

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, MARCADOR DE
DIGESTIBILIDADE, POR MEIO DA FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES
NUCLEARES EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus* L.)**

JOSÉ LUIZ SANTOS PARIZI



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, MARCADOR DE
DIGESTIBILIDADE, POR MEIO DA FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES
NUCLEARES EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus* L.)**

JOSÉ LUIZ SANTOS PARIZI

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

639.3
P232a

Parizi, José Luiz Santos.

Avaliação do potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, marcador de digestibilidade, por meio da frequência de anormalidades nucleares em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*) / José Luiz Santos Parizi. – Presidente Prudente, 2012.

61 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. Micronúcleo. 2. Peixe. 3. Radiação. 4. Crômio. I. Título.

JOSÉ LUIZ SANTOS PARIZI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO $^{51}\text{CR}_2\text{O}_3$, MARCADOR DE DIGESTIBILIDADE, POR MEIO DA FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES NUCLEARES EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus* L.)

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 17 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Junior
Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos João, Ana Carolina e Natália, que sempre ao meu lado, me motivaram a mais um passo em minha vida. E que a nossa convivência serena e pacífica se perpetue em nossos corações e mentes.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio sempre constante em minha formação profissional e por estar presente em cada conquista alcançada.

À minha mãe que em cima dos seus oitenta e quatro anos me ensina a viver um dia de cada vez.

Ao meu pai, que na eternidade acompanha os meus passos.

À tia Marilís, que com seus oitenta anos revisou todo este trabalho, mostrando que com vontade e sabedoria o tempo não é o senhor da razão.

Aos meus filhos e esposa, que entenderam o quanto foi importante para mim este desafio.

À Universidade do Oeste Paulista e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por dois anos fecundos.

Ao Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, que como orientador apostou no desenvolvimento desta pesquisa e confiou em meu trabalho.

À Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai, pela generosidade em me acompanhar nesta caminhada, com suas intervenções precisas e fundamentais. E mais, a leveza que imprimiu em nossos encontros, que como sempre me permite pensar além.

Às funcionárias Vanderléia, Maria, Cris e Simone... que me acompanham de muito tempo.

Obrigado.

“As convicções são as inimigas mais poderosas da verdade”.

Friedrich Nietzsche

“Quem é radicalmente professor, leva todas as coisas a sério apenas em relação aos seus alunos - inclusive a si próprio”.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Avaliação do potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, marcador de digestibilidade, por meio da frequência de anormalidades nucleares em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

Tilápia é a denominação comum de um grande número de espécies de peixes ciclídeos. Dentro da aquicultura, este é um dos peixes mais rentáveis, pois apresenta conversão alimentar menor que os demais peixes. O óxido de cromo tem sido usado como marcador de digestibilidade por ser inerte e não alterar o processo biológico de absorção alimentar. O uso da forma radioativa do cromo como marcador de digestibilidade economiza tempo e trabalho. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, utilizado como marcador biológico em estudos de nutrição e fisiologia, por meio da frequência de anormalidades nucleares. Foram utilizadas 40 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) adultas, machos (01 animal/aquário), em um delineamento experimental casualizado. O período experimental foi de 21 dias, sendo 14 dias para adaptação às instalações e recebendo ração encapsulada, isenta do marcador, com 30% de proteína bruta (PB) e 2.800 $\text{Kg}^{-1}\text{Kcal}$ de energia digestível (ED)/kg de ração. Após este período, foram fornecidas diariamente duas cápsulas contendo óxido de cromo, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ (forma radioativa) (grupo experimental) e cápsulas contendo a ração sem o marcador até a saciedade. Foram avaliados sete tempos amostrais. O marcador não foi absorvido significativamente pelo trato digestório, porém o teste do micronúcleo e a frequência de anormalidades nucleares demonstraram que houve efeito genotóxico significativo sobre os eritrócitos de juvenis de tilápias do Nilo, expostos à concentração de 66 $\mu\text{Ci.g}^{-1}$ de ^{51}Cr , na forma de óxido de cromo, para os sete tempos amostrais.

Palavras-chave: Micronúcleo. Peixe. Radiação. Cromo.

ABSTRACT

The evaluation of genotoxic potential of $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, a digestibility marker, by the frequency of nuclear abnormalities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

Tilapia is the common name of a large number of species of cichlid fish. In aquaculture, this is one of the most profitable fish, since it presents lower feed conversion than other fish. The chromium oxide has been used as a marker for digestibility because it is inert and not alter the biological process of dietary intake. The use of radioactive form of chromium as a marker of digestibility saves time and labor. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, used as a biological marker in studies of nutrition and physiology, through the frequency of nuclear abnormalities. We used 40 adult, male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) (01 animal / tank) in a randomized design. The experimental period lasted 21 days, with 14 days to adapt to the installations and receiving encapsulated feed, free of the marker, with 30% crude protein (CP) and 2,800 $\text{Kg}^{-1}\text{Kcal}$ of digestible energy (DE)/kg. After this period, two capsules containing chromium oxide, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ (radioactive form), were provided daily (experimental group) and to satiety were administered capsules containing the diet without the marker. We evaluated seven times sampling. The marker was not significantly absorbed by the digestive tract, but the micronucleus test and the frequency of nuclear abnormalities demonstrated that there was significant genotoxic effect on the erythrocytes of juvenile Nile tilapia, exposed to concentrations of $66\mu\text{Ci.g}^{-1}$ of ^{51}Cr in the form of chromium oxide, for the seven sampling times.

Key words: Micronucleus. Fish. Radiation. Chromium.

LISTA DE SIGLAS

°C	- Graus centígrados
μCi	- Unidade de medida nuclear usada para designar a desintegração atômica por segundo $1\mu\text{Ci} = 3.7 \times 10^4$ desintegração por segundo.
μg.Kg	- Micro grama por quilo.
μg.L	- Micro grama por litro.
⁵¹ Cr	- Forma radioativa do crômio
⁵¹ CR ₂ O ₃	- Óxido de crômio radioativo
AQ	- Água do aquário
cpm.g ⁻¹	- Medida de radioatividade - contagens por minuto por grama
cpm.mL ⁻¹	- Medida de radioatividade - contagens por minuto por mililitro
Cr	- Crômio
Cr ₂ O ₃	- Óxido de crômio
CTD	- Conteúdo do trato digestório
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ED	- Energia digestível
g	- Grama
Kg	- Quilograma
Kg ⁻¹ Kcal	- Quilograma por quilocaloria
mg.g ⁻¹	- Miligrama por grama
mL.L ⁻¹	- Mililitro por litro
MN	- Micronúcleos
PB	- Proteína Bruta
TH	- Tecido hepático
TR	- Tecido renal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> L.)	11
1.2 Marcadores de Digestibilidade	12
1.3 Crômio.....	12
1.4 Crômio Como Marcador de Digestibilidade	15
1.5 Mutagênese Ambiental.....	18
1.6 Testes de Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	20
1.7 Teste do Micronúcleo	22
1.8 Anormalidades Nucleares	24
2 OBJETIVO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
4 ARTIGO.....	33
ANEXO A – Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).	48
ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a Qual o Artigo Será Submetido.....	49

1 INTRODUÇÃO

A falta de controle da densidade de peixes, o que é fundamental para uma adequada exploração e expansão da aquicultura, afetam de forma ampla a produção de peixes (GOMES; SCHLINDWEIN, 2000). Uma densidade de estocagem ótima é “representada pela maior quantidade de peixes produzida eficientemente por unidade de área ou volume de um tanque” (GOMES; SCHLINDWEIN, 2000, p.3).

Gomes e Schlindwein (2000, p.3), uma “produção eficiente não significa necessariamente o peso máximo que pode ser produzido, mas sim o peso que pode ser atingido com uma baixa conversão alimentar, num período razoavelmente curto e com um peso final aceito pelo mercado consumidor”.

Altas densidades de estocagem determinam maiores produções e, assim maior retorno sobre os investimentos em estruturas e equipamentos. A determinação da densidade de estocagem ótima para uma espécie e/ou sistema de cultivo pode ser um fator crítico no sistema de produção (MERENGONI, 2006).

1.1 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

As tilápias pertencentes à ordem Perciformes, família *Cichlidae*, são originárias do continente africano e são encontradas principalmente nas bacias dos rios Nilo, Níger, Tchade e nos lagos do centro-oeste. Foi introduzida em mais de 100 países das regiões tropicais e subtropicais, para melhorar a produtividade pesqueira e auxiliar o desenvolvimento da aquicultura (GODOY, 2006; MERENGONI, 2006).

A *Tilapia rendalli* (tilápia do Congo) foi a primeira espécie de tilápia introduzida no Brasil, no Estado de São Paulo, em 1953. A *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e *O. urolepis hornorum* (tilápia de Zanzibar) foram introduzidas na região Nordeste, em 1971 (LOVSHIN, 2000).

Atualmente, no Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada, perfazendo 40% do volume da aquicultura nacional. Isto ocorre, pois a tilápia do Nilo apresenta boa aceitação e elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e por isso custo de produção relativamente baixo (MERENGONI, 2006).

Além disso, o fato da tilápia do Nilo apresentar hábito alimentar onívoro, utilizando satisfatoriamente altos teores de proteína vegetal, desperta um grande interesse dos países desenvolvidos onde predominam o cultivo de espécies carnívoras que são muito dependentes da farinha de pescado. Adapta-se facilmente a práticas de manejo alimentar e tolera altas densidades de estocagem em sistemas intensivos de criação (MERENGONI, 2006).

Entender os efeitos da alimentação sobre a tilápia e a sua fisiologia digestiva tem como principal objetivo, melhorar o rendimento aquícola, especialmente nos países em desenvolvimento (GODOY, 2006).

1.2 Marcadores de Digestibilidade

Marcador é uma substância presente no alimento (marcador interno) ou adicionada a ele (marcador externo), cuja análise de sua concentração no alimento ou nas fezes permite calcular os coeficientes de digestibilidade de um nutriente e/ou dieta (OETTING, 2002).

Os marcadores externos podem ser ministrados à ração ou por via oral aos animais. Para que um elemento possa ser usado como marcador, ele deve obedecer as seguintes especificações: ser indigerível e inassimilável pelo organismo, não possuir ação farmacodinâmica para o trato digestório, misturar-se uniformemente com a digesta e ser facilmente avaliado analiticamente (OETTING, 2002).

Os coeficientes de digestibilidade são determinados através da relação entre a porcentagem de marcador encontrada na dieta e nas fezes (OETTING, 2002).

Um indicativo de confiabilidade de um marcador é sua porcentagem de recuperação nas fezes (OETTING, 2002).

1.3 Crômio

O cromo ou crômio (do grego "chrôma", cor) é um elemento químico símbolo Cr, número atômico 24 (24 prótons e 24 elétrons) e massa atômica 52 u, sólido em temperatura ambiente (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999). Foi descoberto

em 1797 por Louis Nicolas Vauquelin no mineral crocoíta encontrado na Rússia (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

É um metal encontrado no grupo 6 (6B) da Classificação Periódica dos Elementos, empregado especialmente em metalurgia em processos denominados eletrodeposição. Alguns de seus óxidos e cromatos são usados como corantes (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

O cromo, um metal encontrado na natureza, naturalmente em baixas concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$ ou $\mu\text{g.kg}^{-1}$) no ar, água, solo e essencialmente em materiais biológicos (SASSON, 1966), na forma de óxido 0, +2, +3 e +6 sendo a forma trivalente a mais estável e encontrada em maior quantidade na natureza e está envolvido no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas (MERTZ, 1992). Considerado elemento essencial participa como fator de tolerância à glicose (GTF) como forma biologicamente ativa do cromo em uma molécula orgânica composta por ácido nicotínico, glicina, ácido glutâmico, cisteína, cálcio e cromo (MERTZ, 1993).

Geralmente, não se considera que o cromo metálico e os compostos de cromo III sejam, especialmente, um risco para a saúde. Trata-se de um elemento essencial para o ser humano, porém em altas concentrações é tóxico (ANDERSON, 1986).

Os compostos de cromo VI são tóxicos quando ingeridos, sendo a dose letal de algumas gramas. Em níveis não letais, é carcinógeno, irrita os olhos, a pele e as mucosas e a exposição crônica aos seus compostos pode provocar danos permanentes nos olhos (ANDERSON, 1986; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1988).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda desde 1958 uma concentração máxima de 0.05 mg/litro de cromo VI na água de consumo. Este valor está sendo revisado, havendo novos estudos sobre os seus efeitos a saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1988).

O cromo é um metal de transição, duro, frágil, de coloração cinza semelhante ao aço. É muito resistente à corrosão (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

Seu maior estado de oxidação é +6, ainda que estes compostos sejam muito oxidantes. Os estados de oxidação +4 e +5 são pouco frequentes, enquanto que os estados mais estáveis são +2 e +3. Também é possível obter-se compostos

nos quais o cromo apresenta estados de oxidação mais baixos, porém são bastante raros (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

São encontrados três isótopos estáveis na natureza: $^{52}\text{cromo}$, $^{53}\text{cromo}$ e $^{54}\text{cromo}$. O mais abundante é o $^{52}\text{cromo}$ (83,789%). Se tem caracterizado 19 radioisótopos, sendo o mais estável o cromo-50 com uma meia-vida de mais de $1,8 \times 10^{17}$ anos, seguido do $^{51}\text{cromo}$ com uma meia-vida de 27,7025 dias. Os demais tem uma meia-vida de menos de 24 horas, e a maioria com menos de um minuto (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

O $^{53}\text{cromo}$ é um produto do decaimento do $^{53}\text{manganês}$. Os conteúdos isotópicos no cromo estão relacionados com os de manganês, o que se aplica em geologia. As relações isotópicas de Manganês-Crômio (Mn-Cr) reforçam a evidência de $^{26}\text{alumínio}$ e $^{107}\text{paládio}$ na origem do Sistema solar. As variações nas relações de $^{53}\text{cromo}/^{52}\text{cromo}$ e Mn-Cr em alguns meteoritos indicam uma relação inicial de $^{53}\text{Mn}/^{55}\text{Mn}$, sugerindo que as relações isotópicas Mn-Cr resultam do decaimento *in situ* de ^{53}Mn em corpos planetários diferenciados. Portanto, o ^{53}Cr dá uma evidência adicional de processos nucleossintéticos anteriores a formação do Sistema Solar (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

O peso atômico dos isótopos do cromo variam desde 43 u ($^{43}\text{cromo}$) até 67 u ($^{67}\text{cromo}$). O principal modo de decaimento antes do isótopo estável mais abundante, o $^{52}\text{cromo}$, é a captura eletrônica, enquanto os depois deste, é a desintegração beta (ROCHA-FILHO; CHAGAS, 1999).

Óxido de crômio (III) é o composto inorgânico de fórmula Cr_2O_3 . É um dos principais óxidos de cromo, é um precursor largamente utilizado para outros compostos de cromo (HOLLEMAN; WIBERG, 2001). Tem massa molecular de 151.99 g/mol, densidade $5,22 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e é praticamente insolúvel na água (HOLLEMAN; WIBERG, 2001).

O óxido de crômio é usado na fabricação de materiais inoxidáveis como o Aço Inox. Os materiais revestidos de Óxido de Cromo são largamente utilizados em indústrias de dessalinização da água do mar e em estruturas de metal expostas à água salgada, seja esta do mar ou produto de sal utilizado para derreter gelo acumulado nas ruas de países de clima gélido. Esse uso acontece porque os íons do sal - NaCl - dissolvidos em água se dissociam, permitindo a condução de corrente elétrica pelo líquido. Assim, os átomos de Oxigênio existentes no ar entram na água e fazem contato com as partes metálicas da estrutura e, pelo elemento se

estabilizar com 8 elétrons em sua camada de valência, e ter apenas 6 em seu estado natural, ele "rouba" elétrons do metal. Processo conhecido como oxidação. Assim, tais materiais são revestidos com uma fina película de Óxido de Cromo a fim de conferir uma maior resistência à corrosão (HOLLEMAN; WIBERG, 2001).

1.4 Crômio Como Marcador de Digestibilidade

Em função de sua inércia química em sistemas digestórios, o óxido de crômio (III), Cr_2O_3 , vem sendo empregado há muito tempo como marcador biológico em estudos de nutrição, digestibilidade, farmacologia, produção e trânsito fecal em animais. O óxido de crômio (III) é o marcador mais comumente usado para estudos de fluxo da digesta em trabalhos publicados no *Journal of Animal Science* entre 1986 e 1995: de 124 experimentos que Titgemeyer (1997) considera úteis para avaliar a variabilidade em estudos de fluxo, 90 usaram Cr_2O_3 como marcador da digestão.

O óxido de crômio (III) é misturado nas rações, encapsulado com gelatina, suspenso em óleos, como comprimidos farináceos ou introduzido diretamente no trato digestório superior dos animais através de sonda apropriada, para posterior coleta das fezes e dosagem do conteúdo do metal (KANE, JACOBSON; MOORE, 1950; IRWIN; CRAMPTON, 1951; LLOYD; MACCAY, 1954; CLANTON, 1962; FURUKAWA; TSUKAHARA, 1966; HAENLEIN; SMITH; YOON, 1966; ITURBIDE, 1967; KOTB; LUCKEY, 1972; MACORIS, 1989). Os autores de estudos nas áreas de farmacologia, nutrição e ciência animal têm alertado para fatores biológicos que afetam o trânsito e a excreção do Cr_2O_3 , sugerindo meios para diminuir ou controlar estes fatores e melhorar a recuperação do crômio inicialmente fornecido (KAMEOKA; TAKAHASHI; MORIMOTO, 1956; BALCH; REID; STROUD, 1957; CLANTON, 1962; ITURBIDE, 1967).

O crômio é um elemento de transição que pode ocorrer nos estados de oxidação de 0, 2+, 3+, e 6+ (HARTFORD, 1963) e na sua forma trivalente é o estado mais estável desse metal e predominante de ocorrência nos materiais biológicos em condições normais (BOWEN, 1964; CHUECAS; RILEY, 1966; MERTZ, 1969; MERTZ; ROGINSKY, 1971). A estabilidade do crômio (III), acrescida da inércia do óxido fornecido na forma de óxido de crômio (III) como marcador biológico, em quantidade muito superior à natural, atravessa os sistemas digestivos sem reagir,

solubilizar-se ou sofrer absorção, e é prática e totalmente recuperada através das fezes, inclusive sem ser afetado pelos teores comparativamente desprezíveis do crômio natural (BOWEN, 1964; CHUECAS; RILEY, 1966; MERTZ, 1969; MERTZ; ROGINSKY, 1971).

Deve-se ressaltar que o crômio normalmente encontrado nos alimentos é um cátion com número de oxidação 3^+ [como no óxido de crômio (III)]. Sua absorção só pode ocorrer se estiver numa forma solúvel (cloretos, sulfatos, nitratos), nunca na forma insolúvel e estável de Cr_2O_3 . A utilização do óxido de crômio (III) na forma comercial como marcador, pode introduzir diminuta quantidade de formas contaminantes e solúveis do metal que, sendo absorvidas pelos animais durante um experimento, poderiam comprometer a interpretação dos resultados experimentais (WHITBY; LANG, 1960; SASSON, 1966).

No método indireto envolvendo o uso de indicador inerte na ração, assume-se que a quantidade do mesmo, no alimento e nas fezes, permaneça constante ao longo do período experimental e que todo o indicador ingerido deva aparecer nas fezes (UTLEY et al., 1970; CHO; SLINGER; BAYLEY, 1982). Entretanto, Brisson (1956) postula que o estado de equilíbrio é um estado de “saturação” do trato digestório com o indicador.

Fatores como horário e tipo de alimentação, forma de dosificação, densidade do óxido de crômio (III), número de doses, método e hora de coleta da amostra de fezes, período de adaptação, período de coleta e método analítico, são citados como responsáveis pela variabilidade do teor de óxido de crômio (III) (HARDISON; REID, 1953; PIGDEN; BRISSON, 1956; BRISSON, 1956, 1960; PUTMAN, 1962), porém, os resultados obtidos por Bremer Neto (1999) referentes ao teor do marcador nas fezes não apresentaram essa variabilidade e estão de acordo com os de Corbett et al. (1960). Moore (1957) estudando as variações na recuperação do óxido de crômio (III), atribui a erros nas determinações químicas as baixas recuperações do indicador e assim, teoricamente, uma amostra seria suficiente para efetuar as estimativas necessárias.

Devido a dificuldades da coleta das amostras fecais em experimentos aquáticos, os marcadores ou são comumente incluídos nas rações no começo do período de alimentação do experimento ou podem naturalmente estar associadas a elas (WATANABE et al., 1983; YONG; TAKEUCHI; WATANABE, 1989). Quanto ao óxido de crômio, os níveis atualmente empregados do marcador nas dietas

experimentais variam de 0,01% até 3% (LIED et al., 1982; SILVA; PERERA, 1984; LA NOÛE; CHOUBERT, 1985; SHIAU; CHEN, 1993; DAVIS; ARNOLD, 1994; RICHE; WHITE; BROWN, 1995; GAYLORD; GATLIN III, 1996; HILL et al., 1996; GOMES; PEÑA, 1997; BREMER NETO, 1999) e, segundo alguns autores, este marcador aumenta a utilização da glicose e poderia, desta maneira, influenciar significativamente os resultados em estudos de nutrição de animais aquáticos (SHIAU; HUANG, 1990; SHIAU; CHEN, 1993; SHIAU; LIN, 1993; SHIAU; SHY, 1998).

Este fato inviabilizaria a utilização do óxido de crômio (III) como marcador, pois o mesmo, ao ser absorvido, acarretaria alteração nos parâmetros sob investigação. Porém, os resultados encontrados por Utley et al. (1970) utilizando óxido de crômio (III) na forma radioativa ($^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$), administrado por via oral, não detectaram no sangue ou urina de novilhas, traços de radiação após a aplicação de aproximadamente 146 μCi de isótopos de óxido de crômio (III).

O óxido de crômio (Cr_2O_3) por ser insolúvel e estável (SASSON, 1966), é utilizado como marcador biológico em estudos de nutrição e fisiologia (KOTB; LUCKEY, 1972).

Harrison, Fraser e Mullan (1968) utilizaram o óxido de crômio em sua forma radioativa, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, em estudos de nutrição, marcador biológico, porém o ^{51}Cr é um emissor de radiação gama ionizante tornando-o um potencial agente mutagênico.

Isótopos radioativos aplicados aos estudos de digestibilidade sugerem diminuição de tempo e trabalho, substituindo a leitura automática de amostras para o ensaio químico do Cr_2O_3 , o qual é relativamente lento, e maior precisão, reduzindo a quantidade de erro associado com a análise química do Cr_2O_3 (KANE; JACOBSON; DAMEWOOD, 1959).

O tempo necessário para uma determinação química do óxido de crômio pelo método de Edin leva em média 1 hora (EDIN, 1918). O tempo necessário para uma determinação de óxido de crômio radioativo é de cerca de 10 minutos. Se as amostras são executados em triplicata ou quadruplicata, é evidente que o método de óxido de crômio radioativo poupa tempo, trabalho e produtos químicos (KANE; JACOBSON; DAMEWOOD, 1959).

A utilização do óxido de crômio na forma radioativa pode ser também um agente mutagênico causador de mutação. Este tipo de elemento, emissor de

radiação gama ionizante, pode levar a ejeção de elétrons dos átomos, formando íons eletricamente carregados. Quando estes íons estão situados dentro ou próximos de moléculas de DNA, podem promover reações químicas que alteram as bases do DNA. Alguns danos severos ao material genético, como rearranjos assimétricos com formação de fragmentos, não disjunção e quebras podem ocorrer (CARRANO, 1973). A exposição de carpas prussianas (*Carassius auratus gibelio*) ao crômio [Cr (VI) e Cr (III)], em vários níveis de concentração, levaram a um aumento na frequência de micronúcleos, quando comparado com o grupo controle (AL-SABTI et al., 1994).

1.5 Mutagênese Ambiental

Cerca de 10^{16} divisões celulares ocorrem no corpo humano durante a vida. As mutações irão ocorrer espontaneamente a uma razão estimada em cerca de 10^6 mutações por gene por divisão celular um valor estabelecido por limitações na acuidade de replicação do DNA e reparo, mesmo em um ambiente livre de mutagênicos. Assim, durante a vida, cada gene deverá sofrer mutação em cerca de 10^{10} ocasiões independentes em qualquer ser humano e, deste modo, entre células mutantes poderá haver muitas que possuam distúrbios nos genes envolvidos na regulação da divisão celular (ALBERTS et al., 2004).

Danos oxidativos no DNA ocorrem numa alta escala em condições metabólicas normais. É estimado que o DNA de cada célula do nosso corpo esteja exposto a 10^4 situações oxidativas por dia, levando a uma formação de mais de 20 diferentes lesões oxidativas no DNA. Há um conjunto de enzimas de reparo de DNA, tais como, as exonucleases, endonucleases e glicosilases específicas que podem remover essas lesões. No entanto, os sistemas de reparo não são perfeitos; embora eles possam reparar 99% das lesões, o 1% restante leva a um acúmulo dessas lesões com o tempo. Por consequência, os danos oxidativos no DNA e o acúmulo dessas lesões com a idade, podem contribuir para a carcinogênese e outras doenças degenerativas (RIBEIRO, 2003).

No próprio organismo humano, em condições normais, há a formação de espécies reativas de oxigênio; as moléculas de oxigênio que restam da cadeia respiratória mitocondrial são reduzidas a ânion superóxido (O^{2-}) (KEHRER, 1993). Essas moléculas são assim caracterizadas pela presença de um elétron não

pareado; esse elétron busca outro elétron para parear e, deste modo, forma um composto que não é um radical. No entanto, a adição de um terceiro elétron neste composto leva à formação de um radical mais reativo e mais agressivo que o primeiro (PRYOR; PRIER; CHURCH, 1983; CHURCH; PRYOR, 1985).

A mutação e a cancerização estão estreitamente associadas, uma vez que ambas representam alterações abruptas em uma única célula, são permanentes e herdadas pelas células - filhas (RABELLO-GAY, 1991). O câncer pode ser por causa de uma alteração na seqüência do DNA da célula ou uma mudança no padrão da expressão gênica sem a alteração citada (ALBERTS et al., 2004). Ele não é resultado de uma única mutação em uma célula e sim da ocorrência de vários eventos independentes com efeitos cumulativos. É praticamente impossível ocorrer duas mutações sucessivas no mesmo ponto do DNA de uma célula de um indivíduo e, portanto, supõe-se se isto ocorrer, uma dessas mutações seja herdada de um de seus genitores e a outra, seja resultado da associação entre a predisposição genética e fatores ambientais a que esteja submetido.

A carcinogênese ou oncogênese é um processo anormal, não controlado, da diferenciação e proliferação celular, de início localizado, mas pode se disseminar pelo organismo e pode levar a sua morte. Este processo pode ser identificado desde o início, quando alterações moleculares são identificadas no DNA, sendo sucedidas por alterações bioquímicas e fenotípicas das células, continuamente em direção à malignidade (WEINSTEIN, 1988).

Pela frequência com que os agentes carcinogênicos fazem parte do nosso dia a dia e por seus efeitos prejudiciais em nosso material genético, é importante que existam técnicas laboratoriais que permitam uma sensível detecção de danos no DNA e reparos. Os danos induzidos no DNA são, freqüentemente, específicos no nível tecidual e celular. Uma técnica, para ser considerada "apropriada", deve ter o poder de detectar danos e reparos no DNA em células individuais, que forem submetidas a uma variedade de condições experimentais (TICE, 1995).

O interesse crescente na genotoxicidade por poluentes potenciais tem gerado o desenvolvimento de vários testes biológicos para detecção e identificação de genotóxicos no ar, na água e no solo. Peixes forneceram um modelo adequado para o monitoramento de genotoxicidade aquática e qualidade da água de

descarte pela sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes. O método de micronúcleos tem sido utilizado com sucesso em várias espécies de peixes para realizar esta análise (AL-SABTI, 1994; AL-SABTI; METCLAFE, 1995; MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996).

O desenvolvimento de um programa de biomonitoramento em peixes requer conhecimento da cinética do ciclo de vida dos eritrócitos e indução de micronúcleos. A frequência da formação espontânea e indução de micronúcleos acima do normal necessitam ser determinada para confirmar o monitoramento desta espécie através deste método. No corpo dos peixes o sitio hematopoiético significativo está localizado na cabeça do fígado, porém, o método de micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico vem sendo eleito por diferentes autores como significado de ponto final (KLIGERMAN; BLOOM; HOWELL, 1975; HOOFTMAN; DE RAAT, 1982).

1.6 Testes de Mutagenicidade e Genotoxicidade

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou de recombinação, podendo ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos. Se a alteração incidir sobre células somáticas pode levar a um processo carcinogênico no indivíduo, se ocorrer em células germinativas podem produzir doenças ou mau formações nas gerações futuras (RABELLO-GAY, 1991). As mutações gênicas, ou de ponto, são modificações de um ou de poucos nucleotídeos. As alterações cromossômicas consistem em mudanças que afetam segmentos relativamente extensos do genoma e causam as modificações estruturais e numéricas (ALBERTS et al., 2004).

As substâncias que induzem diferentes efeitos na morfo-fisiologia celular são agrupadas em duas categorias principais: as genotóxicas e as citotóxicas ou cicloativas. As genotóxicas alteram o funcionamento ou estrutura normal do material genético e podem causar mutações gênicas e alterações cromossômicas. As citotóxicas causam modificações do aparelho mitótico ou deprimem a síntese de macromoléculas essenciais à vida celular e, como consequência, causam diminuição ou atraso da divisão celular ou morte celular (RIBEIRO, 2003).

Os agentes, os clastogênicos causam quebras cromossômicas

interferindo na localização e no número de genes, sendo que inversões e translocações são mudanças na localização dos genes nos cromossomos e, deficiências e duplicações consistem em alterações no número dos genes dos mesmos (RIBEIRO, 2003).

As mutações contribuem de forma significativa para o estabelecimento das doenças humanas e más formações congênitas, embora a extensão desta contribuição seja desconhecida (RIBEIRO, 2003).

Testes de genotoxicidade dispõem de diversas metodologias que os tornam importantes para pesquisa e avaliação de toxicidade celular podendo identificar potenciais carcinogênicos e mutagenicidade. Os testes atuam em um sistema experimental, divididos em quatro níveis, onde o primeiro nível engloba ensaios moleculares e em bactérias (avaliação de mutação em gene bacteriano); o segundo nível consiste em provas *in vitro* em células de cultivo (avaliação de aberrações cromossômicas); o terceiro nível compreende análises *in vivo* (avaliação de mutações gênicas em células de mamíferos); o quarto e último nível corresponde aos estudos em populações expostas a materiais genotóxicos (CRUZ; FREITAS, 2010).

Várias técnicas podem ser utilizadas para testes, tais como: coeficiente DNA/proteína, atividade de enzimas mitocondriais, proliferação celular, quebras e reparo de DNA, índices mitóticos, identificação de danos, aberrações cromossômicas, não disjunções, detecção de apoptose e necrose (CRUZ; FREITAS, 2010). Dentre os principais testes estão:

1. Teste de Ames (teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*): este teste fundamenta-se na restauração ou compensação de um defeito genético específico que causa exigência a um determinado nutriente. A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após exposição de uma população a um agente mutagênico. Este teste permite a monitorização da ação direta sobre o material genético e a verificação da atividade positiva e ou negativa de metabólitos após biotransformação, semelhante ao que ocorreria nos fígados dos mamíferos (CRUZ; FREITAS, 2010);

2. Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa”: consiste na quantificação de danos em DNA de células embebidas em gel de agarose, permite a detecção de danos e reparos em uma única célula. Suas vias de reparo de DNA podem ocorrer das seguintes formas: reversão da lesão, reparo por excisão, reparo recombinacional e tolerância a lesões (CRUZ; FREITAS, 2010);
3. Teste do micronúcleo: o micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por cromossomos ou seus fragmentos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (RAMÍREZ; SALDANHA, 1998; RIBEIRO, 2003).

1.7 Teste do Micronúcleo

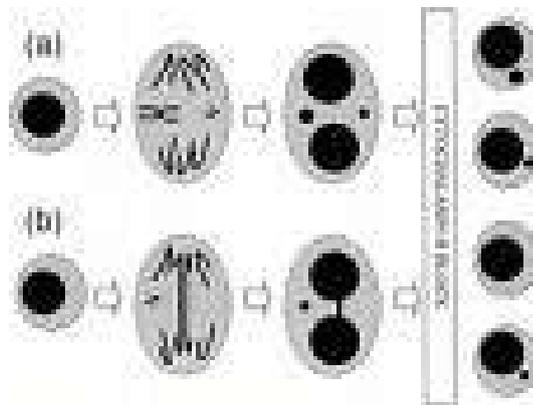
Os micronúcleos foram descritos no citoplasma de eritrócitos há mais de um século, e foram chamados de “fragmentos do material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” por Jolly, no final do século XIX e início do XX. Devido a esta descoberta, os hematologistas chamaram esta estrutura de corpúsculo de Howell-Jolly (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

O teste do Micronúcleo é utilizado para avaliar os efeitos genotóxicos, produzidos por baixas doses de carcinogênicos químicos ou físicos, em tecidos de mamíferos. Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos que se atrasam, em relação aos demais, em sua migração para os pólos do fuso na anáfase; neste caso, são excluídos do novo núcleo formado na telófase. Estes micronúcleos são corpúsculos contendo DNA Feulgen - positivo no citoplasma, sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal, podendo haver um ou mais por célula. Sua frequência aparece aumentada em tecidos expostos a agentes carcinogênicos bem antes de qualquer sintoma clínico. O teste do Micronúcleo pode ser aplicado a qualquer população de células humanas esfoliadas, tais como, do tecido da mucosa bucal, da bexiga, do

ureter, dos brônquios e da cérvix (RIBEIRO, 2003). A sensibilidade deste teste é comparável àquela da análise de quebras e trocas cromatídicas (RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (Figura) (RIBEIRO, 2003; FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Figura – Formação de uma célula micronucleada (RIBEIRO, 2003).



Evans et al. (1959, apud HEDDLE et al., 1983) usaram a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em células de raízes de *Vicia faba* por raio nêutrons e gama na presença e ausência de oxigênio. Heddle, em 1973, e Schmid, em 1975 (apud AL-SABTI, 1994), recomendaram o uso de células da medula óssea de camundongos para detectar danos causados por mutágenos químicos e demonstraram uma conexão entre frequência de micronúcleos e danos citogenéticos.

Os agentes clastogênicos podem ser detectados, em uma primeira abordagem, pelo teste do micronúcleo, realizados em mamíferos "*in vivo*". As substâncias a serem testadas são geralmente administradas a roedores e o efeito verificado em esfregaços de medula óssea. O ensaio serve como um primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos. Desta forma, constitui – se num parâmetro bem oportuno para a avaliação de populações expostas (HEDDLE et al., 1983; FENECH; MORLEY, 1985; SARTO et al., 1987). Alguns danos severos ao material genético, como rearranjos assimétricos com fragmentos, não disjunção e quebras, que embora possam ser visíveis como aberrações cromossômicas em

metáfases, geralmente não permitem que a célula se divida (CARRANO, 1973), o que é necessário para expressar micronúcleos.

Os métodos de avaliação de micronúcleos apresentam as vantagens de serem simples, de curta duração, de baixo custo e por permitirem uma análise rápida de um elevado número de células, quando comparados a outros ensaios. Além disso, podem ser aplicados praticamente a qualquer população de células que estejam em constante divisão celular (*in vivo* ou *in vitro*), durante exposição a agentes genotóxicos, clastogênicos, ambos ou aneugênicos (RIBEIRO, 2003).

1.8 Anormalidades Nucleares

Os eventos genotóxicos podem induzir ainda diversos outros estados nucleares como a formação de células binucleadas ou núcleos do tipo *broken egg*. Uma outra situação de defesa celular contra o dano genético é a apoptose. Em regras gerais, a apoptose representa a morte celular programada por genes específicos. A apoptose também pode produzir núcleo picnótico, cromatina condensada e cariorréxis (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

Além da avaliação dos micronúcleos está proposta também a avaliação das seguintes anormalidades nucleares na quantificação do dano genético (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992):

1. cariorréxis, cromatina condensada e picnose: associadas a citotoxicidade (necrose) e genotoxicidade (apoptose);
2. cariólise: associada à necrose;
3. binucleação: provavelmente associada a estágios tardios da divisão celular;
4. *broken-eggs*: descrito primeiramente por Sarto et al. (1987), mas de origem e significados desconhecidos.

Diante do exposto, e sabendo-se que o óxido de crômio radioativo pode otimizar a avaliação da digestibilidade em peixes, é importante que se avalie a possibilidade deste composto ser genotóxico.

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, um marcador biológico para estudos de nutrição e fisiologia, por meio da frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. London: Garland Science Publishing, 2004.

AL-SABTI, K. et al. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, p. 333-336, 1994.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v. 343, p. 121-135, 1995.

ANDERSON, R. A. Chromium metabolism and its role in disease processes in man. **Clin. Physiol. Biochem.**, Basel, v. 4, n. 1, p. 31-41, 1986.

BALCH, C. C.; REID, J. T.; STROUD, J. W. Factors affecting the rate of excretion of administered chromium sesquioxide by steers. **British Journal of Nutrition**, v. 11, p. 184-197, 1957.

BOWEN, H. J. M. The determination of chromium in biological material by radioactivation. **Analyst**, v. 89, p. 658-661, 1964.

BREMER NETO, H. **O método da s-difenilcarbazida na determinação espectrofotométrica do cromo (III) em fezes, após sua utilização como marcador biológico na forma de óxido de cromo (III)**. 1999. 53 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BRISSON, G. J. Indicator methods for estimating amounts of forage consumed by grazing animals. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 8., Reading, 1960. **Anais...** Reading: University of Reading, 1960. p. 435-438.

BRISSON, G. J. Note on the routine determination of chromic oxide in feces. **Canadian Journal of Agricultural Science**, v. 36, p. 210-212, 1956.

CARRANO, A. V. Chromosome aberrations and radiation-induced cell death, II. Predicted and observed cell survival. **Mutat. Res.**, v. 17, p. 355-366, 1973.

CHO, C. Y.; SLINGER, S. J.; BAYLEY, H. S. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. **Comparative Biochemistry and Physiology B.**, v. 73, p. 25-41, 1982.

CHUECAS, L.; RILEY, J. P. The spectrophotometric determination of chromium in sea water. **Analytica Chim. Acta**, v. 35, p. 240-246, 1966.

CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. **Environ. Health Perspect.**, v. 64, p. 111-126, 1985.

CLANTON, D. C. Variation in chromic oxide methods of determining digestibility of hand-fed beef cattle rations. **Journal Animal Science**, v. 21, p. 214-218, 1962.

CORBETT, J. L. et al. Excretion of chromium sesquioxide administered as component of paper to sheep. **British Journal of Nutrition Society**, v. 14, p. 289-295, 1960.

CRAMPTON, E. W.; LLOYD, L. E. Studies with sheep on the use of chromic as an index of digestibility of ruminant rations. **Journal of Nutrition**, v. 45, p. 319-327, 1951.

CRUZ, A. B.; FREITAS, R. A. Toxicologia in vitro: principais modelos utilizados. In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, Itajaí, 2010.

Anais... Disponível em: <

http://www.vsiptm.com.br/html/arquivos_menu2/cursos/Curso_7_2.pdf >. Acesso em: 15 abr. 2012.

DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. Estimation of apparent phosphorus availability from organic phosphorus sources for *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 127, p. 245-254, 1994.

EDIN, H. Orienterande Foroak over en pa "Ledkroppsprincipen" grundad method att bestamma en foderblandnings smalbarhet. Centralansten for forsoksvasendet pa jobruksomradet. **Stockholm Medd. Nr.**, v. 165, p. 1-5, 1918.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-190, 1985.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U. M. Teste de Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-40, 2008.

FURUKAWA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin Japanese Society Science Fish**, Tóquio, v. 32, p. 502-506, 1966.

GAYLORD, T. G.; GATLIN III, D. M. Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 139, p. 303-14, 1996.

GODOY, C. E. M. **Produção da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L, 1758), linhagem Chitralada, de pequeno porte, em tanques-rede visando o atendimento de comunidades carentes.** 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

GOMES, S. Z.; PEÑA, M. C. G. Digestibilidade aparente da Mandioca (*Manihot esculenta*) pelo camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, p. 858-862, 1997.

GOMES, S. Z.; SCHLINDWEIN, A. P. Efeito de períodos de cultivo e densidades de estocagem sobre o desempenho do catfish (*Ictalurus punctatus*) nas condições climáticas do litoral de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 29, p. 1266-1272, 2000.

HAENLEIN, G. F. W.; SMITH, R. C.; YOON, Y. M. Determination of fecal excretion rate of horses with chromic oxide. **Journal of Animal Science**, v. 25, p. 1091-1095, 1966.

HARDISON, W. A.; REID, J. T. Use of indicators in the measurement of the dry matter intake of grazing animals. **Journal of Nutrition**, v. 51, p. 35-52, 1953.

HARRISON, M.; FRASER, R.; MULLAN, B. Use of radioactive chromium oxide in digestibility. **Lancet**, p. 1015-1019, 1968.

HARTFORD, W. H. *Chromium*. In. KOLTHOFF, I. M.; ELVING, P. J. (ed.). **Treatise on analytical chemistry**. Part II. Analytical chemistry of the elements, v.8: The rare earths, Bi, V, Cr, the platinum metals. New York: Interscience Publishers, 1963. p. 373-377.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HILL, R. C. et al. The use of chromic oxide as a marker for measuring small intestinal digestibility in cannulated dogs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1629-34, 1996.

HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. **Inorganic Chemistry**. New York: Academic Press, 2001.

HOOFTMAN, R.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow (*Umbra pugnata*) by ethyl methanesulphonate. **Mutat. Res.**, v. 104, p. 147-152, 1982.

IRWIN, M. I.; CRAMPTON, E. W. The use of chromic oxide as an index material in digestion trials with human subjects. **Journal of Nutrition**, v. 43, p. 77-85, 1951.

ITURBIDE, C. A. El óxido crómico como indicador externo para estimar producción fecal y consumo en las pruebas de digestibilidad. **Turrialba**, v. 17, p. 304-313, 1967.

KAMEOKA, K. K.; TAKAHASHI, S.; MORIMOTO, H. Variation in the excretion of chromic oxide by ruminants. **Journal Dairy Science**, v. 39, p. 462-467, 1956.

KANE, E. A.; JACOBSON, W. C.; DAMEWOOD, J. R. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. **Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 1359-1366, 1959.

KANE, E. A.; JACOBSON, W. C.; MOORE, L. A. A comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. **Journal of Nutrition**, v. 41, p. 583-596, 1950.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 23, n. 1, p. 22, 1993.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v. 540, n. 2, p. 153-63, 2003.

KLIGERMAN, A. D.; BLOOM, S. E.; HOWELL, W. M. Umbra limi: a model for the study of chromosome aberrations in fishes. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 225-233, 1975.

KOTB, A. R.; LUCKEY, T. D. Markers in nutrition. **Nutrition Abstracts Reviews**, v. 42, p. 813-845, 1972.

LA NOUE, J.; CHOUBERT, G. Apparent digestibility of invertebrate biomasses by rainbow trout. **Aquaculture**, v. 50, p. 103-112, 1985.

LIED, E. et al. Determination of protein digestibility in Atlantic cod (*Gadus morhua*) with internal and external indicators. **Canadian Journal Fish Aquatical Science**, v. 39, p. 854-861, 1982.

LLOYD, L. E.; McCAY, C. M. The use of chromic oxide in digestibility and balance trials with dogs. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 53, p. 613-622, 1954.

LOVSHIN L. L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia Aquaculture in the Americas**. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 133-140.

MACORIS, D. G. **Trânsito intestinal em equinos: efeitos dos tratamentos com flunixin meglumina, dipirona-hioxina e óleo mineral**. 1989. 28 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Clínica-Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

MERENGONI, N. G. Produção de tilápia do nilo *oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Arch. Zootec.**, v. 55, n. 210, p. 127-138. 2006.

MERTZ, W. Chromium in human nutrition: a review. **Journal of nutrition**, v. 123, p. 623-633, 1993.

MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiological Reviews**, v. 49, p. 163-239, 1969.

MERTZ, W. Chromium: history and nutritional importance. **Biological Trace Element Research**, v. 32, p. 3-8, 1992.

MERTZ, W.; ROGINSKI, E. E. Chromium metabolism: the glucose tolerance factor. In: MERTZ, W.; CORNATZER, W. E. **Newer trace elements in nutrition**. New York: Marcel Dekker, 1971. p. 123-153.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutat. Res.**, v. 367, p. 245-251, 1996.

MOORE, J. H. Diurnal variations in the composition of the faeces of pigs on diets containing chromium oxide. **British Journal of Nutrition**, v. 11, p. 273-280, 1957.

OETTING, L. L. **Avaliação de diferentes marcadores para a determinação da digestibilidade e taxa de passagem do alimento em suínos**. 2002. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 61. **Chromium**. Geneva: World Health Organization, 1988.

OSTLE, B.; MENSING, R. W. **Statistics in reserch**. 3.ed. Ames: Iowa State University Press, 1975.

PIGDEN, W. J.; BRISSON, G. J. Effect of frequency of administration of chromic oxide on its fecal excretion pattern by grazing wethers. **Canadian Journal of Agricultural Science**, v. 36, p. 146-155, 1956.

PRYOR, W. A.; PRIER, D. G.; CHURCH, D. F. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. **Environ. Health Perspect.**, v. 47, p. 345-355, 1983.

PUTMAN, P. A. Survey of the use of chromic oxide in ruminant research. **Journal of Animal Science**, v. 21, p. 185-192, 1962.

RABELLO-GAY, M. N. Teste de micronúcleo em medula óssea. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed). **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.83-90.

RAMÍREZ, A.; SALDANHA, P. H. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n.3, p.140, 1998.

RIBEIRO, R. L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, R. L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (orgs.). **Mutagênese ambiental**. 1.ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173-200.

RICHE, M.; WHITE, M. R.; BROWN, P. B. Barium carbonate as an alternative indicator to chromic oxide for use digestibility esperiments with rainbow trout. **Nutrition Reserch**, v. 15, p. 1323-1331, 1995.

ROCHA-FILHO, R. C.; CHAGAS, A. P. Sobre os nomes dos elementos químicos, inclusive dos transférmios. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000500022 &lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 set. 2007. DOI:10.1590/S0100-40421999000500 022

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-17, 1987.

- SASSON, H. F. Labeled chromium sesquioxide as a marker for digesta: preparation and quantitative determination in feces. **International Journal of Applied Radiation and Isotopes**, n. 17, p. 329-334, 1966.
- SHIAU, S. Y.; CHEN, M. J. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. **Journal Nutrition**, v. 123 p. 1747-1753, 1993.
- SHIAU, S. Y.; HUANG, S. L. Influence of varying energy levels with two protein concentrations in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in seawater. **Aquaculture**, v. 91, p. 143-152, 1990.
- SHIAU, S. Y.; LIN, S. F. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium of the utilization of different carbohydrate in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 110, p. 321-330, 1993.
- SHIAU, S. Y.; SHY, S. M. Dietary chromic oxide inclusion level required to maximize glucose utilization in hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 161, p. 357-364, 1998.
- SILVA, D. E. S. S.; PERERA, M. K. Food, nutritional status and digestibility of *Sarotherodon mossambicus* populations of 12 man-made lakes in Sri Lanka. **Environmental Biology of Fishes**, v. 11, p. 205-219, 1984.
- TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Ed.). **Environmental Mutagenesis**. Oxford: Bios. Scientific, 1995. p. 315-339.
- TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 2235-2247, 1997.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Research**, v. 271, p. 69-77, 1992.
- UTLEY, P. R. et al. Recovery of radioactive chromic oxide from the bovine gastro intestinal tract. **Journal Nutrition**, v. 100, p. 1227-1231, 1970.
- WATANABE, T. et al. Nutritional evaluation of brown meals as a protein source in diets for rainbow trout. **Bulletin Japan Society Science Fish**, v. 49, p. 1083-1087, 1983.
- WEINSTEIN, I. B. Strategies for inhibiting multistage carcinogenesis based on signal transduction pathways. **Mutat Res.**, v. 202, p. 413-420, 1988.
- WHITBY, L. G.; LANG, D. Experience with the chromic oxide method of fecal marking in metabolic balance investigations on humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 39, p. 854-859, 1960.

YONG, W. Y.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Relationship between digestible energy contents and optimum energy to protein ratio in *Oreochromis niloticus* diet. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 55, p. 869-873, 1989.

ARTIGO

Avaliação do potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, marcador de digestibilidade, por meio da frequência de anormalidades nucleares em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)

The evaluation of genotoxic potential of $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, a digestibility marker, by the frequency of nuclear abnormalities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

Jose Luiz Santos Parizi¹

José Eurico Possebon Cyrino²

Adibe Luiz Abdalla³

Ana Cristina Messas⁴

Hermann Bremer Neto^{1,4}

Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) - UNOESTE

Endereço: Rua José Bongiovani, 700.

Telefone: 55 18 3229 1181.

Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), UNOESTE¹.
ESALQ, USP², CENA, USP³, FCA, UNOESTE⁴.

¹Rua Jose Bongiovani, 700 - Cidade Universitária, Presidente Prudente. SP. Brazil. CEP 19050-680. E-mail: hermann@unoeste.br

RESUMO

Avaliou-se o potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, utilizado como marcador biológico em estudos de nutrição e fisiologia, por meio da frequência de anormalidades nucleares. Foram utilizadas 40 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) adultas e machos (01 animal/aquário), em um delineamento experimental casualizado. O período experimental foi de 21 dias, sendo 14 dias para adaptação às instalações e recebendo ração encapsulada, isenta do marcador, com 30% de proteína bruta (PB) e 2.800 $\text{Kg}^{-1}\text{Kcal}$ de energia digestível (ED)/kg de ração. Após este período, foram fornecidas diariamente duas cápsulas contendo óxido de cromo, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ (forma radioativa) (grupo experimental) e cápsulas contendo a ração sem o marcador até a saciedade. Foram avaliados sete tempos amostrais. O marcador não foi absorvido significativamente pelo trato digestório, porém o teste do micronúcleo e a frequência de anormalidades nucleares demonstraram que houve efeito genotóxico significativo sobre os eritrócitos de juvenis de tilápias do Nilo, expostos à concentração de 66 $\mu\text{Ci.g}^{-1}$ de ^{51}Cr , na forma de óxido de cromo, para os sete tempos amostrais.

Palavras-chave: Teste de Micronúcleo, peixe, radiação, cromo, dano de DNA, genotoxicidade.

SUMMARY

The genotoxic potential of $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, used as a biological marker in studies of nutrition and physiology, was evaluated through the frequency of nuclear abnormalities. We used 40 adult, male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) (01 animal / tank) in a randomized design. The experimental period lasted 21 days, with 14 days to adapt to the installations and receiving encapsulated feed, free of the marker, with 30% crude protein (CP) and 2,800 $\text{Kg}^{-1}\text{Kcal}$ of digestible energy (DE)/kg. After this period, two capsules containing chromium oxide, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ (radioactive form), were provided daily (experimental group) and to satiety were administered capsules containing the diet without the marker. We evaluated seven times sampling. The marker was not significantly absorbed by the digestive tract, but the micronucleus test and the frequency of nuclear abnormalities demonstrated that there was significant genotoxic effect on the erythrocytes of juvenile Nile tilapia, exposed to concentrations of 66 $\mu\text{Ci.g}^{-1}$ of ^{51}Cr in the form of chromium oxide, for the seven sampling times.

Key words: Micronucleus test, fish, radiation, chromium, DNA damage, genotoxicity.

INTRODUÇÃO

As tilápias pertencem à ordem Perciformes, família *Cichlidae*, são originárias do continente africanas e encontradas principalmente nas bacias dos rios Nilo, Níger, Tchade e nos lagos do centro-oeste (Merengoni, 2006).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada em países da zona tropical. Isto ocorre, pois apresenta boa aceitação e elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e por isso custo de produção relativamente baixo (Merengoni, 2006). A energia utilizada para o crescimento das tilápias do Nilo é influenciada pela composição de micronutrientes em sua dieta. (Schrama et al., 2011). Peixes em criadouro comem frequentemente uma quantidade pré-determinada de um único tipo de comida. Assim os peixes podem não compensar a eventual falta de um nutriente e do conteúdo energético o qual pode levar a perda de peso. Predizer a proporção alimentar próxima a ingestão alimentar voluntária do peixe é essencial para maximizar a taxa de crescimento e minimizar o desperdício de comida no ambiente aquático (Subramanian et al, 2012).

Entender os efeitos da alimentação sobre a tilápia e a sua fisiologia digestiva tem como principal objetivo, melhorar o rendimento aquícola, especialmente nos países em desenvolvimento (De Silva et al., 1990). Para esta avaliação da fisiologia digestiva são usados diversos tipos de marcadores biológicos, entre eles, o crômio (Ajakaiyine et al, 2003).

O crômio é um metal que ocorre naturalmente em baixas concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) no ar, água, solo e essencialmente em materiais biológicos. Na forma de óxido de crômio (Cr_2O_3) é insolúvel e estável (Sasson, 1966), sendo utilizado como marcador biológico em estudos de nutrição e fisiologia (Kotb and Luckey, 1972).

Harrison et al. (1968) utilizaram o óxido de crômio em sua forma radioativa, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, em estudos de nutrição, como marcador biológico. A utilização do isótopo radioativo ^{51}Cr , na forma de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, com pureza de 99,99%, permite uma leitura, direta simples, sensível e precisa do elemento nas amostras do material, reduzindo o viés associado com a análise química, especialmente em estudos de digestibilidade e recuperação completa (Kane et al., 1959; Krawielitzki et al., 1987). Isótopos radioativos aplicados aos estudos de digestibilidade sugerem diminuição de tempo e trabalho, substituindo a leitura automática de amostras para o ensaio

químico do Cr_2O_3 , o qual é relativamente lento, e maior precisão, reduzindo a quantidade de erro associado com a análise química do Cr_2O_3 (Kane et al., 1959; Krawielitzki et al., 1987). O tempo necessário para uma determinação química do óxido de cromo pelo método de Edin leva em média 1 hora. O tempo necessário para uma determinação de óxido de cromo radioativo é de cerca de 10 minutos. Se as amostras são executadas em triplicata ou quadruplicata, é evidente que o método de óxido de cromo radioativo poupa tempo, trabalho e produtos químicos (Kane et al., 1959; Krawielitzki et al., 1987).

O cromo VI é considerado um carcinógeno para seres humanos e ratos, havendo evidências que este cause danos oxidativos e adutos de DNA (McCarroll et al., 2010). O ^{51}Cr é um emissor de radiação gama e pode levar à ejeção de elétrons dos átomos e de íons eletricamente carregados quando estão situadas dentro ou próximo de moléculas de DNA (Kane et al., 1959). O ^{51}Cr pode promover reações químicas que alteram as bases do DNA, podendo causar graves danos ao material genético, como rearranjos assimétricos com formação de fragmentos, não-disjunção e quebra cromossômica (Kirsch-Volders; Fenech, 2001).

Danos no DNA podem ser avaliados utilizando o teste de micronúcleo, pois este teste é potencialmente sensível em várias espécies (Fenech, 2000), bem como nos peixes (Al-Sabtl et al., 1994).

Outras anormalidades nucleares nas células também são indicadoras de mutagenicidade, tais como células disformes, *broken-eggs*, picnose, binucleação e degeneração, sendo que estas anormalidades correspondem a diferentes processos biológicos (Tolbert et al., 1991). O registro da ocorrência de anormalidades nucleares tem sido considerado como uma abordagem confiável dos efeitos genotóxicos e citotóxicos em organismos aquáticos (Russo et al., 2004).

Diante do exposto, e sabendo-se que o óxido de cromo radioativo pode otimizar a avaliação da digestibilidade em peixes e que não há estudos na literatura sobre sua aplicação na avaliação da digestibilidade de peixes, é importante que se avalie a possibilidade deste composto ser genotóxico.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial genotóxico do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, um marcador biológico para estudos de nutrição e fisiologia, por meio da frequência de anormalidade nucleares em eritrócitos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 40 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), adultas, do sexo masculino, pesando $672,97 \pm 10,81$ g, selecionados aleatoriamente de um grupo original de 300 peixes, os quais estavam estocados em 70 aquários de plástico de 85L, suprido com sistemas de aeração e linha de água, independentes. Após a seleção, os 40 animais foram separados um por tanque. Os seguintes parâmetros de qualidade da água foram monitorados uma vez ao dia com o kit de análise de água HACH FF-02 Fish Farmer's water quality test kit (Hach Company, Loveland, EUA): temperatura, pH e concentrações de nitrito, amônia total e oxigênio dissolvido.

Os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais durante 14 dias e alimentados a vontade, com dieta basal contendo 30% de proteína bruta (PB) e 2.800 Kg^{-1} Kcal de energia digestível (ED)/kg de ração (AOAC, 1990; NRC, 1993). Amido de milho (Amilogill 2100; Cargill Agr. SA, Uberlândia, MG, Brasil) foi adicionado à dieta (40%) como fonte de carboidratos.

Foi realizada uma pré-mistura de 20g de dieta basal com 0,0074g de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ (emissão gama; meia-vida de 27,8 dias) (Anderson, 1981). À 117,5g de dieta basal foi adicionada a pré-mistura, sendo cuidadosamente homogeneizadas e o produto final foi denominado de dieta experimental. As dietas basal e experimental foram incluídas em cápsulas gelatinosas de 0,5g. A medida radioativa média de cada cápsula apresentava atividade específica de $66 \mu\text{Ci}$ (2.442 MBq) [pureza de 99,99% (Krawielitzki et al.,1987), Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear - IPEN, São Paulo, Brasil], e 0,00635g Cr_2O_3 (99,99% pureza; Aldrich Chemical Company, Inc.), com concentração total do marcador de 100 mg.g^{-1} (Krawielitzki et al.,1987). A atividade específica de $66 \mu\text{Ci}$ é considerada baixa para rejeito sólido ($<50\mu\text{Ci /kg.h}$) (Resolução CNEN-NE-6.05, novembro de 1985).

Trinta e cinco peixes foram alimentados com duas cápsulas da dieta experimental mais cápsulas contendo a dieta basal até saciedade aparente (grupo experimental). Os peixes do grupo controle (n=5) foram alimentados com cápsulas contendo dieta basal somente. Os peixes foram escolhidos ao acaso, foram anestesiados com 1,0g de benzocaína a 100mg.L^{-1} (Merck, EUA), dissolvido em álcool e após este procedimento foram sacrificados (Sudagara et al., 2009). Foram

coletadas separadamente amostras de sangue por punção intracardíaca, utilizando-se um tubo vacutainer heparinizado, com capacidade para 10 mL. O primeiro grupo de peixes foi avaliado no tempo 0, antes do início da dieta experimental (Grupo controle).

Dos peixes do grupo experimental foram coletadas amostras de tecido renal (TR), tecido hepático (TH), do conteúdo do trato digestório (CTD) e da água do aquário (AQ), além de sangue (Spyridakis et al., 1989), com 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de dieta.

Testes Anormalidades Nucleares

Foram feitos dois esfregaços sanguíneos por animal das amostras colhidas de sangue, fixados em metanol absoluto e após 24 horas, corados com Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil) a 5% por 30 minutos. Foram analisadas 1000 células por lâmina/ animal/dia. A análise das lâminas foi feita de acordo com Fenech et al. (2003). A frequência de micronúcleos (MN), células deformadas, *broken-eggs*, picnose, células binucleadas e células degeneradas obtidas para cada tempo de exposição foram confrontadas a do grupo controle, comparando as médias usando o teste T para duas amostras independentes (Pimentel-Gomes, 2000). A análise das lâminas foi cega e realizada por um único avaliador.

Determinação do ^{51}Cr , na forma de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$

A atividade específica foi determinada em todas as amostras. As leituras da atividade do ^{51}Cr (contagens por minuto) foram transformados logaritmicamente [$\log_{10}(\text{cpm.g}^{-1}$ ou $\text{cpm.mL}^{-1} + 10)$], montadas em curvas de regressão e comparadas através dos coeficientes angulares e de linearidade (Pimentel-Gomes, 2000).

Descarte dos resíduos radioativos

Resíduos radioativos foram descartados de acordo com normativas do Conselho Nacional de Energia Nuclear Brasileiro (CNEN-NE-6.05, novembro de 1985), o que segue a regulamentação internacional.

Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA/UNOESTE - Protocolo nº. 551/2010).

RESULTADOS

Durante o período de coleta, foram encontrados os seguintes valores médios dos parâmetros da qualidade da água: temperatura ($28,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($4,6 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), pH ($6,6 \pm 0,1$), amônia ($0,13 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) e nitrito ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$).

A leitura da atividade específica do ^{51}Cr nas amostras de sangue, no tecido renal e hepático dos animais do grupo experimental, após transformação logarítmica, foram comparadas através de regressão simples, através dos coeficientes angular e linear das mesmas e não apresentaram diferença estatística significativa entre os tempos estudados ($p > 0.05$). Quando estas regressões foram comparadas com as ajustadas às amostras da água do aquário e do conteúdo do trato digestório dos peixes que receberam o marcador biológico $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ contendo atividade radioativa, verificou-se que houve um aumento linear significativo ao longo dos dias ($p < 0.05$) (Figura 1).

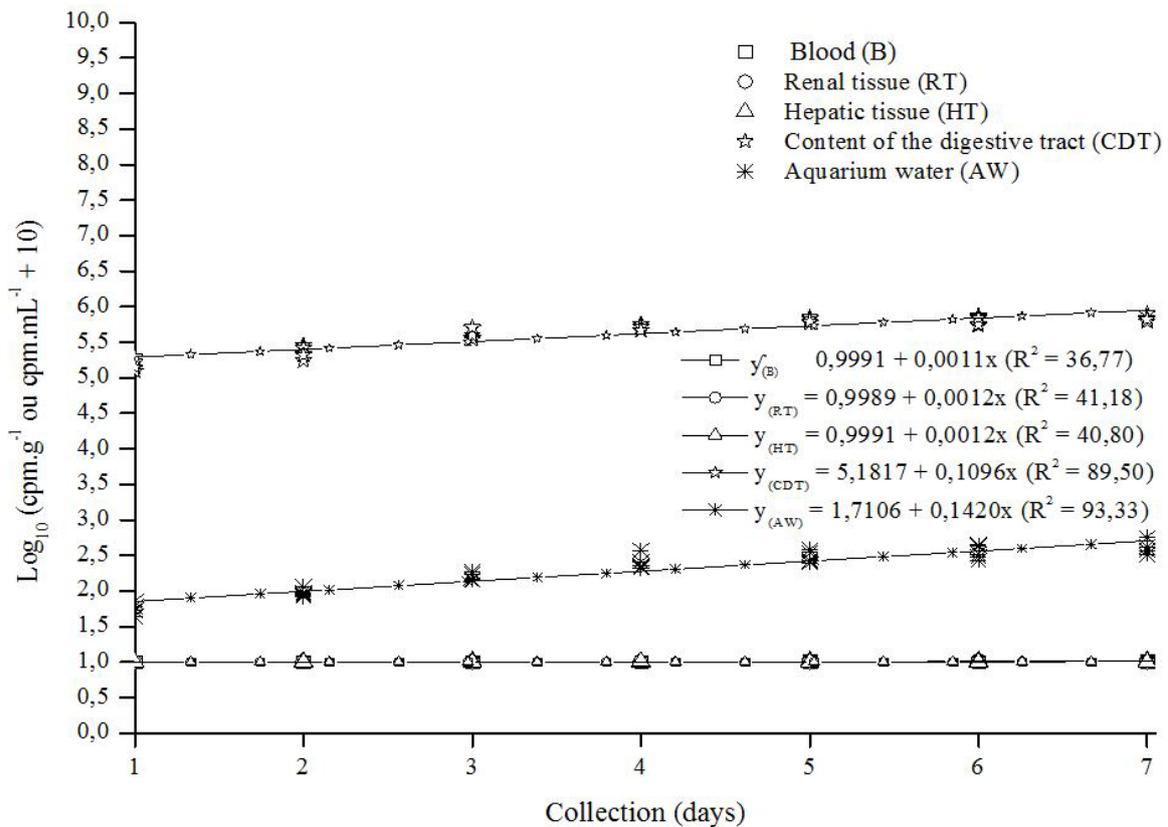


Figura 1. Estimativas da radiação, após transformação logarítmica, em função do tempo (dias) de coleta, para cada amostra do grupo experimental (n=35).

A frequência de micronúcleos variou consideravelmente de um indivíduo para outro (0.03% a 0.47%), sendo que entre indivíduos no dia 0 (controle) foi de $0.23 \pm 0.15\%$, assim como as demais alterações celulares: células disformes – $0.31 \pm 0.56\%$, *broken-eggs* $0.29 \pm 0.35\%$, picnose $0.29 \pm 0.25\%$, binucleação $0.19 \pm 0.33\%$ e degeneração $0.24 \pm 0.44\%$ (Tabela 1).

A amostragem dos peixes, através da coleta de sangue para a realização dos testes de micronúcleos (MN) e das demais anormalidades celulares em eritrócitos de peixes foram realizados em sete momentos após o início do tratamento e houve um aumento significativo das alterações ($p < 0.05$) até o sétimo dia amostrado (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de características nucleares (%) em eritrócitos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) expostas 7 dias ao $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, como marcador biológico* (n=40).

Exposição (dias)	Frequência de anormalidades nucleares (por mil)					
	MN	Células disformes	<i>Broken-eggs</i>	Picnose	Binucleação	Degeneração
0 [#]	0.23 ± 0.15 ^a	0.31 ± 0.56 ^a	0.29 ± 0.35 ^a	0.29 ± 0.25 ^a	0.19 ± 0.33 ^a	0.24 ± 0.44 ^a
1	0.38 ± 0.27 ^{ab}	0.31 ± 0.42 ^{ab}	0.33 ± 0.37 ^{ab}	0.30 ± 0.26 ^a	0.24 ± 0.36 ^{ab}	0.25 ± 0.49 ^a
2	0.60 ± 0.34 ^{bc}	0.41 ± 0.20 ^{abc}	0.40 ± 0.15 ^b	0.45 ± 0.10 ^{ab}	0.34 ± 0.24 ^{abc}	0.32 ± 0.19 ^a
3	0.78 ± 0.43 ^{cd}	0.50 ± 0.30 ^{bc}	0.41 ± 0.30 ^{bc}	0.47 ± 0.32 ^{abc}	0.51 ± 0.29 ^{cd}	0.44 ± 0.12 ^b
4	0.90 ± 0.11 ^d	0.52 ± 0.46 ^{bc}	0.47 ± 0.25 ^{bc}	0.55 ± 0.36 ^{bc}	0.57 ± 0.39 ^d	0.55 ± 0.45 ^{bc}
5	0.93 ± 0.15 ^d	0.55 ± 0.25 ^c	0.48 ± 0.31 ^{bc}	0.57 ± 0.14 ^{bc}	0.57 ± 0.32 ^d	0.57 ± 0.14 ^c
6	1.01 ± 0.16 ^{de}	0.61 ± 0.42 ^c	0.53 ± 0.33 ^{bc}	0.58 ± 0.20 ^{bc}	0.65 ± 0.55 ^d	0.59 ± 0.21 ^c
7	1.11 ± 0.21 ^e	0.67 ± 0.55 ^c	0.57 ± 0.33 ^c	0.60 ± 0.53 ^c	0.67 ± 0.45 ^d	0.69 ± 0.57 ^c

*Médias das frequências de anormalidades nucleares ± desvio padrão. [#]grupo controle. Resultados em coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

As características físicas e químicas da água monitorada durante o período experimental não apresentaram variações significativas entre os tratamentos e foram consideradas apropriadas para a vida dos peixes e o seu desenvolvimento natural (Boyd, 1990).

O cromo tende a acumular-se no fígado, rins, pâncreas e baço, em vez de no sangue, músculos, coração e pulmões (Pechova and Pavlata, 2007), por esta razão, este estudo utilizou amostras de fígado e tecido renal de peixe para avaliação.

As leituras da atividade do ^{51}Cr das amostras do grupo experimental, transformada logaritmicamente e ajustado em relação ao tempo de exposição, utilizando os coeficientes de regressão linear e angulares ajustados, não mostrou

aumento significativo, indicando que o ^{51}Cr sob a forma de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ não foi absorvida. Estes dados confirmam os resultados obtidos por Utley et al. (1970), que utilizando óxido de crômio radioativo administrado por via oral para bovinos, não detectou traços de radiação no sangue ou na urina das novilhas.

As amostras de água do aquário e os conteúdos do trato digestório, através das regressões angulares e lineares ajustadas, tiveram um aumento significativo durante a exposição em relação à amostra do primeiro dia, indicando que o marcador até ao sétimo dia aumentou a sua concentração no trato digestório dos peixes e a sua excreção aumentou a concentração de crômio radioativo na água do aquário.

Como emissor de radiação gama ionizante, o ^{51}Cr torna-se um potencial agente genotóxico. A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* L., tilápia do Nilo, se presta adequadamente ao biomonitoramento, pois responde de maneira completamente diferente a cada agente genotóxico, variando a frequência das taxas de micronúcleos. Esta frequência variada provavelmente esteja relacionada com a farmacocinética do agente usado e a velocidade do ciclo hematopoiético (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Neste estudo, a frequência de micronúcleos e demais anormalidades nucleares variaram consideravelmente de um indivíduo para outro no mesmo tempo de sacrifício, apesar de serem da mesma desova e do mesmo sexo. Estas diferenças dependem não somente da alimentação e a idade, mais também de fatores genéticos e ambientais (Pastor et al., 2002).

O teste do micronúcleo e das demais anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias do Nilo foram realizados em sete tempos durante a exposição, tornando assim possível acompanhar mudança nas frequências das alterações, conforme preconizado por Titenko et al. (1994).

Estudos sobre as taxas de micronúcleos induzidas por diferentes agentes químicos mutagênicos em várias espécies de peixes demonstraram que estes geralmente apresentam pico entre o primeiro e o quinto dia após o início da exposição (Grisolia and Cordeiro, 2000), porém neste estudo houve um aumento significativo até o sétimo dia amostrado. Isto pode ter ocorrido, pois no presente estudo utilizou-se um agente físico radioativo.

As alterações nucleares geralmente são formadas devido à exposição a substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas e a taxa destas alterações pode depender da espécie, do genótipo, dos mecanismos de reparo do DNA, da

segregação cromossomal deficiente, do estado imune, do sexo e da idade do indivíduo (Zuniga-Gonzales, 2001).

Os resultados das análises citológicas, nos diferentes tipos de anormalidades nucleares, à medida que os peixes foram sendo expostos a radiação gama proveniente do $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, indicaram que este é indutor de alterações que podem ter ocorrido durante a formação das células avaliadas. Ainda, as alterações morfológicas nucleares podem ser devidas às células que se duplicaram, mas não completaram a citocinese, ou amplificação gênica que será eliminada através de brotamentos ou divisão mitótica incompleta (Fenech and Neville, 1992; AL-SABTI; METCALFE, 1995). A presença de eritrócitos bilobulados (em divisão mitótica) no sangue periférico pode estar associada com aumento provisório da capacidade de transporte de oxigênio, ou ainda com uma forma de senescência celular (Houston and Murad, 1995).

Embora não tenha ocorrido absorção do óxido de cromo radioativo, as alterações nucleares e a frequência de micronúcleos aumentaram significativamente até o final do experimento. Isto pode ter ocorrido devido ao acúmulo de material radioativo disperso na água ou saturação do trato digestório pelo ^{51}Cr , na forma de óxido de cromo.

Estudos mostram que minhocas sobrevivem em solo contaminado com elevados níveis de metais radioativos, como o arsênio, cádmio, chumbo e cromo, embora uma certa quantidade de radionuclídeos fique acumulada em seus corpos (Mrdakovic et al., 2012). Assim a hipótese de saturação do trato digestório é a mais plausível para explicar o efeito genotóxico do óxido de cromo radioativo, pois embora não tenha sido absorvido, a presença deste no trato digestório mantém a emissão da radiação dentro do organismo.

CONCLUSÃO

O óxido de cromo radioativo demonstrou não ser absorvido pelo trato digestório, porém o teste do micronúcleo e a frequência de anormalidades nucleares demonstraram que houve efeito genotóxico significativo sobre os eritrócitos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), expostos à concentração de $66 \mu\text{Ci.g}^{-1}$ de ^{51}Cr , na forma de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, para os sete tempos amostrais.

REFERÊNCIAS

Ajakaiye, A., Fan, M.Z., Archbold, T., Hacker, R.R., Forsberg, C.W., Phillips, J.P., 2003 Determination of true digestive utilization of phosphorus and the endogenous phosphorus outputs associated with soybean meal for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 2766-2775

Al-Sabti, K., Metcalfe, C., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.

Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijanic, B., Knez, S., Stegnar, P., 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. *Journal of Applied Toxicology.* 13, 333-336.

Anderson, R.A., 1981. Nutritional role of chromium. *The Science of the Total Environment.* 17, 13-29.

Boyd, C.E., 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture.* 3th. ed. Birmingham Publishing Co., Alabama. 421p.

CNEN. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Gerência de Rejeitos Radioativos em Instalações Radiativas. Resolução CNEN – 19/85 Publicação: D. O. U. de 17 de dezembro de 1985.

De Silva, S.S., Shim, K.F., Khim Ong, A., 1990. An evaluation of the method used in digestibility estims of a dietary ingredient and comparisons on external and internal markers, and time of faeces collection in digestibility studies in the fish *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 215-26.

Fenech, M., 2000. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis.* 15:4, 329-336.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-

block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 534: 65-75.

Fenech, M., Neville, S., 1992. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 19, 27-36.

Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*. 23, 235-239.

Harrison, M., Fraser, R., Mullan, B., 1968. Use of radioactive chromium oxide in digestibility. *Lancet*. J 1015-1019.

Houstan, A.H., Murad, A., 1995. Erythrokinetics in fish. *Can J Zool*. 73:411-418.

Kane, E.A., Jacobson, W.C., Damewood, J.R. 1959. Use of radioactive chromium oxide in digestibility determinations. *Journal of Dairy Science*. 42, 1359-1366.

Kirsch-Volders, M., Fenech, M., 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*. 16, 51-58.

Kotb, A.R., Luckey, T.D., 1972. Markers in Nutrition. *Nutrition Abstracts Reviews*. 42, 813-845.

Krawielitzki, K., Schadereit, R., Borgmann, E., Evers, B., 1987. Use of $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ and TiO_2 as markers for the determination of passage rate and protein digestibility in rats. *Arch. Tierernahr*. 37, 1085-99.

McCarroll, N., Keshava, N., Chen, J., Akerman, G., Kligerman, A., Rinde, E., 2010. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI). *Environ. Mol. Mutagen*. 51, 89-111.

Marengoni, N.G., 2006. Produção de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, Sob diferentes densidades de estocagem. *Arch. Zootec.* 55 (210): 127-138.

Mrdakovic, P.J., Salbu, B., Skipperud, L., 2012. Ecological transfer of radionuclides and metals to free-living earthworm species in natural habitats rich in NORM. *Sci. Total Environ.* 414, 167-76.

Pastor. S., Creus, A., Xamena, N., Siffel, C., Marcos, R., 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: Results of a hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and bucal cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 101-109.

Pechova, A., Pavlata, L.; 2007. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinari Medicina.* 52, 1-18.

Pimentel-Gomes, F., 2000. Curso de estatística experimental, 14th ed. Piracicaba, Degaspari. 477p.

Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 57, 168-174.

Savaranan, S., Schrama, J.W., Figueiredo-Siva, A.C., Kaushik, S.J., Verreth, J.A.J., Geurden, I., 2012 Constraints on Energy Intake in Fish: The Link between Diet Composition, Energy Metabolism, and Energy Intake in Rainbow Trout. *PLoS One.* 7, e34743. doi: 10.1371/journal.pone.0034743.

Sasson, H.F., 1966. Labeled chromium sesquioxide as a marker for digesta: preparation and quantitative determination in feces. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes.* 17, 329-334.

Shiau, S.Y., Liang, H.S., 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *J. Nutr.* 125, 976-982.

Schrama, J.W., Saravanan, S., Geurden, I., Heinsbroek, L.T., Kaushik, S.J., Verreth, J.A., 2012. Dietary nutrient composition affects digestible energy utilization for growth: a study on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a literature comparison across fish species. *Br. J. Nutr.* 108, 277-89.

Spyridakis, P., Métaillier, R., Gabaudan, J., Riaza, A., 1989. Studies on nutrient digestibility in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 1. Methodological aspects concerning feces collection. *Aquaculture.* 77, 61-70.

Sudagara, M., Mohammadizarejabada, A., Mazandarania, R., Pooralimotlagha, S., 2009. The efficacy of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition.* 1, 1-5.

Titenko-Holland, N., Moore, L.E., Smith, M.T., 1994. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 312, 39-50.

Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.* 134, 840-850.

Utley, P.R., Boling, J.A., Bradley, N.W., Tucker, R.E., 1970. Recovery of radioactive chromic oxide from the bovine gastro intestinal tract. *J. Nutr.* 100, 1227-1231.

Zuniga-Gonzales, G., Torres-Bugarin, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos Ibarra, M.L., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D., Gallegos-Arreola, M.P., 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat. Res.* 494, 161–167.

ANEXO A – Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).



Coordenadoria Central de Pesquisa
Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Protocolo de Pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO 51CR203, COMO MARCADOR BIOLÓGICO, ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO**” cadastrado na CEUA e na CCPq sob nº 551/10 (on line), tendo como pesquisador(a) responsável o(a) **Prof. Dr. HERMANN BREMER NETO**, os(as) Docentes Participantes Profa. Ms. ANA CRISTINA MESSAS e Prof. Dr. PAULO EDUARDO PARDO, o Participante Externo ADIBE LUIZ ABDALLA, o mestrando JOSE LUIZ SANTOS PARIZI e a acadêmica HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 05 de maio de 2011.

Presidente Prudente, 06 de maio de 2011.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA – UNOESTE

Retirado
27/05/2011


ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a Qual o Artigo Será

Submetido.

AQUATIC TOXICOLOGY
ISSN: 0166-445X

DESCRIPTION

Aquatic Toxicology publishes original scientific papers dealing with the mechanisms of toxicity and the responses to toxic agents in aquatic environments at the community, species, tissue, cellular, subcellular and molecular levels, including aspects of uptake, metabolism and excretion of toxicants. The aim of the journal is to increase our understanding of the impact of toxicants on aquatic organisms and ecosystems. Studies with aquatic model systems that provide fundamental mechanistic insight to toxic effects on organisms in general are also welcome. Both laboratory and field studies will be considered. The mechanistic focus includes genetic disturbances and adaptations to environmental perturbations, including the evolution of toxicant responses; biochemical, physiological and behavioural responses of organisms to toxicants; interactions of genetic and functional responses, and interactions between natural and toxicant-induced environmental changes. The bioaccumulation of contaminants is considered when studies address mechanisms influencing accumulation. Ecological investigations that address reasons, possibly also considering their genetic and physiological aspects, for toxicant-induced alterations of aquatic communities or populations are suitable. Reports on technique development or monitoring efforts are generally not within the scope of Aquatic Toxicology, except those concerning new methodologies for mechanistic research with an example of their application. Identification of toxicants or toxicologically relevant molecules in organisms will be considered only if the identification is a part of a more comprehensive mechanistic study. Whenever possible, information of exposure should be based on measured concentrations and not nominal or assumed ones. Manuscripts reporting acute toxicity data (lethal concentration, LC-50 or lethal dose, LD-50) as a major finding are usually not considered.

AUDIENCE

Environmental Toxicologists, Marine Biologists, Ecotoxicologists, Biochemical Toxicologists, Conservationists.

IMPACT FACTOR

2010: 3.333 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBASE

EMBiology
 Elsevier BIOBASE
 GEOBASE
 Marine Science Contents Tables
 Scopus

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles can be divided into three types:

- Regular reviews covering subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. These should generally not exceed 12 printed pages (approx. 6000 words).
- Mini-reviews. These will be short reviews or overviews (not exceeding 2-3 printed pages, approx. 1000-1500 words) on topics of above-average emerging interest.
- Commentaries. This label will be given to mini-reviews which clearly contain the personal opinions of the author concerned. All types of review articles will be solicited by the Reviews Editor, Prof. M.N. Moore, Plymouth Marine Laboratory, Prospect Place, The Hoe, Plymouth, PL1 3DH, UK. E-mail: mnm@pml.ac.uk.

Short Communications will be restricted to papers describing short, complete studies. They should not exceed 3 printed pages, including figures and tables (approx. 1500 words), and should be written in a continuous style, without subdivisions of introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgements; they should always begin with a summary. A short communication, although brief, should be a complete and final publication, and figures and tables from the communication should not occur in a later paper.

Letters to the Editor should either offer comment on a paper published in the journal, or comment on any general matter providing that this is relevant to the scope of the journal. In the case of letters commenting on published papers, the author(s) of the latter will be given the opportunity to react to the letter and the two items will subsequently be published together in the journal.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association

(Declaration of Helsinki) for animal experiments
<http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; Uniform Requirements for
 manuscripts submitted to Biomedical journals

<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are

included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at www.elsevier.com/locate/aqtox5 <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further

processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqtox/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Aquatic Toxicology has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then

Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed

separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in

the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These

will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional reprints can be ordered on a reprint order form which will be sent to the corresponding author of the accepted article by the publisher.

Author's Discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>