

Micronúcleos e anormalidades nucleares em peixes como biomarcadores de citotoxicidade e genotoxicidade de radiação gama, cromo 51, em ambiente aquático

Luiz Waldemar de Oliveira

Doutor, UNOESTE, Brasil
oliveira@unoeste.br

Thiago Tomio Takabatake

Mestre, UNOESTE, Brasil
thiagozootecnista84@gmail.com

Paula Marioto Perez

Mestre, UNOESTE, Brasil
paula_marioto@hotmail.com

Ana Cristina Messas

Mestre, UNOESTE, Brasil
anamessas@gmail.com

Gabriel Zanuto Sakita

Doutor, CENA/USP, Brasil
gabrielsakita@gmail.com

Adibe Luiz Abdalla

Professor Doutor, CENA/USP, Brasil
abdalla@cena.usp.br

Hermann Bremer Neto

Professor Doutor, UNOESTE, Brasil
hermann@unoeste.br

RESUMO

Contexto: Acidentes ou desastres nucleares podem contaminar corpos d'água e métodos de monitoramento ambiental são necessários para avaliar baixos níveis de radiação. Objetivo: Avaliar a genotoxicidade em peixes, *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo, sob exposição ao crômio radioativo (^{51}Cr), como fonte de radiação gama, utilizando o teste de micronúcleos e outras anormalidades nucleares. Metodologia: Tilápias adultas foram submetidas à dose de radiação gama de 20 Gy/dia, através da incorporação na dieta de óxido de crômio radioativo, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, e administrado durante os sete dias do período experimental, totalizando aproximadamente 140 Gy. Durante esse período amostras de sangue periférico foram coletadas [dias 0 (controle), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7] e analisadas pelo ensaio do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias. Resultados: A exposição subcrônica ao ^{51}Cr causou um aumento dependente do tempo ($p < 0,05$) nas anormalidades nucleares, micronúcleos, núcleo deformado, broto nuclear, ponte nuclear, células binucleadas e células apoptóticas. Além disso, os resultados revelaram uma forte correlação entre a frequência de micronúcleos e das outras anormalidades nucleares. Contribuições teórico-metodológicas: A tilápia do Nilo demonstrou poder ser um organismo vivo capaz de ser utilizado para o biomonitoramento na contaminação por baixa radiação gama em ambiente de água doce, decorrente da contaminação. Contribuições sociais e ambientais: Os resultados sugerem que a análise morfológica e a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas de tilápia do Nilo podem ser consideradas parâmetros confiáveis na avaliação biomarcadores citogenéticos em alimentos e ambientes aquáticos contaminados com agente radioativo, ^{51}Cr , emissor de radiação gama.

PALAVRAS-CHAVE: Radionuclídeos. Biomonitoramento. Tilápia do Nilo

1 INTRODUÇÃO

A liberação de materiais radioativos em ambientes aquáticos e terrestres contamina o meio ambiente diretamente ou indiretamente através da geração de radionuclídeos artificiais derivados de acidentes ou testes nucleares. A radiação ionizante, gama, proveniente de radionuclídeos é considerada um agente genotóxico e que pode induzir mutações genéticas, aberrações cromossômicas e morte celular (BAUDIN et al., 2021; MAVRAGANI et al., 2019; OKUNO, 2013; SUGIMOTO et al., 2014).

Durante os anos de pico da produção de plutônio nos reatores nucleares em Hanford, localizada às margens do rio Columbia, no estado de Washington, e operado pelo Governo Federal dos Estados Unidos, liberou crômio-51, ^{51}Cr , diariamente dos reatores no rio (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2002). Esse radionuclídeo afeta principalmente o trato gastrointestinal, ossos e órgãos reprodutivos e formadores de sangue de organismos aquáticos, como os peixes (ASWOOD; AL-HAMZAWI; KHADAYEIR, 2019).

O óxido de crômio (III) é o composto inorgânico de fórmula Cr_2O_3 e não é absorvido pelo trato gastrointestinal, brânquias ou outra possível via de absorção em tilápia do Nilo (SAKITA et al., 2015). No entanto, o $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ é um emissor de radiação gama ionizante e um potencial mutagênico (TAUHATA et al., 2013), que pode levar à ejeção de elétrons dos átomos, íons e íons eletricamente carregados quando localizados dentro ou próximos às moléculas de DNA, podendo promover reações químicas que alteram as bases do DNA, causar graves danos ao material genético, como rearranjos assimétricos com formação de fragmentos, não disjunção e quebra (KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001).

Para avaliar o dano ao DNA em peixes, o teste de micronúcleo, MN, tem sido utilizado por ser potencialmente sensível (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Além disso, outras anormalidades nucleares nas células também são indicadores de mutagenicidade, como núcleo deformado, broto nuclear, ponte nuclear e células binucleadas e apoptóticas e essas

anormalidades correspondem a diferentes processos biológicos (BAUDIN et al., 2021; OSMAN; ABUEL-FADL; KLOAS, 2012). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência de anormalidades nucleares, como biomarcadores citogenéticos, induzidas pela exposição subcrônica à radiação gama e produzidas pelo decaimento do crômio (^{51}Cr), na forma de $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), usadas como modelo experimental para biomonitoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Centro de Energia na Agricultura – CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil e Laboratório de Ciências Funcionais da Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil (CEUA, protocolo nº 551).

Foram utilizados 80 adultos de tilápia-do-Nilo revertidos sexualmente e com peso inicial médio de $200,6 \text{ g} \pm 11,4 \text{ g}$, distribuídos randomicamente em 80 aquários com volume de 250 L. Os aquários dispunham de sistema fechado de recirculação de água independentes, com aeração, aquecimento controlado por meio de aquecedores elétricos ligados a termostato ($26,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$) e filtragem física e biológica da água por meio de biofiltro. Os restos de alimentos e acúmulo de excretas foram sifonados e realizado diariamente o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água através do auxílio de sonda multiparâmetros YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Os parâmetros da água durante o experimento permaneceram constantes: oxigênio dissolvido $9,8 \pm 2,2 \text{ mg/L}$; temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$; pH $8,1 \pm 0,5$ e condutividade $780 \pm 10 \text{ }\mu\text{hos}$.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 18 h) até a saciedade com ração basal composta de 30,0% de proteína digestível e 3.000 kcal/kg de energia digestível e incluída em cápsulas gelatinosas de 1,0 g (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011; OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2016). Duas cápsulas contendo crômio radioativo, $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$, incorporado na ração foram fornecidas diariamente, sendo uma as 8 h e a outra as 18 h e cápsulas contendo apenas a ração basal até saciedade. A dose de radiação absorvida estimada para cada peixe (peso médio 200g), a partir da contaminação oral de ^{51}Cr , foi de 20 Gy/dia (WEGST, 1987).

No início do período experimental (dia 0) e a cada 24 horas, dez exemplares foram aleatoriamente capturados, utilizando uma tabela de sequencia gerada pelo programa R (HARRELL, 2015) e anestesiados por imersão em solução de benzocaína (100 mg/L). Amostra de sangue foi coletada da veia caudal de cada exemplar no dia 0 (controle), 1, 2, 3, 4, 5 6 e 7 com seringas heparinizadas e imediatamente espalhadas em lâminas de vidro limpas, secas ao ar durante a noite e depois fixadas em metanol absoluto por 15 minutos. Cada lâmina foi corada com solução de Giemsa 5% por 20 minutos (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000). Lâminas em triplicata foram feitas para cada peixe e 3.000 células foram avaliadas por dois pesquisadores experientes às cegas usando um microscópio de luz (Leica DM 750, câmera Leica ICC50 HD - Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) acoplado ao software Leica Application Suite (LAS) EZ.

Os principais critérios para identificação do micronúcleo (MN) basearam-se em considerar a ausência de conexões com o núcleo principal, coloração semelhante e tamanho

entre 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo principal (AL-SABTI; METCALFE, 1995), uma vez que a maioria dos cromossomos de peixes é muito menor do que os cromossomos de mamíferos (SCHMID, 1975). Os critérios estabelecidos para a identificação dos micronúcleos foram rigorosamente seguidos para garantir uma pontuação autêntica (MATSUMOTO et al., 2006). Células com aparência oval com citoplasma intacto, núcleos ovais com membrana nuclear intacta, micronúcleos menores ou iguais a 1/3 do tamanho dos núcleos principais, micronúcleos claramente separados dos núcleos principais e micronúcleos não refringentes foram considerados para contagem.

As anormalidades citológicas observadas no presente estudo foram classificadas em anormalidades nucleares (ANs). As ANs incluem células com um núcleo principal com um núcleo menor claramente separado denominado micronúcleo (MN); núcleos com “notched” no núcleo foram anotados como deformados (DN); núcleos contendo eucromatina e tendo uma evaginação (broto) relativamente pequena da membrana nuclear como broto nuclear (NBu). Uma formação semelhante a uma ponte entre dois eritrócitos foi identificada como ponte nuclear (NBr) e células contendo dois núcleos e um citoplasma comum como células binucleadas (BNC). Células com núcleos fragmentados foram consideradas apoptóticas (AC) (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012).

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism versão 5.02. Para determinar a distribuição normal dos dados, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. O Teste t de Student’s foi utilizado para comparar a frequência de anormalidades nucleares encontradas em todos os momentos de amostragem que foram estatisticamente comparadas com o controle (dia 0) e entre si. O teste de correlação de Pearson foi realizado para determinar possíveis relações entre os valores de MN e possíveis anormalidades nucleares. Em todos os casos, o nível de significância selecionado foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tilápia do Nilo é um dos peixes de água doce mais utilizados em estudos toxicológicos, pois apresenta uma série de características que podem torná-la um modelo adequado para uso como espécie indicadora em programas de biomonitoramento (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007; OSMAN; ABUEL-FADL; KLOAS, 2012).

Neste estudo, houve variação na frequência de micronúcleos entre os indivíduos no dia 0 (controle), $0,23 \pm 0,15\%$, além de outras anomalias celulares, núcleo deformado $0,31 \pm 0,12\%$, broto nuclear $0,31 \pm 0,12\%$, ponte nuclear - micrócito $0,29 \pm 0,15\%$, células binucleadas $0,19 \pm 0,33\%$ e células apoptóticas $0,24 \pm 0,44\%$ [Tabela 1 e Figuras 2A - Micronúcleos (MN), 2B - Núcleo deformado (DN), 2C - Broto nuclear (NBu), 2D - Ponte nuclear - Microcito (NBr), 2E - Célula binucleada (BNC); e 2F - Células apoptóticas (AC)]. A frequência dos micronúcleos pode variar consideravelmente de um indivíduo para outro (0,03 a 0,47%), e essas diferenças dependem de fatores genéticos e ambientais, assim como a dieta, idade e sexo (PASTOR et al., 2002) e para diminuir os efeitos genéticos, ambientais, assim como manejo, idade e sexo, utilizamos exemplares da mesma desova, revertidos sexualmente (machos) e ração basal e manejo semelhantes.

O teste de micronúcleo e outras anomalias em eritrócitos de peixes deve ser realizado em vários momentos após a exposição, possibilitando assim rastrear possível aumento das alterações nas frequências (ANBUMANI; MOHANKUMAR, 2011) e neste estudo as coletas foram feitas diariamente durante os sete dias do período experimental e o aumento verificado na frequência de micronúcleos deve ser decorrente do mau reparo das quebras da dupla fita do DNA, levando a trocas simétricas e assimétricas de cromátides e cromossomos ou fragmentos que não conseguem ser incluídos nos núcleos-filhos ao final da telófase durante mitose devido à falta de fixação do fuso durante o processo de segregação na anáfase (FENECH et al., 2011). Um aumento estatisticamente significativo na formação de MN também foi observado em estudos com outras espécies de peixes, *Ictalurus punctatus* em uma lagoa de resfriamento em um local contaminado por Chernobyl (SUGG et al., 1996), *Esox lucius* em instalações nucleares e complexos químicos na Sibéria (ILYINSKIKH; ILYINSKIKH; ILYINSKIKH, 1998) e *Catla catla* mantidos em aquários (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012).

Tabela 1. Frequência (média \pm desvio padrão) das características nucleares em eritrócitos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) expostos a 7 dias de radiação gama resultante do decaimento de ^{51}Cr , $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3^*$.

| Exposição (dias) | Frequência de anormalidades nucleares** | | | | | |
|---------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MN*** | Núcleos deformados | Broto nuclear | Ponte nuclear - Microcito | Binucleada | Apoptótica |
| 0 (controle) | 0.23 \pm 0.15 ^A | 0.31 \pm 0.12 ^A | 0.31 \pm 0.12 ^A | 0.29 \pm 0.15 ^A | 0.19 \pm 0.13 ^A | 0.24 \pm 0.14 ^A |
| 1 | 0.45 \pm 0.21 ^{AB} | 0.38 \pm 0.17 ^{AB} | 0.37 \pm 0.14 ^{Ab} | 0.37 \pm 0.16 ^A | 0.28 \pm 0.20 ^{Ab} | 0.37 \pm 0.19 ^A |
| 2 | 0.65 \pm 0.30 ^{BC} | 0.47 \pm 0.20 ^{ABC} | 0.46 \pm 0.10 ^B | 0.47 \pm 0.19 ^{AB} | 0.41 \pm 0.14 ^{BC} | 0.42 \pm 0.29 ^{AB} |
| 3 | 0.83 \pm 0.43 ^{CD} | 0.57 \pm 0.20 ^{BC} | 0.51 \pm 0.11 ^{BC} | 0.54 \pm 0.22 ^{ABC} | 0.54 \pm 0.19 ^{CD} | 0.54 \pm 0.12 ^B |
| 4 | 0.97 \pm 0.11 ^D | 0.62 \pm 0.26 ^{BC} | 0.57 \pm 0.15 ^{BC} | 0.62 \pm 0.26 ^{BC} | 0.57 \pm 0.19 ^{CD} | 0.62 \pm 0.25 ^{BC} |
| 5 | 1.08 \pm 0.15 ^D | 0.67 \pm 0.25 ^C | 0.61 \pm 0.11 ^{BC} | 0.67 \pm 0.14 ^{BC} | 0.67 \pm 0.12 ^D | 0.70 \pm 0.14 ^C |
| 6 | 1.18 \pm 0.16 ^{DE} | 0.72 \pm 0.19 ^C | 0.66 \pm 0.13 ^{BC} | 0.74 \pm 0.20 ^{BC} | 0.75 \pm 0.25 ^{Dd} | 0.76 \pm 0.21 ^C |
| 7 | 1.27 \pm 0.21 ^E | 0.75 \pm 0.25 ^C | 0.70 \pm 0.14 ^C | 0.80 \pm 0.23 ^C | 0.80 \pm 0.25 ^D | 0.82 \pm 0.17 ^C |

* Fonte: Autores. ** Os resultados na coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente (Student's t Test; $p < 0.05$). *** Micronúcleo.

O teste de micronúcleo e outras anomalias em eritrócitos de peixes deve ser realizado em vários momentos após a exposição, possibilitando assim rastrear possível aumento das alterações nas frequências (ANBUMANI; MOHANKUMAR, 2011) e neste estudo as coletas foram feitas diariamente durante os sete dias do período experimental e o aumento verificado na frequência de micronúcleos deve ser decorrente do mau reparo das quebras da dupla fita do DNA, levando a trocas simétricas e assimétricas de cromátides e cromossomos ou fragmentos que não conseguem ser incluídos nos núcleos-filhos ao final da telófase durante mitose devido à falta de fixação do fuso durante o processo de segregação na anáfase (FENECH

et al., 2011). Um aumento estatisticamente significativo na formação de MN também foi observado em estudos com outras espécies de peixes, *Ictalurus punctatus* em uma lagoa de resfriamento em um local contaminado por Chernobyl (SUGG et al., 1996), *Esox lucius* em instalações nucleares e complexos químicos na Sibéria (ILYINSKIKH; ILYINSKIKH; ILYINSKIKH, 1998) e *Catla catla* mantidos em aquários (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012).

O período de exposição neste estudo foi de sete dias e os resultados revelaram aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de MN de maneira dependente do tempo. Estudo usando ^{60}Co como fonte de radiação gama em peixes de água doce, *Catla catla*, mostrou que a frequência MN atingiu o pico no dia 12 e que provavelmente é o tempo necessário para a produção de células nascentes que sofrem danos no DNA para atingir a circulação periférica do rim cefálico ou do baço sob condições estressantes (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012). Entretanto, outros estudos sobre as taxas de micronúcleos de várias espécies de peixes (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*), os resultados demonstraram que esse aumento ocorre entre o primeiro e o quinto dia após o início da exposição (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000).

Os resultados revelaram também uma correlação positiva entre as frequências de MN e anormalidades nucleares (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D e 1E), sugerindo a importância de outras anormalidades nucleares como biomarcadores prospectivos (OSMAN et al., 2010). A expressão simultânea de anormalidades morfológicas nucleares (ANs), juntamente com MN são consideradas como indicadores de citotoxicidade e genotoxicidade, respectivamente (GRISOLIA et al., 2009). As anormalidades nucleares surgem de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que acabam sendo perdidos durante a mitose e geralmente são formados devido à exposição a atividades clastogênicas e/ou aneugênicas de substâncias. Além disso, a velocidade do início da ocorrência dessas alterações pode depender da espécie, genótipo, mecanismos de reparo do DNA, segregação cromossômica deficiente, estado imunológico, sexo e idade do indivíduo (ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2001).

Poucos estudos foram realizados utilizando peixes expostos à radiação gama (ANBUMANI; MOHANKUMAR, 2011; ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012; ILYINSKIKH; ILYINSKIKH; ILYINSKIKH, 1998) e neles a exposição à radiação ocorreu com resíduos radioativos diluídos em meio aquoso e lançados extensivamente em rios ou em tanques laboratoriais. No entanto, este estudo difere dos demais, pois utilizou o elemento radioativo como fonte de radiação ionizante incorporada à dieta, com o objetivo de simular a ingestão de alimentos contaminados.

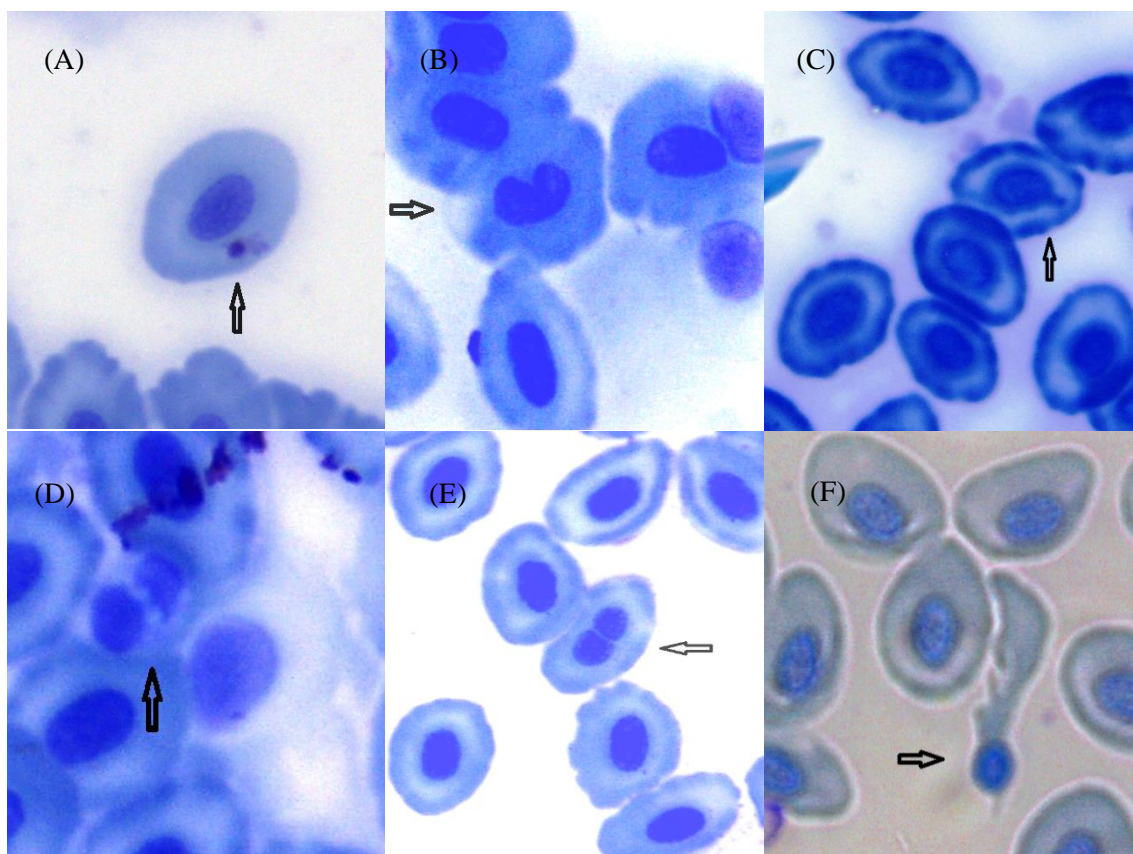
Juntamente com MN, várias outras anormalidades nucleares como núcleo deformado, broto nuclear, ponte nuclear, célula binucleada e células apoptóticas foram observadas em peixes durante a exposição subcrônica à radiação gama gerada pelo decaimento do ^{51}Cr e administrada por via oral para peixe tilápia do Nilo (representado nas Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E e 2F). As alterações morfológicas nucleares podem ser devidas a células que duplicaram, mas não completaram a citocinese e a amplificação gênica e serão eliminadas por brotamento ou divisão mitótica incompleta (FENECH, 2007). A presença de eritrócitos binucleados (em divisão mitótica) no sangue periférico pode estar associada ao aumento temporário da capacidade de transporte de oxigênio, ou a uma forma de senescência

celular (HOUSTON; MURAD, 1995). Além disso, a mutação do gene na lâmina nuclear pode resultar em anormalidades nucleares (STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009).

No presente estudo, observaram-se pontes entre células binucleadas e as referidas alterações nucleares, embora em baixa frequência, em eritrócitos periféricos, o que também foi observado em outro estudo utilizando peixes *Catla catla* (Ham.) expostos à radiação gama (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012). A radiação ionizante é conhecida por induzir quebras na fita dupla do DNA, causando a formação de cromossomos dicêntricos que se manifestam como pontes nucleoplasmáticas na citocinese (FENECH, 2007).

Os resultados da correlação de Pearson mostraram uma correlação positiva significativa entre as frequências de MN e outras anormalidades nucleares: Núcleo Deformado [$r(\text{Pearson})=0,9983$, IC 95% = 0,99 a 1,00, $R^2=0,9965$, $p<0,0001$ (Fig. 1A)], Broto Nuclear [$r(\text{Pearson})=0,9974$, IC 95% = 0,97 a 1,00, $R^2=0,9948$, $p<0,0001$ (Fig. 1B)], Microcito [$r(\text{Pearson})=0,9958$, IC 95% = 0,98 a 1,00, $R^2=0,9916$, $p<0,0001$ (Fig. 1C)], Binucleado [$r(\text{Pearson})=0,9954$, IC 95% = 0,95 a 1,00, $R^2=0,9909$, $p<0,0001$ (Fig. 1D)] e Apoptótico [$r(\text{Pearson})=0,9945$, IC 95% = 0,95 a 1,00, $R^2=0,9891$, $p<0,0001$ (Fig. 1E)]. Observações semelhantes, evidenciadas pela correlação entre a frequência de MN e outras anormalidades nucleares também foram encontradas em outros estudos (CAVAS; KONEN, 2008; RYBAKOVAS; BARSIENTE; LANG, 2009).

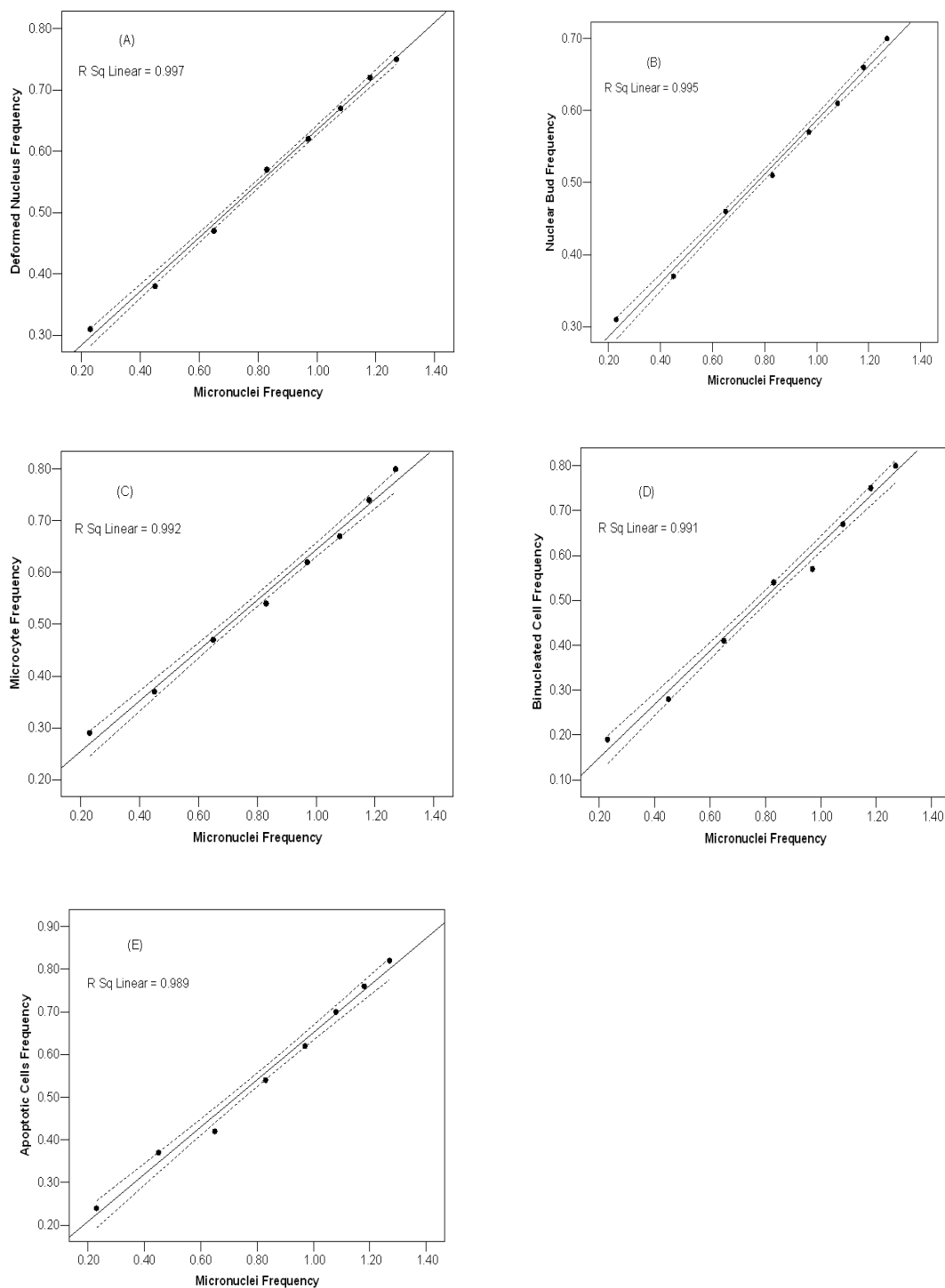
Figura 1. Imagens representativas de várias anormalidades celulares eritrocíticas no peixe tilápia do Nilo exposto à exposição aguda de radiação gama (^{51}Cr) no peixe tilápia do Nilo. As anomalias nucleares observadas foram (A) Micronúcleos (MN), (B) Núcleo deformado (DN), (C) Broto nuclear (NBu), (D) Ponte nuclear - Microcito (NBr), (E) Célula binucleada (BNC); e (F) Células apoptóticas (AC).



Fonte: Autores.

Nesse estudo foram observados brotos nucleares e essa anormalidade nuclear é formada quando uma ponte nucleoplasmática entre os núcleos se rompe e os remanescentes encolhem em direção aos núcleos (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012; UTANI et al., 2010). Essas e as anormalidades dos “núcleos da cauda” também foram observadas em hemácias de peixes e em linfócitos humanos expostos à radiação gama proveniente do decaimento de radioisótopos do acidente nuclear de Chernobyl (KRAVTSOV et al., 2000).

Figure 2. Teste do coeficiente de correlação de Pearson ($p < 0,05$) da frequência de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares em eritrócitos de tilápias do Nilo expostas a radiação gama e proveniente de ração contaminada com ^{51}Cr (radiação gama). (A) Correlação entre a frequência de MN e a frequência de Núcleos Deformados. (B) Correlação entre a frequência MN e a frequência do botão nuclear. (C) Correlação entre MN e frequência de micrócitos. (D) Correlação entre MN e frequência de hemácias binucleadas. (E) Correlação entre MN e frequência de hemácias apoptóticas.



Fonte: Autores

Além disso, observamos que a exposição subcrônica à radiação gama do decaimento de radionuclídeos durante o período experimental de sete dias resultou em um aumento significativo de anormalidades nucleares e apoptose. Essas anormalidades também foram relatadas em estudos com seres humanos (linfócitos do sangue periférico humano) e peixes (eritrócitos) e que foram expostos a radiação aguda ou subcrônica e demonstraram induzir uma cascata complexa de eventos, como condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de bolhas e fragmentação (ANBUMANI; MOHANKUMAR; SELVANAYAGAM, 2012; YADAV et al., 2021). Além disso, os resultados revelaram uma alta correlação positiva na frequência de células binucleadas e que pode ser decorrente da falha da tubulina, dificuldade de polimerização e formação do fuso mitótico causado pela ação aneugênica de tóxicos (DE CAMPOS VENTURA; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

4 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que tilápias do Nilo são sensíveis a radiação gama, decorrente do decaimento do ^{51}Cr , expostas e contaminadas por ração incorporada com o elemento mineral na forma radioativa. A substância poluidora causou alterações eritrocitárias e anormalidades nucleares, devido à radiação ionizante presente na ração e meio aquático e forte correlação entre as alterações eritrocitárias e anormalidades nucleares. Portanto, esta espécie demonstrou poder usada como uma ferramenta sensível para monitorar áreas afetadas pela radiação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, jun. 1995.
- ANBUMANI, S.; MOHANKUMAR, M. N. Nuclear and Cytoplasmic Abnormalities in the Fish *Catla catla* (Hamilton) Exposed to Chemicals and Ionizing Radiation. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 12, p. 867–877, 1 dez. 2011.
- ANBUMANI, S.; MOHANKUMAR, M. N.; SELVANAYAGAM, M. Flow cytometric assessment of DNA damage in the fish *Catla catla* (Ham.) exposed to gamma radiation. **Journal of Advanced Biotechnology**, v. 44, n. 12, p. 36–40, 2012.
- ASWOOD, M. S.; AL-HAMZAWI, A. A.; KHADAYEIR, A. A. Natural radionuclides in six selected fish consumed in south Iraq and their committed effective doses. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 21, 23 jan. 2019.
- BAUDIN, C. et al. Biomarkers of Genotoxicity in Medical Workers Exposed to Low-Dose Ionizing Radiation: Systematic Review and Meta-Analyses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7504, 13 jul. 2021.
- CAVAS, T.; KONEN, S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 154–159, 11 nov. 2008.
- DE CAMPOS VENTURA, B.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 1, p. 42–51, jan. 2008.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–104, jan. 2007.

- FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 1 jan. 2011.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A. et al. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 103–109, mar. 2007.
- GRISOLIA, C. K. et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 138–43, jan. 2009.
- GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235–239, mar. 2000.
- HARRELL, F. E. R Software. In: **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: [s.n.]. p. 127–142.
- HOUSTON, A. H.; MURAD, A. Erythrocytes in fish: recovery of the goldfish *Carassius auratus* from acute anemia. **Canadian Journal of Zoology**, v. 73, n. 3, p. 411–418, 1995.
- ILYINSKIKH, N. N.; ILYINSKIKH, E. N.; ILYINSKIKH, I. N. Micronucleated erythrocytes frequency and radiocesium bioconcentration in pikes (*Esox lucius*) caught in the Tom River near the nuclear facilities of the Siberian Chemical Complex (Tomsk-7). **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 421, n. 2, p. 197–203, 3 nov. 1998.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 51–58, jan. 2001.
- MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.
- MAVRAGANI, I. V. et al. Ionizing Radiation and Complex DNA Damage: From Prediction to Detection Challenges and Biological Significance. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1789, 14 nov. 2019.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, N. **Letter Report: Review of the Identification of Radionuclides Released from the Hanford Nuclear Reservation’s Facilities to the Columbia River**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, N. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2016.
- OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185–200, 2013.
- OSMAN, A. et al. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoospore fungi (*Achlya klebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 1, p. 24–31, jan. 2010.
- OSMAN, A. G. M.; ABUEL-FADL, K. Y.; KLOAS, W. In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 1, p. 14–21, 30 ago. 2012.
- PASTOR, S. et al. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 40, n. 2, p. 101–9, jan. 2002.
- RYBAKOVAS, A.; BARSIENTE, J.; LANG, T. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the

Baltic and the North Seas. **Marine environmental research**, v. 68, n. 5, p. 246–256, dez. 2009.

SAKITA, G. Z. et al. Chromium oxide ($51\text{Cr}2\text{O}_3$) used as biological marker was not absorbed by fish. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 755–762, jun. 2015.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9–15, fev. 1975.

STRUNJAK-PEROVIC, I. et al. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. **Journal of fish biology**, v. 74, n. 10, p. 2239–49, jul. 2009.

SUGG, D. W. et al. DNA damage and radiocesium in channel catfish from chernobyl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1057–1063, jul. 1996.

SUGIMOTO, A. et al. Assessment of the Risk of Medium-Term Internal Contamination in Minamisoma City, Fukushima, Japan, after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Accident. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 6, p. 587–593, 14 mar. 2014.

TAUHATA, L. et al. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 9. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Rio de Janeiro, 2013.

UTANI, K. -I. et al. Emergence of Micronuclei and Their Effects on the Fate of Cells under Replication Stress. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10089, 8 abr. 2010.

WEGST, A. V. Methods of calculating radiation absorbed dose. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology**, v. 14, n. 3, p. 269–271, jan. 1987.

YADAV, U. et al. Refined premature chromosome condensation (G0-PCC) with cryo-preserved mitotic cells for rapid radiation biodosimetry. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13498, 29 jun. 2021.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. et al. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans - Spontaneous micronuclei in 43 species. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, n. 1–2, p. 161–167, 2001.