidade de energia emitida pela fonte e as características dos tecidos, acarretando efeitos diretos ou indiretos. Os efeitos diretos ocorrem quando a radiação interage diretamente com moléculas importantes e específicas como o DNA, podendo causar quebras de fita dupla ou simples. Os efeitos indiretos ocorrem quando a radiação interage com a matéria por meio de excitação ou ionização produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas espécies são capazes de danificar a membrana celular e quebrar ligações químicas, podendo causar estresse oxidativo ou danos ao DNA (6-8).

O maior ou menor efeito biológico sobre os organismos não depende apenas da intensidade de exposição à radiação, mas também das características intrínsecas associadas ao surgimento de efeitos adversos causados pela radiação, uma dessas características é a radiosensibilidade.

Os trabalhos de Bergonié e Tribondeau (1959), posteriormente revisados por Vogin e Foray em 2013 (9) sobre os efeitos biológicos induzidos pela radiação ionizante nos tecidos, estabelecem que o estágio de desenvolvimento, atividade metabólica, proliferação e diferenciação celular são características que definem a sensibilidade à radiação, portanto tecidos mais jovens e menos especializados são mais sensíveis em comparação à tecidos adultos e mais especializados (10-13).

Dentre os tecidos mais radiosensíveis temos o sistema hematopoiético, sofrendo danos estruturais entre 2 e 4Gy, o trato gastrointestinal com danos entre 10 e 100Gy, e o sistema nervoso acima de 100Gy. O tecido muscular precisa de uma dose maior para que ocorra um dano permanente. A restauração ou não dos danos celulares causados pela radiação ionizante pode levar a alterações cromossômicas, mutações, câncer e morte celular (14-16).

De acordo com os trabalhos de Mothersill e Seymour (2012) não existe dose segura de radiação, qualquer exposição aumenta o risco de danos, devido a diversas variáveis descontroladas tais como tempo de exposição, calibração do

equipamento e exposição. Além disso em acidentes nucleares, uma dose superior a 1Gy já permanece no ambiente exposto (17, 18).

A utilização de animais de laboratório ou cultura de células é uma ótima alternativa para avaliar efeitos biológicos em ambientes controlados com populações com baixa variabilidade individual e experimentação em diversas doses de radiação. O zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno teleosteo tropical e de água doce e tem se mostrado um bom modelo experimental pelo baixo custo, fácil manutenção e similaridade genômica para com humanos. Esse peixe compartilha metade do tamanho do genoma humano e cerca de 70% dos genes humanos, além de 82% dos genes cancerígenos. Atualmente esse modelo é amplamente utilizado em diversas linhas de pesquisa (modelos de câncer, distrofia muscular, estresse e neurociência), porém sua utilização em radiobiologia é ainda escasso e quase restrito à fase embrionária (19-26).

A maior parte do corpo dos peixes é formada por tecido muscular, que é responsável pela locomoção, uma vez que o ambiente aquático é mais denso que o terrestre, os peixes necessitam de maior força para se deslocar em situações como caça ou fuga de predadores. Os músculos esqueléticos são ligados às costelas e pele, direcionando a energia de contração muscular para uma força motriz, ao contrário dos mamíferos (27-29).

A principal função do trato gastrointestinal do zebrafish, que é formado por intestino delgado e intestino grosso, é a digestão e absorção de nutrientes assim como nos mamíferos. O intestino delgado é o principal local de absorção de nutrientes enquanto o intestino grosso, de absorção de sais e água. Os mecanismos de digestão e absorção ocorrem através de processos de mistura e impulsão dos materiais a fim de transformar, digerir, absorver e posteriormente eliminar os mesmos. A principal diferença entre o trato gastrointestinal do zebrafish e o humano, é a ausência de expressão de genes para codificar as funções gástricas, e a presença de estruturas independentes compostas por células endodérmicas dispostas em lâmina ou cordão (30-32).

A maioria dos estudos em organismos vivos utilizam exposições crônicas à radiação ionizante em baixas doses e pouca atenção tem sido dada aos efeitos da exposição aguda à radiação ionizante. No presente estudo utilizamos o zebrafish como modelo biológico visando investigar os efeitos da exposição única e de corpo inteiro na dose de 2Gy sobre o Sistema Digestório e a Musculatura Esquelética de zebrafish adultos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Modelo Experimental**

Para determinarmos os efeitos teciduais e possíveis alterações morfofisiológicas causados pela exposição à radiação ionizante de corpo inteiro, utilizamos como modelo experimental o zebrafish (*Danio rerio*) e dois tecidos de radiosensibilidades bem distintos; o Trato Gastrointestinal (TGI) com radiosensibilidade dos tecidos mais baixa e o Musculo Esquelético; mais elevada.(9)

### **Manutenção dos peixes**

Os animais utilizados nesse estudo foram espécimes adultos (aproximadamente 60 dias de idade,  $3,5 \pm 0,5$  cm de comprimento e massa de  $0,4 \pm 0,1$ g) da espécie *Danio rerio* (zebrafish), selecionados da população estoque mantida no biotério de peixes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor Fisiologia) do Instituto de Biociências de Botucatu -UNESP.

Os animais foram mantidos em tanques de alvenaria de 1200L (150 indivíduos) com aeração constante e fluxo contínuo de água desclorada para constante renovação e filtração mecânica e biológica. Os níveis de amônia e nitrito foram  $<0,002$  ppm e  $<0,25$  ppm, respectivamente. O pH da água variou em torno de 7,0 a 7,2 e a temperatura de 24 a 26°C (sendo mantidos em ambiente fechado contando com ar-condicionado e termostatos).

O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, das 6 às 18 horas, com transição abrupta de luz para sombra, controlada por timer eletrônico. A iluminação foi artificial (lâmpada com aproximadamente 5200K de temperatura) com intensidade luminosa de 120 lux na superfície da água dos tanques. A alimentação foi diária com ração industrializada até a saciação.

### **Delineamento experimental**

Como estratégia geral, avaliou-se os efeitos da radiação ionizante (2Gy) no número de células intestinais, comprimento das vilosidades intestinais e diâmetro das fibras musculares esqueléticas de zebrafish adulto. Para isso foram selecionados aleatoriamente 60 animais do nosso estoque, que foram transferidos para cinco aquários de vidro (40x25x22cm, 22 litros de água) e mantidos sob essas condições durante o período de aclimatação de 1 semana.

Os peixes selecionados formaram cinco grupos, sendo um grupo controle (n=20) e quatro grupos experimentais, expostos à radiação (n=40). Os quatro grupos experimentais foram caracterizados pelo tempo de eutanásia após a exposição, portanto R1, R3, R7 e R15, eutanasiados 1, 3, 7 e 15 dias após a exposição, respectivamente.

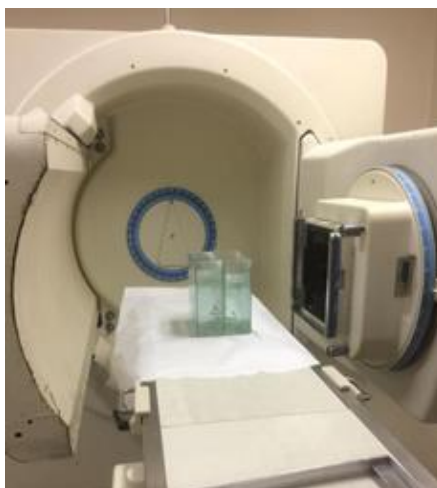
Foram realizadas análises e comparações do comprimento das vilosidades e o número de células intestinais presentes ao longo das vilosidades e o diâmetro da musculatura esquelética dos peixes expostos à radiação ionizante com o grupo controle, não expostos, mas submetidos aos mesmos procedimentos experimentais durante 15 dias após exposição, com os cortes histológicos sendo realizados nos dias 1, 3, 7 e 15.

Os aquários continham sistema de aeração por ar comprimido, temperatura controlada, ar-condicionado, alimentação duas vezes por dia até a saciação, limpeza e sifonagem dos tanques duas vezes por semana para remoção de fezes e restos de alimento, e complemento com água desclorada até 8 litros.

### Exposição à Radiação Ionizante

Os peixes foram transportados ao setor de Radioterapia do HCFMB – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e expostos à uma dose única de 2Gy em uma unidade de telecobaltoterapia Alcyon II. A dosimetria foi realizada com câmara de ionização calibrada para a energia do  $\text{Co}^{60}$  de acordo com IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica) seguindo protocolo TRS-398 (Tabela 1).

O procedimento consistiu no posicionamento de dois aquários no isocentro do Alcyon II, e posterior irradiação com 2 campos, um  $45^\circ$  à esquerda e outro  $45^\circ$  à direita (Figura 1). Considerando o coeficiente de atenuação da água e do vidro, o tempo de exposição e a entrega de 2,56Gy garantiram a homogeneidade da dose de 2Gy em todos os animais. Imediatamente após a exposição, os peixes retornaram aos tanques de origem e foram eutanasiados de acordo com o grupo experimental, nesse dia os peixes não foram alimentados.



**Figura 1.** Mostra a disposição dos aquários no isocentro do Alcyon II. Fonte: Acervo Pessoal.

**Tabela 2.** Especificações da unidade de telecobaltoterapia Alcyon II.

<b>Especificações Alcyon II</b>	
<b>Aparelho</b>	Alcyon II
<b>Campo equivalente</b>	30
<b>Profundidade (cm)</b>	8
<b>Distância – SSD</b>	80
<b>Dose (cGy)</b>	200
<b>Bandeja</b>	Sem Bandeja
<b>PDP %</b>	70,1
<b>Rendimento (cGy/min)</b>	50,8
<b>Fator Campo</b>	1,109
<b>Fator Bandeja</b>	1
<b>Tempo (min)</b>	5,04

### Dissecação

A dissecação consistiu no método de Gupta e Mullins (2010), no qual os peixes foram previamente anestesiados em solução supersaturada de Benzocaína e imediatamente colocados em contato com gelo durante 15 minutos para fixação e preservação dos órgãos. Após isso, o animal foi posicionado em um Microscópio Binocular ZEISS 2000® em uma placa de petri embebida com parafina e envolta por papel metálico. Cada animal foi fixado com a ajuda de alfinetes e posteriormente dissecados com auxílio de instrumentos cirúrgicos para remoção do trato gastrointestinal e musculatura esquelética. Após a remoção, as peças foram imersas imediatamente em Glutaraldeído 4% para fixação e posterior armazenamento em refrigerador à 10°C. Pode-se observar as peças dissecadas nas Figuras 2 e 3 a seguir (33).



**Figura 2.** Imagem representativa do intestino delgado de zebrafish sob papel metálico antes da imersão em Glutaraldeído 4%. Fonte: Acervo Pessoal



**Figura 3.** Imagem representativa do zebrafish fixado na placa de petri com o auxílio de alfinetes e uma porção da musculatura esquelética retirada do lado esquerdo do peixe. Fonte: Acervo Pessoal.

### **Análise Histológica**

Os tecidos previamente armazenados foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e decrescentes de xilol e mergulhados em parafina. Após a solidificação da parafina foram feitos cortes de três seções na espessura de 4  $\mu\text{m}$  com auxílio de um micrômetro. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e foram realizadas análises comparativas entre o grupo controle e os grupos expostos.

As análises histológicas das lâminas de intestino e músculo esquelético foram realizadas em microscópio OLYMPUS CX23. O software Cell Sens Standard (Olympus®, USA) foi usado para mensurar o comprimento das vilosidades intestinais e diâmetro das fibras musculares, traçando uma linha arbitrária entre dois pontos e o software retornava os valores em  $\mu\text{m}$ . Quanto à contagem de células intestinais, o software diferencia os núcleos celulares por meio da coloração e retorna o número de núcleos da região escolhida.

No Anexo 1 (página 33) pode-se observar um banco de figuras das lâminas capturadas pelo microscópio.

### **Análise Estatística**

Foi utilizado o software GraphPad Prism 8 para a análise estatística e confecção dos gráficos. O teste adotado foi o ANOVA (Análise de Variância) seguido de post-hoc de Tukey e análise estatística descritiva com significância estabelecida por  $p < 0,05$ . Os gráficos são do tipo linha, com média e desvio padrão.

## **RESULTADOS**

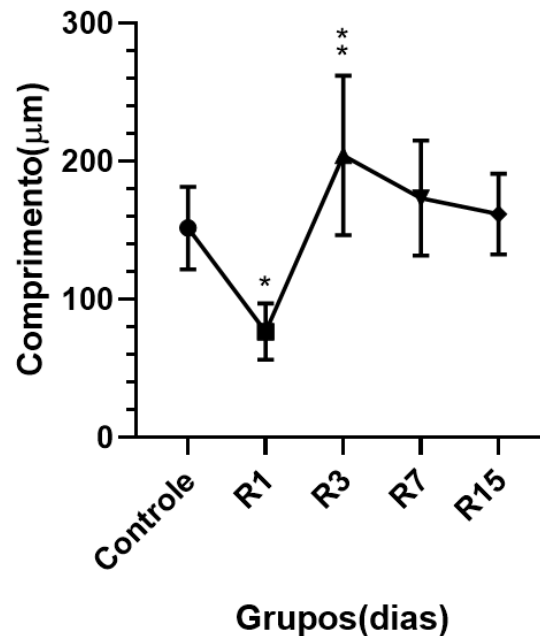
Nesse estudo, após exposição aguda e de corpo inteiro à radiação ionizante na dose de 2Gy, não foi observada morte, deformidades nem quaisquer alterações comportamentais nos animais após o retorno aos aquários de origem no laboratório.

Os efeitos da radiação ionizante sobre o organismo dependem principalmente do quanto o tecido exposto é radio sensível. De acordo com a Lei de Bergonié e Tribondeau (1959) a radiosensibilidade dos tecidos depende do seu grau de desenvolvimento e especialização.

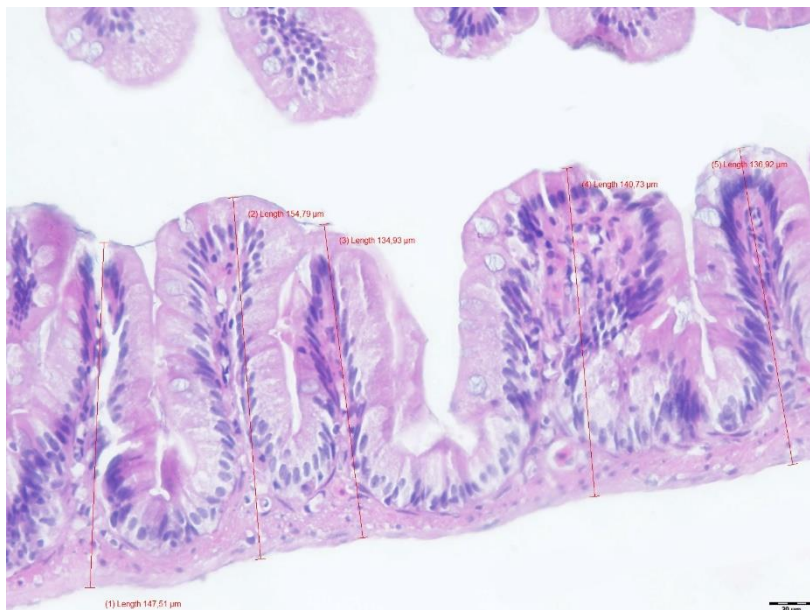
Constatamos que a radiação ionizante de corpo inteiro na dose única de 2Gy promove queda significativa no número de células e no comprimento das vilosidades intestinais e aumento significativo do diâmetro das fibras musculares esqueléticas, alterações essas identificadas principalmente no primeiro dia após a exposição.

Os valores médios obtidos após análise dos cortes histológicos em relação ao comprimento das vilosidades foi de  $151,8 \pm 29,89\mu\text{m}$  para o grupo controle. No primeiro dia após exposição, o comprimento das vilosidades apresentou queda significativa em relação ao controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ), com valores médios de  $76,73 \pm 20,3\mu\text{m}$  (R1). Esta queda não perdurou nos outros momentos analisados, com uma possível regeneração e ou diferenciação celular que culminaram com um crescimento significativo das vilosidades intestinais no

terceiro dia ( $R3= 204,3\pm 57,82\mu\text{m}$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA  $p=0,00013$ ), e retornando aos valores basais no sétimo dia ( $R7=173,5 \pm 41,61 \mu\text{m}$ ) e décimo quinto dia ( $R15=161,9 \pm 29,3\mu\text{m}$ ), mostrando a grande capacidade de reparação tecidual do TGI do zebrafish após lesão provocada pela radiação ionizante . Gráfico 1 e Figura 4.



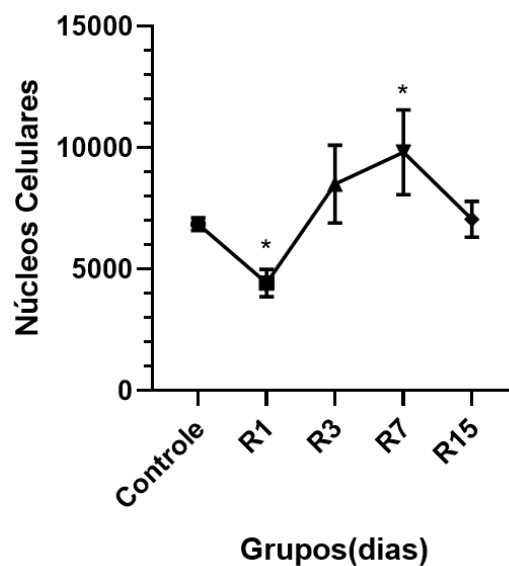
**Gráfico 1** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do comprimento das vilosidades intestinais ( $\mu\text{m}$ ) de Zebrafish expostos a radiação ionizante na dose de 2 Gy. \* indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) e \*\* indica diferença significativa ( $p<0,0001$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.



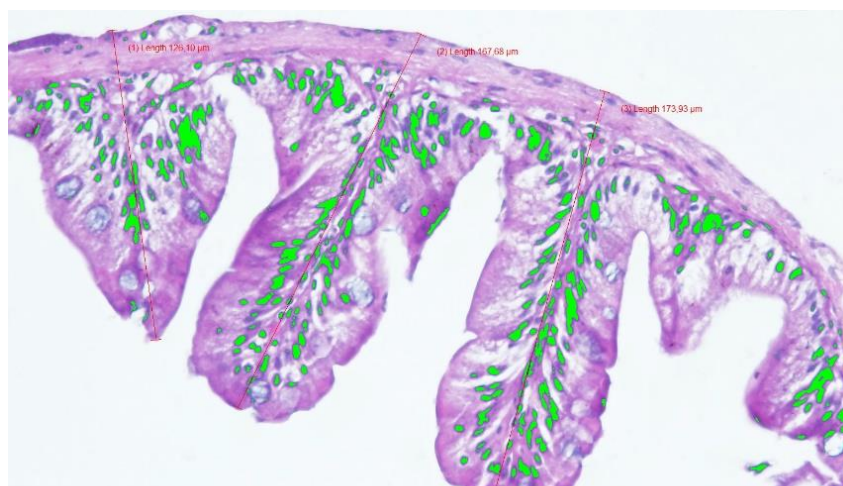
**Figura 4** Imagem ilustrativa mostrando as vilosidades intestinais de zebrafish após a exposição única e de corpo inteiro à radiação ionizante na dose de 2Gy. Linhas vermelhas mostram o comprimento das vilosidades intestinais em  $\mu\text{m}$ .

Resultado semelhante foi obtido em relação ao número de células do tecido gastrointestinal com queda significativa já no primeiro dia ( $R1=4432\pm 563,9$  núcleos) em relação ao controle ( $CTL=6858\pm 262,6$  núcleos) (ANOVA,  $p=0,0232$ ). A partir do terceiro dia a análise morfológica mostrou início de regeneração celular ( $R3=8507\pm 1603$  núcleos) com aumento significativo no número de células observado no sétimo dia ( $R7= 9814\pm 1740$  núcleos) em relação ao grupo controle (ANOVA,  $p=0,0046$ ).

No décimo quinto dia após a exposição, o número de células diminuiu significativamente ( $R15=7059\pm 736$  núcleos) em relação ao momento anterior (ANOVA,  $p=0,0086$ ), porém se manteve semelhante aos níveis basais pré-exposição, conforme Gráfico 2 e Figura 5.



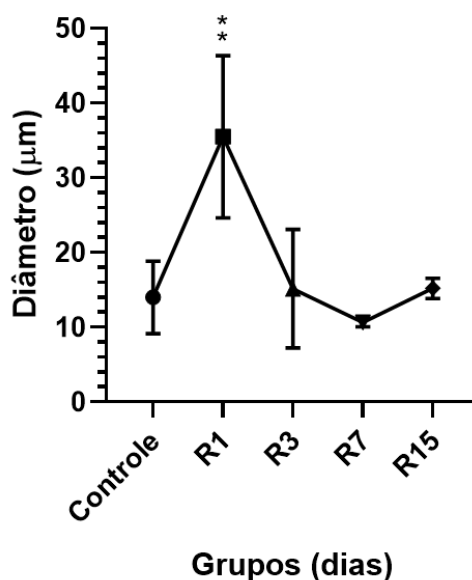
**Gráfico 2** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do número de núcleos celulares na região das vilosidades intestinais de Zebrafish expostos a radiação ionizante na dose de 2 Gy. \* indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA seguido de post-hoc de Tukey



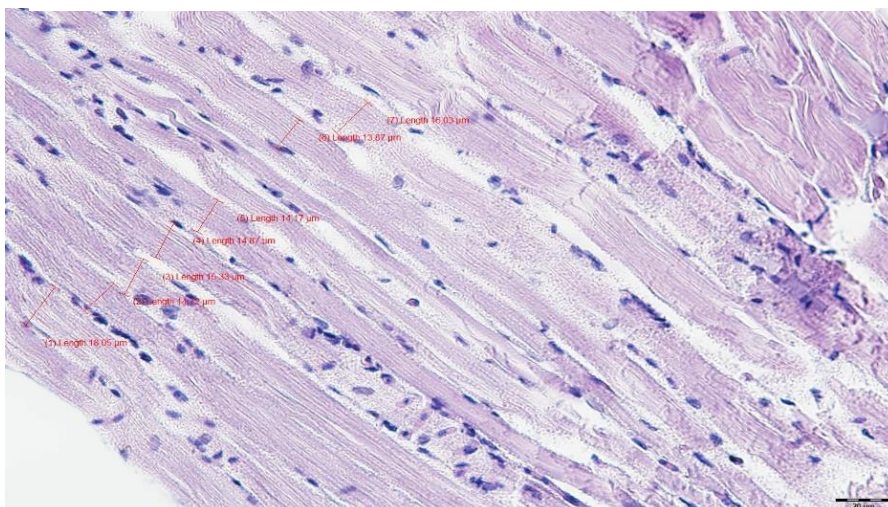
**Figura 5** Imagem ilustrativa mostrando as vilosidades e o núcleo das células do intestino de zebrafish após a exposição única e de corpo inteiro à radiação ionizante na dose de 2Gy. Núcleos celulares coloridos em verde.

Ao analisarmos os cortes histológicos das peças musculares esqueléticas, tecido menos radio sensível que o TGI, verificamos uma resposta surpreendente em relação ao diâmetro das fibras musculares no primeiro dia após a exposição ( $R1=35,5\pm 10,86\mu\text{m}$ ), com valores significativamente maiores em relação ao grupo controle ( $CTL=14\pm 4,87\mu\text{m}$ ), com as fibras musculares apresentando uma certa hipertrofia significativa (ANOVA,  $p<0,0001$ ).

Esse aumento inicial no diâmetro das fibras musculares esqueléticas não foi verificado nos outros momentos analisados, com valores próximos e não significativos em relação ao grupo controle no terceiro dia ( $R3=12,25\pm 7,93\mu\text{m}$ ), sétimo ( $R7=10,65\pm 0,57\mu\text{m}$ ) e décimo quinto dia ( $R15=15,22\pm 1,34\mu\text{m}$ ) conforme Gráfico 3 e Figura 6.



**Gráfico 3** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do diâmetro das fibras musculares esqueléticas de Zebrafish expostos a radiação ionizante na dose de 2 Gy. \* indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) e \*\* indica diferença significativa ( $p<0,0001$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.



**Figura 6** Imagem ilustrativa mostrando as fibras musculares esqueléticas de zebrafish após a exposição única e de corpo inteiro à radiação ionizante na dose de 2Gy. Barras vermelhas indicando o diâmetro das fibras em  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

A exposição à radiação ionizante de corpo inteiro com uma única dose de 2Gy promoveu alterações morfofisiológicas significativas no Trato Gastrointestinal e no Músculo Esquelético, com diminuição no comprimento das vilosidades e no número de células intestinais e aumento no diâmetro do músculo esquelético em peixes da espécie zebrafish (*Danio rerio*). Essas alterações foram observadas principalmente nos primeiros dias após a exposição e houve uma importante recuperação nos dias subsequentes.

Estes resultados são importantes para os procedimentos radioterápicos utilizados como recurso terapêutico no tratamento do câncer. Normalmente, a terapia contra a neoplasia tem a finalidade de impedir a multiplicação e provocar a morte das células malignas, evitando ao máximo qualquer efeito colateral às células ou tecidos adjacentes ao alvo, que apresentam certo grau de radiosensibilidade, tais como a pele e a mucosa intestinal (34).

Entretanto, efeitos indesejáveis precoces ou tardios estão entre os principais fatores que limitam a radioterapia principalmente nas primeiras fases da vida e, conhecer os efeitos secundários da radioterapia nos tecidos não alvos é de extrema importância.

Por outro lado, mesmo tendo conhecimento dos efeitos colaterais da radiação, poucos são os estudos que utilizam baixas doses de radiação de corpo inteiro em animais adultos e, na sua maioria, os estudos se limitam a animais na fase embrionária e exposição a altas doses de radiação de forma aguda ou crônica (35).

Os estudos de Bergonié e Tribondeau (1959) e revisados por Vogin e Foray (2013) mostram que a maior radiosensibilidade depende do estado metabólico do tecido, da diferenciação e proliferação das células, e da idade dos tecidos ou órgãos que estão sendo irradiados. Portanto, a fim de analisar os efeitos da radiação ionizante de baixa dose sobre os parâmetros morfofisiológicos, foram utilizados dois tecidos de radiosensibilidade totalmente distinta, o TGI e a musculatura esquelética. O TGI é o segundo tecido mais radiosensível do organismo, apresentando danos estruturais com doses na faixa de 10Gy, enquanto o músculo esquelético necessita de uma dose bem maior (15)(9).

Além da diferença clássica da radiosensibilidade, não podemos descartar as características intrínsecas de cada tecido, uma vez que Mothersill e Seymour (2012) mostraram que não existe dose segura de radiação ionizante e que vários fatores estão envolvidos, desde a dose, o tempo de exposição, a calibração do equipamento, além das condições fisiológicas do próprio animal, o que pode levar o surgimento de danos teciduais críticos, com alterações cromossômicas, mutações, câncer e morte celular (18).

No presente estudo, procurou-se manter todos os fatores externos controlados para todos os grupos, experimentais e controle e utilizamos como modelo experimental o zebrafish (*Danio rerio*), principalmente pela sua similaridade genômica com os humanos, compartilhando metade do tamanho do genoma

humano e cerca de 70% dos genes. Além desses animais possuem uma grande capacidade de adaptação à diversos tipos de ambientes e agentes estressores externos com uma capacidade significativa de restauração homeostática através de respostas adaptativas (21, 35).

Após exposição de corpo inteiro na dose de 2Gy, constatamos alterações significativas no Sistema Digestório, com diminuição significativa no comprimento das vilosidades e no número de células intestinais logo no primeiro dia após a exposição à radiação ionizante. Os efeitos observados nesse estudo são prodrômicos, ou seja, são respostas observadas em um curto intervalo de tempo após à exposição aguda de baixa e única dose de radiação ionizante. De acordo com Gunter-Smith (1987) os efeitos prodrômicos são reversíveis, mas se não tratados podem causar a incapacitação do indivíduo (36).

Nesse estudo, constatamos que o zebrafish apresentou capacidade de regeneração de órgãos internos por meio de mecanismos de reparação celular, uma vez que o comprimento das vilosidades e o número de células aumentaram significativamente no terceiro (3º) e no sétimo (7º) dia respectivamente após exposição.

Em humanos, pouco se sabe sobre os processos de reconstituição tecidual em comparação aos animais, segundo Kawakami (2010) os zebrafish possuem certa capacidade de substituir células danificadas, com certa variação entre os tecidos, mas com potencial para regenerar barbatanas, cauda, escamas, retina, medula espinhal, além da regeneração de órgãos internos, tais como o pâncreas e o coração (37).

Como o TGI é um órgão envolvido em diversas funções fisiológicas, a preservação da mucosa intestinal é de extrema importância para os processos digestivos, absorptivos e metabólicos, a sua integridade ou regeneração permite que os nutrientes sejam processados, absorvidos e distribuídos pelo organismo e utilizados na manutenção, reprodução e crescimento do organismo. Portanto, o desenvolvimento das vilosidades intestinais através da ação integrada dos estímulos neurais, hormonais e parácrinos promovem aumento na área de superfície intestinal, facilitando a absorção dos nutrientes disponíveis (38, 39).

De fato, a avaliação da integridade da mucosa intestinal pode ser realizada por meio da mensuração da altura e densidade das vilosidades. Existe um equilíbrio no tecido gastrointestinal entre a apoptose e renovação das células intestinais através das atividades das células regenerativas ou células tronco intestinais localizadas na base das criptas de Lieberkühn. Essas células podem permanecer na base das criptas ou se diferenciar em células especializadas, migrando ao longo das vilosidades a fim de manter o tamanho e funcionalidade do Sistema Digestório como observado em ostras, anfíbios, peixes e roedores (40-43).

Essa diferenciação não depende apenas das condições gerais do intestino e das necessidades do momento, mas dos fatores que levaram a agressão do TGI e

que más decisões ou má coordenação por parte das células tronco pode resultar em distúrbios intestinais, como doença inflamatória intestinal ou câncer (44).

De acordo com Oriá, B. (2016), a morte celular e a renovação contínua do epitélio intestinal precisam apresentar forças iguais para manter a homeostase do tecido epitelial, visto que qualquer desequilíbrio entre a produção e a morte celular pode levar ao surgimento de patologias tais como o acúmulo ou perda celular (45). A renovação constante das células intestinais tem por intuito manter a capacidade digestiva e absorptiva, contudo, quando algum agente externo (microrganismos, radiação ionizante, toxinas) faz contato com a mucosa intestinal, pode ocorrer um desequilíbrio fisiológico culminando em apoptose celular e comprometendo a renovação celular, modificando a altura, comprimento e espessura das vilosidades (46).

A diminuição aguda no comprimento das vilosidades e no número de células observada no zebrafish, pode de certa forma comprometer a capacidade absorptiva do animal, porém não verificamos tal alteração, uma vez que a mucosa intestinal mostrou uma grande capacidade de regeneração do comprimento das vilosidades no terceiro dia e um aumento significativo do número de células no sétimo dia após à exposição. Essa capacidade regenerativa da mucosa intestinal é observada em humanos e o turnover do epitélio intestinal ocorre em média com 5 dias, principalmente nos enterócitos e células caliciformes (45).

Nos tratamentos radioterápicos, a destruição de células patogênicas e células não alvo é comumente observada como efeitos secundários ou colaterais, podendo ocorrer através de mecanismos de apoptose ou necrose. Durante seus estudos Beck et al., (2004) e Becciolini et al., (1997) observaram redução acentuada no número de células caliciformes após o tratamento radioterápico, com retorno gradual no número de células ao longo do tempo (47, 48).

Por outro lado, Marta, et al., (2011) constataram em ratos que a queda inicial após irradiação de 1,5Gy, não foi acompanhada pela regeneração das células caliciformes ao longo dos 25 dias experimentais, mas ocorreu um pico de proliferação celular 4 dias após exposição (34).

O mecanismo de regeneração diário das células intestinais é um processo fisiológico que permite ao intestino desempenhar sua função digestiva e absorptiva, além de funcionar como uma barreira física que protege o organismo contra a entrada de patógenos, toxinas e substâncias carcinogênicas. (44)

Em nosso Laboratório de Fisiologia Digestória e Comportamento em Peixes, estudos previamente realizados por Giarola et. al., (2016) demonstraram que as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), expostas a altas doses de radiação ionizante (80Gy), apresentaram alterações no comportamento alimentar passados 8 dias da exposição, com um quadro de mucosite significativo que impedia a realização da deglutição do alimento. O reflexo alimentar foi mantido, mostrando a preservação do Sistema Nervoso Autônomo, uma vez que os peixes se deslocavam até a superfície dos aquários na busca do alimento, mas

não conseguiam ingerir, mostrando que o Sistema Digestório foi comprometido pela radiação (49).

Em mamíferos, Shadad et al., (2013), demonstraram que a radiação ionizante altera significativamente funções gastrointestinais como esvaziamento gástrico, causando diarreia, perda de apetite, náusea, vômito e até anorexia, e que as consequências são dependentes da dose, além de promover queimaduras, agravações neurológicas e morte (50-52).

O comprometimento do Sistema Digestório após a exposição à radiação ionizante é fato, como pôde ser observado por Otterson (1988) e Potten (1998) em intestinos de cachorros e ratos, apresentando aumento da apoptose das células intestinais já nas primeiras 3 a 6 horas após exposição (53, 54).

A ocorrência dos efeitos prodrômicos se verifica no período de 1 a 3 dias após a exposição, promovendo alterações estruturais na mucosa intestinal, e podendo comprometer o desenvolvimento e a manutenção da microflora intestinal, e causar diminuição das funções digestivas e absorptivas (42, 55).

Nesse estudo, observamos alterações significativas nas características morfofuncionais do Sistema Digestório do zebrafish nos primeiros dias após exposição, e uma grande capacidade regenerativa do Sistema Digestório em restabelecer o comprimento das vilosidades e o número de células intestinais sem comprometer os comportamentos cognitivos e alimentares durante os 15 dias.

Quanto aos efeitos da radiação sobre a musculatura esquelética, mais uma vez nos deparamos com poucos estudos envolvendo baixas doses de radiação ionizante e os estudos radiobiológicos em peixes, em sua maioria se limitavam ao uso de animais na fase embrionária, além de metodologias distintas entre os estudos.

Na maioria dos peixes o músculo esquelético constitui cerca de 60% da massa corpórea e verifica-se uma variação no diâmetro das fibras, que depende de fatores como do próprio músculo, idade, sexo, estado de nutrição, exercício físico e diversas patologias (56).

Ao longo da evolução, essa musculatura se especializou para atender novas exigências de um ambiente que lhe impõe uma certa resistência e para isso os peixes desenvolveram estruturas que favoreceram o seu deslocamento no ambiente líquido, tais como corpo alongado e hidrodinâmico, secreção de muco na superfície corporal e escamas (57, 58).

De fato, o tecido muscular esquelético é fundamental e essencial para vários processos fisiológicos dos vertebrados e especialmente para os peixes, como a produção de força e geração de movimentos que promovem o deslocamento, a sustentação e manutenção da posição, bem como nas mudanças buscas de postura (59).

Mesmo sendo um tecido pós mitótico e de baixa radiosensibilidade, são tecidos com baixa proliferação e diferenciação celular e, portanto, mais especializados e menos susceptíveis aos efeitos da radiação ionizante.

Entretanto, deve se tomar cuidado em afirmar que a musculatura esquelética não apresenta alterações morfológicas após exposição à radiação, uma vez que os estudos de Viana (2015) mostram que a estrutura celular das proteínas contráteis dos músculos esqueléticos são afetadas pela radiação, principalmente durante a exposição a altas doses (60, 61).

Quanto aos efeitos observados da radiação em crianças e adolescentes, maior cuidado e atenção tem sido empregado, uma vez que os procedimentos radioterápicos vêm crescendo nesta faixa etária principalmente nos tratamentos de leucemias, linfomas e tumores do Sistema Nervoso Central, sendo observadas sequelas tardias na musculatura esquelética (62).

Como o organismo dos indivíduos nessa faixa etária estão em pleno desenvolvimento, os tecidos são mais radiosensíveis que em indivíduos adultos. O organismo mais jovem mantém tecidos com alto grau de plasticidade fenotípica, sendo observadas alterações fisiológicas ou morfológicas de acordo com as condições ambientais, e o surgimento de distúrbios morfofisiológicos como efeitos colaterais tardios sobre a musculatura esquelética tem sido observado (62, 63).

No presente estudo, verificou-se que o zebrafish adulto exposto à radiação ionizante na dose única de 2Gy apresenta diminuição significativa no diâmetro das fibras musculares esqueléticas no primeiro dia após a exposição, apresentando aumento significativo no diâmetro muscular em relação ao controle nos dias subsequentes, mostrando que a musculatura esquelética do zebrafish é extremamente capaz de restaurar a lesão inicialmente observada.

Se de fato o músculo esquelético é resistente a radiação, quais os mecanismos que estariam envolvidos nessa alteração da morfologia muscular logo após a exposição à radiação. Algumas suposições podem ser levantadas, tais como comprometimento dos vasos sanguíneos, afetando o suprimento energético para a musculatura, infecção secundária com a liberação de mediadores inflamatórios, lesão primária das fibras musculares, apoptose, alteração no metabolismo proteico, fibrose muscular e a participação ou não de células satélites na regeneração.

Embora os estudos comprovem que a radiação ionizante promove efeitos deletérios sobre a morfologia e o funcionamento do músculo esquelético, poucos são as investigações e na sua maioria com resultados contraditórios e metodologias diferentes, o que dificulta a interpretação e comparação dos dados (60).

De fato, Olive et al., (1995) demonstram que a radiação gama induz a morte celular no músculo com características morfológicas de apoptose. Por outro lado, Viana et al., (2015), identificaram que a musculatura esquelética possui capacidade regenerativa induzida pela exposição à radiação e que as células

satélites estariam diretamente envolvidas nas respostas de caráter regenerador e nos processos de hipertrofia e hiperplasia no músculo esquelético adulto. Essas células, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática estão quiescentes e são estimuladas a se diferenciar através dos fatores de crescimento liberados por leucócitos e pelas próprias fibras musculares lesadas (60, 64).

Segundo Bischoff, (1994) e Husmann (1996), a maior ou menor capacidade das células satélites em participar da regeneração celular dependem da dose aplicada e do estágio de desenvolvimento do animal (65, 66).

No entanto, a maioria dos estudos envolvendo musculatura esquelética e células satélites têm mostrado que a irradiação prejudica a proliferação de células satélites, impactando negativamente no processo de regeneração celular e, portanto, na hipertrofia muscular (67, 68).

Já na década de 90, estudos envolvendo ratos recém-nascidos e expostos a dose de 2Gy de radiação, apresentaram morte celular, principalmente das células satélites, indicando que o tecido muscular esquelético é radiossensível quando em fase de desenvolvimento (69).

Quando analisados os efeitos da radiação em doses terapêuticas sobre a musculatura esquelética de humanos, constata-se uma alta radio resistência morfológica, no entanto, é possível observar necrose tardia do músculo causada principalmente por danos aos capilares sanguíneos e ao tecido conjuntivo (70).

Por sua vez, Jurdana (2008) acrescenta que a radiação afeta as células satélites musculares, prejudicando sua ativação, proliferação e diferenciação, além de apresentar sérias repercussões funcionais como interferência na permeabilidade da membrana, comprometendo a excitabilidade e contratilidade da musculatura (71).

Acredita-se que a radiação impeça a mitose das células satélites ao causar quebras nos filamentos do DNA da célula. Se ocorrer uma quebra apenas em uma única fita, o dano pode ser reparado, porém se o dano ocorrer no mesmo ponto em ambas as fitas, a deleção pode ser irreparável, o que pode levar à falha mitótica e morte celular (72).

Outra possibilidade destacada por Jurdana (2008) é que baixas doses de radiação podem desativar as células satélites mitoticamente ativas, mas não os mionúcleos pós mitóticos prevenindo a hipertrofia compensatória (71, 73).

Caiozzo et al., (2010), observaram redução de 50% a 70% no número de células satélites em ratas expostas à radiação gama em doses de 2Gy e 5Gy respectivamente, além de promover elevação do estresse oxidativo. Os autores observaram redução significativa nos níveis de óxido nítrico (NO) nas células satélites, prejudicando a proliferação "*in vitro*" da musculatura esquelética (74).

Mais tarde, Jurdana et al., (2013), constataram que os mioblastos da musculatura esquelética de humanos são sensíveis à radiação, no que diz respeito a capacidade de proliferação e diferenciação. Sugerindo a possibilidade

de atrofia muscular induzida por altas doses de radiação e que uma miopatia pós-radiação pode levar a incapacidade regenerativa do músculo (75).

No presente estudo, não foram realizadas quaisquer análises sobre a participação das células satélites no processo hipertrófico da musculatura esquelética do zebrafish observado logo após a radiação, bem como dos outros fatores listados anteriormente. Que também podem estar envolvidos.

Nesse estudo, utilizamos uma dose baixa de radiação ionizante de corpo inteiro de 2Gy que pode ter promovido micro lesões no tecido muscular e, como resposta compensatória, as células satélites podem ter sido estimuladas a se proliferarem mitoticamente com a finalidade de reparar as fibras lesadas pela radiação ionizante, levando a musculatura a uma hipertrofia inicial e posteriormente retornaram aos valores basais a partir do 3º dia.

Vierck et al., (2000) mostram que após o micro trauma muscular induzido pela radiação, tem início uma resposta imune, resultante do influxo de macrófagos na região danificada 48 horas após a lesão aguda, e que na presença de uma resposta aumentada de macrófagos, há um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites (76).

Johnston et al., (2011) destacam que os peixes possuem alta capacidade de regeneração pós-natal em comparação aos humanos e que uma população de células precursoras miogênicas que dão origem aos mioblastos indiferenciados ou células satélites são as responsáveis pela regeneração celular (56, 77).

De acordo com Hall e Giaccia (2006), os efeitos da radiação no tecido muscular são divididos em efeitos precoces e tardios, que mostram padrões de resposta diferentes e uma relação dose-resposta. Sendo que os danos agudos são rapidamente reparados devido à rápida proliferação de células-tronco e podem ser completamente reversíveis (15).

Estudos envolvendo partes de músculo tratados com baixas doses de radiação e posteriormente implantados na musculatura de origem, apresentaram capacidade regenerativa com a proliferação e diferenciação de células satélites em mioblastos que se fundiram para a formação de miotubos e miofibrilas (78, 79).

Wernig et al., (2000), constataram aumento na capacidade dos mioblastos transplantados, promovendo a proliferação de numerosas fibras de pequeno diâmetro ao utilizarem células cultivadas e posteriormente implantadas no músculo sóleo de ratos previamente irradiados com 16Gy (80).

Nos peixes, o crescimento muscular ocorre mediante a proliferação e a diferenciação dos mioblastos. Quando ativados, os mioblastos proliferam, diferenciam-se e os núcleos são internalizados às fibras musculares pré-existentes, aumentando o número de núcleos e o diâmetro das fibras, processo esse denominado de hipertrofia (56, 81-84).

Por outro lado, quando os mioblastos em proliferação se agregam à superfície de fibras musculares pré-existentes com a formação de novos miotubos e novas fibras musculares, verificamos o processo de hiperplasia (77, 85).

Acredita-se que a estratégia de renovação celular por parte dos peixes dependa do tipo de tecido ou até mesmo da extensão da lesão. A radiação ionizante é um dos fatores que promovem alterações homeostáticas no organismo, porém baixas doses de radiação podem levar a pequenas “feridas” ou micro lesões que são reparadas por células circundantes e células fibroblásticas. Em caso de perda de grande parte do tecido, há necessidade do envolvimento de vários processos, como a proliferação celular e a produção de novas células, a fim de reconstituir o tecido danificado através da formação ou ativação de células tronco, resultando na completa regeneração tecidual.

Através desse estudo, foi possível constatar que baixas doses de radiação ionizante promovem alterações morfofisiológicas no Sistema Digestório bem como na Musculatura Esquelética e que ambos têm capacidade regenerativa. No entanto, os mecanismos envolvidos permanecem obscuros, ressaltando a necessidade de maior atenção e pesquisa envolvendo diferentes dosagens de radiação ionizante e outros métodos de análise a fim de esclarecer as lacunas envolvendo os efeitos da radiação e regeneração celular.

## REFERÊNCIAS

1. Charles M. UNSCEAR Report 2000: sources and effects of ionizing radiation. *Journal of Radiological Protection*. 2001;21(1):83.
2. Okuno E, Yoshimura EM. Física das radiações: Oficina de Textos; 2016.
3. Jarvis R, Knowles J. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate  $\gamma$ -radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003;541(1-2):63-9.
4. Ryan JL. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(3):985-93.
5. Pino ES, Giovedi C. Radiação ionizante e suas aplicações na indústria. *UNILUS Ensino e Pesquisa*. 2013;2(2):47-52.
6. Borin FHR. Efeitos da radiação gama sobre comportamento alimentar, hematócrito, glicemia e perfil eletroforético plasmático em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)(Linnaeus, 1759): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2015.
7. CNEN. NN 3.01, Resolução 164/14, Março/2014. Diretrizes básicas de proteção radiológica Norma.3.
8. Okuno E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *Estudos avançados*. 2013;27(77):185-200.
9. Vogin G, Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. *International journal of radiation biology*. 2013;89(1):2-8.
10. Tauhata L, Salati P, Di Prinzio R, Di Prinzio AR. Radioproteção e dosimetria: fundamentos: CBPF; 2003.

11. Okuno E. Radiação: efeitos, riscos e benefícios: Oficina de Textos; 2018.
12. Arena V. Ionizing radiation and life: An introduction to radiation biology and biological radiotracer methods: Mosby St. Louis; 1971.
13. Twardella D, Chang-Claude J. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view—overview of methods and results. *Radiotherapy and oncology*. 2002;62(3):249-60.
14. de Souza Silva EC, Cavalcanti MB, Carneiro PFP. Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO*. 2014;1(3):111-7.
15. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*: Philadelphia; 2006.
16. Jeggo P, Lavin MF. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *International journal of radiation biology*. 2009;85(12):1061-81.
17. Rhee JS, Kim BM, Kang CM, Lee YM, Lee JS. Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* embryo. *Environmental toxicology and chemistry*. 2012;31(8):1745-53.
18. Mothersill CE, Seymour CB. Implications for human and environmental health of low doses of radiation. *Radiobiology and Environmental Security*: Springer; 2012. p. 43-51.
19. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005;20:28-34.
20. Lemos J, Neuparth T, Trigo M, Costa P, Vieira D, Cunha L, et al. Single low-dose ionizing radiation induces genotoxicity in adult zebrafish and its non-irradiated progeny. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2017;98(2):190-5.
21. Silveira TRd, Schneider AC, Hammes TO. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*. 2012;64(2):4-5.
22. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503.
23. Feitsma H, Cuppen E. Zebrafish as a cancer model. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(5):685-94.
24. Bassett D, Currie PD. Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2004;31(8):537-40.
25. Bilotta J, Saszik S. The zebrafish as a model visual system. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2001;19(7):621-9.
26. Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL. The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011;35(6):1432-51.
27. Bone Q, Hoar W, Randall D. Locomotor muscle. *Fish physiology*. 1978;7:361-424.
28. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic pathology*. 2011;39(5):759-75.
29. Wieser W, Schiemer F, Goldschmidt A, Kotrschal K. *Environmental biology of European cyprinids: Papers from the workshop on 'The Environmental Biology of Cyprinids' held at the University of Salzburg, Austria, in September 1989*: Springer Science & Business Media; 2012.

30. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of development*. 2005;122(2):157-73.
31. Field H, Kelley K, Martell L, Goldstein A, Serluca F. Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish. *Neurogastroenterology & Motility*. 2009;21(3):304-12.
32. Zhao X, Pack M. Modeling intestinal disorders using zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 2017;138:241-70.
33. Gupta T, Mullins MC. Dissection of organs from the adult zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010(37):e1717.
34. Marta GN, Hanna SA, Silva JLFd, Carvalho HdA. Câncer de cabeça e pescoço e radioterapia: breve contextualização. *Diagn Tratamento [Internet]*. 2011;16(3):134-6.
35. Neto AS, Mariano WS, Sória SF. *Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal*. São Carlos: Pedro & João Editores 2009.
36. Gunter-Smith PJ. Effect of ionizing radiation on gastrointestinal physiology. *Military radiobiology*. 1987:135-52.
37. Kawakami A. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Development, growth & differentiation*. 2010;52(1):77-87.
38. Caballero M, Izquierdo M, Kjørsvik E, Montero D, Socorro J, Fernández A, et al. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*. 2003;225(1-4):325-40.
39. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American journal of clinical nutrition*. 1992;55(1):299S-308S.
40. Mammen JM, Matthews JB. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Critical care medicine*. 2003;31(8):S532-S7.
41. Mix MC, Sparks AK. Repair of digestive tubule tissue of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, damaged by ionizing radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1971;17(2):172-7.
42. Somosy Z, Horvath G, Telbisz A, Rez G, Palfia Z. Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron*. 2002;33(2):167-78.
43. Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*. 2009;324(5935):1666-9.
44. Niec RE, Chu T, Gur-Cohen S, Schernthanner M, Hidalgo L, Pasolli HA, et al. A lymphatic-stem cell interactome regulates intestinal stem cell activity. *bioRxiv*. 2022:2022.01. 29.478341.
45. Oriá RB, Brito GdC. *Sistema digestório: integração básico-clínica*. São Paulo: Blucher. 2016.
46. Pelicano ERL, Souza P, Souza H, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, et al. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2003;98(547):125-34.
47. Beck P, Wong J, Li Y, Swaminathan S, Xavier R, Devaney K, et al. Chemotherapy-and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology*. 2004;126(3):796-808.
48. Becciolini A, Balzi M, Fabbrica D, Potten C. The effects of irradiation at different times of the day on rat intestinal goblet cells. *Cell proliferation*. 1997;30(3-4):161-70.
49. Giarola RS, Borin FH, Hormaza JM, Fernandes MA, Ramos PR, Delicio HC, editors. *Feed variation and biometrical factors in tilapias (Oreochromis*

niloticus) exposed to  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation. AIP Conference Proceedings; 2016: AIP Publishing LLC.

50. Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2013;19(2):199.

51. Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ. Gastrointestinal radiation injury: symptoms, risk factors and mechanisms. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2013;19(2):185.

52. Anno GH, Baum SJ, Withers HR, Young RW. Symptomatology of acute radiation effects in humans after exposure to doses of 0.5-30 Gy. *Health physics*. 1989;56(6):821-38.

53. Otterson MF, Sarna SK, Moulder JE. Effects of fractionated doses of ionizing radiation on small intestinal motor activity. *Gastroenterology*. 1988;95(5):1249-57.

54. Potten CS, Grant H. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *British journal of cancer*. 1998;78(8):993-1003.

55. Visek W. The mode of growth promotion by antibiotics. *Journal of Animal Science*. 1978;46(5):1447-69.

56. Johnston IA. Genetic and environmental determinants of muscle growth patterns. *Fish physiology*. 18: Elsevier; 2001. p. 141-86.

57. Duran BODS. Cultura celular de mioblastos de peixes como um modelo para entender a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular. 2019.

58. Carani FR, Duran BODS, Paula TGD, Piedade WP, Dal-Pai-Silva M. Morfologia e expressão de genes relacionados ao crescimento do músculo esquelético em juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*, *Arapaimatidae*, *Teleostei*). *Acta Scientiarum Animal Sciences*. 2013;35:219-26.

59. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 12. KOOGAN, Guanabara. 2013;568.

60. Viana W, Lambertz D, Borges E, Melo J, Lambertz K, Amaral A. Late effects of radiation on skeletal muscle: an open field of research. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2015;8(08):555.

61. MELO WVdC. Efeitos da irradiação de corpo inteiro sobre as proteínas contráteis do músculo esquelético de ratos precocemente desnutridos. 2016.

62. Meadows A, Gallagher J, Bunin G. Late effects of early childhood cancer therapy. *The British Journal of cancer Supplement*. 1992;18:S92.

63. Flann KL, LaStayo PC, McClain DA, Hazel M, Lindstedt SL. Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? *Journal of Experimental Biology*. 2011;214(4):674-9.

64. Olivé M, Blanco R, Rivera R, Cinos C, Ferrer I. Cell death induced by gamma irradiation of developing skeletal muscle. *J Anat*. 1995;187 ( Pt 1)(Pt 1):127-32.

65. Bischoff R, Heintz C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Developmental dynamics*. 1994;201(1):41-54.

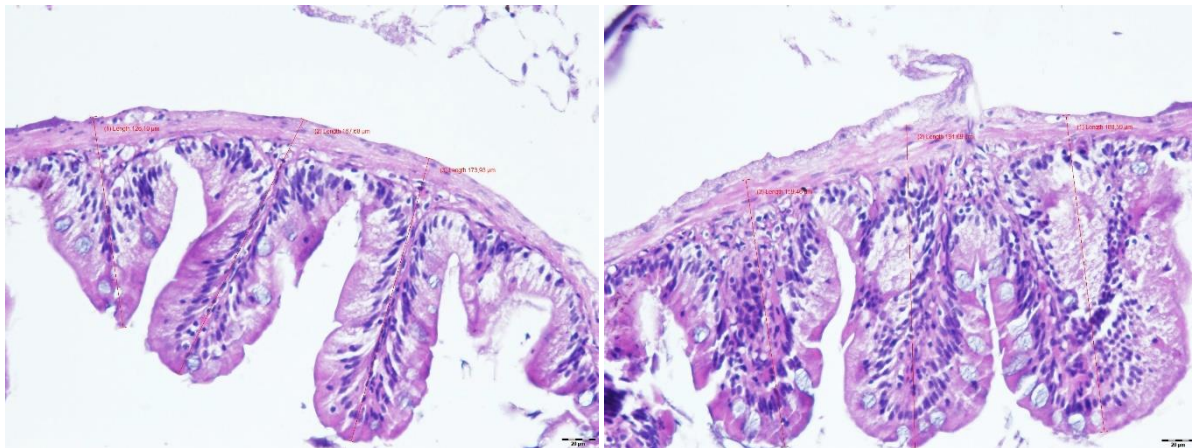
66. Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*. 1996;7(3):249-58.

67. Phelan JN, Gonyea WJ. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *The Anatomical*

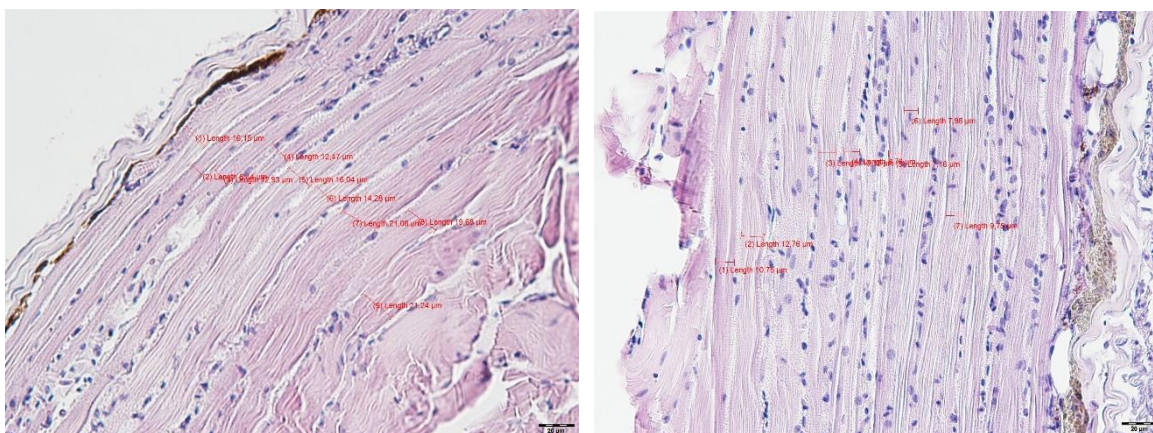
- Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists. 1997;247(2):179-88.
68. Rosenblatt JD, Parry DJ. Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *Journal of Applied Physiology*. 1992;73(6):2538-43.
  69. Bandstra ER, Thompson RW, Nelson GA, Willey JS, Judex S, Cairns MA, et al. Musculoskeletal changes in mice from 20–50 cGy of simulated galactic cosmic rays. *Radiation research*. 2009;172(1):21-9.
  70. Zeman W, Solomon M. EFFECTS OF RADIATION ON STRIATED MUSCLE. Indiana Univ., Indianapolis; 1971.
  71. Jurdana M. Radiation effects on skeletal muscle. *Radiology and Oncology*. 2008;42(1).
  72. Denekamp J, Rojas A. Cell kinetics and radiation pathology. *Experientia*. 1989;45:33-41.
  73. Moss F, Leblond C. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *The Anatomical Record*. 1971;170(4):421-35.
  74. Caiozzo VJ, Giedzinski E, Baker M, Suarez T, Izadi A, Lan M, et al. The radiosensitivity of satellite cells: cell cycle regulation, apoptosis and oxidative stress. *Radiation research*. 2010;174(5):582-9.
  75. Jurdana M, Cemazar M, Pegan K, Mars T. Effect of ionizing radiation on human skeletal muscle precursor cells. *Radiology and oncology*. 2013;47(4):376.
  76. Vierck J, O'Reilly B, Hossner K, Antonio J, Byrne K, Bucci L, et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell biology international*. 2000;24(5):263-72.
  77. Koumans J, Akster H, Dulos G, Osse J. Myosatellite cells of *Cyprinus carpio* (Teleostei) in vitro: isolation, recognition and differentiation. *Cell and Tissue Research*. 1990;261:173-81.
  78. Gulati AK. The effect of X-irradiation on skeletal muscle regeneration in the adult rat. *Journal of the neurological sciences*. 1987;78(1):111-20.
  79. Popova M, Il'yasova SG. Effect of a helium—Neon laser beam on regeneration of irradiated transplanted skeletal muscle. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1978;86:909-12.
  80. Wernig A, Zweyer M, Irintchev A. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *The Journal of Physiology*. 2000;522(2):333-45.
  81. Alfei L, Onali A, Spano L, Colombari P, Altavista P, De Vita R. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). *European journal of histochemistry: EJH*. 1994;38(2):151-62.
  82. Johnston IA. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*. 1999;177(1-4):99-115.
  83. Koumans J, Akster H. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1995;110(1):3-20.
  84. Rowlerson A, Veggetti A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Muscle development and growth: Academic Press*; 2001. p. 103-40.
  85. Veggetti A, Mascarello F, Scapolo P, Rowlerson A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.) An ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and embryology*. 1990;182:1-10.

## ANEXO 1 BANCO DE ILUSTRAÇÕES

### Grupo Controle

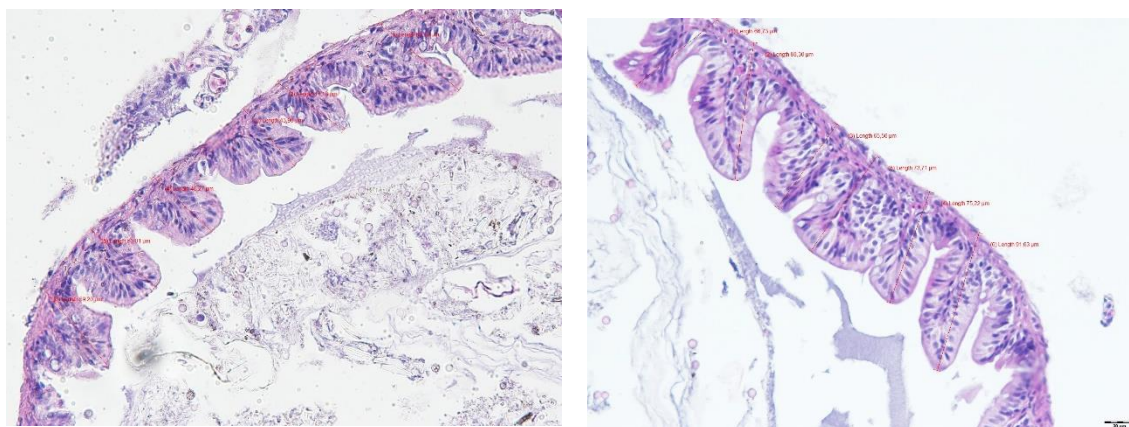


Vilosidades intestinais do grupo controle, barras vermelhas indicam o comprimento das vilosidades

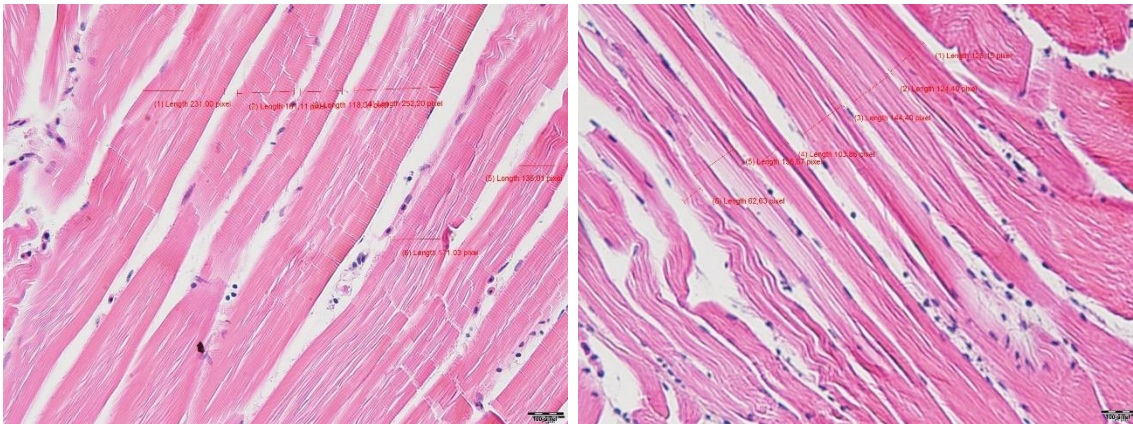


Fibras musculares esqueléticas do grupo controle, barras vermelhas indicam o diâmetro das fibras.

### Grupo R1

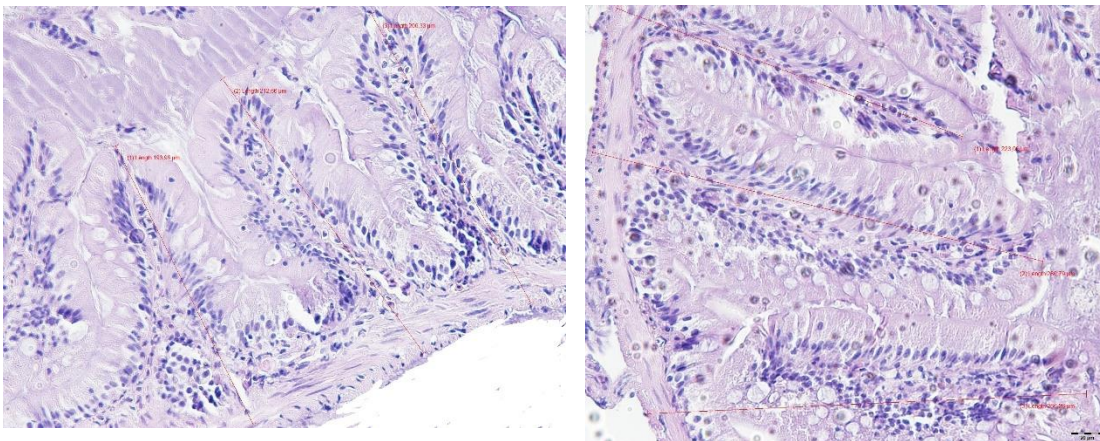


Vilosidades intestinais do grupo R1, barras vermelhas indicam o comprimento das vilosidades

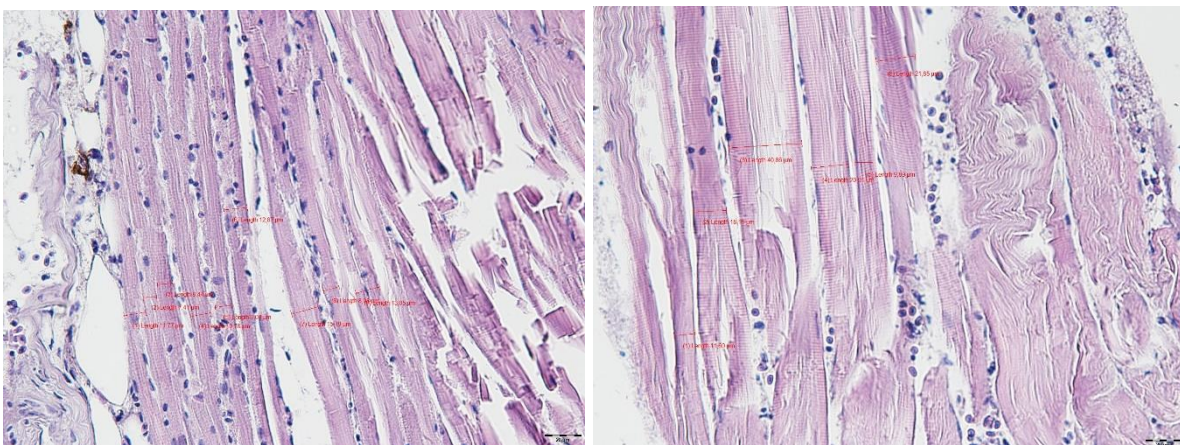


Fibras musculares esqueléticas do grupo R1, barras vermelhas indicam o diâmetro das fibras.

### Grupo R3

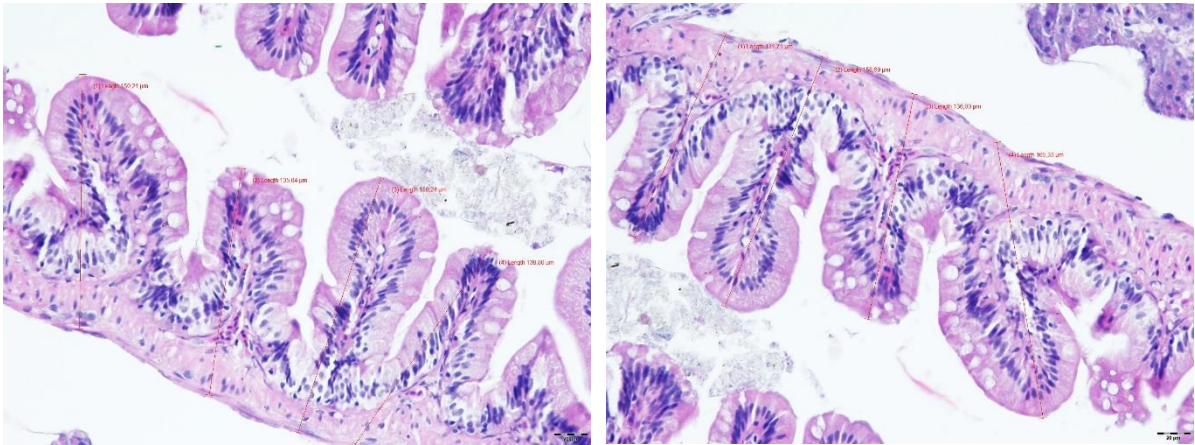


Vilosidades intestinais do grupo R3, barras vermelhas indicam o comprimento das vilosidades

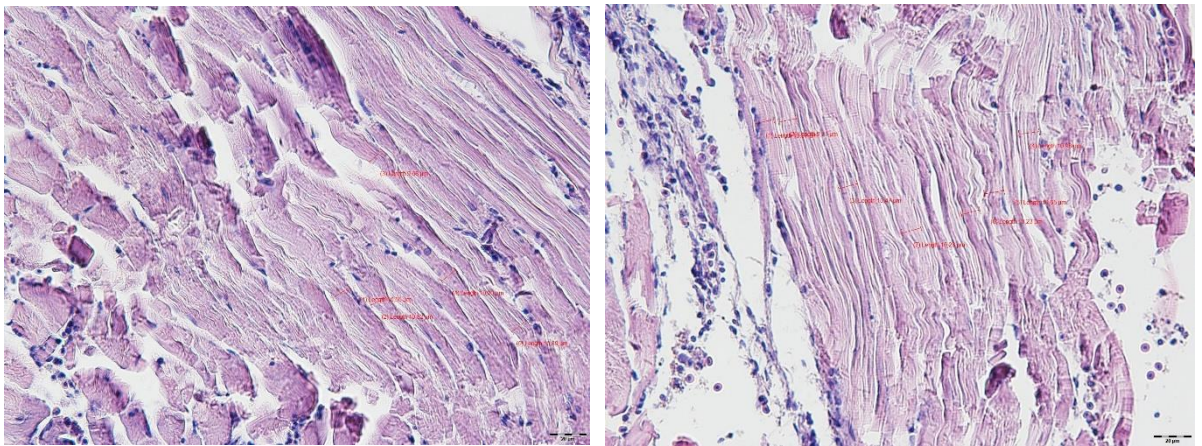


Fibras musculares esqueléticas do grupo R3, barras vermelhas indicam o diâmetro das fibras.

## Grupo R7

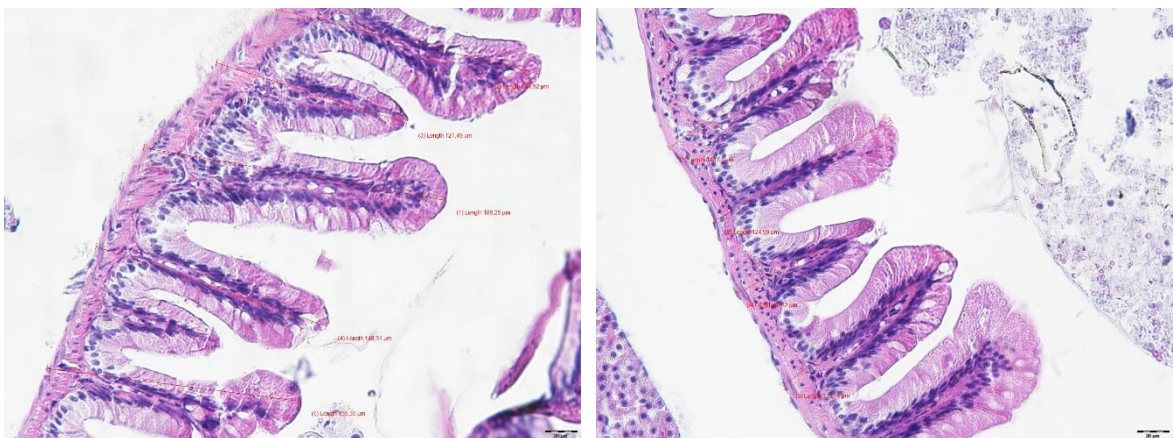


Vilosidades intestinais do grupo R7, barras vermelhas indicam o comprimento das vilosidades.

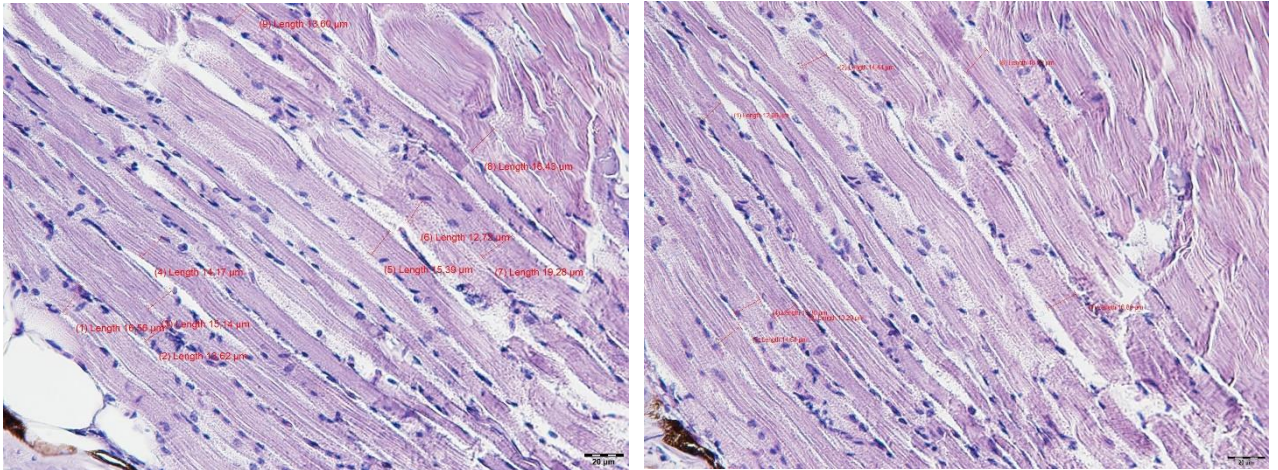


Fibras musculares esqueléticas do grupo R7, barras vermelhas indicam o diâmetro das fibras.

## Grupo R15



Vilosidades intestinais do grupo R15, barras vermelhas indicam o comprimento das vilosidades.



Fibras musculares esqueléticas do grupo R15, barras vermelhas indicam o diâmetro das fibras.