
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO
HERBICIDA ATRAZINA, UTILIZANDO
Allium cepa E *Oreochromis niloticus*
COMO SISTEMAS-TESTE**

BRUNA DE CAMPOS VENTURA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Julho - 2004

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO HERBICIDA
ATRAZINA, UTILIZANDO *Allium cepa* E *Oreochromis
niloticus* COMO SISTEMAS-TESTE**

BRUNA DE CAMPOS VENTURA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA APARECIDA MARIN-MORALES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área Concentração: Biologia Celular Molecular)

**RIO CLARO
Estado de São Paulo - Brasil
Julho/2004**

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”.

(Thomas Huxley)

TOCANDO EM FRENTE

"Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei
E nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das
maçãs
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou

Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das
maçãs
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz!!!"

(Almir Sater/Renato Teixeira)

Às duas pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos e maravilhosos pais, Carlos e Cláudia, pelo incomparável incentivo, pela confiança e por todo o amor! Com todo o carinho e imensurável gratidão, dedico-lhes esse trabalho de valor inestimável em minha jornada profissional!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento especial só podia ser a Ele, DEUS, que acompanhou cada passo dado durante essa trajetória, concedendo-me muita saúde e encorajando-me diariamente a levantar e ter forças para seguir sempre em frente, mesmo diante dos obstáculos mais difíceis que pudessem ser encontrados. Somente DEUS sabe o que realmente se passou em minha mente e no meu coração no decorrer do meu mestrado. A Ele serei eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu verdadeiro amigo, por me conceder o dom da vida e da fé. Por permitir que eu realizasse esse grande sonho, iluminando cada instante dos meus dias!

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Marin-Morales, pela orientação desde a minha iniciação científica e pelos diversos ensinamentos, tanto na vida profissional como, principalmente, na minha vida pessoal. Acima de tudo, agradeço pela verdadeira amizade que construímos ao longo desses quase seis anos de convivência diária!

Aos meus companheiros técnicos de laboratório, Rogilene, Gérson e Anderson, que sempre estiveram dispostos a me ajudar nos experimentos realizados.

À desenhista do Departamento de Biologia, Cristiane, e ao meu amigo Rômulo, pelo auxílio imprescindível no campo da informática.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação de “Biologia Celular e Molecular” da Universidade Estadual Paulista de Rio Claro, por muito terem contribuído, cada qual à sua peculiar maneira, na minha formação.

À Prof^ª. Dr^ª. Dejanira de Franceschi de Angelis, pertencente ao Laboratório de Toxicologia do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista de Rio Claro, pela inestimável assessoria nas pesquisas realizadas durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Mauricio Bacci Junior e à Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina Brochetto Braga, pela concessão de alguns materiais utilizados no ensaio de cometa.

À Prof^ª. Dr^ª. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, membro da minha banca de qualificação, pelas sugestões dadas ao trabalho de aberrações cromossômicas.

À Prof^ª. Dr^ª. Silvia Tamie Matsumoto, pelas valiosas sugestões nas pesquisas realizadas e, principalmente, por ter acompanhado prontamente cada passo do meu mestrado. Além de tudo, agradeço a essa pessoa extraordinária, pelo companheirismo, amizade e momentos de enormes gargalhadas!

Aos colegas do Laboratório TOXICAN da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, especialmente à Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Regina Ribeiro, à Prof^ª. Dr^ª. Daisy Maria Fávero Salvadori e à doutoranda Marina, por me permitirem a utilização do microscópio de epifluorescência e me auxiliarem nas análises do ensaio de cometa.

Gagari, Ana Paula, Ferfo, Karina, Vagner, William, Lorena, Rosângela, Marielle, Douglas, Thalita, Cauré, Akio, Fábio, Tiago, Bibi, Bob, Mamute, Alberto, Maurício, Sil, Angélica, Marília, Yara, Érica, Kelly, Gui, Du, Dânia, Jaqueline, Joyce, Zezão, Dani, Pedro, João, Fred, Tati Perez, Rê Bordinhon e Rodrigo Matos pelo carinho, “discussões filosóficas”, congressos, seminários, churrascos, cervejadas, festas e por todos os momentos compartilhados.

Aos meus queridos amigos Bibiana e Eduardo (Bob), por sempre me acolherem com alegria e carinho, pelos nossos momentos esportivos altamente produtivos e engraçados, pelas nossas loucas conversas e cantorias, enfim, pela nossa linda amizade abençoada por Deus!

À minha maravilhosa amiga Márcia (Japa), pela sua inconfundível animação nas baladas, pelo seu companheirismo único em qualquer situação (até mesmo em experimentos intermináveis em muitos finais de semana!!!), pelo seu sorriso que irradia luz a todos os que estão à sua volta, pelos seus diversos conselhos e, simplesmente, por ser essa pessoa tão especial!

Ao meu grande amigo Léo, por ter sido verdadeiro companheiro durante a graduação e a pós-graduação, pela sua integridade incontestável, pela sua determinação e por tudo o que sempre me ensinou!

Ao William, pelas sugestões dadas a esse trabalho de mestrado, por todas as horas que passamos juntos e pelo carinho! Enfim, pela pessoa especial com quem muito aprendi!

Aos meus irmãos de coração, em especial, à Vanessa, Fernanda, Ana Cláudia, Flávia, Fabrício, Joel Fernando, José Eduardo e Marcelle, por me mostrarem como a vida é linda quando se tem verdadeiros e bons amigos!

À toda a família Maranata, grupo de oração que me ensinou a acreditar no único caminho para a real felicidade: Deus!

À toda a minha família, avós, tios e primos, pela torcida, incentivo, carinho e amor. Em particular, ao meu sábio avô Alpeu, grande conselheiro de vida!

Ao meu lindo irmãozinho Fê, por ser esse menino de caráter invejável, pelo seu excelente bom humor, por escutar minhas “abobrinhas”, pelas parcerias musicais e por todo o carinho!

	Página
1. Introdução Geral e Relevância do Tema.....	01
2. Revisão da Literatura.....	04
a. Sistema-teste vegetal: <i>Allium cepa</i>	08
b. Peixes como sistema-teste animal.....	10
c. Ensaio de aberrações cromossômicas com o herbicida atrazina.....	11
d. Morte celular: necrose e apoptose.....	13
e. Ensaio de micronúcleos e de anormalidades nucleares.....	17
f. Ensaio de cometa.....	19
3. Artigo 1 - Avaliação dos efeitos mutagênicos do herbicida atrazina, por meio do ensaio de aberrações cromossômicas, utilizando sistema-teste de <i>Allium cepa</i>.....	24
4. Artigo 2 - Investigação dos efeitos citotóxicos do herbicida atrazina, pela indução de morte celular, em sistema-teste de <i>Allium cepa</i>.....	42
5. Artigo 3 - Avaliação dos efeitos mutagênicos e genotóxicos do herbicida atrazina, por meio do teste de micronúcleos e de anormalidades nucleares, utilizando <i>Oreochromis niloticus</i> como sistema-teste.....	55
6. Artigo 4 - Avaliação dos efeitos genotóxicos do herbicida atrazina, por meio do ensaio de cometa, utilizando <i>Oreochromis niloticus</i> como sistema-teste.....	76
7. Discussão Geral.....	92
a. Sistemas-teste.....	92
b. Análise dos efeitos citotóxicos.....	93
c. Análise dos efeitos genotóxicos.....	94
d. Análise dos efeitos mutagênicos.....	96
8. Conclusão.....	101
9. Referências Bibliográficas.....	103

1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

Durante as últimas décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e das instituições em se detectar, conhecer e controlar os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas. Este interesse tem se intensificado pelos aumentos assustadores dos relatos de ação antropogênica sobre o meio ambiente, responsáveis por danos na camada de ozônio, liberação acidentais de dejetos e gases radioativos industriais, além da liberação de pesticidas utilizados nas práticas agrícolas. Portanto, o crescimento da população humana e das atividades associadas com a agricultura, industrialização e comércio ainda contribuem para a depredação da biodiversidade e variabilidade genética, tendo como consequência o comprometimento de muitas espécies, inclusive o homem (SILVA & FONSECA, 2003).

Após a revolução industrial, um grande número de substâncias químicas tem sido lançadas nos ambientes terrestre, aquático e na atmosfera. Estas substâncias podem ser transportadas e transformadas por diferentes processos e seus subprodutos podem causar efeitos adversos ao homem, assim como danos aos ecossistemas terrestres e aquáticos. Muitos estudos têm evidenciado a presença de resíduos de várias substâncias químicas no ar, na água, no solo, nos alimentos e nos organismos em geral (BERTOLETTI, 1996).

A poluição do ambiente em que vivemos, por produtos genotóxicos e mutagênicos, afeta o próprio organismo e as suas gerações futuras, sendo observada não apenas para o homem, como também para as plantas, os animais e os microorganismos. O estudo

detalhado, minucioso e ordenado para detectar o modo de ação e os meios de prevenção do incremento de mutações, devido a causas antrópicas, deve, portanto, merecer uma atenção bastante especial por parte, principalmente, da comunidade científica (RIBEIRO et al., 2003).

Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de se avaliar o comportamento, as transformações e os efeitos de agentes químicos, tanto no ambiente como nos organismos. A toxicologia estabelece limites de concentração ou quantidade de substâncias químicas aceitáveis no ambiente, por meio de estudos sobre os efeitos tóxicos dessas substâncias nos organismos e nos ecossistemas (RAND & PETROCELLI, 1985).

Considerando-se que o uso dos agrotóxicos, como os herbicidas, tem causado uma grande contaminação ambiental, devido à forma indiscriminada de como é realizada essa prática, tornou-se imprescindível a realização da avaliação da toxicidade, dagentotoxicidade e da mutagenicidade desses compostos.

Segundo Ueta et al. (1997), o herbicida atrazina é amplamente utilizado em culturas de todo o mundo. Os perigos, tanto tóxicos como genotóxicos, que o herbicida atrazina pode representar para diferentes organismos e ambientes têm sido revisados. Porém, há uma necessidade emergencial de estudos mais detalhados sobre o modo de ação desse herbicida.

As espécies *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) e *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) são muito usadas como organismos teste para ensaios de toxicidade, pois oferecem vantagens, principalmente, devido à sua adequação às finalidades do estudo.

A interação entre diferentes métodos de avaliação de potencial tóxico, genotóxico e mutagênico fornece uma visão mais global e abrangente sobre o efeito de um agente químico.

Frente ao exposto acima, foram testados os sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do herbicida atrazina.

Para melhor apresentação, os resultados obtidos no presente trabalho, bem como a discussão de cada tema abordado, foram subdivididos em capítulos, escritos em forma de artigo.

Após a apresentação dos referidos artigos, foram realizadas a discussão e a conclusão geral de todos os dados apresentados, a fim de correlacioná-los entre si, para se obter uma visão mais holística dos efeitos do herbicida atrazina sobre os organismos testados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os seres vivos estão expostos às ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos. Estes agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos e podem provocar, nos organismos, efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995). Uma grande variedade de substâncias químicas com potencial mutagênico, tanto naturais como sintéticas, tem sido pesquisada. Muitas destas substâncias são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos defensivos agrícolas e nos complexos de efluentes domésticos e industriais. Sabe-se que muitos destes compostos podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, sem que se expressem de imediato (VOGEL, 1982). Desta maneira, há muitos compostos mutagênicos no ambiente, os quais podem representar um perigo para a saúde do homem, em virtude do seu potencial para induzir mutações (TAVARES, 1991).

A genética toxicológica tem por finalidade identificar e analisar a ação de agentes tóxicos que são capazes de interagir com o material genético dos organismos. Entende-se por genotoxicidade, alterações na estrutura dos cromossomos (clastogenicidade) ou na sequência de pares de bases (mutagenicidade), causadas pela exposição do organismo a agentes tóxicos (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

A detecção e o entendimento das propriedades dos agentes tóxicos físicos e químicos permitem avaliar os efeitos deletérios ou mesmo letais desses agentes para os organismos (ARNAIZ, 1995). Testes biológicos de toxicidade e mutagenicidade são, segundo Moraes

(2000), indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental como também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes. O impacto de materiais tóxicos na integridade e funcionamento do DNA celular tem sido investigado em muitos organismos sob condições de campo (MCCARTHY & SHUGART, 1990). Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção dos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos da poluição. Entre eles, podemos citar a presença de adutos de DNA, aberrações cromossômicas, quebras nas fitas de DNA, formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares, além da indução de morte celular (BOMBAIL et al., 2001). A maioria dos testes para detectar o potencial mutagênico de substâncias químicas baseia-se na investigação de possíveis induções de danos cromossômicos como alterações estruturais, formação de micronúcleos, trocas entre cromátides-irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA, utilizando diferentes organismos-teste, tais como bactérias, plantas e animais, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (PEÑA, 1996).

A produção de alimentos se dá por meio da prática da agricultura e da pecuária e o rendimento desta produção está diretamente relacionado com a competição que enfrenta com outros sistemas biológicos vegetais, animais, microbianos e parasitários. Dessa forma, o processo de modernização da agricultura introduziu, nos anos 60, o emprego de novas variedades biológicas consideradas mais produtivas, porém dependentes de adubos químicos e de uso intensivo de pesticidas, para que pudessem aumentar os índices de sua produtividade. O emprego desses agentes químicos resultou no aumento da produtividade, mais por outro lado, trouxe conseqüências adversas ao homem, visto serem estes agentes nocivos tanto ao homem como ao ambiente. A prática mundial do uso de agroquímicos, por longos períodos, muitas vezes indiscriminada e abusiva, vem trazendo preocupações às autoridades públicas e aos especialistas em saúde pública e sustentabilidade de recursos naturais (UETA et al., 1997).

Os agroquímicos são produtos bastante tóxicos, cuja absorção no organismo do homem, quase sempre, se dá por via oral, podendo ocorrer também por inalação ou por via dérmica. Como conseqüência da exposição do homem aos pesticidas, podemos observar uma

série de distúrbios, tais como gástricos, neurológicos e musculares. São agentes que persistem por muito tempo no meio ambiente (ALVES, 1986).

Dentre os praguicidas, os principais agentes de intoxicação são os herbicidas e os inseticidas. Ambos causam intoxicações graves, sendo os inseticidas os maiores causadores de óbitos (ZAMBRONE, 1986).

Segundo Chevreuil et al. (1996), Kim & Feagley (1998) e Abdel-Ramham et al. (1999), a maioria dos efeitos tóxicos dos herbicidas, sobre animais e plantas, foi insuficientemente investigada. Como consequência da falta de esclarecimento sobre a ação dos herbicidas no meio biológico, esses agentes químicos também podem representar um problema para a saúde humana (MUNGER et al., 1997; GORELL et al., 1998).

Para Veiga (1995), hoje, através de métodos relativamente simples, é possível estimar os efeitos genotóxico, mutagênico, carcinogênico e teratogênico dos agrotóxicos. Muitos trabalhos têm sido realizados por diversos pesquisadores preocupados com os efeitos nocivos de defensivos agrícolas, na tentativa de verificar os seus possíveis efeitos fisiológicos (ALMEIDA, 1974; PAVANELLI, 1995), mutagênicos (DASSENOY & MEYER, 1973; SAKAMOTO & TAKAHASHI, 1979; VENTURA et al., 2000, 2002; VENTURA & MARIN-MORALES, 2003; FERNANDES et al., 2001, 2002; MATSUMOTO et al., 2003) e carcinogênicos (TERRACINI, 1977).

Para o monitoramento dos organismos expostos aos agentes químicos, os ensaios de aberrações cromossômicas, micronúcleos e de cometa têm sido bastante utilizados (HAGMAR et al., 1998). Alguns poucos estudos também têm mostrado os efeitos tóxicos de químicos, por meio de processos de morte celular, tanto do tipo necrótico como apoptótico (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

O impacto de um pesticida no ambiente depende de seu modo de dispersão e da sua concentração, bem como da sua própria toxicidade (VANDER WERF, 1996).

Os efeitos mutagênicos dos pesticidas em geral podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação no DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (TIMBRELL, 1999).

Os herbicidas apresentam uma capacidade de interferir diretamente na divisão celular de plantas, no alongamento e/ou na diferenciação celular, causando distúrbios no funcionamento das raízes ou dos tecidos vasculares (LINCK, 1979). Já nos animais, os herbicidas podem atuar em diversos tecidos ou órgãos, estando, muitas vezes, associados a processos tumorigênicos (NATARAJAN, 2002).

A atrazina é um herbicida triazínico, classificado como moderadamente tóxico de pré e pós-emergência, utilizado para o controle de ervas daninhas em culturas de aspargo, milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi (POPA et al., 1986). Segundo Eldrige et al. (1999), os herbicidas triazínicos estão entre os pesticidas mais utilizados na agricultura, devido à capacidade em inibir a fotossíntese de invasoras de culturas. O Brasil, com as culturas de cana e de milho na liderança, emprega elevadas quantidades de herbicidas triazínicos (UETA et al., 1997).

Os herbicidas triazínicos são usados extensivamente nos Estados Unidos para controlar grama e ervas daninhas de folhas largas durante o cultivo de milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar e coníferas (WORTHING & WALKER, 1983). Devido ao seu uso difundido na agricultura e ao seu potencial para a extensiva exposição humana, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) tem conduzido a uma Revisão Especial de dados publicados e não publicados de vários herbicidas triazínicos (GOLDMAN, 1994).

De acordo com vários órgãos internacionais, incluindo o Environmental Protection Agency (EPA), o Development for Environmental Assessment Center dos Estados Unidos e o IARC Monographs (International Agency for Research on Cancer), o herbicida atrazina é um agente químico possivelmente carcinogênico para os seres humanos, embora o embasamento para essa conclusão seja apenas evidenciado em outros animais (JONES & FAWELL, 1987; WATERS et al., 1999). Sabe-se, por exemplo, que a atrazina induz tumores mamários em ratas Sprague-Dawley, sendo que o Peer Review Committee do EPA's Office of Pesticide Program (OPP) concluiu que a atrazina deve ser considerada no Grupo C - Possível Carcinógeno Humano. Mais recentemente, o EPA's OPP tem se encarregado de atualizar a avaliação dos possíveis modos de ação da atrazina, incluindo mutagênese, disrupção endócrina, e teratogênese (USEPA, 1999).

A atrazina tem sido testada em vários sistemas, mas há deficiências em relação a certos testes realizados, sendo que algumas evidências de efeitos genotóxicos, in vivo, precisam ainda ser confirmadas (RIBAS et al., 1998).

Segundo Kristen (1997), a dramática expansão do universo de compostos xenobióticos vem influenciando o meio ambiente devido à presença de milhões de químicos antropogênicos com potencial tóxico para a biosfera. Atualmente, há uma grande necessidade de se avaliar a toxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade de substâncias químicas, como o herbicida atrazina, presentes nos ecossistemas, sendo que isso pode ser realizado através da avaliação dos mecanismos de ação dos tóxicos em células de plantas e animais.

a. Sistema-teste vegetal: *Allium cepa*

O teste de *Allium* tem recebido muita atenção por estar sendo usado em avaliação de poluentes presentes em solo e água (FISKESJÖ et al., 1981; FISKESJÖ, 1985; BERGGREN & FISKESJÖ, 1987; GROOVES et al., 1988; VIDAKOVIC et al., 1993; FRANEKIC et al., 1994; LIU et al., 1995).

Allium tem sido um sistema-teste vegetal bastante utilizado nos estudos de determinação dos efeitos de alguns químicos. Entre as espécies de *Allium*, a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982) é a espécie *Allium cepa* (Asparaginales: Alliaceae).

O teste do *Allium cepa* é um teste confiável para biomonitoramentos do potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade para diferentes substâncias químicas. Ma et al. (1995), usando-se de técnicas citogenéticas realizadas em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba*, concluíram que esses materiais constituem uma eficiente ferramenta para monitoramento ambiental de detecção de mutagenicidade, causadas por químicos.

O uso do *Allium cepa* como organismo-teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade deve-se às características que possui na sua cinética de proliferação, no crescimento rápido de suas raízes, no grande número de células em divisão, na sua alta

tolerância a diferentes condições de cultivo, na sua disponibilidade durante o ano todo, no seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987).

A espécie *Allium cepa* é usada como material-teste desde 1920 (FISKESJÖ, 1985; RANK & NIELSEN, 1993) e, a partir daí, tem sido utilizada para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente (FISKESJÖ, 1985), sendo extensamente utilizada para a avaliação de aberrações cromossômicas (GRANT, 1982). Essa espécie tem sido utilizada como material vegetal teste indicador de mutagenicidade por diversos autores como Rank & Nielsen (1993, 1997, 1998), Khors et al. (1997), Smaka-Kincl et al. (1997), Kovalchuck et al. (1998), Chauhan et al. (1999), Ventura et al. (2000, 2002), Ventura & Marin-Morales (2003), Fernandes et al. (2001, 2002) e Matsumoto et al. (2003), dentre outros. Testes com *Allium cepa* são adequados por oferecer parâmetros macroscópicos como turgescência, mudança de cor, formato, textura, espessura e comprimento da raiz, e parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, C-mitoses e micronúcleos, que são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

Considerando apenas as análises de aberrações em células anáfasicas e telofásicas, o teste de *Allium cepa* é o mais simples e, consideravelmente, o mais confiável dentre os métodos de investigação de aberrações realizados para todos os outros tipos de células mitóticas (RANK & NIELSEN, 1987).

Segundo Rank & Nielsen (1993), a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores. Os testes com *Allium cepa* também apresentam uma alta correlação com os resultados obtidos com outros sistemas-teste de mamíferos (GRANT, 1982).

As células meristemáticas de *Allium cepa* constituem um eficiente material citogenético para analisar aberrações cromossômicas causadas pela poluição ambiental (KRISTEN, 1997).

O teste do *Allium cepa* pode ser usado como ferramenta para avaliação de contaminação por algumas substâncias carcinogênicas que são negativas no teste Ames.

Desta forma, Rank & Nielsen (1998) apontam que o teste de *Allium cepa* pode ser considerado um método mais sensível que outros até hoje utilizados.

Segundo Cotellet et al. (1999), o teste de *Allium cepa* promove um diagnóstico rápido sobre reações causadas por herbicidas, cujo produto químico pode ser arriscado para saúde humana.

De acordo com Cotellet et al. (1999), há indícios de severa inibição no índice mitótico de células de *Allium cepa*, quando estas são submetidas ao solo contaminado por vários metais pesados e herbicidas.

Alguns herbicidas têm uma ação comprovada na indução de efeitos clastogênicos e aberrações cromossômicas em testes com *Allium cepa* (MA et al., 1995; PANDA et al., 1997; RANK & NIELSEN, 1997; COTELLE et al., 1999).

b. Peixes como sistema-teste animal

O acúmulo de substâncias químicas, em peixes, pode se dar pela exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou pela cadeia alimentar, sendo esta uma maneira indireta de contaminação (ATEEQ et al., 2002). Segundo Aaronson (1980), a mortalidade em massa de peixes de pequenos lagos ou de tanques pode ser atribuída à ação de compostos químicos tóxicos a esses organismos que estão presentes na água.

Segundo Powers (1989) e Ateeq et al. (2002), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental.

De acordo com Harshbarger & Clark (1990), os peixes constituem bons organismos-teste para monitoramento toxicológico, especialmente espécies pequenas de aquário, pois podem ser mantidos em laboratório e facilmente expostos a substâncias tóxicas de maneira similar. Segundo esses autores, esses organismos têm sido usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico em humanos.

Segundo Bombail et al. (2001), os peixes constituem bons bioindicadores dos efeitos de poluentes e estão sendo, cada vez mais, utilizados para detectar possíveis problemas ambientais. De acordo com Alves-Costa (2001), as espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Hoplias malabaricus* (traíra) são excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais, sendo freqüentemente utilizadas para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos. *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) é uma espécie de peixe comercialmente importante no sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. Esta espécie é também comumente encontrada em estuários de todo o mundo, sendo reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

c. Ensaio de aberrações cromossômicas com o herbicida atrazina

Testes citogenéticos são adequados para identificar os efeitos perigosos de substâncias, em suas diversas concentrações, e em diferentes tempos de exposição. Estes testes, realizados geralmente em organismos-teste, são comumente aplicados no biomonitoramento da extensão da poluição e na avaliação dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas, sobre os organismos no ambiente natural (MORAES, 2000).

Plantas de sorgo, tratadas com atrazina, apresentaram aumento do número de seus cromossomos, células multinucleadas, aneuploidia e poliploidia, e anormalidades em células-mãe de grãos-de-pólen, o que sugere que esse herbicida interfere na estabilidade da meiose (LIANE et al., 1967).

Popa et al. (1986) observaram que a atrazina, quando aplicada em altas concentrações em plântulas de milho, pode induzir quebras cromossômicas, que podem ser visualizadas pela presença de fragmentos cromossômicos únicos e pareados; uma alta freqüência de cromátides e pontes cromossômicas; cromossomos retardatários e a presença de células heteropoliplóides ou poliplóides.

Grant & Owens (2001) demonstraram que a atrazina induziu quebras cromossômicas (na mitose e na meiose) nas espécies *Pisum sativum* e *Allium cepa*.

Estudos sobre o efeito da atrazina, realizados por Kligerman et al. (1993), constataram que não houve aumento significativo de trocas de cromátides-irmãs e aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos de alguns animais expostos, experimentalmente, a esse herbicida. No entanto, Adler (1980) observou que doses de 1500 e 2000 mg/Kg de atrazina induziram mutações letais dominantes e quebras cromatínicas em medula óssea de ratos.

Estudos in vitro com linfócitos humanos, tratados com 0,10 ppm de atrazina, detectaram um pequeno aumento no índice de aberrações cromossômicas (MEISNER et al., 1992). Porém, para concentrações abaixo de 0,001 ppm desse herbicida não foram detectadas aberrações cromossômicas (ROLOFF et al., 1992). Lioi et al. (1998) observaram um pequeno aumento no número de troca de cromátides-irmãs, mas um grande aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos expostos à atrazina. Meisner et al. (1993) observaram um aumento significativo na frequência de quebras cromossômicas em células sanguíneas humanas expostas a 1 ppm do herbicida atrazina.

A atrazina também tem sido testada para avaliar a habilidade em induzir danos citogenéticos em roedores. Meisner et al. (1992) submeteram ratos a 20 ppm de atrazina (por meio de água de beber) e não observaram aumento no número de aberrações cromossômicas, após a exposição ao herbicida. Num estudo similar, Roloff et al. (1992) relataram que não houve aumento significativo de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos, quando esses foram alimentados com 20 ppm de atrazina, por 90 dias.

Segundo Ribas et al. (1998), a atrazina é responsável por uma significativa frequência de aneuploidias em *Neurospora crassa*, pela não-disjunção cromossômica em *Aspergillus nidulans*, além da indução da perda dos cromossomos sexuais em *Drosophila melanogaster*, sendo esses efeitos ocasionados pela toxicidade desse herbicida.

Muitos estudos usando o sistema-teste de *Aspergillus* têm mostrado que a atrazina não é mutagênica (SUMMER et al., 1984; KAPPAS, 1988; BUTLER & HOAGLAND, 1989), embora seja considerada mutagênica para outros sistemas-teste, como *Drosophila melanogaster* (MURNIK & NASH, 1977; TORRES et al., 1992).

Em sistemas-teste de mamíferos, submetidos à ação do herbicida atrazina, a maioria dos resultados parece ser negativa, exceto para os resultados de Loprieno & Adler (1980),

que obtiveram um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas de células de medula óssea de ratos, e os dados obtidos por Meisner et al. (1993), que descreveram uma indução de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos humanos. Enquanto os resultados advindos de sistemas-teste de bactérias e de mamíferos são quase sempre negativos, a atrazina exerce efeitos mutagênicos claros em diferentes sistemas-teste de plantas, por induzir aberrações cromossômicas em *Hordeum vulgare* e *Vicia faba* (WUU & GRANT, 1966; 1967), em *Zea mays* (PLEWA et al., 1984), e em *Sorghum vulgare* (LEE et al., 1974); trocas de cromátides-irmãs em milho (CHOU & WEBER, 1981) e mutação pontual também em milho (PLEWA et al., 1984).

d. Morte celular: necrose e apoptose

De acordo com Mello et al. (2001), agentes indutores de estresse, tais como: radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, álcoois, hipóxia, jejum, inibidores metabólicos, agentes oxidantes e infecções virais, dentre outros, podem induzir a morte celular. Segundo Kaioumova et al. (2001), a perturbação de células por agentes químicos pode levar a uma seqüência complexa de eventos que podem resultar em morte celular, tanto de maneira apoptótica como necrótica.

A necrose é um tipo de morte celular, antigamente considerada como descontrolada. Para Zakeri & Lockshin (2002), se uma célula encontra qualquer insulto ou injúria grave à sua existência, seus mecanismos de geração de ATP ou de integridade e permeabilidade de membrana são comprometidos. A necrose pode ocorrer pela presença de toxinas ou componentes químicos tóxicos, os quais promovem a lise celular, sendo que as funções mitocondriais e de canais iônicos do sistema de membranas das células são totalmente comprometidas. A necrose não é determinada por fatores intrínsecos da própria célula, mas por perturbações do meio ambiente, injúrias estas que causam uma agressão letal, por ser grave, intensa, contínua ou não, mas que ultrapassa o nível de habilidade homeostática da célula. Os agentes agressores podem ser agrupados em agentes físicos (ação mecânica, temperatura, radiação, efeitos magnéticos, eletricidade), químicos (compreendem substâncias tóxicas e não tóxicas), e biológicos (toxinas, infecções viróticas, bacterianas ou micóticas,

parasitas, etc). Esses agentes, dentre os quais estão incluídos os herbicidas, provocam um comprometimento dos níveis celulares de respiração aeróbica, da síntese proteica, da manutenção da integridade das membranas celulares e da manutenção da capacidade de multiplicação celular por interferências no RNA e DNA. A ação dos agentes agressores sobre os sistemas biológicos provoca a perda da homeostase e da morfostase celular, de tal forma que a célula perde sua viabilidade (KAIUOMOVA et al., 2001).

Diferentemente da apoptose, que é um fenômeno ocorrente com células únicas, a necrose tem sido freqüentemente descrita como um fenômeno multicelular. Estudos moleculares têm mostrado que o primeiro evento observado na necrose é a alteração na bomba de sódio e potássio da membrana celular, provocando edema intracelular. Quando as enzimas lisossomais digerem as organelas citoplasmáticas, o citoplasma adquire um aspecto vacuolizado, podendo ocorrer um processo associado de calcificação nas células mortas. As alterações nucleares ocorrem, reversivelmente, até a etapa de condensação da cromatina, formando blocos nucleares ligados à membrana nuclear e ao nucléolo (cariorrexe). Entretanto, quando as alterações degenerativas progredirem, pode aparecer retração do núcleo, que se transforma em uma massa densa e enrugada de cromatina (picnose). Esta cromatina sofre uma dissolução progressiva (cariólise), aparentemente como resultado da ação hidrolítica das DNAses de origem lisossomal. O citoplasma perde a basofilia e o limite celular torna-se indistinto. Observa-se que a perda da homeostase envolve o sistema respiratório celular (comprometimento das mitocôndrias), o sistema enzimático (comprometimento dos lisossomos) e o sistema de membranas, o qual parece ter um papel crucial para o estabelecimento de lesões irreversíveis na célula (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

Dados recentes indicam que, em contraste com a necrose que é causada por condições muito extremas, a apoptose é um tipo de morte celular caracterizado por um evento fisiologicamente normal e regulado (programado). Atualmente, sabe-se que tanto a apoptose como a necrose possuem caminhos de sinalização, como receptores de morte celular, cascatas de quinases e eventos mitocondriais. Através da modulação desses caminhos de sinalização em ambos os processos de morte celular, é possível identificar e distinguir a apoptose da necrose. As conseqüências da necrose e da apoptose para os organismos são

diferentes. A necrose envolve constituintes citossólicos que extravasam para o espaço extra-celular, através da membrana plasmática danificada, podendo provocar uma resposta inflamatória. Na apoptose, os constituintes citossólicos são isolados por membranas, sendo então fagocitados por macrófagos. A resposta inflamatória causada pela necrose, no entanto, pode ter um significado adaptativo (por exemplo, uma resposta imune emergencial e forte) sob condições patológicas (como câncer e infecções) (WOODLE & KULKARNI, 1998; HUPERTZ et al., 1999; STALDEMANN & LASSMANN, 2000; PROSKURYAKOV et al., 2003).

Morfologicamente, a necrose é um pouco diferente da apoptose “clássica”. Na necrose, as células primeiramente incham, a membrana plasmática se colapsa, e as células são rapidamente lisadas. Na apoptose, as células primeiramente se reduzem e depois seus núcleos se condensam, sendo que as células, finalmente, desintegram-se em corpos apoptóticos. Diferente da apoptose, a necrose não é promovida por sinais químicos intrínsecos da célula, pois ela é uma consequência dos danos causados por injúrias. No entanto, as próprias enzimas liberadas do extravasamento das células necróticas têm a capacidade de induzir a quebra da homeostase das células vizinhas, levando-as a processos também necróticos, pela promoção de digestão de suas membranas (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; MAJNO & JORIS, 1995).

Atualmente, Proskuryakov et al. (2003) determinaram que o termo apoptose pode ser atribuído ao processo de eliminação celular sem um rompimento aparente da membrana plasmática, enquanto a necrose é um tipo de morte celular acompanhada por um rápido efluxo de constituintes celulares no espaço extra-celular.

Como se sabe, os efeitos tóxicos de químicos podem levar a uma morte celular conhecida como necrose ou resultar na apoptose. Atualmente, é evidente que muitos químicos ambientais também exercem toxicidade via sinalização celular apoptótica. A apoptose define uma situação em que uma célula em processo de morte perde sua aderência com as células vizinhas ou com a matriz extracelular. Além disso, a cromatina fragmenta-se no núcleo, formando pequenas massas rodeadas pela membrana nuclear, enquanto que o citoplasma fica com um aspecto diferenciado característico. Essa aparência característica do citoplasma e do núcleo é resultante da ativação de caspases, proteases de restrição, que

podem clivar componentes importantes do citoesqueleto e da matriz nuclear (ZAKERI & LOCKSHIN, 2002).

A apoptose requer a ativação de uma cascata de eventos bioquímicos regulados geneticamente. A mitocôndria age como executor central da apoptose, onde os estímulos apoptóticos induzem a transição de permeabilidade mitocondrial, despolarização de membrana e liberação da citocromo C. A ligação do citocromo C com o Apaf-1 (fator ativador da protease apoptótica) desencadeia a ativação da caspase 9, iniciada na cascata proteolítica. Entre as caspases efetoras, a caspase 3 e seu substrato são responsáveis pela característica morfológica das células apoptóticas. Seguida a ativação da caspases, a membrana celular perde sua assimetria e a fosfatidilserina é externada para o folheto externo da membrana plasmática. Além disso, haverá a promoção de condensação cromatínica e as endonucleases induzem a fragmentação do DNA nuclear (TUSCHL & SCHWAB, 2003).

A apoptose pode ser induzida no curso normal de crescimento e desenvolvimento de tecidos e, além disso, por uma variedade de compostos e condições. A apoptose é a principal via de morte celular e é necessária para a manutenção da cinética do equilíbrio de tecidos saudáveis. Evidências indicam que a apoptose pode representar um mecanismo para a deleção seletiva de células cuja sobrevivência prejudicaria o organismo como um todo (STEINERT, 1996).

A ação de certas substâncias químicas em animais ativa algumas enzimas específicas, podendo causar quebras no material genético e induzir a apoptose (PEITSCH et al. 1994).

A caracterização de células apoptóticas e/ou necróticas tem sido baseada na morfologia celular e na detecção de fragmentação de DNA por técnicas bioquímicas e histoquímicas (HUPPERTZ et al., 1999; WILLINGHAM, 1999). Tanto a falta de ATP como o aumento da intensidade do estímulo podem resultar no aborto da apoptose e, conseqüentemente, numa mistura de características apoptóticas e necróticas (LEIST et al., 1997; LEIST & NICOTERA, 1997; HIRSCH et al., 1997; GREEN & REED, 1998). Similarmente, a morte celular mediada pela cascata de caspases pode servir como precursora de necrose secundária (GREEN & REED, 1998).

A utilização de marcadores fluorescentes na determinação de morte celular vem se mostrando um excelente método pela simplicidade, rapidez e sensibilidade desses

marcadores. Tanto o Iodeto de Propídio (IP) como o Hoechst são marcadores específicos para evidenciar ácidos nucleicos de cadeia dupla. O iodeto de propídio é um reagente muito utilizado para a marcação de células apoptóticas. Em células saudáveis, a integridade da membrana plasmática não permite a entrada do iodeto de propídio devido à sua característica polar (hidrofílico), diferente das células em processo de morte que, devido às alterações na membrana, permitem a entrada desse marcador. Após a entrada, o corante se liga com os ácidos nucleicos, emitindo luz vermelha, quando expostos à radiação ultravioleta. O Hoechst 33342 é um marcador que apresenta baixa citotoxicidade e se intercala entre as regiões A-T do DNA (TAS & WESTERNENG, 1981).

e. Ensaio de micronúcleos e de anormalidades nucleares

Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (SCHMID, 1976; AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genotóxicos e mutagênicos, resultantes de exposição a um agente tóxico (HEDDLE et al., 1983). O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMID, 1976) e, mais tarde, estendido a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). Esse teste tem sido também aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes. Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para esse teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente, como um resultado de atividade clastogênica (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Sabe-se que os ensaios de anormalidades nucleares e de micronúcleos têm sido largamente aplicados, em peixes, para a investigação dos efeitos mutagênicos ambientais (AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; CARRASCO et al., 1990; HUGHES & HEBERT, 1991). Para Landolt & Kocan (1983) e Heddle et al. (1983), o teste de micronúcleo pisco é um dos mais promissores, baratos e rápidos para a avaliação de mutagenicidade.

O teste de micronúcleo é um teste simples e rápido, servindo para biomonitoramento da qualidade da água (BURGEOT et al., 1995). Hayashi et al. (1998) descrevem o teste do micronúcleo como uma técnica vantajosa, pelo fato de poder ser usado em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio de seu cariótipo.

Os ensaios de micronúcleos, especificamente em peixes, representam um meio sensitivo de medida de atividade mutagênica tanto em ensaios de laboratório como de campo (GRISOLIA & STARLING, 2001).

A técnica de micronúcleos em peixes tem utilizado convencionalmente eritrócitos, devido à facilidade de obtenção dessas células; à taxa mitótica relativamente alta do tecido hematopoiético, o qual oferece uma rápida resposta mutagênica em relação à exposição a xenobióticos; e à facilidade para a preparação de lâminas por meio de esfregaço sanguíneo (SCHMID, 1976; TICE & IVETT, 1985).

O teste de micronúcleos, em eritrócitos de peixes, tem sido utilizado largamente para detectar os efeitos genotóxicos de mutágenos no meio ambiente e sua freqüência é considerada o reflexo dos danos mutagênicos nas células, principalmente nos cromossomos (ATEEQ et al., 2002).

Al-Sabti et al. (1994) investigaram os efeitos citotóxicos do cromo (tri e hexavalente) em sistemas-teste de peixes, empregando o teste do micronúcleo. Os autores observaram que a exposição dos animais, em águas com concentrações diversas de cromo, causou um aumento na freqüência de micronúcleos, quando comparado com um grupo controle.

Minissi et al. (1996) utilizaram o teste do micronúcleo em *Barbus plebejus* para trabalhos de monitoramento *in situ* de dois rios italianos, caracterizados por diferentes níveis de poluição por compostos químicos. Os autores verificaram que a freqüência de micronúcleos parecia estar fortemente relacionada com a qualidade da água, mostrando assim uma resposta adequada para ser usada como teste de biomonitoramento ambiental.

Hose et al. (1984) e Das & Nanda (1986) constataram que muitos agentes clastogênicos e mutagênicos, tais como o benzopireno e a mitomicina C, induzem a formação de micronúcleos. Hose et al. (1987), por sua vez, usando o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrus clathratus*) de um rio do sul da

Califórnia, mostraram que a presença de pesticidas como o DDT e o PCB no ambiente não resultou em um aumento significativo na frequência de micronúcleos.

Segundo Ateeq et al. (2002), o aumento da frequência de micronúcleos e de células alteradas foi significativo, quando eritrócitos do peixe-gato (*Clarias batrachus*) foram analisados, após a exposição aos herbicidas 2,4-D e butacloro. Houve uma positiva relação de dose-resposta em todas as exposições aos dois herbicidas e em todos os tempos de exposição testados.

f. Ensaio de cometa

O ensaio de cometa é particularmente uma técnica valiosa e barata, que permite a detecção de diferenças intercelulares no dano e reparo de DNA, em qualquer população de célula eucariótica que pode ser obtida por uma suspensão celular simples (SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). A técnica requer pequenas amostras celulares (1-10000 células) e os resultados podem ser obtidos em um único dia. Ostling & Johanson (1984) e Olive et al. (1990) têm mostrado que a sensibilidade do ensaio de cometa em detectar danos em células simples é comparável a outros métodos de avaliação, sendo usado na investigação da genotoxicidade de vários agentes (SINGH et al., 1988, 1991; TICE et al., 1990; OLIVE et al. 1991, 1992; BETTI et al., 1993).

O ensaio de cometa é uma técnica promissora, especialmente diante de agentes químicos (RIBAS et al., 1995). O ensaio de eletroforese de células únicas em gel é uma técnica poderosa para a detecção de quebras de DNA e danos em locais álcali-sensitivos em células eucarióticas (OLIVE et al., 1990).

Ostling & Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de eletroforese em gel para detectar danos de DNA na taxa de células únicas. Nessa técnica, as células embebidas em agarose foram colocadas em uma lâmina de microscopia, lisadas por detergentes e sais, e o seu DNA liberado para ser submetido à eletroforese sob condições neutras. As células com uma alta frequência de quebras duplas do DNA (DBS) mostraram uma migração crescente de DNA em direção ao ânodo. A migração de DNA foi quantificada

por coloração com brometo de etídeo e através da medida da intensidade da fluorescência de duas posições fixas, dentro do padrão de migração, usando um fotômetro microscópico. As condições neutras usadas limitaram a utilidade geral do ensaio.

O método do ensaio do cometa foi desenvolvido por Singh et al. (1988), que adaptaram outras metodologias já utilizadas, para desenvolver uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE – single cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Essa técnica evidencia a ocorrência de quebras em cadeias simples do DNA. A visualização subsequente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio bastante adequado para detectarem-se danos no DNA em células únicas. Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios, porém, recentemente, Mcnamee et al. (2000) propuseram modificações nos métodos ortodoxos de célula única, fazendo com que várias células fossem processadas, de uma só vez, aumentando a eficiência da técnica, sem comprometer a sua confiabilidade. Os resultados obtidos por eles demonstraram-se similares àqueles previamente relatados, quando utilizaram o ensaio de cometa convencional.

Durante a última década, o ensaio de cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, alcançando aplicações químicas para biomonitoramento ambiental, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética. Frenzilli et al. (2000) utilizaram o ensaio de cometa para a validação dos efeitos genotóxicos de 18 compostos químicos, revelando sua eficiência na identificação de agentes genotóxicos. Os mesmos pesquisadores também demonstraram que a produção de quebras nas fitas de DNA pode ser bem correlacionada com muitas propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos poluentes ambientais.

Considerada atualmente como uma das maiores ferramentas no biomonitoramento ambiental, o ensaio de cometa, pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vitro* ou *in vivo* e podem ser aplicadas com o propósito de análises genotoxicológicas (MONTEITH & VANSTONE, 1995). De acordo com Ribas et al. (1995), a simplicidade, a reprodução e a rapidez associada aos danos de DNA, pela técnica de cometa, torna o uso desse ensaio largamente aplicável à genotoxicologia ambiental.

Monteith & Vanstone (1995) compararam o potencial do ensaio de cometa, como teste genotoxicológico, com outras técnicas *in vitro* (aberrações cromossômicas e mutações,

utilizando células pulmonares V79 de hamsteres chineses) e *in vivo* (micronúcleos de medula óssea em camundongos e reparo de DNA em ratos), demonstrando que o cometa tem a habilidade de detectar danos no DNA, tanto quanto as demais técnicas.

Mitchelmore & Chipman (1998) concluíram que o ensaio de cometa é um método adequado como biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outros organismos aquáticos, destacando a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos de compostos químicos. Ainda segundo Nacci et al. (1996) e Belpaeme et al. (1996), o ensaio de cometa tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de muitas espécies de peixes expostas a diversos agentes genotóxicos, o que pode ser verificado através das quebras das fitas de DNA desses animais.

O estudo sobre a influência de uma mistura complexa de herbicidas (atrazina, 2,4-D, alaclora, ciazina e malathion) em trabalhadores ocupacionalmente expostos à mesma, foi realizado, utilizando-se de métodos citogenéticos padronizadamente estabelecidos (aberrações cromossômicas e ensaio de micronúcleos) e da técnica do Ensaio de Cometa. Esse ensaio mostrou um significativo aumento na migração do DNA ($P < 0,001$), sugerindo que uma exposição a longo prazo aos pesticidas poderia causar danos no genoma em células somáticas e, portanto, representaria um perigo potencial à saúde humana (GARAJ-VRHOVAC & ZELJEZIC, 2002).

Para a obtenção de dados mais concisos a respeito da genotoxicidade dos herbicidas triazínicos, Tennant et al. (2001) utilizaram a metodologia de ensaio do cometa, que se mostrou altamente sensível em detectar pequenas taxas de danos de DNA, além de requisitar um pequeno número de células para análise. De acordo com esse mesmo autor, o ensaio de cometa mostrou que a atrazina induziu um pequeno aumento de danos de DNA em leucócitos de ratos. Além disso, pela técnica de cometa, Clements et al. (1997) relataram que a atrazina, na forma comercial (AAtrex Nine-O), induziu um dano significativo no DNA de eritrócitos de algumas espécies de sapos.

A genotoxicidade de herbicidas, como a atrazina, também tem sido avaliada pelo ensaio de cometa, através da utilização de linfócitos sanguíneos humanos. Segundo Ribas et al. (1995), células sanguíneas tratadas com o herbicida atrazina, nas concentrações de 50-200 $\mu\text{g/l}$, mostraram uma extensa migração de DNA, principalmente nas concentrações de

100 e 200 µg/l. Tais dados indicaram que o SCGE tem sido altamente sensível na detecção do dano de DNA, induzido pelo herbicida testado, sugerindo a alta habilidade do ensaio cometa em detectar danos de DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., 1990; OLIVE et al., 1992; BETTI et al., 1993).

ARTIGO 1

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
POR MEIO DO ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, UTILIZANDO
SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa***

Bruna de Campos Ventura¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro/SP

Manuscrito submetido à Revista "Mutation Research"

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
POR MEIO DO ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, UTILIZANDO
SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa***

RESUMO

A atrazina é um herbicida que pode provocar sérios danos ao meio ambiente e, possivelmente, comprometer o material genético de organismos que entram em contato com esse agente, provocando mutações no seu DNA. Foi avaliada a mutagenicidade de diferentes concentrações do herbicida atrazina, através do ensaio de aberrações cromossômicas, utilizando *Allium cepa* como sistema-teste. Diferentes concentrações do herbicida atrazina (0,015; 0,031; 0,062 e 0,125ppm) induziram alterações genéticas no organismo-teste, tais como: anáfases multipolares, pontes, quebras e perdas cromossômicas, micronúcleos, atrasos anafásicos e telofásicos, C-metáfases e prófases com perda de material genético. A freqüente presença dessas aberrações sugere que esse pesticida apresente a característica de ser mutagênico para todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: atrazina, mutagenicidade, aberrações cromossômicas, *Allium cepa*.

**EVALUATION OF THE MUTAGENIC EFFECTS OF THE HERBICIDE
ATRAZINE, THROUGH THE CHROMOSOME ABERRATIONS TEST, USING
THE *Allium cepa* TEST-SYSTEM**

ABSTRACT

Atrazine is an herbicide that causes serious damage to the environment and possibly affects the genetic material of organisms that come into contact with this agent, provoking mutations in their DNA. The mutagenicity of different atrazine concentrations was determined using the *Allium cepa* test-system through chromosome aberrations test. Different concentrations of the herbicide (0,015; 0,031; 0,062 and 0,125ppm) induced the following alterations in the genetic material of the test organism: multipolar anaphases, chromosome bridges, breaks and losses, micronuclei, anaphase and telophase delays, C-metaphases, and prophases with loss of genetic material. The frequent presence of these aberrations suggests that this herbicide is mutagenic for all concentrations tested.

Keywords: atrazine, mutagenicity, chromosome aberrations, *Allium cepa*.

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de substâncias químicas com potencial mutagênico, tanto naturais como sintéticas, tem sido pesquisada. Muitas dessas substâncias são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos agrotóxicos e nos complexos de efluentes domésticos e industriais. Sabe-se que muitos desses compostos podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, sem que se expressem de imediato [1]. A preocupação com a proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que levam a possíveis alterações no material genético dos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de métodos que avaliam a genotoxicidade e a mutagenicidade de substâncias químicas [2].

Testes biológicos de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade são, segundo Moraes [3], indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental e também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes.

A maioria dos testes realizados com substâncias mutagênicas baseia-se na avaliação da indução de danos cromossômicos, tais como alterações estruturais, formação de micronúcleos, trocas entre cromátides-irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA. Para essa avaliação são utilizados diferentes organismos como bactérias, insetos, plantas e vertebrados, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* [4].

Para Veiga [5], hoje, através de métodos relativamente simples, é possível estimar o efeito genotóxico, mutagênico, carcinogênico e teratogênico de vários agrotóxicos. Dentre esses agrotóxicos está o herbicida triazínico atrazina, classificado como moderadamente tóxico de pré e pós-emergência. Esse herbicida é utilizado para o controle de ervas daninhas em culturas de aspargo, milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi [6]. Segundo Eldrige et al. [7], os herbicidas triazínicos estão entre os pesticidas mais utilizados na agricultura.

A atrazina tem sido testada em vários sistemas, mas há deficiências em relação a certos testes realizados, sendo que algumas evidências de efeitos genotóxicos, *in vivo*, precisam ainda ser confirmadas [8].

testes, realizados geralmente em organismos-teste, são comumente aplicados no biomonitoramento da extensão da poluição, e na avaliação dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas, sobre os organismos no ambiente natural [3].

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) tem sido indicado como um eficiente organismo-teste de genotoxicidade e mutagenicidade. Essa eficiência é dada pelas características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho [9,10].

O uso do *Allium cepa* (cebola) como material-teste foi originalmente introduzido em 1920 e, a partir daí, tem sido utilizado para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente [9]. Essa espécie tem sido utilizada como material vegetal teste indicador de mutagenicidade por diversos autores como Rank and Nielsen [11, 12, 13], Khors et al. [14], Smaka-Kincl et al. [15], Kovalchuck et al. [16], Chauhan et al. [17], Ventura et al. [18, 19], Ventura and Marin-Morales [20], Fernandes et al. [21, 22] e Matsumoto et al. [23], dentre outros. Testes com *Allium cepa* são adequados por se basearem em parâmetros microscópicos, podendo ser observadas anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, C-mitoses ou C-metáfases e micronúcleos, que são indicadoras de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

Segundo Fiskesjö [9], resultados positivos, obtidos pelo teste de *Allium cepa*, devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos em outros organismos.

Para Chauhan et al. [17], o *Allium cepa* é um dos melhores sistemas -teste já estabelecido, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de químicos no ambiente, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos. Para Rank and Nielsen [11], a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* é superior em 82% aos resultados obtidos com roedores.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material biológico utilizado como sistema -teste constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ($2n=16$ cromossomos), que foram submetidas à germinação em diversas concentrações do herbicida atrazina. A germinação ocorreu sempre em temperatura ambiente e em placas protegidas de luminosidade para a proteção de eventuais eventos de fotodegradação.

A atrazina (CAS nº 1912-24-9; pureza 97,7%) é um herbicida seletivo do grupo químico das triazinas (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), cuja fórmula empírica é $C_8H_{14}ClN_5$. As doses desse herbicida utilizadas em campo variam de 5 a 7 litros por hectare, os quais são diluídos em 200 a 400 litros de água, dependendo da cultura.

Cinquenta sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em soluções do herbicida atrazina na mínima concentração utilizada em campo (0,125ppm) e em concentrações progressivamente menores, como seguem: 0,062ppm, 0,031ppm e 0,015ppm. Todos os testes foram feitos em duplicata, para se obter um amplo número amostral.

Todas as sementes foram submetidas à germinação em água milli-Q, até que as raízes atingissem 2cm de comprimento. Posteriormente, foram transferidas para placas contendo o herbicida atrazina em suas diferentes concentrações, com exceção do controle (que foi feito com sementes submetidas à germinação apenas em água milli-Q), sendo sempre uma placa para cada concentração. As sementes permaneceram nessas placas por 20 horas. Decorrido este tempo, foi coletada aproximadamente a metade das raízes de cada ensaio e o restante das raízes foi transferido para placas contendo água milli-Q, para um período de recuperação de 48 horas. Após esse período, foram realizadas novas coletas de raízes. Todas as raízes coletadas foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético), por 6 a 18 horas.

Para a realização das análises citológicas, os meristemas foram submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 11 minutos, seguido de uma lavagem em água destilada. A coloração foi feita com Reativo de Schiff, por duas horas em local escuro. Todas as lâminas foram obtidas submetendo os meristemas a um esmagamento suave do material entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio

líquido e as lâminas foram montadas em Entellan, para serem posteriormente observadas.

Foram analisadas as células que apresentaram anormalidades como: células portadoras de micronúcleos, prófases com perda de material genético, aderências cromossômicas na metáfase, C-metáfases, anáfases irregulares (anáfases multipolares, com atraso, pontes anafásicas), células com perdas e quebras cromossômicas e células com atraso e ponte telofásicas. Também foram verificadas as freqüências relativas das células que apresentaram aberrações cromossômicas. Os resultados de cada concentração foram avaliados e comparados entre si, e as melhores figuras foram fotodocumentadas. A análise estatística dos dados foi feita pelo método de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

A freqüência de células aberrantes (F.A.), observadas para raízes submetidas ao tratamento com água mill-Q (controle), foi nula (0%), uma vez que não foram registrados quaisquer tipos de anormalidades no ciclo celular e/ou nos cromossomos desse material. As freqüências médias de células com aberração, resultantes da exposição às diversas concentrações do herbicida atrazina, apresentaram diferenças entre os tratamentos realizados (20h e 48h). As F.A. foram de 1,07%; 1,28%; 2,36% e 1,59% para as raízes tratadas com atrazina por 20h a 0,015ppm; 0,031ppm; 0,062ppm e 0,125ppm, respectivamente (Tabela 1). As F.A. para essas mesmas raízes, quando transferidas para placas com água milli-Q, pelo período de 48h de recuperação, foram de: 0,53%; 0,53%; 0,30% e 0,80%, respectivamente (Tabela 1).

Os tipos de aberrações e/ou alterações mais freqüentemente observados nas células submetidas às diversas concentrações do herbicida atrazina, durante o período de 20 horas e durante o período de recuperação de 48h em água milli-Q, foram: anáfase multipolar, pontes anafásica e/ou telofásica, quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase, atraso anafásico, micronúcleo, aderência cromossômica, C-metáfase, perda de material genético na prófase, atraso telofásico e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (Tabela 1, Figura 1).

Os tipos e as freqüências de aberrações, nas células submetidas às diversas concentrações do herbicida atrazina, durante o período de 20 horas, foram os seguintes:

- concentração de 0,015ppm: anáfase multipolar (0,065%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,03%), quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,015%), atraso anafásico (0,05%), micronúcleo (0,34%), C-metáfase (0,24%), perda de material genético na prófase (0,214%), atraso telofásico (0,09%) e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,03%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,031ppm: anáfase multipolar (0,05%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,355%), quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,10%), atraso anafásico (0,135%), micronúcleo (0,25%), C-metáfase (0,225%), perda de material genético na prófase (0,115%) e atraso telofásico (0,055%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,062ppm: anáfase multipolar (0,005%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,04%), quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,01%), atraso anafásico (0,11%), micronúcleo (0,205%), C-metáfase (0,09%), perda de material genético na prófase (0,145%), atraso telofásico (1,67%), aderência cromossômica na metáfase (0,08%) e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,01%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,125ppm: anáfase multipolar (0,215%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,22%), quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,055%), atraso anafásico (0,265%), micronúcleo (0,30%), C-metáfase (0,12%), perda de material genético na prófase (0,075%), atraso telofásico (0,29%), aderência cromossômica na metáfase (0,01%) e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,045%) (Tabela 1, Figura 1).

Já os tipos e as freqüências de aberrações, nas células submetidas às diversas concentrações do herbicida atrazina, durante o período de recuperação de 48 horas, foram os seguintes:

- concentração de 0,015ppm – tratamento de recuperação: anáfase multipolar (0,03%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,065%), atraso anafásico (0,035%), micronúcleo (0,225%), C-metáfase (0,075%), perda de material genético na prófase (0,03%), atraso telofásico (0,035%) e aderência cromossômica na metáfase (0,03%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,031ppm – tratamento de recuperação: anáfase multipolar (0,095%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,035%), atrasos anafásico (0,21%), micronúcleo (0,045%), C-metáfase (0,08%), aderência cromossômica na metáfase (0,015%) e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,055%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,062ppm – tratamento de recuperação: anáfase multipolar (0,045%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,03%), quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase (0,005%), atraso anafásico (0,03%), micronúcleo (0,08%), C-metáfase (0,03%), atraso telofásico (0,06%) e aderência cromossômica na metáfase (0,025%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 0,125ppm – tratamento de recuperação: anáfase multipolar (0,017%), ponte anafásica e/ou telofásica (0,005%), atraso anafásico (0,017%), micronúcleo (0,275%), C-metáfase (0,405%), perda de material genético na prófase (0,025%) e atraso telofásico (0,055%) (Tabela 1, Figura 1).

Dentre as alterações encontradas na análise do material exposto ao herbicida atrazina, pode-se observar que a maioria delas está relacionada com perda de material genético (visualizadas pebs eventos de pontes, quebras e atrasos cromossômicos), conforme pode ser observado na Figura 1. Essas perdas estão associadas à presença de micronúcleos em células interfásicas das gerações seguintes.

A frequência total de aberrações cromossômicas observada para a concentração de 0,062ppm (2,360%) foi considerada significativa ao nível de 5% (Teste de Kruskal-Wallis), quando comparada com os resultados obtidos no controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As frequências de células aberrantes totais, observadas para todas as concentrações testadas do herbicida atrazina, para ambos os tratamentos (20h e recuperação), mostraram valores mais altos que o observado no teste controle. Foi observado para a concentração de 0,062ppm um maior valor percentual de células aberrantes, que pôde ser comprovado pelos testes estatísticos realizados (significativos a 5%), confirmando a alta mutagenicidade das concentrações mais altas desse herbicida. A concentração de 0,062ppm foi a que mais induziu alterações celulares, podendo ser a

mesma considerada, dentre as concentrações testadas, como a concentração diagnóstica de mutagenicidade para o herbicida atrazina.

É importante considerar que a concentração de 0,125ppm induziu uma frequência menor de células aberrantes quando comparada à concentração de 0,062ppm do herbicida atrazina. Segundo Ventura [24], isso pode ser explicado porque a concentração de 0,125ppm do herbicida atrazina inibiu o índice mitótico das células de raízes de *Allium cepa*, sendo que aproximadamente 85% dessas células apresentavam-se em intérfase. Além disso, aproximadamente 2,5% das raízes tratadas com 0,125ppm do herbicida atrazina encontravam-se em processo de morte celular. Essa concentração (0,125ppm) apresentou, então, um efeito citotóxico mais drástico que as demais concentrações, levando as células à morte celular.

Decorrido o período de recuperação, foram observadas menores frequências de células aberrantes em todos os testes realizados. Dessa maneira, o período de recuperação de 48h, em água milli-Q, parece ter sido eficiente para minimizar o efeito mutagênico do herbicida em células de *Allium cepa*, pois houve uma diminuição das frequências de aberrações cromossômicas ou, até mesmo, o desaparecimento de algumas das aberrações antes observadas.

Nossos resultados mostraram a presença de diferentes aberrações cromossômicas nos diversos testes realizados. Através das observações realizadas, verificou-se a presença de anáfases multipolares, as quais, segundo Rank and Nielsen [12], ocorrem devido ao mau funcionamento do fuso mitótico, responsável pela distribuição irregular dos cromossomos, encaminhando-os para mais de dois pólos das células, o que contraria o evento de divisão celular normal.

Outras alterações celulares encontradas foram quebras cromossômicas, na metáfase e/ou na anáfase, atrasos cromossômicos e pontes anafásicas e telofásicas. Segundo Fiskesjö [25], as quebras cromossômicas podem ser decorrentes de pontes anafásicas, as quais podem ser originadas por translocações ou simplesmente por terminações cromossômicas coesivas. É possível que as pontes resultem, também, de aderências cromossômicas, podendo, neste caso, serem múltiplas e persistirem até a telófase. Quando as pontes cromossômicas resultam de rearranjos estruturais, elas podem ocasionar fragmentações cromossômicas [26].

Nossos dados também descrevem a presença de micronúcleos, que podem ter sido originados, de acordo com Sudhakar et al. [27], de um atraso cromossômico na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso ou ainda devido à presença de fragmentos acêntricos, derivados de uma resposta clastogênica. Assim, agentes químicos podem induzir micronúcleos, por meio de distúrbios do fuso ou de quebras cromossômicas.

Assim como Sudhakar et al. [27], nós sugerimos que os micronúcleos podem ser formados pelos atrasos cromossômicos na anáfase e por fragmentos acêntricos. Porém, sugerimos ainda que, pelas nossas observações citológicas que evidenciam a presença de pontes cromossômicas em anáfase, os micronúcleos derivados de fragmentos acêntricos devem corresponder às regiões terminais dos cromossomos, que foram perdidas durante a quebra.

A presença de C-metáfases é mais um indicativo da mutagenicidade do herbicida atrazina. Nas C-metáfases ou C-mitoses, o fuso nuclear é completamente inativado, o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e, conseqüentemente, a divisão do centrômero é atrasada ou até mesmo impedida. Desta forma, a presença de células em C-metáfase, continuamente, poderá conduzir a duplicação do número de cromossomos dessas células. Um o utro ef eito da C-metáfase pode ser a produção de números cromossômicos variáveis, isto é, a produção de células displóides. Então, um desvio muito grande em relação ao número cromossômico normal induzirá a um desbalanço cromossômico, com perda de viabilidade, inativação parcial ou completa do fuso nuclear e aumento da contração cromossômica. Segundo Fiskesjö [9,25], a C-metáfase deve ser referida como um mecanismo causador de sérios danos, podendo ser incluída entre os parâmetros para um *screening* dos efeitos genotóxicos e mutagênicos.

Outra alteração encontrada nas células em divisão mitótica foi a existência de metáfases com aderência cromossômica. A atuação do herbicida na célula, possivelmente, impede a migração cromossômica para os pólos, devido à sua ação aneugênica. Há então um estacionamento da divisão celular em metáfase, o que provoca uma continuidade na condensação dos cromossomos, que acaba promovendo uma força de contração do conjunto cromossômico total, decorrendo assim em aderências cromossômicas. Segundo Giacomelli [26], a aderência cromossômica é um fenômeno citogenético amplamente descrito em plantas. Embora sua primeira descrição tenha sido

feita por Köernicke, no início do século passado, o termo *stickiness* foi empregado pela primeira vez em 1932, por Beadle, para descrever o aspecto pegajoso de cromossomos de milho, em células que haviam sofrido uma mutação recessiva.

Todas essas alterações cromossômicas citadas, tais como anáfases multipolares, pontes, quebras e perdas cromossômicas, micronúcleos, aderências cromossômicas e C-metáfases, além de atrasos anafásicos e telofásicos, e prófases com perda de material genético, que foram observadas nos bioensaios realizados, sugerem que esse pesticida apresenta uma alta mutagenicidade, sendo que as concentrações mais altas mostraram-se mais mutagênicas que as concentrações mais baixas. Como todas as concentrações testadas do herbicida atrazina mostraram efeitos mutagênicos, quando comparadas com o teste controle, podemos sugerir que doses residuais deste herbicida podem constituir um problema para organismos expostos a este químico. Assim, o herbicida atrazina pode apresentar uma potencialidade em causar problemas à saúde humana, pela mutagenicidade registrada em outro organismo eucarioto e, portanto, pode também apresentar uma potencialidade carcinogênica, pelo menos para as concentrações testadas nesta pesquisa.

Nota: Valores seguidos por * diferiram significativamente (5%), em relação ao controle, através da análise dos postos médios pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tratamento	Controle negativo		Atrazina 0,015ppm		Atrazina 0,031ppm		Atrazina 0,062ppm		Atrazina 0,125ppm	
	20h	48h								
Anáfase multipolar	0	0	0,065	0,030	0,050	0,095	0,005	0,045	0,215	0,017
Pontes anafásica e/ou telofásica	0	0	0,030	0,065	0,335	0,035	0,040	0,030	0,220	0,005
Quebra cromossômica	0	0	0,015	0	0,100	0	0,010	0,005	0,055	0
Atraso anafásico	0	0	0,050	0,035	0,135	0,210	0,110	0,030	0,265	0,017
Micronúcleo	0	0	0,340	0,225	0,250	0,045	0,205	0,080	0,300	0,275
C-metáfase	0	0	0,240	0,075	0,225	0,080	0,090	0,030	0,120	0,405
Perda de material genético na prófase	0	0	0,214	0,030	0,115	0	0,145	0	0,075	0,025
Atraso telofásico	0	0	0,090	0,035	0,055	0	1,670	0,060	0,290	0,055
Aderência metafásica	0	0	0	0,030	0	0,015	0,080	0,025	0,010	0
Perda cromossômica	0	0	0,030	0	0	0,055	0,010	0	0,045	0
Frequência total de aberrações	0	0	1,070	0,530	1,280	0,530	2,360*	0,300	1,590	0,800
N ^o total de células analisadas	11415	11571	9975	10345	10579	9518	10249	10740	11028	10105

Nota: Valores seguidos por * diferiram significativamente (5%), em relação ao controle, através da análise dos postos médios pelo teste de Kruskal-Wallis.

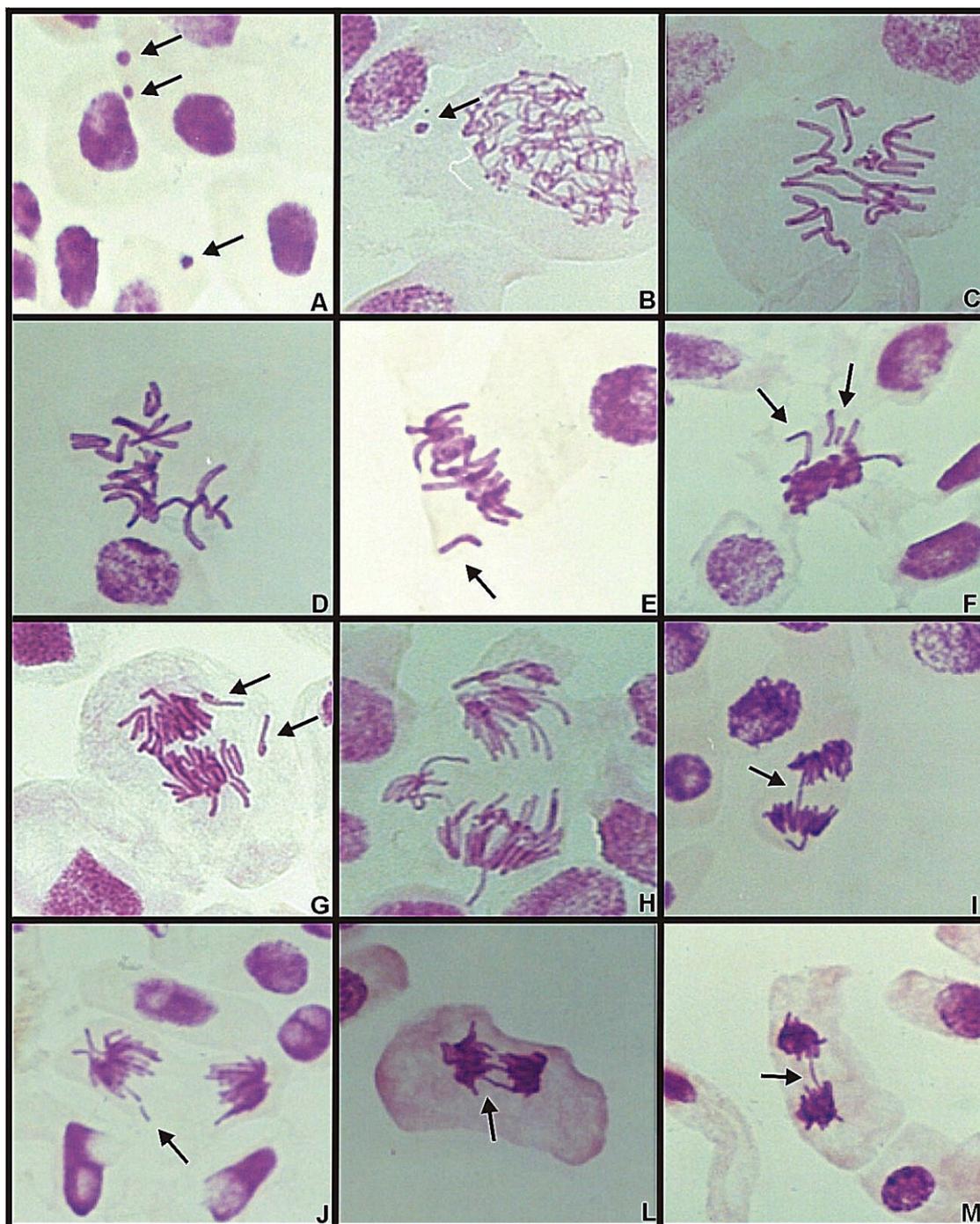


Figura 1: Células portadoras de aberrações cromossômicas, após o tratamento com as diferentes concentrações do herbicida atrazina.

A. células interfásicas portadoras de micronúcleos; **B.** célula no estágio de prófase portando perda de material genético, aparentando um micronúcleo; **C e D.** célula em C-metáfase; **E.** célula em metáfase, apresentando perda cromossômica; **F.** célula metafásica com adreência, perda e quebras cromossômicas; **G.** célula anafásica com perdas cromossômicas **H.** célula com anáfase multipolar ; **I.** célula anafásica com atraso cromossômico; **J.** célula anafásica com quebra cromossômica; **L.** célula anafásica com pontes cromossômicas; **M.** célula em telófase inicial, apresentando ponte cromossômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E.W. Vogel. Assessment of chemically-induced genotoxic events, in: *Prospectives and Limitations*, Leiden, The Netherlands, 1982, pp. 24-29.
- [2] D. Brusick. General Toxicology, in: *Principles of Genetic Toxicology*, New York, Estados Unidos, 1987, pp. 421-432.
- [3] D.S.L. Moraes. Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa*, Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2000, pp. 1-158.
- [4] L.F.M. Peña, Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios, Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 1996, pp. 1-199.
- [5] A.B. Veiga. O uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron, Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 1995, pp. 1-58.
- [6] N.E. Popa, A.M. Zakrzhevskaya, R.V. Kozhokaru, D.K. Enaki. Cytogenetic effect of some herbicides on maize seedlings *Weed Abstr.* 35 (1986) 50.
- [7] J.C. Eldridge, L.T. Wetzel, J.T. Stevens, J.W. Simpkins. The mammary tumor response in triazine-treated female rats: a threshold-mediated interaction with strain and species specific reproductive senescence, *Steroids* 4 (1999) 672-678.
- [8] G. Ribas, J. Surrallés, E. Carbonell, A. Creus, N. Xamena, R. Marcos. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* 416 (1998) 93-99.

[9] G. Fiskesjö. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas* 102 (1985) 99-112.

[10] B. Quinzani-Jordão. Ciclo celular em merístemos. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas, Tese (Doutorado em Genética), Universidade de Complutense, Madrid, 1987, pp. 1-276.

[11] J. Rank, M.H. Nielsen. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, *Hereditas* 118 (1993) 49-53.

[12] J. Rank, M.H. Nielsen. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-Nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfone, *Mutat. Res.* 390 (1997) 121-127.

[13] J. Rank, M.H. Nielsen. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Mutat. Res.* 418 (1998) 113-119.

[14] S.S. Khors, K.K. Panda, B.B. Panda. Genotoxicity of tetrodotoxin from buffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa*, *Mutagenesis* 12 (1997) 265-269.

[15] V. Smaka-Kincl, P. Stegnar, T.M.A.M. Loukam The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure, *Mutat. Res.* 38 (1997) 171-179.

[16] O. Kovalchuck, I. Kovalchuck, A. Arkhipov, P. Telyuk, B. Hohn. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident, *Mutat. Res.* 415 (1998) 4757.

[17] L.K.S. Chauhan, P.M. Savena, S.K. Gupta. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Environ. Exp. Botany* 42 (1999) 181-189.

[18] B.C. Ventura, T.C.C. Fernandes, S.T. Matsumoto, W. Spinosa, M.A. Marin-Morales. O uso do *Allium cepa* na investigação da mutagenicidade derivada de possíveis persistências de agrotóxicos na sub-bacia do Pari-Veado, Gen. Mol. Biol.: Supl. 23 (2000) 690.

[19] B.C. Ventura, T.C.C. Fernandes, M.A. Marin-Morales. Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema -teste de *Allium cepa*, Gen. Mol. Biol.: Supl. 25 (2002) 5.

[20] B.C. Ventura, M.A. Marin-Morales. Avaliação dos efeitos genotóxicos do herbicida atrazina, usando sistema -teste de *Allium cepa*, Gen. Mol. Biol.: Supl. 26 (2003) 202.

[21] T.C.C. Fernandes, B.C. Ventura, M.A. Marin -Morales. Uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina, Gen. Mol. Biol.: Supl. 24 (2001) 4.

[22] T.C.C. Fernandes, B.C. Ventura, M.A. Marin -Morales. O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*, Gen. Mol. Biol.: Supl. 25 (2002) 5.

[23] S.T. Matsumoto, M.I. Malagutti, M.A. Marin-Morales. Avaliação genotóxica de um córrego, município de Franca/SP, que recebe efluente de curtume, utilizando *Allium cepa* como organismo-teste, Gen. Mol. Biol.: Supl. 26 (2003) 200.

[24] B.C. Ventura. Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do herbicida atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa*, Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, Brasil, 2002, pp.1- 81.

[25] G. Fiskesjö. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.), Environ. Toxicol. Water Qual. 8 (1993) 461-470.

[26] F.R.B. Giacomelli. A valiação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul, Tese (Mestrado em Genética), Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 1999, pp.1-131.

[27] D. Sudhakar, K.K. Panda, B.B. Panda. Biomonitoring of lowlevels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay, Mutat. Res. 203 (1998) 11-21.

ARTIGO 2

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
PELA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR, EM
SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa***

Bruna de Campos Ventura¹, William Fernando Antonialli Junior¹,
Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro/SP

Manuscrito submetido à Revista “Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology”

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
PELA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR, EM SISTEMA-
TESTE DE *Allium cepa***

RESUMO

A atrazina é um herbicida que vem causando preocupações no Brasil, pois o seu efeito sobre os organismos tem mostrado um alto potencial tóxico. Foi investigada a indução de morte em células meristemáticas de *Allium cepa*, expostas à concentração de atrazina utilizada em campo e em concentrações progressivamente inferiores. Para a realização desse estudo, as sementes foram submetidas à germinação em água Milli-Q, até atingirem 2 cm de comprimento. Posteriormente, foram transferidas para as placas contendo o herbicida nas várias concentrações, onde as sementes permaneceram por 20h. As lâminas, com os materiais submetidos à ação do herbicida, foram coradas com Corantes Vitais (iodeto de propídio e Hoechst). A indução de morte celular no organismo-teste foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do herbicida. As maiores concentrações levaram a um maior comprometimento das células que, provavelmente, devem levar os organismos à morte. As menores concentrações, apesar de uma menor indução de morte celular, podem provocar um retardo no desenvolvimento do organismo. Assim, doses residuais do herbicida estudado podem levar ao desencadeamento de problemas para as próximas gerações celulares, decorrentes de divisões das células afetadas pela ação do herbicida atrazina.

Palavras-chave: Morte celular, efeitos citotóxicos, atrazina, *Allium cepa*.

**INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF THE HERBICIDE
ATRAZINE, THROUGH THE CELL DEATH INDUCTION,
USING THE *Allium cepa* TEST-SYSTEM**

ABSTRACT

The herbicide atrazine has been a source of concern in Brazil because of its high toxic potential for organisms. We investigated the induction of death of *Allium cepa* meristematic cells exposed to the concentrations of atrazine used in the field and to progressively lower concentrations of these herbicides. *Allium cepa* seeds were allowed to germinate in Milli-Q water until the roots reached 2 cm in length, when they were transferred to plates containing the various concentrations of the herbicide and left there for 20h. Slides prepared with the root material were stained with the vital stains propidium iodide and Hoechst. An increase in cell death induction directly proportional to the increase in herbicide concentration was observed in the test organism. The higher concentrations led to greater cell impairment, probably causing the death of the organism, while the lower concentrations, although causing a lower cell death rate, can cause a delay in the development of the organism. Thus, residual doses of the herbicide studied can induce problems for the next cell generations due to the division of cells affected by the action of the herbicide atrazine.

Keywords: Cell death, cytotoxic effects, atrazine, *Allium cepa*.

INTRODUÇÃO

Atualmente, nos países agrícolas, a aplicação de pesticidas, principalmente dos herbicidas, tem tido grande importância, permitindo uma maior produção agrícola e uma melhor qualidade dos produtos. No entanto, a maioria das ações tóxicas dos herbicidas sobre animais e plantas foi pouco investigada (Kim and Feagley 1998, Abdel-Ramham et al 1999). Como consequência da falta de esclarecimento sobre o papel dos herbicidas no meio biológico, esses agentes químicos também acabam representando danos aos ecossistemas e problemas à saúde humana (Gorell et al 1998).

A preocupação com a proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que levam a possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de diversas metodologias que avaliam a genotoxicidade de substâncias químicas (Brusick 1987). Muitos trabalhos têm sido realizados por diversos pesquisadores preocupados com os efeitos nocivos e tóxicos dos defensivos agrícolas, na tentativa de verificar os seus possíveis efeitos fisiológicos (Almeida 1974, Pavanelli 1995), mutagênicos (Dassenoy and Meyer 1973, Sakamoto and Takahashi 1979, Ventura et al 2000, 2002, Ventura and Marin-Morales 2003, Fernandes et al 2001, 2002, Matsumoto et al 2003) e carcinogênicos (Terracini 1977).

De acordo com Mello et al (2001), agentes indutores de estresse, tais como radiação, drogas, choques térmicos, metais pesados, álcoois, hipóxia, jejum, inibidores metabólicos, agentes oxidantes e infecções virais, entre outros, podem induzir a morte celular.

Segundo Kaioumova et al (2001), a perturbação de células por agentes químicos, como os herbicidas, pode levar a uma seqüência complexa de eventos que podem resultar em morte celular, tanto de maneira apoptótica como necrótica.

Atualmente, Proskuryakov et al (2003) determinaram que o termo apoptose pode ser atribuído ao processo de eliminação celular, sem um rompimento aparente da membrana plasmática, enquanto a necrose é um tipo de morte celular acompanhada por um rápido efluxo de constituintes celulares no espaço extracelular.

Morfologicamente, a necrose é um pouco diferente da apoptose “clássica”. Durante a necrose, as células primeiramente incham, a membrana plasmática se colapsa, e as células são rapidamente lisadas. Durante a apoptose, as células primeiramente se

reduzem e depois seus núcleos se condensam, sendo, finalmente, desintegrados em corpos apoptóticos (Majno and Joris 1995).

Diferentemente da apoptose, que é um fenômeno ocorrente com células únicas, a necrose tem sido freqüentemente descrita como um fenômeno multicelular. Em plantas, há vários tipos de morte celular, incluindo morte espontânea, como, por exemplo, das flores; mortes ativadas através de mecanismos oxidativos ou de estresse; mortes induzidas por agentes infecciosos ou por componentes químicos tóxicos, aparentemente como um mecanismo de defesa; e mortes induzidas por hipersensibilidade desse mecanismo de defesa (Zakeri and Lockshin 2002).

Como se sabe, os efeitos tóxicos de químicos podem levar a uma morte celular conhecida como necrose ou resultar na apoptose. Atualmente, é evidente que muitos químicos ambientais exercem toxicidade via sinalização celular apoptótica (Zakeri and Lockshin 2002).

A atrazina é um herbicida seletivo do grupo químico das triazinas, sendo considerado um pesticida da classe toxicológica III, ou seja, medianamente tóxico, e tem sido usada como um herbicida seletivo de pré e pós-emergência em culturas de aspargo, milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi. As doses utilizadas em campo variam de 5 a 7 litros por hectare, os quais são diluídos em 200 a 400 litros de água, dependendo da cultura.

De acordo com vários órgãos internacionais, incluindo o Environmental Protection Agency (EPA), o Development for Environmental Assessment Center dos Estados Unidos e o IARC Monographs (International Agency for Research on Cancer), o herbicida atrazina é um agente químico possivelmente carcinogênico para os seres humanos, embora o embasamento para essa conclusão seja apenas evidenciado em outros animais (Waters et al 1999).

De acordo com Ventura et al (2002), o herbicida atrazina induz a formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas em testes com *Allium cepa*, demonstrando os efeitos mutagênicos do herbicida, através das técnicas de citogenética convencional.

Para Grant (1982) e Chauhan et al (1999), o *Allium cepa* é um dos melhores sistemas-teste já estabelecidos, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial citotóxico de químicos no ambiente, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos.

O objetivo desse estudo foi investigar, através do uso dos Corantes Vitais Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio, os efeitos citotóxicos do herbicida atrazina, sob o processo de indução de morte celular, utilizando raízes de *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado como sistema-teste para investigar os efeitos citotóxicos do herbicida atrazina, sob o processo de indução de morte celular, através da Técnica de Corantes Vitais, foi constituído de sementes de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos).

Cinqüenta sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em soluções do herbicida atrazina nas concentrações utilizadas nas culturas (concentração de campo: 0,125ppm) e em três concentrações progressivamente menores, como seguem: 0,062ppm, 0,031ppm e 0,015ppm.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri e em temperatura ambiente. Primeiramente, todas as sementes foram submetidas à germinação em água milli-Q, até que as raízes atingissem 2cm de comprimento. Posteriormente, sementes germinadas foram transferidas para as placas contendo o herbicida atrazina em suas diferentes concentrações, sendo sempre uma placa para cada concentração do herbicida. O teste-controle foi realizado submetendo as sementes apenas à germinação em água milli-Q. As sementes permaneceram nessas placas por 20 horas e, após esse período, as raízes foram coletadas para serem processadas a fresco. Foram realizados cortes longitudinais na região meristemática dessas raízes que foram coradas, em lâmina, com uma gota do Corante Vital Hoechst 33342 (solução de 50 ug/ul). Após 10 minutos, o material foi transferido para uma outra lâmina e a ele foi acrescentada uma gota de iodeto de propídio (solução de 25 ug/ul). Ambas incubações foram feitas protegidas da luz. Na seqüência, o material foi analisado e fotografado em microscópio de fluorescência Leica DMLB, sob os filtros de excitação de 365nm e de barreira de 400nm.

Os resultados foram registrados da seguinte forma: as células com núcleos fluorescentes azuis foram consideradas vivas, e com integridade de membrana, e as células com núcleos

todas as células com integridade de membrana e o Iodeto de Propídio cora apenas o DNA de células sem integridade de membrana.

Foram realizadas análises comparativas de regiões meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. As análises foram feitas para as distintas concentrações do herbicida atrazina, bem como para o teste-controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as observações realizadas, foi possível verificar que a indução de morte celular em meristema de *Allium cepa* foi maior, à medida que se aumentou a concentração do herbicida atrazina, conforme pode ser verificado na Figura 1.

Embora a indução de morte celular tenha sido observada para todas as concentrações testadas, as concentrações do herbicida atrazina induziram uma resposta de morte celular mais restrita à região do procâmbio da raiz de *Allium cepa*. Com o aumento das concentrações, foi observado que, além da região procambial já descrita, as regiões do meristema fundamental e da protoderme também ficaram comprometidas (Figura 1).

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que o herbicida atrazina promoveu o desencadeamento da destruição de células, levando as mesmas ao processo de morte celular, mas nada podemos afirmar com relação ao tipo de morte celular, uma vez que a Técnica de Corantes Vitais não distingue células necróticas de apoptóticas. A metodologia aponta a presença de células vivas e células em processo de morte celular generalizada. Segundo Saraste and Pulkki (2000), a falta de critérios uniformes para diferenciar a apoptose de outros tipos de morte celular tem levado a interpretações confusas, principalmente nas situações em que a apoptose e a necrose são coexistentes.

O herbicida atrazina pode ter provocado tanto a morte celular do tipo apoptótica como necrótica, os quais poderiam ser distinguidos apenas pela aplicação de outras técnicas de morte celular. Segundo Huppertz et al (1999), a caracterização de células apoptóticas e/ou necróticas tem sido baseada na morfologia celular e na detecção de fragmentação de DNA por técnicas bioquímicas e histoquímicas. Estudos têm demonstrado que a apoptose e a necrose podem compartilhar mecanismos comuns nos primeiros estágios de morte celular e que finalmente a ativação de caspases determinaria

se a morte celular é fenotipicamente apoptótica ou necrótica (Hirsch et al 1997, Green and Reed 1998). De acordo com Proskuryakov et al (2003), tanto a apoptose como a necrose apresentam cascatas de quinases. Através da modulação dessa via de sinalização, em ambos os processos de morte celular, é possível identificar e distinguir a apoptose da necrose.

Segundo Duke et al (1996), um importante papel da morte celular, independentemente de ser apoptótica ou necrótica, induzida por agentes químicos, físicos ou biológicos é a eliminação de células que se tornaram malignas ou que iriam influenciar, negativamente, a manutenção do metabolismo normal do organismo.

Nossos resultados apontam para um maior comprometimento celular para concentrações mais altas do herbicida atrazina, resultados esses concordantes com os apresentados por Bayer et al (1967), que afirmam que os herbicidas atuam sobre os vegetais, diminuindo a zona de tecido meristemático e interrompendo o desenvolvimento da planta, por bloquear o processo de divisão celular. Sugerimos que o herbicida atrazina, provavelmente, promova a diminuição tecidual devido à ineficiência do organismo-teste em repor as células afetadas geneticamente pela ação desse herbicida e que, conseqüentemente, decorre em uma grande eliminação celular.

Nossas análises inferem que a técnica de coloração pelos corantes vitais iodeto de propídio e Hoechst mostrou-se indicada para a avaliação de indução de morte celular (sem a especificação do tipo de morte celular envolvido) em meristemas radiculares de sistema-teste de *Allium cepa*, constituindo-se em mais um teste eficiente para análise de citotoxicidade de substâncias químicas.

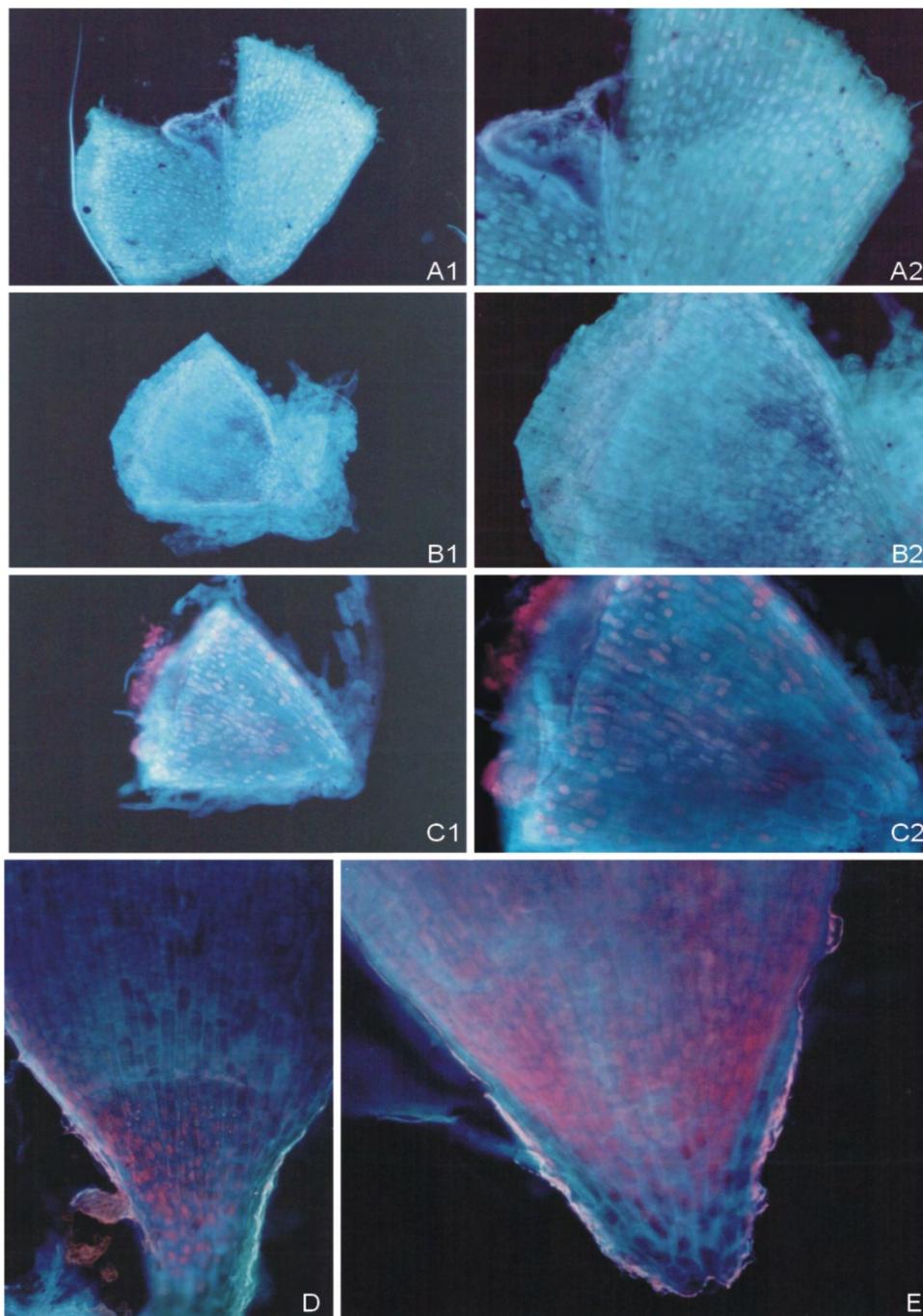


Figura 1: Meristemas de *Allium cepa* expostos ao herbicida atrazina, submetidos à metodologia de detecção de morte celular por Corantes Vitais (Hoechst e Iodeto de Propídeo). As regiões azuis correspondem às células vivas coradas pelo Hoechst e as regiões vermelhas correspondem às células mortas coradas pelo Iodeto de Propídeo. **A1, A2.** teste controle (85x e 150x, respectivamente); **B1, B2.** 0,015ppm (85x e 150x, respectivamente); **C1, C2.** 0,031ppm (85x e 150x, respectivamente); **D.** 0,062ppm (150x); **E.** 0,125ppm (150x).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman AR, Wauchope RD, Truman CC, Dowler CC (1999) Runoff and leaching of atrazine and alachlor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. *Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants* 34: 381-396.

Almeida WF (1974) Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. *O biológico* 6: 171-183.

Bayer DE, Foy CL, Mallory TE, Cutter EG (1967) Herbicides. *American Journal of Botany* 54: 945-952.

Brusick D (1987) *Principles of Genetic Toxicology* 2nd Edition, Plenum Publishing Corporation, New York, P 1-432.

Chauhan LKS, Savena PM, Gupta SK (1999) Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. *Environment and Experiment Botany* 42: 181-9.

Dassenoy B, Meyer JA (1973) Mutagenic effects of benomyl on *Fucarion oxysporum*. *Mutation Research* 21: 119-120.

Duke RC, Ojcius DM, Young JD (1996) Apoptosis. *Scientific American* 3: 36-51.

Fernandes TCC, Ventura BC, Marin-Morales MA (2001) Uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina. *Genetics and Molecular Biology: Supplement* 24 (4).

Fernandes TCC, Ventura BC, Marin-Morales MA (2002) O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology: Supplement* 25 (5).

Gorell JM, Jhonson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Ricchardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50: 1346-1350.

Grant W (1982) Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency - Genotoxic Program: *Mutation Research* 281: 89-92.

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 45: 1573-1581.

Hupertz B, Frank HG, Haufmann P (1999) Cell death. *Anatomy and Embriology* 200: 1.

Kaioumova D, Süsal C, Opelz G (2001) Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Human Immunology* 62: 64-74.

Kim JH, Feagley SE (1998) Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor, a metribuzin in a commerce soil. *Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticid and Food Contaminants* 33: 529-546.

Locke SJ, Peng YS, Cross NL (1990) A supravital staining technique for honeyb spermatozoa. *Physiological-Entomology* 15 (2): 187-192.

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146: 3-15.

Matsumoto ST, Malagutti MI, Marin-Morales MA (2003) Avaliação genotóxica de u córrego, município de Franca/SP, que recebe efluente de curtume, utilizando *Allium ce*, como organismo-teste. *Genetics and Molecular Biology: Supplement* 26 (2): 200.

Mello MLS, Vidal BC, Maria SS in Carvalho FH, Recco-Pimentel SM (2001) A célula 2011 Edição, Manole, P 1-275.

Pavanelli, EAS (1995) Efeito de biocidas sobre a polinização e germinação de sementes orquídeas dos gêneros *Cattleya* Lsl. e *Laelia* Lsl. (Orchidaceae). Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, P 179.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283: 1-16.

Sakamoto ET, Takahashi CS (1979) Efeitos dos fungicidas Dithane M-45, Benlate e Vitavax 75 PM sobre os índices mitóticos dos meristemas radiculares de *Allium cepa*. *Anais da SBI* 31: 573.

Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45: 528-237.

Terracini B (1977) Valutazione della carcinogenecita degli idrocarburi clorutati usati come pesticidi. *Tumori* 53: 601-618.

Ventura BC, Fernandes TCC, Matsumoto ST, Spinosa W, Marin-Morales MA (2000) O uso de *Allium cepa* na investigação da mutagenicidade derivada de possíveis persistências de agrotóxicos na sub-bacia do Pari-Veado. *Genetics and Molecular Biology: Supplement* 23 (3): 690.

Ventura BC, Fernandes TCC, Marin-Morales MA (2002) Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology: Supplement* 25 (5).

Waters MD, Stack HF, Jackson MA (1999) Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research* 437: 21-49.

Zakeri Z, Lockshin RA (2002) Cell death during development. *Journal of Immunological Methods* 265: 3-20.

ARTIGO 3

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E GENOTÓXICOS DO
HERBICIDA ATRAZINA, POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS E DE
ANORMALIDADES NUCLEARES, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus*
COMO SISTEMA-TESTE**

Bruna de Campos Ventura¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro/SP

Manuscrito a ser submetido à Revista “Caryologia”

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E GENOTÓXICOS DO
HERBICIDA ATRAZINA, POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEOS E DE
ANORMALIDADES NUCLEARES, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus*
COMO SISTEMA-TESTE**

RESUMO

O aumento da contaminação do ambiente aquático, por vários resíduos de compostos químicos, tem causado efeitos diretos e indiretos na saúde humana. A atrazina é o herbicida triazínico mais encontrado nos ambientes aquáticos rurais devido ao seu extensivo uso e estabilidade nesses ambientes. A mutagenicidade e a genotoxicidade de diferentes concentrações do herbicida atrazina foram determinadas através do teste de micronúcleos e de anormalidades nucleares, utilizando *Oreochromis niloticus* como sistema-teste. Como as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares, observadas para todas as concentrações do herbicida atrazina testadas, foram altamente significativas quando comparadas ao teste controle, pode-se inferir que esse herbicida pode representar um perigo para a saúde dos organismos à ele expostos, em virtude do potencial que apresentou em induzir micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes.

Palavras-chave: atrazina, teste de micronúcleo, anormalidades nucleares, genotoxicidade, mutagenicidade, *Oreochromis niloticus*.

**EVALUATION OF THE MUTAGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE
HERBICIDE ATRAZINE, THROUGH MICRONUCLEI AND NUCLEAR
ABNORMALITIES TEST, USING *Oreochromis niloticus*
AS THE TEST-SYSTEM**

ABSTRACT

The increase of the aquatic ecosystems contamination, through many chemical residues, had caused both direct and indirect effects to the health human. Atrazine is the triazinic herbicide more encountered in the rural aquatic environments due to its extensive use and its stability in these environments. The mutagenicity and the genotoxicity of different atrazine concentrations was determined using *Oreochromis niloticus* test-system through micronuclei and nuclear abnormalities test. As the frequencies of the micronuclei and nuclear abnormalities cells, observed for all the concentrations tested of this herbicide, were significantly higher than the control assay, we can infer that this herbicide can represent a danger to the health of the organisms exposed to this chemical agent, due to its potential to induce micronuclei and nuclear abnormalities on fish erythrocytes.

Keywords: atrazine, micronuclei test, nuclear abnormalities, genotoxicity, mutagenicity, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

Um aumento significativo no número de compostos químicos industriais, agrícolas e comerciais no ambiente aquático levam a vários efeitos deletérios nos organismos aquáticos (Livingstone, 2001). Muitos desses químicos podem exibir atividades mutagênicas, revelando desordens genéticas, doenças e mortalidade para os organismos expostos (Nehls and Segner, 2001). Em concentrações mais baixas, estas substâncias podem não ter efeitos agudos detectáveis nos organismos, mas podem reduzir sua sobrevivência, via efeitos a longo prazo. Tais efeitos podem ser manifestados por um dano maior ou menor nas células somáticas ou germinativas, e através do desenvolvimento de desordens, como, por exemplo, o câncer, que requer períodos longos e latentes, antes de tornar-se clinicamente visível (White and Rasmussen, 1998).

O aumento da contaminação do ambiente aquático, por vários resíduos de compostos químicos, tem causado efeitos diretos e indiretos na saúde humana (Al-Sabti et al., 1994). A poluição ambiental aquática é um problema sério e crescente. Embora exista uma legislação pertinente, este tipo de poluição, decorrente da emissão de resíduos tóxicos, ainda ocorre.

Algumas vezes, agentes tóxicos são emitidos diretamente no ambiente aquático, tornando-se genotóxicos pelas transformações biológicas ou químicas sofridas pós-emissão (Claxton et al., 1998). Entende-se por genotoxicidade, alterações na estrutura dos cromossomos (clastogenicidade) ou na sequência de pares de bases (mutagenicidade), causadas pela exposição do organismo a agentes tóxicos (Al-Sabti and Metcalfe, 1995).

Uma taxa elevada de agroquímicos é detectada em ecossistemas aquáticos. Os químicos utilizados na agricultura podem ser carregados para rios por meio de chuvas, de assoreamento por solos contaminados e outras atividades relacionadas à agricultura. Segundo Edwards (1973), alguns herbicidas são, comprovadamente, responsáveis pela contaminação de rios e mares. Além disso, os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial de áreas onde ocorreram aplicações.

Os agrotóxicos presentes em corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas de entrada. Seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar do organismo envolvido, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e, especialmente, das características físicas e químicas dos próprios agrotóxicos (Spacie and Hamelink, 1985). Os peixes e invertebrados aquáticos podem acumular agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas em que vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e ser ingeridos por esses organismos (Nimmo, 1985).

Inúmeros compostos químicos, relacionados com atividades urbanas e agrícolas, já foram detectados no meio aquático, causando contaminação ambiental (Balinova, 1993; Brambilla et al., 1993; Tekel and Kovacicova, 1993; Zahradnickova et al., 1994; Pereira et al., 1996). Segundo Kligerman et al. (2000), foram encontrados resíduos do herbicida atrazina em água de abastecimento de diferentes regiões dos Estados Unidos.

A atrazina é a triazina mais encontrada nos ambientes aquáticos rurais devido ao seu extensivo uso e estabilidade nesses ambientes (Kligerman et al., 2000; Brusick, 1994). Esse produto químico é classificado como moderadamente tóxico para várias espécies de peixes, tanto de água doce como salgada (APFS, 1995). As triazinas são os herbicidas mais antigos e mais comumente usados, sendo responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de pesticidas (Tekel and Kovacicova, 1993; Tomita e Beyruth, 2002).

Como ocorre com os outros pesticidas, a atrazina atinge os ambientes aquáticos através das aplicações ocorrentes nos campos agrícolas, próximas aos corpos de água, ou diretamente através da aplicação descuidada (Hussein et al., 1996). A persistência do herbicida atrazina na água é altamente variável, dependendo da natureza do ecossistema aquático em que é introduzido e das condições climáticas do local exposto (Comber, 1999). A atrazina tem sido encontrada em vários locais em concentrações distintas, atingindo cerca de 3,5 ug/l em águas advindas da chuva, 1,25 ug/l na superfície aquática, 0,5 ug/l em ambientes alagados e 0,1 ug/l em águas consideradas potáveis. Além disso, as altas concentrações normalmente ocorrem no meio ambiente por curtos períodos, após a ocorrência de acidentes (Fischer-Scherl et al., 1991).

Vários países, principalmente aqueles em desenvolvimento, têm verificado problemas advindos dos efeitos adversos dos compostos químicos encontrados nos

ecossistemas, influenciando na sobrevivência de organismos aquáticos, como, por exemplo, os peixes (Parkinson and Agius, 1988).

Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental (Powers, 1989; Ateeq et al., 2002). De acordo com Harshbarger and Clark (1990), os resultados obtidos em ensaios realizados com peixes podem ser usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

Bombail et al. (2001) afirmam que o uso de peixes como bioindicadores dos efeitos de poluentes está cada vez mais evidente, sendo que tal prática pode permitir a detecção de possíveis problemas ambientais.

De acordo com Alves-Costa (2001), as espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Hoplias malabariscus* (traíra) são excelentes sistemas-teste para ensaios de toxicidade de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos. *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) é uma espécie de peixe comercialmente importante no sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. É também comumente encontrada em estuários de todo o mundo, e é reconhecida pela sua sensibilidade em responder rapidamente às alterações ambientais (Vijayan et al., 1996).

O herbicida atrazina, em concentrações que variam de 0,01 a 1000 ug/l, induziu mudanças comportamentais e fisiológicas em trutas arco-íris, derivadas de alterações estruturais dos túbulos renais e do fígado (Fischer-Scherl et al., 1991). Para Hussein et al. (1996), as concentrações de atrazina que são consideradas tóxicas para diversas espécies animais dos ecossistemas aquáticos variam de 0,50 ug/l a 88,4 ug/l. No entanto, parece que a atrazina é tóxica e até mesmo letal para espécies distintas de peixes nas concentrações que variam entre 0,01 ug/l e 351,2 ug/l (Funari, 1989).

Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (Schmid, 1976; Al-Sabti and Metcalfe, 1995).

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genotóxicos e mutagênicos, resultantes de exposição a um agente tóxico (Heddle et al., 1983).

O teste de micronúcleos, em mamíferos, é uma técnica comum que avalia danos mutagênicos ocasionados por determinados agentes químicos ou físicos. Embora tenha sido originalmente desenvolvida para sistemas-teste de roedores, como camundongos (Schmid, 1976), a técnica foi subsequentemente modificada por Hooftman and Raat (1982) para a aplicação laboratorial em peixes. Essa modificação, conhecida como o “teste do micronúcleo písceo”, tem sido recentemente proposta como uma técnica potencialmente rápida e barata, indicadora de contaminação ambiental em peixes (Schmid, 1976; Tice and Ivett, 1985; Hose et al., 1987; Grisolia and Starling, 2001; Ateq et al., 2002), como resultado de atividade clastogênica (Al-Sabti and Metcalfe, 1995).

O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes tem sido utilizado como a primeira medida na avaliação do potencial clastogênico. Pelos eritrócitos dos teleósteos serem nucleados, eles apresentam um bom potencial na detecção de substâncias clastogênicas, em meio aquático. Vários estudos têm mostrado que os eritrócitos de peixes apresentam uma alta incidência de micronúcleos, após a exposição a diferentes poluentes, sob condições de campo e de laboratório (Al-Sabti, 1986; Hose et al., 1987; Minissi et al., 1996).

Al-Sabti et al. (1994), investigando os efeitos citotóxicos causados pelo Cromo (tri e hexavalente) em carpas da Prússia (*Carassius auratus gibelio*), observaram que, tanto em laboratório como em campo, os animais expostos a vários níveis de concentração desta substância apresentaram um aumento na frequência de micronúcleos, quando comparados com o grupo controle.

Minissi et al. (1996) utilizaram o teste do micronúcleo em peixes (*Barbus plebejus*) para realizar estudos de monitoramento de dois rios italianos, caracterizados por diferentes níveis de poluição por compostos químicos. Os autores verificaram que a frequência de micronúcleos parecia estar fortemente relacionada com a qualidade da água dos locais examinados, corroborando com citações anteriores de eficiência do teste.

Hose et al. (1984) e Das and Nanda (1986) constataram que muitos agentes clastogênicos e mutagênicos, tais como o benzopireno e a mitomicina C, induzem a formação de micronúcleos. Hose et al. (1987), usando o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrus clathratus*), mostraram que a presença de pesticidas (DDT e PCB) nas águas de um rio do sul da Califórnia não induziu aumento significativo na frequência de micronúcleos, quando comparados com o teste controle.

Segundo Ateeq et al. (2002), o aumento da frequência de micronúcleos e de células alteradas foi significativo, quando eritrócitos do peixe-gato *Clarias batrachus* foram analisados, após a exposição aos herbicidas 2,4-D e butacloro. Houve uma relação positiva de dose-resposta em todas as exposições aos dois herbicidas e para todos os tempos testados.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a mutagenicidade e a genotoxicidade do herbicida atrazina, pelo teste de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos, utilizando a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) como sistema-teste.

MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) foi usada como organismo-teste para detectar possíveis danos mutagênicos e genotóxicos do herbicida atrazina. Os testes foram realizados com eritrócitos desse material biológico, onde foi avaliada a indução de micronúcleos e de anormalidades nucleares. Os peixes utilizados apresentavam um tamanho médio de 15 cm. Os animais foram trazidos ao laboratório e aclimatados em tanque, sob condições controladas.

A substância química testada, a atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), é um herbicida seletivo do grupo químico das triazinas. As concentrações de atrazina utilizadas no experimento foram: 25 ug/l; 12,5 ug/l e 6,25 ug/l.

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados quatro aquários, sendo que, em um deles, foi realizado o teste controle com água de poço artesiano e, nos três restantes, foram colocadas as distintas concentrações do herbicida atrazina. Foram colocados, por 72 horas, cinco espécimes de peixes em cada aquário. Decorrido esse

tempo, foi retirado, de cada animal, cerca de 0,3 cc de sangue, por meio de punção cardíaca, realizada com seringas heparinizadas. Logo após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente e a primeira gota de sangue foi descartada, para evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. As gotas posteriores foram usadas para a confecção das lâminas pela técnica de esfregaço (extensões sangüíneas).

As lâminas foram fixadas durante 10 minutos em metanol absoluto, e secas a temperatura ambiente por 24h. Após esse tempo, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 20 minutos. Foram realizadas, no mínimo, cinco extensões sanguíneas para cada indivíduo. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum, utilizando-se as objetivas de 40 e 100x.

Foram analisadas 1000 células sangüíneas de cada lâmina, para se determinar a média e o desvio padrão de eritrócitos com micronúcleos e com anormalidades nucleares. Os resultados obtidos para os ensaios realizados com o herbicida foram comparados com os resultados do controle pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Teste H).

RESULTADOS

As freqüências de micronúcleos e de alterações nucleares, observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápia), submetidos ao tratamento com água do poço artesiano (controle), foram de 0,040 0,002 e 0,208 0,010, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

As freqüências de eritrócitos micronucleados de *Oreochromis niloticus*, submetidos às diversas concentrações testadas do herbicida atrazina (25 ug/l; 12,5 ug/l e 6,25 ug/l) por 72h, apresentaram diferenças entre si. As médias e os desvios padrão foram de 0,345 0,001; 0,724 0,012 e 1,192 0,041 para as concentrações de 25 ug/l, 12,5 ug/l e 6,25 ug/l, respectivamente (Tabela 1).

Os tipos de alterações nucleares mais freqüentemente observados nos eritrócitos de *O. niloticus*, após exposição ao herbicida atrazina, por 72h, testadas para as diversas concentrações, foram: células binucleadas, células com núcleos do tipo “blebbed”, células com núcleos do tipo “lobed”, células com núcleos do tipo “notched”, células com núcleos vacuolizados, células com núcleos do tipo “broken-eggs” e células com núcleos

heteropicnóticos (Figura 1), segundo classificação de Carrasco et al. (1990). O teste controle também exibiu alterações nucleares semelhantes às encontradas nos testes com atrazina, porém em menor frequência.

De um total de 27431 células analisadas no teste controle (água do poço artesiano) foram registradas que 0,022% (0,008) foi de células binucleadas, 0,011% (0,009) de células com núcleos “blebbed”, 0,011% (0,009) de células com núcleos “lobed”, 0,003% (0,008) de células com núcleos “notched”, 0,052% (0,008) de células com núcleos vacuolizados, 0,003% (0,008) de células com núcleos “broken-eggs” e 0,106% (0,008) de células com núcleos heteropicnóticos (Tabela 2, Figura 1).

De um total de 27551 células analisadas na concentração de 6,25 ug/l de atrazina foram registradas que 0,164% (0,003) foi de células binucleadas, 0,969% (0,017) de células com núcleos “blebbed”, 0,229% (0,004) de células com núcleos “lobed”, 0,054% (0,002) de células com núcleos “notched”, 0,777% (0,020) de células com núcleos vacuolizados, 0,119% (0,004) de células com núcleos “broken-eggs” e 0,272% (0,010) de células com núcleos heteropicnóticos (Tabela 2, Figura 1).

De um total de 27603 células analisadas na concentração de 12,5 ug/l de atrazina foram registradas que 0,076% (0,004) foi de células binucleadas, 0,576% (0,017) de células com núcleos “blebbed”, 0,156% (0,005) de células com núcleos “lobed”, 0,866% (0,019) de células com núcleos vacuolizados, 0,054% (0,004) células com núcleos “broken-eggs” e 1,058% (0,017) de células com núcleos heteropicnóticos (Tabela 2, Figura 1).

De um total de 27598 células analisadas na concentração de 25 ug/l de atrazina foram registradas que 0,080% (0,003) foi de células binucleadas, 0,562% (0,013) de células com núcleos “blebbed”, 0,141% (0,004) de células com núcleos “lobed”, 1,134% (0,009) de células com núcleos vacuolizados, 0,065% (0,003) de células com núcleos “broken-eggs” e 1,181% (0,017) de células com núcleos heteropicnóticos (Tabela 2, Figura 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise do bioensaio, utilizando *Oreochromis niloticus* como organismo-teste, mostrou que as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares, observadas para as concentrações testadas do herbicida atrazina, foram significativamente mais altas que as frequências de células com micronúcleos e com alterações nucleares observadas para o teste controle. Além disso, podemos dizer que, quanto maior a concentração utilizada do herbicida atrazina, maior foi o valor percentual de células com núcleos alterados (micronúcleos e anormalidades nucleares). Os potenciais de mutagenicidade e genotoxicidade do herbicida atrazina, para todas as concentrações testadas, foram comprovados pelos testes estatísticos realizados, mostrando níveis de significância a 5%, quando comparados com os resultados do controle. A concentração de 25 ug/l do herbicida apresentou maiores índices de células com micronúcleos e com alterações nucleares, demonstrando a alta mutagenicidade do herbicida atrazina nesta concentração. Como pode ser observado nas tabelas 1 e 2, houve uma relação positiva de dose-resposta para as concentrações do herbicida atrazina.

Embora os nossos dados tenham mostrado que a frequência total de alterações nucleares foi diretamente proporcional às concentrações testadas do herbicida atrazina, pudemos observar que, se considerarmos cada tipo específico de alteração nuclear, a concentração de 6,25 ug/l do herbicida atrazina apresentou as maiores frequências de células binucleadas, de células com núcleos “blebbed”, células com núcleos “lobed” e células com núcleos “broken-eggs”. Além disso, somente a concentração de 6,25 ug/l do herbicida induziu a alteração nuclear do tipo “notched” (Tabela 2). Esses resultados demonstram que a concentração de 6,25 ug/l do herbicida atrazina apresenta um alto potencial de indução de danos genéticos associados a irregularidades da divisão celular (no caso das células binucleadas) e à descaracterização da membrana nuclear e/ou perda de material genético (no caso das células com núcleos “blebbed”, “lobed”, “notched” e “broken-eggs”). Por outro lado, a concentração de 25 ug/l do herbicida atrazina apresentou os maiores índices de células com núcleos vacuolizados e heteropicnóticos, como pode ser observado na Tabela 2. Segundo Ribeiro et al. (2003), células com núcleos vacuolizados e heteropicnóticos podem ser associadas a alterações

morfológicas características de processos celulares necróticos e apoptóticos, respectivamente. Dessa maneira, a concentração de 25 ug/l do herbicida atrazina apresenta uma alta potencialidade em induzir alterações nucleares relacionadas a eventos de morte celular.

Os nossos resultados mostraram uma alta frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares nos indivíduos de *O. niloticus* expostos às diferentes concentrações do herbicida atrazina. Esses dados são concordantes com estudos de morfologia nuclear de eritrócitos de peixes, desenvolvidos por Das and Nanda (1986), Hose et al. (1987) e Hughes and Hebert (1991), os quais também demonstram uma alta incidência de micronúcleos e de alterações nucleares em organismos expostos a diferentes substâncias químicas. Dessa maneira, nossos dados corroboram com De Flora et al. (1993), que propuseram que o teste de micronúcleo pisco constitui uma ferramenta sensível da medida mutagênica de substâncias químicas, especialmente daquelas que provocam respostas clastogênicas em organismos expostos.

As alterações nucleares, encontradas nos eritrócitos dos peixes expostos ao herbicida atrazina, podem ser consideradas alterações celulares, que são bastante comuns em organismos submetidos à exposição de agentes químicos, segundo Hose et al. (1984) e Carrasco et al. (1990). De acordo com Beutler (1985), um grande número de drogas e outros compostos químicos pode interferir na síntese de DNA dos seres vivos a eles expostos, resultando nas conhecidas alterações nucleares.

De acordo com os nossos resultados, as concentrações testadas do herbicida atrazina induziram a formação de micronúcleos no organismo-teste *Oreochromis niloticus*. Essa indução pode estar relacionada, segundo Schmid (1976) e Al-Sabti and Metcalfe (1995), com atrasos cromossômicos na anáfase, caracterizados por um mau funcionamento do fuso, ou devido à presença de fragmentos acêntricos.

As concentrações utilizadas do herbicida atrazina induziram também a formação de anormalidades nucleares no organismo-teste. No entanto, os mecanismos exatos de como os compostos químicos interferem na estrutura nuclear dos organismos, ocasionando todos os tipos de anormalidades nucleares observados (células binucleadas, células com núcleos "blebbed", células com núcleos "lobed", células com núcleos "notched", células com núcleos vacuolizados, células com núcleos "broken-eggs" e células com núcleos heteropicnóticos) ainda não são claros, necessitando de estudos

específicos para que possam ser melhor avaliados. Segundo Ghadially (1982), as alterações nucleares do tipo “notched” e vacuolização do núcleo devem estar provavelmente associadas a aneuploidias. As células binucleadas podem ter sido originadas de falhas na polimerização da tubulina, decorrente da ação do herbicida atrazina. Essa afirmação é coincidente com as de Canevari (1996), que cita que as células binucleadas se originam devido à dificuldade da formação do fuso mitótico, ocasionada pela ação aneugênica de compostos químicos.

Como todas as concentrações testadas do herbicida atrazina induziram efeitos mutagênicos e genotóxicos no organismo-teste, podemos inferir que esse herbicida, pelo menos nas concentrações de 6,25 ug/l, 12,5 ug/l e 25 ug/l, apresenta potencial para indução de micronúcleos e alterações nucleares que podem ocasionar problemas à saúde de outros organismos expostos a esse químico.

Em última análise, podemos considerar a concentração de 6,25 ug/l do herbicida atrazina como a dosagem diagnóstico para detecção de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, podendo ser essa concentração usada como controle positivo para testes com *Oreochromis niloticus*.

Tabela 1: Incidência de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após o tratamento de 72h em diferentes concentrações do herbicida atrazina e em água do poço artesiano (teste controle).

Concentração (ug/l)	Total de eritrócitos analisados	Número total de micronúcleos observados	Frequência de micronúcleos (média e desvio padrão)	
controle	27431	11	0,040	0,002
6,25	27551	95	0,345	0,001*
12,5	27603	197	0,724	0,012*
25	27598	329	1,192	0,041*

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente (5%), em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2: Incidência de alterações nucleares (média e desvio padrão) encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após o tratamento de 72h em diferentes concentrações do herbicida atrazina e em água de poço artesiano (teste controle).

	Controle		Atrazina 6,25 ug/l		Atrazina 12,5 ug/l		Atrazina 25 ug/l	
Células binucleadas	0,022	0,008	0,164	0,003*	0,076	0,004*	0,080	0,003*
Células com núcleos "blebbed"	0,011	0,009	0,969	0,017*	0,576	0,017*	0,562	0,013*
Células com núcleos "lobed"	0,011	0,009	0,229	0,004*	0,156	0,005*	0,141	0,004*
Células com núcleos "notched"	0,003	0,008	0,054	0,002*	0,000	0,000	0,000	0,000
Células com núcleos "vacuolizados"	0,052	0,008	0,777	0,020*	0,866	0,019*	1,134	0,009*
Células com núcleos "broken-eggs"	0,003	0,008	0,119	0,004*	0,054	0,004*	0,065	0,003*
Células com núcleos heteropicnóticos	0,106	0,008	0,272	0,010*	1,058	0,017*	1,181	0,017*
Total de alterações nucleares	0,208	0,010	2,584	0,169*	2,786	0,159*	3,163	0,078*
Número total de alterações nucleares	57		712		769		873	
Número total de células analisadas	27431		27551		27603		27598	

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente (5%), em relação ao controle, pelo teste de Kruskal-Wallis.

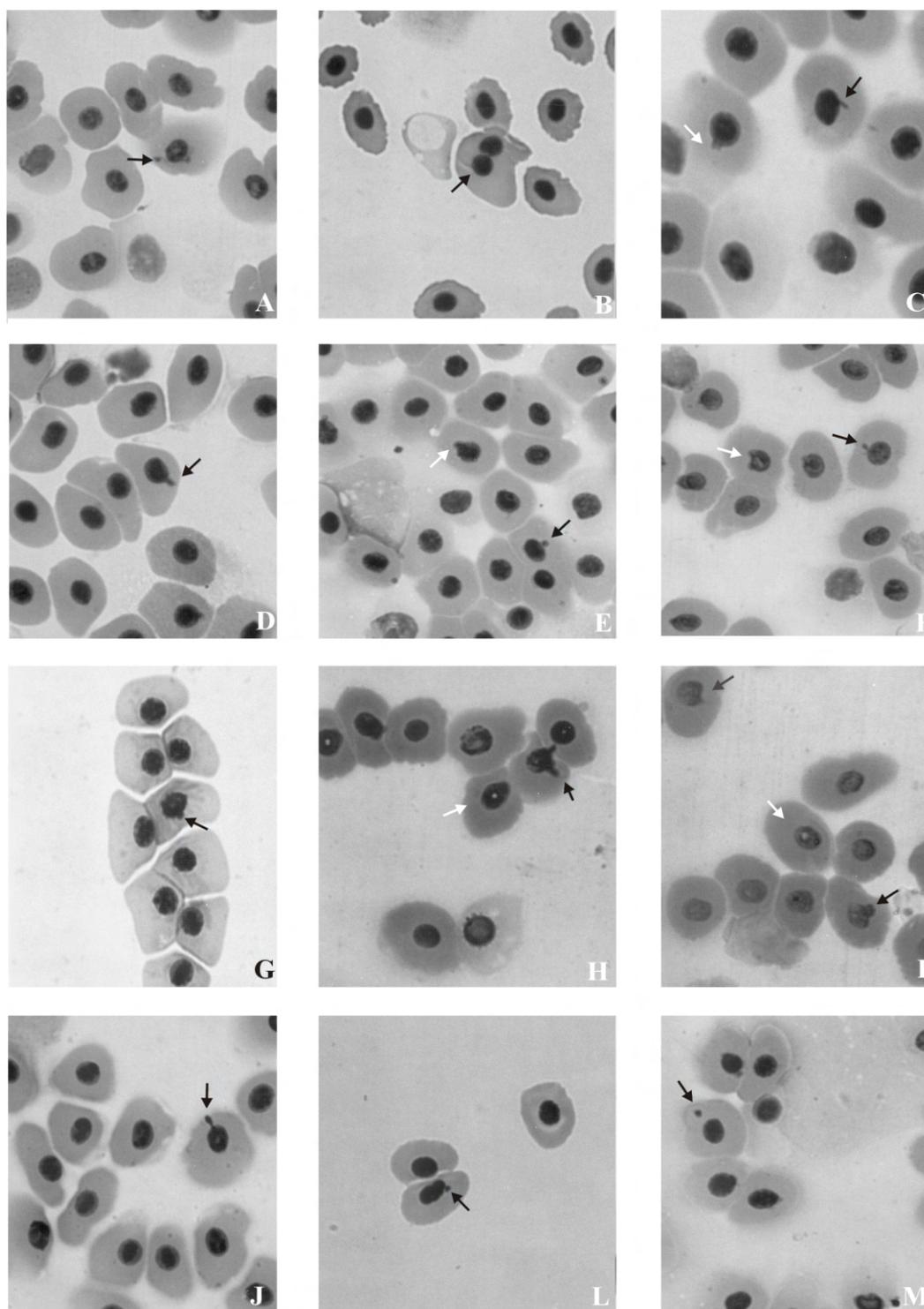


Figura 1: Micronúcleos e anormalidades nucleares encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* tratados com o herbicida atrazina. **A.** célula com micronúcleo; **B.** célula binucleada; **C.** célula com núcleo lobed (seta branca) e célula com núcleo blebbed (seta preta); **D.** célula com núcleo blebbed; **E.** Célula com núcleo lobed (seta branca) e célula com núcleo blebbed (seta preta); **F.** Célula com núcleo lobed (seta branca) e célula com núcleo blebbed (seta preta); **G.** célula com núcleo lobed; **H.** célula com núcleo vacuolizado (seta branca) e célula com núcleo blebbed (seta preta); **I.** célula com núcleo notched (seta cinza), célula com núcleo vacuolizado (seta branca) e célula com núcleo lobed (seta preta); **J.** célula com núcleo broken-egg; **L.** célula com núcleo lobed; **M.** célula com micronúcleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Sabti, K., 1986 - *Clastogenetic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of common carp Cyprinus carpio L.* Compedium of Biochemical and Physiology, 85 (1): 5-9.
- Al-Sabti, K.; Franko, M.; Andrijanic, B.; Knez, S.; Stegnar, P., 1994 - *Chromium-induced micronuclei in fish.* Journal of Applied Toxicology, 13 (5): 333-336.
- Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D., 1995 - *Fish micronuclei for assessing of genotoxicity in water.* Mutation Research, 343 (2-3): 121-135.
- Alves-Costa, J.R.M., 2001. *Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com Hoplias malabaricus e Oreochromis niloticus.* Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná. Curitiba -PR.
- Ateeq, B.; Abdul-Farah, M.; Ali, M.N.; Ahmad, W., 2002 - *Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish Clarias batrachus by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor.* Mutation Research, 518: 135-144.
- Atrazine Pesticide Fact Sheet (APFS), 1995 - *Atrazine.* Prepared for the United States Department of Agriculture. Forest Service by Information Ventures, Inc. Prepared by Information Ventures, Inc, under U.S. Forest Service Contract, 1-394.
- Balinova, A., 1993 - *Solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water.* Journal of Chromatography, 643: 203-207.
- Beutler, E., 1985 - *Chemical toxicity of the erythrocyte.* In: Toxicology of the blood and bone marrow. Estados Unidos: Raven Press of New York, 182p.

- Bombail, V.; Dennis, A.W.; Gordon, E.; Batty, J., 2001 - *Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (Pholis gunnellus) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland*. Chemosphere, 44: 383-392.
- Brambilla, A.; Rindone, B.; Polesello, S.; Galassi, S.; Balestrini, R., 1993 - *The fate of triazine pesticides in River Po water*. Science of the Total Environment, 132: 339-348.
- Brusick, D.J., 1994 - *An assessment of the genetic toxicity of atrazine: relevance to human health and environmental effects*. Mutation Research, 317 (2): 133-144.
- Canevari, R.A., 1996. *Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em Prochilodus lineatus (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina*. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral). Universidade Estadual de Londrina. Londrina - PR.
- Carrasco, R.K.; Tilbury, K.L.; Myers, M., 1990 - *Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47: 2123-2136.
- Claxton, L.D.; Houk, V.S.; Hughes, T.J., 1998 - *Genotoxicity of industrial wastes and effluents*. Mutation Research, 410 (3): 237-243.
- Comber, S.D.W., 1999 - *Abiotic persistence of atrazine and simazine in water*. Pesticides Science 55: 696-702.
- Das, R.K. and Nanda, N.K., 1986 - *Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish Heteropneustes fossilis by mitomycin-C and paper mill effluent*. Mutation Research, 175: 67-71.

- De Flora, S.; Vigano, L.; D'agostine, F.D.; Camoirano, A.; Bagnosco, M.; Benicelli, C.; Melodia, L.; Arillo, A., 1993 - *Multiple genotoxicity markers in fish exposed in situ to polluted river water*. Mutation Research, 319: 167-177.
- Edwards, C.A., 1973 - *Persistent pesticides in the environment*. 2nd ed. Estados Unidos: CRC Press, 170p.
- Fischer-Scherl, T.; Veese, A.; Hoffman, R.W.; Kühnhauser, C.; Negele, R.D.; Ewringmann, T., 1991 - *Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20: 454-461.
- Funari, E., 1989 - *Preliminary report on the atrazine and molinate water supply contamination in Italy*. Chemosphere, 18: 2339-2343.
- Ghadially, F.N., 1982 - *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. 2nd ed. London: Butterworths, 971p.
- Grisolia, C.K. and Starling, F.L.R.M., 2001 - *Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges*. Mutation Research, 491: 39-44.
- Harshbarger, J.C. and Clark, J.B., 1990 - *Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America*. Science of the Total Environment, 94 (1-2): 1-32.
- Heddle, J.A.; Hite, M.; Irkhart, B.; Macgregor, J.T.E.; Salamone, M.F., 1983 - *The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program*. Mutation Research, 123 (1): 61-118.

- Hooftman, R.N. and Raat, W.K., 1982 - *Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow Umbra pygmaea by ethyl methanesulphonate*. Mutation Research, 104: 147-152.
- Hose, J.E.; Hannah, J.B.; Puffer, H.W.; Landolt, M.N., 1984 - *Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene-treated rainbow trout alevins*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 13: 675-684.
- Hose, J.E.; Cross, J.N.; Smith, S.G.; Diell, D., 1987 - *Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California*. Marine Environmental Research, 22: 167-176.
- Hughes, J.B. and Hebert, A.T., 1991 - *Erythrocyte micronuclei in winter flounder (Pseudopleuronectes americanus) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20: 474-479.
- Hussein, S.Y.; El-Nasser, M.A.; Ahmed, S.M., 1996 - *Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish Oreochromis niloticus and Chrysichthyes auratus at Assiut, Egypt*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 57: 503-510.
- Kligerman, A.D.; Doerr, C.L.; Tennant, A.H.; Peng, B., 2000 - *Cytogenetic studies of three triazine herbicides. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow*. Mutation Research, 471: 107-112.
- Livingstone, D.R., 2001 - *Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms*. Bulletin of Marine Pollutants, 42: 656-666.
- Minissi, S.; Ciccotti, E.; Rizzoni, M., 1996 - *Micronucleus test in erythrocytes of Barbus plebejus (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay*

for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research*, 367 (4): 245-251.

Nehls, S. and Segner, H., 2001 - *Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-W1, using the comet assay*. *Environmental Toxicology*, 16: 321-329.

Nimmo, D.R., 1985 - *Pesticides*. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. 1st ed. Estados Unidos: Hemisphere, 373 p.

Parkinson, C. and Agius, C., 1988 - *Acute toxicity of DDT to tilapia (Oreochromis spilurus Gunther) in vivo and in vitro*. *ATLA*, 15: 298-302.

Pereira, W.E.; Domagalski, J.L.; Hostettler, F.D.; Brown, L.R.; Rapp, J.B., 1996 - *Occurrence and accumulation of pesticides and organic contaminants in river sediment, water and clam tissues from the San Joaquin River and tributaries, California*. *Environmental Toxicology of Chemicals*, 15 (2): 172-180.

Powers, D.A., 1989 - *Fish as model systems*. *Science*, 246: 352-358.

Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K., 2003 – *Mutagênese Ambiental*. 1^a ed. Brasil: ULBRA, 355p.

Schmid, W., 1976 - *The micronucleus test for cytogenetics analysis*. In: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 53p.

Spacie, A. and Hamelink, J.L., 1985 - *Bioaccumulation*. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. 3rd ed. New York: Hemisphere, 525p.

- Tekel, J. and Kovacicova, J., 1993 - *Chromatographic methods in the determination of herbicide residues in crops, food and environmental samples*. Journal of Chromatography, 643: 291-303.
- Tice, R.R. and Ivett, J.L., 1985 - *Cytogenetic analysis of bone marrow damage*. In: Toxicology of the blood and bone marrow. 1st ed. Estados Unidos: Raven Press of New York, 140 p.
- Tomita, R.Y. e Beyruth, Z., 2002 - *Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático*. O Biológico, 64 (2): 135-142.
- Vijayan, M.M.; Morgan, J.D.; Sakamoto, T.; Grau, E.G.; Iwama, G.K., 1996 - *Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes*. Journal of Experimental Biology, 199: 2467-2475.
- White, P.A. and Rassmussen, J.B., 1998 - The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. Mutation Research, 410: 223-236.
- Zahradnickova, H.; Simek, P.; Horicova, P.; Triska, J., 1994 - Determination of atrazine and simazine in drinking and surface waters by solid-phase extraction and high performance thin layer chromatography. Journal of Chromatography, 688: 383-389.

ARTIGO 4

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
POR MEIO DO ENSAIO DE COMETA, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus*
COMO SISTEMA-TESTE**

Bruna de Campos Ventura¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro/S

Manuscrito a ser submetido à Revista “Cytologia”

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DO HERBICIDA ATRAZINA,
POR MEIO DO ENSAIO DE COMETA, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus*
COMO SISTEMA-TESTE**

RESUMO

O ensaio de cometa tem sido descrito como uma eficiente ferramenta para a detecção de mudanças na molécula de DNA de células expostas a agentes contaminantes, tanto *in vitro* como *in vivo*. A genotoxicidade de diferentes concentrações do herbicida atrazina foi determinada através do ensaio de cometa, utilizando *Oreochromis niloticus* como sistema-teste. Os dados sugerem que o ensaio de cometa é sensível e eficiente para a determinação de danos no DNA ocasionados pela ação do herbicida atrazina. Como todas as concentrações testadas desse herbicida induziram fragmentação de DNA, pode-se inferir que a atrazina possui a potencialidade de causar danos no material genético de organismos expostos a este agente químico.

Palavras-chave: atrazina, ensaio de cometa, genotoxicidade, *Oreochromis niloticus*.

**EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF THE HERBICIDE ATRAZINE,
THROUGH COMET ASSAY, USING *Oreochromis niloticus*
AS THE TEST-SYSTEM**

ABSTRACT

The comet assay has been described as an efficient tool for the detection of changes in the DNA molecule of cells exposed to contaminating agents *in vitro* and *in vivo*. The genotoxicity of different atrazine concentrations was determined using *Oreochromis niloticus* test-system through comet assay. The data suggest that the comet assay is sensitive and efficient for the determination of DNA damage caused by the action of the herbicide atrazine. As all the concentrations tested of this herbicide induced DNA fragmentation, we can infer that the atrazine has a potentiality to cause damage on the genetic material of organisms exposed to this chemical agent.

Keywords: atrazine, comet assay, genotoxicity, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

A avaliação de danos de DNA é primordialmente importante quando se quer determinar possíveis efeitos genotóxicos em organismos vivos, devido à exposição a poluentes. As substâncias genotóxicas podem causar efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, além de problemas à saúde animal, inclusive humana, resultando em efeitos adversos para a estabilidade dos ecossistemas (Nacci *et al.* 1996, Mitchelmore and Chipman 1998).

Herbicidas são pesticidas significativamente utilizados para destruir plantas indesejáveis, tendo um importante papel na agricultura moderna, o que pode representar um potencial perigo genético à saúde humana devido à sua interação com o DNA, como relatado em muitos estudos (IARC 1991). No entanto, quando levamos em conta a toxicidade de tais compostos químicos, muitos resultados não conclusivos também têm sido relatados. Assim, o ensaio de cometa é prontamente uma técnica promissora, especialmente diante de agentes químicos (Ribas *et al.* 1995).

O ensaio de eletroforese de células únicas em gel é uma técnica poderosa para a detecção de quebras de DNA e danos em locais álcali-sensitivos em células eucarióticas. Também conhecido como ensaio cometa, ele é um método rápido, simples e sensível para quantificar o dano genético em um número pequeno de células (Ostling and Johanson 1984, Olive *et al.* 1990).

O ensaio de cometa, por ser considerado sensível, rápido, econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (Mitchelmore and Chipman 1998, Sasaki *et al.* 1997, Kosz-Vnenchak and Rokosz 1997), tem sido indicado como um método para detecção de mudanças muito pequenas na estrutura do DNA célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (Koppen *et al.* 1999).

O método do ensaio de cometa foi desenvolvido por Singh *et al.* (1988), que adaptaram outras metodologias já utilizadas para desenvolver uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE – single cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Essa técnica evidencia a ocorrência de quebras em cadeias simples do DNA. A visualização subsequente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio bastante adequado para se detectar danos no DNA, em células únicas.

O ensaio de cometa é considerado atualmente uma das ferramentas mais eficientes no biomonitoramento ambiental, pois pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vitro* ou *in vivo*, podendo também ser aplicado com o propósito de análise genotoxicológica (Monteith and Vanstone 1995).

De acordo com Steinert (1996), o ensaio de cometa, além de ser uma ferramenta sensível na detecção de estresse citotóxico e genotóxico, pode detectar a influência de um amplo espectro de agentes contaminantes.

Para a obtenção de dados mais concisos a respeito da genotoxicidade dos herbicidas triazínicos, Tennant *et al.* (2001) escolheram o SCGE como metodologia, justificando que esse ensaio é altamente sensível para detectar pequenas taxas de danos de DNA, além de requisitar um pequeno número de células para análise. De acordo com esses mesmos autores, a atrazina induziu um pequeno aumento de danos de DNA em leucócitos de ratos, submetidos ao ensaio de cometa. Além disso, Clements *et al.* (1997), utilizando o ensaio do cometa, relataram que a atrazina na forma comercial (AAAtrex Nine-O) induziu a um significativo dano no DNA de eritrócitos de algumas espécies de sapos.

A genotoxicidade de herbicidas, como a atrazina, também tem sido avaliada pelo ensaio de cometa, através da utilização de linfócitos sanguíneos humanos. Segundo Ribas *et al.* (1995), células sanguíneas tratadas com o herbicida atrazina nas concentrações de 50-200 ug/ml, mostraram uma extensa migração de DNA, principalmente nas concentrações de 100 e 200 ug/l. Tais dados indicaram que o SCGE tem sido altamente sensível na detecção do dano de DNA induzido pelo herbicida testado, sugerindo a alta habilidade do ensaio cometa em detectar danos na molécula de DNA (Singh *et al.* 1988, Olive *et al.* 1992, Tice *et al.* 1990, Betti *et al.* 1993).

Mitchelmore and Chipman (1998) concluíram que o ensaio de cometa é um método adequado como biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outros organismos aquáticos, destacando a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos de compostos químicos. Ainda segundo Nacci *et al.* (1996) e Belpaeme *et al.* (1996), o ensaio de cometa tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de muitas espécies de peixes expostas a diversos agentes genotóxicos, o que pode ser verificado através das quebras das fitas de DNA desses animais.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a genotoxicidade do herbicida atrazina, através do ensaio de cometa, utilizando a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) como sistema-teste.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material biológico, utilizado como sistema-teste para detectar possíveis danos genotóxicos do herbicida atrazina, através da observação e classificação dos nucleóides de eritrócitos, constituiu-se de indivíduos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) oriundos da piscicultura e com um tamanho médio de 15 cm. Os animais, trazidos ao laboratório, foram aclimatados em tanque sob condições controladas e com sistema de filtração e aeração.

A substância química testada, a atrazina, é um herbicida seletivo do grupo químico das triazinas e possui a seguinte composição: 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina. A atrazina é considerada um pesticida da classe toxicológica III, ou seja, moderadamente tóxica, sendo usada como um herbicida seletivo de pré e pós-emergência em culturas de aspargo, milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi. As concentrações de atrazina utilizadas no experimento foram: 25 ug/l; 12,5 ug/l e 6,25 ug/l.

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados quatro aquários, sendo que, um deles, foi destinado ao teste controle com água de poço artesiano e, os três restantes, destinados às distintas concentrações do herbicida atrazina. Em cada aquário, foram colocados cinco espécimes, que aí permaneceram por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos das diferentes concentrações da atrazina.

Amostras de sangue dos peixes foram colhidas em seringa heparinizada. Uma amostra de 10 μ l de sangue foi diluída em 1000 μ l de soro bovino fetal. As lâminas foram montadas com 10 μ l da suspensão celular + 120 μ l de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1 ml de Triton X-100, 10 ml de DMSO e 89 ml de solução de lise estoque, pH 10,0 - solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, ~8,0 g de NaOH sólido, 10 g de lauryl sarcosinato sódico para 1L) em geladeira por 1 hora. Após a lise, as lâminas permaneceram em tampão NaOH 300 mM + EDTA 1 mM (pH>13) por 20 minutos

para denaturação do DNA, sendo logo após submetidas a uma corrida de eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram então neutralizadas com Tris 0,4 M por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos.

As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (0,02 mg/ml). A análise foi feita ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX60), com filtro de excitação = 420-490 nM e barreira = 520 nM, em objetiva 40x. Para cada amostra de sangue (de cada indivíduo) foram analisados 100 nucleóides. Os nucleóides foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0 (sem dano, ou seja, com nucleóides que não apresentaram cauda); classe 1 (dano pequeno, ou seja, com nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça); classe 2 (dano médio, ou seja, com nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça); classe 3 (dano grande, ou seja, com nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a 2 vezes o tamanho do diâmetro da cabeça), de acordo com a classificação de Kobayashi *et al.* (1995). Também foram verificados os scores de cada tratamento, multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Para análise estatística, foi utilizado o teste do χ^2 (Pereira 1991), onde se comparou o número total de nucleóides alterados, encontrados para cada tratamento, com os resultados obtidos no controle.

RESULTADOS

Todos os testes realizados com as diferentes concentrações do herbicida atrazina indicaram a presença de danos na molécula de DNA, através do ensaio de cometa. O teste controle apresentou um número de 83 nucleóides com danos e 417 nucleóides sem danos, ou seja, freqüências de 16,6% nucleóides com danos e 83,4% nucleóides sem danos, respectivamente. A maior parte dos nucleóides com danos observados no teste controle foram da classe 1 (14,6%) (Tabela 1, Figura 1).

Os números e as freqüências de nucleóides (Figura 2), para cada classe considerada, encontradas nos eritrócitos de *O. niloticus* submetidos por 72h às diferentes concentrações do herbicida atrazina (6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l) foram as seguintes:

- concentração de 6,25 ug/l: classe 0 (108; 21,6%), classe 1 (127; 25,4%), classe 2 (158; 31,6%) e classe 3 (107; 21,4%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 12,5 ug/l: classe 0 (80; 16%), classe 1 (108; 21,6%), classe 2 (134; 26,8%) e classe 3 (178; 35,6%) (Tabela 1, Figura 1).

- concentração de 25 ug/l: classe 0 (59; 11,8%), classe 1 (70, 14%), classe 2 (177; 35,4%) e classe 3 (194; 38,8%) (Tabela 1, Figura 1).

As médias dos scores obtidos, através do tratamento dos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* com o herbicida atrazina nas concentrações de 6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l e por meio do tratamento com a água do poço artesiano (controle), apresentaram os valores de 152,8; 182; 201,2 e 18,8, respectivamente (Tabela 1).

Os resultados obtidos pela aplicação do ensaio de cometa em eritrócitos de *O. niloticus*, que foram expostos às diversas concentrações do herbicida atrazina por 72h, mostraram que o total de células com cometa exibiram diferenças significativas (nível de 0,5%) pelo teste de χ^2 , quando comparadas com os resultados exibidos pelo controle (Tabela 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise do bioensaio, utilizando *Oreochromis niloticus* como organismo-teste, mostrou que as freqüências de nucleóides, apresentando todas as classes de danos, observadas em todas as concentrações do herbicida atrazina testadas, foram significativamente mais altas que as freqüências de nucleóides com danos observadas para o teste controle. Além disso, podemos dizer que, quanto maior a concentração do herbicida atrazina testada, maior foi o valor percentual de nucleóides com danos, que pôde ser comprovado pelos testes estatísticos realizados (significativos a 0,5%), o que confirmou a genotoxicidade do herbicida atrazina em todas as concentrações testadas. A concentração de 25 ug/l do herbicida apresentou os maiores índices de nucleóides com danos das classes 2 e 3, demonstrando a alta genotoxicidade do herbicida atrazina para essa concentração testada. Pode-se afirmar, portanto, que existiu uma relação positiva de dose-resposta em todas as exposições às concentrações do herbicida atrazina testadas.

Nossos resultados corroboraram com os estudos de Mitchelmore and Chipman (1998), Nacci *et al.* (1996) e Belpaeme *et al.* (1996), os quais mostraram que o ensaio de cometa com eritrócitos de peixes parece ser eficiente para detectar a genotoxicidade de compostos químicos. A aplicabilidade do ensaio de cometa, como uma ferramenta sensível para a detecção da genotoxicidade de substâncias químicas, foi também verificada no trabalho desenvolvido por Nanthawan *et al.* (2002). Nossos dados ainda são concordantes com aqueles relatados por Darroundi and Natarajan (1993) e Mcnamee *et al.* (2000), os quais verificaram que o ensaio de cometa é um eficiente método para a avaliação de danos na molécula de DNA, induzidos por químicos.

Segundo Kammann *et al.* (2001), a fragmentação ou a quebra de fitas de DNA é considerada uma lesão potencialmente pré-mutagênica, sendo que a produção de quebras nas fitas de DNA pode ser bem correlacionada com muitas propriedades mutagênicas e carcinogênicas de substâncias químicas (Frenzilli *et al.* 2000).

A genotoxicidade da atrazina, avaliada através da fragmentação do material genético de diferentes organismos submetidos a esse herbicida (Ribas *et al.*, 1995; Clements *et al.*, 1997; Tennant *et al.*, 2001; Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2002), pôde ser confirmada através dos nossos estudos com *Oreochromis niloticus* (tilápia). Nossos dados corroboram com os relatados por Clements *et al.* (1997) que, utilizando o ensaio de cometa, mostraram que a atrazina na forma comercial (AAAtrex Nine-O) induziu um dano significativo no DNA de eritrócitos de algumas espécies de sapo. Ribas *et al.* (1995) também verificaram a genotoxicidade do herbicida atrazina, através do ensaio de cometa, mostrando que as concentrações de 50-200 µg/l induzem uma extensa migração do DNA de linfócitos sanguíneos humanos. De acordo com Tennant *et al.* (2001), o ensaio do cometa mostrou que a atrazina induziu um aumento de danos de DNA em leucócitos de ratos. Nossos resultados ainda são concordantes com os estudos de Garaj-Vrhovac and Zeljezic (2002) que, por meio do ensaio de cometa, mostraram que trabalhadores, ocupacionalmente expostos ao herbicida atrazina, apresentaram significativos aumentos na migração do DNA de suas células sanguíneas.

Como todas as concentrações testadas do herbicida atrazina mostraram efeito genotóxico, quando comparadas ao teste controle, podemos inferir que esse herbicida, pelo menos nas concentrações de 6,25 µg/l, 12,5 µg/l e 25 µg/l, pode ocasionar danos no material genético de organismos expostos a esse químico, uma vez que se verificou que

o herbicida atrazina foi capaz de provocar fragmentação no material genético do organismo-teste.

Baseado nos resultados apresentados, podemos sugerir que doses residuais do herbicida atrazina, decorrente de lixiviação de solos de culturas que margeiam recursos hídricos, podem comprometer a estabilidade de ecossistemas aquáticos, principalmente no que se refere à potencialidade em promover danos no material genético de peixes.

Nossa conclusão, a respeito da utilidade do ensaio de cometa, corrobora com as de Singh *et al.* (1988), Olive *et al.* (1992), Tice *et al.* (1990) e Betti *et al.* (1993), que concluíram, em seus diferentes trabalhos, que o ensaio de cometa é um eficiente indicador biológico de genotoxicidade à contaminação química.

Tabela 1: Análise das mudanças observadas, pelo Ensaio de Cometa, nos eritrócitos de

Concentração do herbicida atrazina (ug/l)	Total de células analisadas	Total de células com cometa	Número de nucleóides da classe 0	Número de nucleóides da classe 1	Número de nucleóides da classe 2	Número de nucleóides da classe 3	Scores
	100	19	81	18	1	0	20
	100	17	83	15	2	0	19
0 (controle)	100	20	80	16	3	1	25
	100	13	87	11	2	0	15
	100	14	86	13	1	0	15
Total	500	83	417	73	9	1	X=18,8
	100	78	22	25	31	22	153
	100	75	25	26	30	19	143
6,25	100	80	20	26	33	21	155
	100	81	19	26	32	23	159
	100	78	22	24	32	22	154
Total	500	392*	108	127	158	107	X= 152,8
	100	88	12	19	31	38	195
	100	76	24	31	19	26	147
12,5	100	89	11	19	31	39	198
	100	89	11	15	32	42	205
	100	78	22	24	21	33	165
Total	500	420*	80	108	134	178	X=182
	100	91	9	13	36	42	211
	100	80	20	18	30	32	174
25	100	87	13	13	36	38	199
	100	91	9	12	38	41	211
	100	92	8	14	37	41	211
Total	500	441*	59	70	177	194	X=201,2

valores seguidos por * diferiram significativamente (0,5%), em relação ao controle, pelo teste estatístico de ².

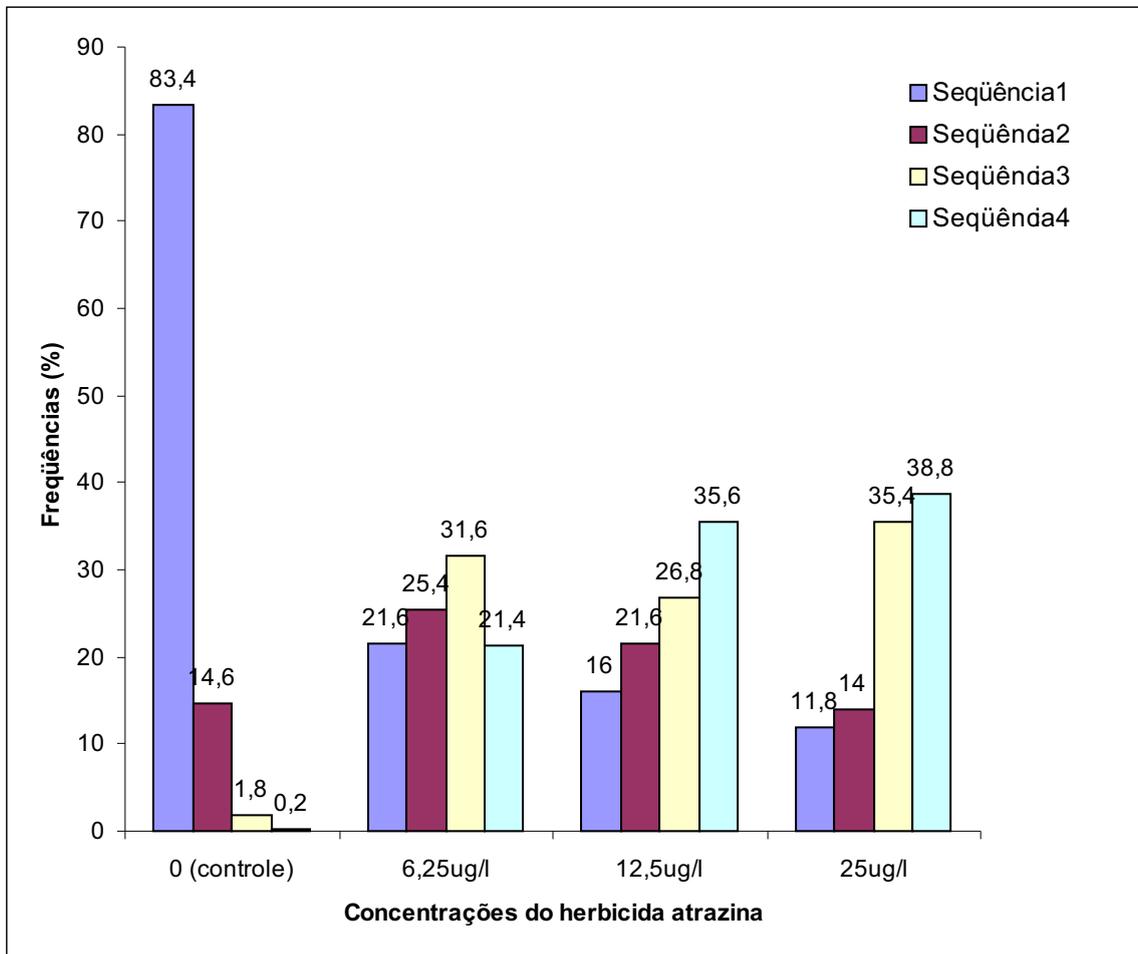


Figura 1: Frequências de nucleóides com danos, para cada classe considerada, encontradas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* tratados com diferentes concentrações do herbicida atrazina.

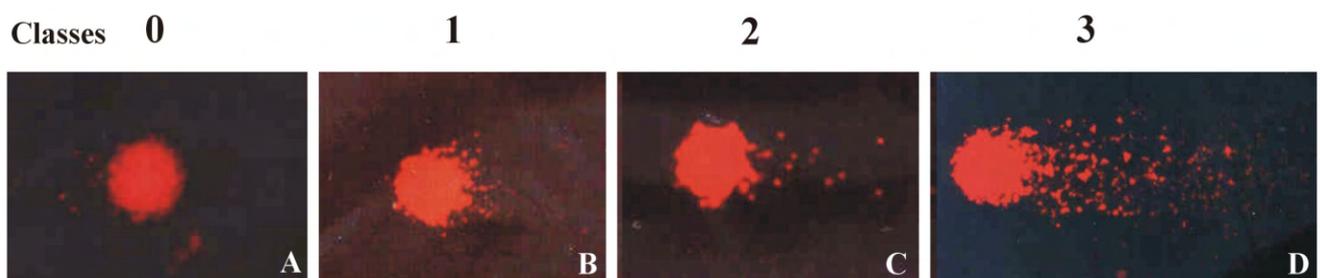


Figura 2: Ensaio de Cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. **A.** Classe 0 (células sem dano); **B.** Classe 1 (dano pequeno); **C.** Classe 2 (dano médio); **D.** Classe 3 (dano grande).

Nota: Classificação dos nucleóides segundo Kobayashi et al. (1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belpaeme, K., Deldeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M. 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* **11**: 485-492.
- Betti, C., Barale, R., Pool-Zobel, B. L. 1993. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**: 172-180.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M. 1997. Genotoxicity of selected herbicides in tadpoles *Rana catesbeiana*, using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* **29**: 277-288.
- Darroundi, F. and Natarajan, A. T. 1993. Metabolic activation of chemicals to mutagenic carcinogens by human hepatoma microsomal extracts in Chinese hamster ovary cells (*in vitro*). *Mutagenesis* **8**: 11-15.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R. 2000. Validation of single gell assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutat. Res.* **35**: 206-221.
- Garaj-Vrhovac, V. and Zeljezic, D. 2002. Assessment of genoma damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J. Ap. Toxicol.* **22** (4): 249-255.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1991. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **53**: 90-105.

- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N. 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res.* **498**: 61-77.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Comm.* **3**: 103-115.
- Koppen, G., Toncelli, L. M., Triest, L., Verschaeve, L. 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mech. Ag. Develop.* **110** (1-2): 13-24.
- Kosz-Vnenchak, M. and Rokosz, K. 1997. The “comet” assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. *Fol. Biol.* **45** (3-4): 153-156.
- Mcnamee, J. P., Mclean, J. R. N., Ferrarotto, C. L., Bellier, P. V. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat. Res.* **466**: 63-69.
- Mitchelmore, C. L. and Chipman, J. K. 1998. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using the single-gel electrophoresis comet assay. *Aquat. Toxicol.* **41**: 161-182.
- Monteith, D. K. and Vanstone, J. 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. *Mutat. Res.* **345**: (3-4): 97-103.
- Nacci, D. E., Cayula, S., Jackmin, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* **35**: 197-210.

- Nanthawan, A., Rabinowits, C., Moiseeva, E., Rinkevich, B. 2002. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. *Mutat. Res.* **518**: 21-37.
- Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E. 1990. Heterogenicity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**: 86-94.
- Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E., Banáth, J. P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* **198**: 259-267.
- Ostling, O. and Johanson, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291-298.
- Pereira, A. A. B. 1991. Testes estatísticos para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R, Monteleone-Neto, R. (eds). *Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação, Brasil.* pp. 113-121.
- Ribas, G., Frenzili, G., Barale, R., Marcos, R. 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat. Res.* **344**: 41-54.
- Sasaki, Y. F., Tsuda, S., Izumiyama, F., Nishidate, E. 1997. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat. Res.* **388**: 33-44.

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Scheider, E. L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175** (1): 184-191.
- Steinert, S. A. 1996. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.* **42**: 253-259.
- Tennant, A. H., Peng, B, Kligerman, A. D. 2001. Genotoxicity studies of triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single gel (SCG) assay. *Mutat. Res.* **493**: 1-10.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., Singh, N. P. 1990. The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: Suntherland, B. M. and Wordhead, A. D. (eds.). *DNA damage and repair in human tissues*. Plenum Press of New York, Estados Unidos. pp. 291-301.

7. DISCUSSÃO GERAL

a. Sistemas-teste

Foram realizadas análises de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, utilizando-se *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste, em diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina.

O sistema-teste de *A. cepa* foi utilizado para avaliar as ações citotóxicas e mutagênicas (através dos ensaios de morte celular e de aberrações cromossômicas, respectivamente) de diferentes concentrações do herbicida atrazina (0,015ppm; 0,031ppm; 0,062ppm e 0,125ppm), comparando os resultados com o controle (realizado apenas com água milli-Q).

O sistema-teste de *O. niloticus* foi utilizado para avaliar as ações genotóxicas (por meio dos ensaios de anormalidades nucleares e de cometa) e mutagênicas (por meio do ensaio de micronúcleos) de diferentes concentrações do herbicida atrazina (6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l), comparando os resultados com o controle (realizado apenas com água de poço artesiano).

A escolha dos sistemas-teste seguiu a indicação de outros estudos (FISKESJÖ, 1985; AL-SABTI, 1986; HOSE et al., 1987; GROOVES et al., 1988; HARSHBARGER & CLARK, 1990; RANK & NIELSEN, 1993, 1997, 1998; FRANEKIC et al., 1994; AL-SABTI & METCALFE, 1995; KHORS et al., 1997; SMAKA-KINCL et al., 1997;

KOVALCHUCK et al., 1998; CHAUHAN et al., 1999; COTELLE et al., 1999; ALVES-COSTA, 2001; BOMBAIL et al., 2001), que descreveram a efetividade dos organismos na avaliação de tóxicos ambientais.

b. Análise dos efeitos citotóxicos

Foram realizadas análises, em sistema-teste de *Allium cepa*, para avaliar a potencialidade de indução do efeito citotóxico de diferentes concentrações do herbicida atrazina (0,015ppm; 0,031ppm; 0,062ppm; 0,125ppm (concentração mínima utilizada em campo), por meio do ensaio de morte celular (Técnica de Corantes Vitais). Foram observadas, para todas as raízes de *Allium cepa* submetidas às concentrações do herbicida atrazina testadas, porções de tecidos vivos e porções de tecidos em morte celular (apoptose ou necrose). Nenhuma região de morte celular foi observada para o controle.

É importante salientar que para as concentrações mais altas do herbicida atrazina (0,062ppm e 0,125ppm) houve uma maior indução de morte celular. Esses resultados demonstram que o herbicida atrazina apresenta um efeito citotóxico sobre o sistema-teste de *Allium cepa*, especialmente nas maiores concentrações do herbicida, incluindo, portanto, a concentração de 0,125ppm, que é utilizada em campo. Esse elevado grau de morte celular observado provavelmente ocorreu devido ao comprometimento dos tecidos precursores do sistema vascular, tais como o córtex radicular e a epiderme, tecidos esses de importância vital para o organismo. Nossos resultados são concordantes com os resultados de Bayer et al. (1967), que afirmam que os herbicidas atuam sobre os vegetais, diminuindo a zona de tecido meristemático e interrompendo o desenvolvimento da planta, por bloquear o processo de divisão celular. Provavelmente essa diminuição tecidual ocorra devido à ineficiência do organismo-teste em repor as células afetadas pela ação do herbicida atrazina e que, conseqüentemente, decorre em grande eliminação celular.

Nossos dados revelam que o ensaio de morte celular em sistema-teste de *Allium cepa* constitui um bom parâmetro de avaliação de citotoxicidade de substâncias químicas. Pelas nossas análises, pudemos observar que todas as raízes submetidas às concentrações testadas do herbicida atrazina tiveram uma indução de morte celular e, portanto, uma

redução de sua viabilidade celular. Os dados aqui apresentados corroboram com as citações de Steinert (1996) e Kaioumova et al. (2001), que afirmam que a perturbação de células por agentes químicos, como os herbicidas, pode levar a uma seqüência complexa de eventos que pode resultar em morte celular, tanto de maneira apoptótica como necrótica. Os dados aqui apresentados acrescentam às citações de Tuschl & Schwab (2003), que afirmam que o herbicida 2,4-D é capaz de induzir morte celular em linhagens de células humanas de hepatoma, e Sinha et al. (1998), que demonstraram que o herbicida flucloralina induz morte celular, do tipo apoptótica, em células tratadas com esse herbicida, que também o herbicida atrazina pode induzir morte celular em tecidos radiculares de *Allium cepa*.

Nada podemos afirmar com relação ao tipo de morte celular, uma vez que a Técnica de Corantes Vitais não distingue células necróticas de apoptóticas, mas sim células vivas e em processo de quaisquer tipos de morte celular. O herbicida atrazina pode ter provocado tanto a morte celular do tipo apoptótica como necrótica, os quais poderiam ser distinguidos apenas pela aplicação de outras técnicas de morte celular (HUPPERTZ et al., 1999).

Nossas análises inferem que a técnica de coloração pelos corantes vitais iodeto de propídio e Hoechst mostrou-se indicada para a avaliação de indução de morte celular em meristemas radiculares de sistema-teste de *Allium cepa*, porém sem especificar o tipo de morte celular envolvido, constituindo-se em mais um teste eficiente para análise de citotoxicidade de substâncias químicas.

c. Análise dos efeitos genotóxicos

O potencial de genotoxicidade das diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina foi avaliado pela freqüência de danos no DNA de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, detectado por meio dos ensaios de anormalidades nucleares e de cometa.

Foram realizadas análises em sistema-teste de *Oreochromis niloticus* para avaliar a potencialidade de indução do efeito genotóxico de diferentes concentrações do herbicida atrazina (6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l), por meio do ensaio de anormalidades nucleares. Foram observados nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, tratados com as diferentes

concentrações do herbicida atrazina, freqüências significativas de alterações nucleares, quando comparadas com o controle.

As alterações nucleares, encontradas nos eritrócitos dos peixes expostos ao herbicida atrazina, podem ser consideradas aberrações celulares, as quais são bastante comuns, segundo Carrasco et al. (1990), em organismos submetidos à exposição de agentes químicos. De acordo com Beutler (1985), um grande número de drogas e outros compostos químicos pode interferir na síntese de DNA dos seres vivos a eles expostos, resultando nas conhecidas lesões nucleares.

Nossos dados demonstraram que o herbicida atrazina, nas concentrações testadas, é capaz de interferir no material genético dos organismos a ele expostos, ocasionando alterações nucleares. Estudos adicionais são necessários para que possamos elucidar os mecanismos exatos de como os compostos químicos podem induzir a formação de anormalidades nucleares. De acordo com Ghadially (1982), as alterações nucleares do tipo “notched” e vacuolização do núcleo devem estar, provavelmente, associadas às aneuploidias. Ribeiro et al. (2003) consideram que as células com núcleos heteroploides e vacuolizados estejam associadas aos processos de morte celular. Já as células binucleadas podem ter sido originadas devido à dificuldade da formação do fuso mitótico, ocasionada pela ação aneugênica de compostos químicos (CANEVARI, 1996).

Foram realizadas análises em sistema-teste de *Oreochromis niloticus* para avaliar a potencialidade de indução do efeito genotóxico de diferentes concentrações do herbicida atrazina (6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l), por meio do ensaio de cometa. O ensaio do cometa tem sido proposto como uma ferramenta eficiente no campo da genética toxicológica (TICE et al., 1990; BETTI et al., 1993). Esse teste evidencia danos na molécula de DNA, pela migração diferencial do material nuclear, quando submetido à eletroforese (ANDERSON et al, 1998; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; NANTHAWAN, 2002).

Foram observadas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, tratados com as diferentes concentrações do herbicida atrazina, freqüências significativas de danos na molécula de DNA, quando comparadas com o controle. Além disso, existiu uma relação positiva de dose-resposta em todas as exposições às concentrações do herbicida atrazina testadas.

Nossos resultados demonstraram, através do ensaio de cometa, que as concentrações testadas do herbicida atrazina induziram efeitos genotóxicos em sistema-teste de *Oreochromis niloticus*. Esses dados corroboraram com os estudos de Mitchelmore & Chipman (1998), Nacci et al. (1996) e Belpaeme et al. (1996), os quais mostraram que o ensaio de cometa em eritrócitos de peixes é uma técnica eficiente para detectar a genotoxicidade de compostos químicos, já que as células sanguíneas são bastante sensíveis aos efeitos das substâncias tóxicas. Darroundi & Natarajan (1993) e Mcnamee et al. (2000) também afirmam a eficiência do ensaio de cometa como método para a avaliação de danos na molécula de DNA induzidos por químicos.

A genotoxicidade da atrazina pôde ser confirmada através dos nossos estudos com *Oreochromis niloticus*, para todas as concentrações testadas. Assim, podemos inferir que esse herbicida, pelo menos nas concentrações de 6,25 ug/l, 12,5 ug/l e 25 ug/l, pode ocasionar danos no material genético dos organismos expostos a esse químico, podendo ser potencialmente prejudicial, inclusive para o homem.

d. Análise dos efeitos mutagênicos

Para as análises dos efeitos mutagênicos das diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina, foram utilizados dois sistemas-teste, o *Allium cepa* e o *Oreochromis niloticus*. Esses sistemas-teste são reconhecidos como organismos eficientes na avaliação de mutagênese ambiental, por vários autores.

O potencial de mutagenicidade das diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina foi avaliado pela frequência de células aberrantes em meristemas de *Allium cepa* (por meio do ensaio de aberrações cromossômicas) e pela frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (por meio do ensaio do micronúcleo písceo).

Foram realizadas análises das células portadoras de aberrações cromossômicas, em sistema-teste de *Allium cepa*, para avaliar a potencialidade mutagênica das diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina (0,015ppm; 0,031ppm; 0,062ppm; 0,125ppm – concentração mínima utilizada em campo) nos tratamentos de 20h e de 48h (recuperação). As aberrações observadas, para os dois tratamentos, nas células submetidas às diversas

concentrações do herbicida, foram: anáfase multipolar, pontes anafásica e/ou telofásica, quebra cromossômica na metáfase e/ou na anáfase, atraso anafásico, micronúcleo, aderência cromossômica, C-metáfase, perda de material genético na prófase, atraso telofásico e perda cromossômica na metáfase e/ou na anáfase. As freqüências de células aberrantes totais, observadas para todas as concentrações testadas do herbicida atrazina, para ambos os tratamentos (20h e recuperação), foram significativamente mais altas que a freqüência observada para o teste controle.

A concentração de 0,062ppm foi a que mais induziu alterações celulares, podendo ser a mesma considerada, dentre as concentrações testadas, como a concentração diagnóstico de mutagenicidade, em sistema-teste de *Allium cepa*, para o herbicida atrazina.

A concentração de 0,125ppm induziu uma freqüência menor de células aberrantes quando comparada à concentração de 0,062ppm do herbicida atrazina, o que pode ser explicado devido à inibição do índice mitótico das células das raízes de *Allium cepa* e da indução de morte celular devido à ação do herbicida atrazina na sua concentração mínima utilizada em campo (VENTURA, 2002).

Decorrido o período de recuperação, foram observadas menores freqüências de células aberrantes em todos os testes realizados. Dessa maneira, o período de recuperação parece ter sido eficiente para minimizar o efeito mutagênico do herbicida, pois houve uma diminuição das freqüências de aberrações ou, até mesmo, o desaparecimento de algumas das aberrações antes observadas.

Nossos dados são pioneiros quanto ao potencial de recuperação de danos promovidos pela ação do herbicida atrazina em células de *Allium cepa*.

Nossos resultados apontam a presença de diversos tipos de aberrações cromossômicas, nos diferentes testes realizados. Foi verificada a presença de anáfases multipolares, as quais, segundo Rank & Nielsen (1997), ocorrem devido ao mau funcionamento do fuso mitótico, distribuindo os cromossomos para mais de dois pólos das células.

Outras aberrações cromossômicas encontradas, devido à ação do herbicida atrazina, foram quebras, atrasos e pontes cromossômicas. Segundo Fiskesjö (1993), as quebras cromossômicas podem causar pontes anafásicas, as quais podem ser originadas por

translocações ou por terminações cromossômicas coesivas. É possível que as pontes resultem, também, de aderências cromossômicas, podendo, neste caso, serem múltiplas e persistirem até a telófase. Quando as pontes cromossômicas resultam de rearranjos estruturais, elas podem deixar fragmentos cromossômicos (GIACOMELLI, 1999).

Também foi observada a presença de micronúcleos, que podem ter sido originados, segundo Sudhakar et al. (1998), de um atraso cromossômico na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso ou ainda devido à presença de fragmentos acêntricos. Assim, agentes químicos podem induzir micronúcleos, por meio de distúrbios do fuso ou de quebras cromossômicas.

Assim como Sudhakar et al. (1998), nós sugerimos que, os micronúcleos induzidos pelo herbicida atrazina, podem ser formados pelos atrasos cromossômicos na anáfase e por fragmentos acêntricos. Porém, sugerimos ainda que, pelas nossas observações citológicas que evidenciam a presença de pontes cromossômicas em anáfase, os micronúcleos derivados de fragmentos acêntricos devem corresponder às regiões teloméricas perdidas dos cromossomos de *A. cepa* envolvidos na quebra.

A presença de C-metáfases é mais um indicativo da mutagenicidade do herbicida atrazina. Nas C-metáfases ou C-mitoses, o fuso nuclear é completamente inativado, o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e, conseqüentemente, a divisão do centrômero é atrasada ou até impedida. Desta forma, a presença de células em C-metáfase, continuamente, poderá conduzir a duplicação do número de cromossomos dessas células. Um outro efeito da C-metáfase é a produção de números cromossômicos variáveis, isto é, a produção de células displóides. Então, um desvio muito grande em relação ao número cromossômico normal induzirá a um desbalanço cromossômico, com perda da viabilidade, inativação parcial ou completa do fuso nuclear e aumento da contração cromossômica. Segundo Fiskesjö (1985, 1993), a C-metáfase deve ser referida como um mecanismo causador de sérios danos, podendo ser incluída entre os parâmetros para um *screening* de efeitos genotóxicos e mutagênicos.

Outra alteração encontrada foi a existência de metáfases com aderência cromossômica. Essa alteração também pode ter sido induzida pela inativação do fuso mitótico decorrente da ação da atrazina sob a célula, que decorre no impedimento da

migração cromossômica para os pólos. Há, então, um estacionamento da divisão celular em metáfase, o que provoca aderências cromossômicas. Segundo Giacomelli (1999), a aderência cromossômica é um fenômeno citogenético amplamente descrito em plantas. Embora sua primeira descrição tenha sido feita por Köernicke, no início do século passado, o termo *stickiness* foi empregado pela primeira vez em 1932, por Beadle, para descrever o aspecto pegajoso de cromossomos de milho, em células que haviam sofrido uma mutação recessiva.

Foram realizadas análises das células portadoras de micronúcleos, em sistema-teste de *Oreochromis niloticus*, para avaliar o potencial mutagênico das diferentes concentrações testadas do herbicida atrazina (6,25 ug/l; 12,5 ug/l e 25 ug/l). Foram observados nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, tratados com as diferentes concentrações do herbicida atrazina, freqüências significativas de células com micronúcleos, quando comparadas com o teste controle. Além disso, existiu uma relação positiva proporcional de dose-resposta para todas as concentrações do herbicida atrazina testadas. A atrazina pode ter induzido a formação de micronúcleos tanto por meio de distúrbios do fuso como por quebras cromossômicas.

Nossos resultados mostraram a alta freqüência de micronúcleos nos indivíduos de *O. niloticus* expostos às diferentes concentrações do herbicida atrazina, o que também pôde ser visto em outros estudos de morfologia nuclear de eritrócitos de peixes expostos a outros compostos químicos (DAS & NANDA, 1986; HOSE et al., 1987; HUGHES & HEBERT, 1991). Dessa maneira, nós concordamos com De Flora et al. (1993), que propuseram que o teste de micronúcleo písceo é uma ferramenta eficaz para a avaliação do potencial mutagênico de substâncias químicas, especialmente daquelas que provocam respostas clastogênicas em organismos expostos.

Nossos resultados corroboram com as afirmações de Longwell et al. (1983), Das & Nanda (1986), Al-Sabti (1986), Hose et al. (1987) e Long & Buchman (1989), os quais concluíram, em seus diferentes trabalhos, que o uso do teste do micronúcleo písceo é um eficiente indicador biológico de mutagenicidade devido à exposição química.

Os dados referentes a todos os ensaios aqui apresentados demonstram a potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica das diferentes concentrações testadas do

herbicida atrazina, a qual pode estar relacionada com problemas de descaracterização do material genético dos organismos expostos a esse químico.

8. CONCLUSÃO

- As análises realizadas com as diferentes concentrações do herbicida atrazina testadas mostraram que houve a indução de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nos sistemas-teste utilizados.

- Houve uma relação diretamente proporcional de dose-resposta para todas as concentrações testadas do herbicida atrazina nos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.

- O período de recuperação mostrou-se eficiente para minimizar os efeitos mutagênicos do herbicida atrazina, uma vez que a frequência de células aberrantes, em sistema-teste de *Allium cepa*, diminuiu em todas as concentrações testadas.

- A concentração de 25 ug/l do herbicida atrazina foi a que induziu uma maior frequência de micronúcleos, sendo considerada como potencialmente mais mutagênica que as outras concentrações utilizadas.

- Todas as concentrações do herbicida atrazina utilizadas para o sistema-teste de *Oreochromis niloticus* mostraram um alto potencial genotóxico, uma vez que induziram significativas frequências de anormalidades nucleares e de fragmentação do DNA dos organismos expostos.

- Podemos considerar a concentração de 0,062ppm do herbicida atrazina como a dosagem diagnóstica para detecção de aberrações cromossômicas em células

meristemáticas de *Allium cepa*; e a concentração de 6,25 ug/l do herbicida atrazina como a dosagem diagnóstico para detecção de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Essas concentrações poderiam constituir um eficiente indutor de alterações celulares e cromossômicas, podendo ser usadas em ensaios de controle positivo.

- Acredita-se que as potencialidades citotóxica, genotóxica e mutagênica do herbicida atrazina sobre os sistemas-teste utilizados, possam constituir um grande perigo à saúde dos organismos expostos a esse composto químico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, M.J. Identification and confirmation of atrazine in pond water. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 25, p. 492-498, 1980.

ABDEL-RAHMAM, A.R.; WAUCHOPE, R.D.; TRUMAN, C.C.; DOWLER, C.C. Runoff and leaching of atrazine and alachlor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 34, p. 381-396, 1999.

ADLER, I.D. A review of the coordinated research effort on the comparison of the test systems for the detection of mutagenic effects, sponsored by the E.C.C. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 74, p. 77-93, 1980.

ALMEIDA, W. F. Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica. **O biológico**, São Paulo, v. 6, p. 171-183, 1974.

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios**, Cambridge, v. 47, p. 147-154, 1986.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 13, n. 5, p. 333-336, 1994.

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

ALVES, A. Usos e Abusos. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 49-52, 1986.

ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANDERSON, D.; YU, T-W; MCGREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. **Mutagenesis**, New York, v. 13, p. 539-555, 1998.

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos**. 2 ed. México: [s.n.], 1995. 267 p.

ATEEQ, B.; ABDUL-FARAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 135-144, 2002.

BAYER, D.E.; FOY, C.L.; MALLORY, T.E.; CUTTER, E.G. Herbicides. **American Journal of Botany**, [S.l.], v. 54, p. 945-952, 1967.

BELPAEME, K.; DELDEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, New York, v. 11, p. 485-492, 1996.

BERGGREN, D.; FISKESJÖ, G. Aluminium toxicity and speciation in soil liquids-experiments with *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 6, p. 771-779, 1987.

BERTOLETTI, E. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental: Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua ação no controle da poluição de São Paulo**. 1 ed. Brasil: [s.n.], 1996. 29p.

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B.L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 22, p. 172-180, 1993.

BEUTLER, E. Chemical toxicity of the erythrocyte. In: **Toxicology of the blood and bone marrow**. 1 ed. Estados Unidos: Raven Press of New York, 1985. 182p.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A.W.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 383-392, 2001.

BURGEOT, T.; HIS, E.; GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, p. 1-16, 1995.

BUTLER, M.A.; HOAGLAND, R.E. Genotoxicity assessment of atrazine and some major metabolites in the Ames test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Florida, v. 43, p. 797-804, 1989.

CANEVARI, R.A. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos**

agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina. 1996. n f. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARRASCO, R.K.; TILBURY, K.L.; MYERS, M. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CHAUHAN, L.K.S.; SAVENA, P.M.; GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 42, p. 181-189, 1999.

CHEVREUIL, M.; GARMOUMA, M.; TEIL, M.J.; CHESTERIKOFF, A. Occurrence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of Paris area. **Science of the Environment**, [S.l.], v. 182, p. 25-37, 1996.

CHOU, T.S.; WEBER, D.F. The effect of the atrazine on sister-chromatid exchanges maize. **Genetics**, Califórnia, v. 97, p. 521, 1981.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of selected herbicides em tadpole *Rana catesbeiana*, using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 29, p. 277-288, 1997.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F., FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* - micronucleus and the *Tradescantia* - micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 167-171, 1999.

DARROUNDI, F.; NATARAJAN, A.T. Metabolic activation of chemicals to mutagenic carcinogens by human hepatoma microsomal extracts in Chinese hamster ovary cells (*in vitro*). **Mutagenesis**, New York, v. 8, p. 11-15, 1993.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-C and paper mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 175, p. 67-71, 1986.

DASSENOY, B.; MEYER, J.A. Mutagenic effects of benomyl on *Fucarion oxysporum*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 21, p. 119-120, 1973.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; D'AGOSTINE, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNOSCO, M.; BENICELLI, C.; MELODIA, L.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity markers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 319, p. 167-177, 1993.

ELDRIDGE, J.C.; WETZEL, L.T.; STEVENS, J.T.; SIMPKINS, J.W. The mammary tumor response in triazine-treated female rats: a threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. **Steroids**, Califórnia, v. 4, p. 672-678, 1999.

FERNANDES, T.C.C.; VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina. **Genetics and Molecular Biology**: Suplement, Ribeirão Preto, v. 24, n. 4, 2001.

FERNANDES, T.C.C.; VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**: Suplement, Ribeirão Preto, v. 25, n. 5, 2002.

FISKESJÖ, G.; LASSEN, C.; RENBER, L. Chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 34, p. 333-444, 1981.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993.

FRANEKIC, J.; BRATULIC, N.; PAVLIKA, M.; PAPES, D. Genotoxicity of thiocarbamates and their metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, p. 65-74, 1994.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single gell assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 35, p. 206-221, 2000.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genoma damage in a population Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analys micronucleus assay and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 22, n. p. 249-255, 2002.

GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 2 ed. London: Butterworths, 1982. 971p.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 131f. Tese (Mestrado em Genética), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

GOLDMAN, L.R. **Atrazine, simazine and cyanazine: Notice of initiation of special review in federal register**, Estados Unidos, s.n.: 60412-60443. 1994.

GORELL, J.M.; JHONSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; RICCHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farmin, well water, and rural living. **Neurology**, Heidelberg, v. 50, p. 1346-1350, 1998.

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W.F.; OWENS, E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 188, p. 93-118, 2001.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44, 2001.

GROVES, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides - a comparative study using a battery of assays. **Nucleus**, [S.l.], v. 31, p. 69-77, 1988.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; BROGGER, A.; KNUDSEN, L.E.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCTH). **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, p. 4117-4121, 1998.

HARSHBARGER, J.C.; CLARK, J.B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.E.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; SUSIN, S.A. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. **Oncogene**, United Kingdom, v. 45, p. 1573-1581, 1997.

HOSE, J.E.; HANNAH, J.B.; PUFFER, H.W.; LANDOLT, M.N. Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene-treated rainbow trout alevins. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 13, p. 675-684, 1984.

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIELL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 22, p. 167-176, 1987.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 20, p. 474-479, 1991.

HUPERTZ, B.; FRANK, H-G; HAUFMANN, P. Cell death. **Anatomy and Embriology**, Roma, v. 200, p. 1, 1999.

JONES, F.; FAWELL, J.K. Lessons learnt from the river DEE Pollution Incident. **Public Health in Proceedings of the World conference on chemicals accidents**, Harvard, v. 4, p. 223-226, 1987.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, Heidelberg, v. 62, p. 64-74, 2001.

KAPPAS, A. On the mutagenic and the recombinogenic activity of ceratin herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 204, p. 615-621, 1988.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal Cancer**, United Kingdom, v. 26, p. 239-257, 1972.

KHORS, S.S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Genotoxicity of tetrodotoxin from buffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, New York, v. 12, p. 265-269, 1997.

KIM, J.H.; FEAGLEY, S.E. Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor, and metribuzin in a commerce soil. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 33, p. 529-546, 1998.

KLIGERMAN, A.D.; CHAPIN, R.E., EREXSON, G.L.; GERMOLEC, D.R.; KWANYUEN, P.; YANG, R.S. Analyses of cytogenetic damage in rodents following exposure to simulated groundwater contaminated with pesticides and a fertilizer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 300, p. 125-134, 1993.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The “comet” assay for detection of potent genotoxicity of polluted water. **Folia biologica**, Kraków, v. 45, n. 3-4, p.153-156, 1997.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B., KOVALCHUCK, I. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 415, n. 20, p. 47-57, 1998.

KRISTEN, U. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. **Toxicology in vitro**, United Kingdom, v. 11, p. 181-191, 1997.

LANDOLT, M.L.; KOCAN, R.M. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 4, p. 336-353, 1983.

LEE, K.C.; RAO, G.M.; BARNETT, F.L.; LIANG, G.H. Further evidence of meio instability induced by atrazine in grain sorghum. **Cytologia**, Tokyo, v. 34, p. 697-702, 1974.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, [S.l.], v. 236, p. 1-9, 1997.

LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A.F.; KÜHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, p. 1481-1486, 1997.

LIANE, G.H.L.; FELTNER, K.C.; LIANG, Y.T.S.; MORRILL, J.L. Cytogenetic effects and responses of agronomic characters in grain sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.) following atrazine application. **Crop Science**, New York, v. 7, n. 3, p. 245-248, 1967.

LINCK, A.J. Effects on the cytology and fine structure of plant cells. **Herbicides**, [S.l.], v. 1, p. 83-121, 1979.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; BERARDINO, D.D.; URSINI, M.V. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 32, p. 39-46, 1998.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAI, L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium cepa* test. **Israel Journal of Plant Science**, Northern Greece, v. 43, p. 125-133, 1995.

LONG, E.R.; BUCHMAN, M.F. An evaluation of candidate measures of biological effects for the National Status and Trends Program. **Nat'l Oceanic Atmospheric Administration and Technology**, New York, v. 45, p. 1-97, 1989.

LONGWELL, A.C.; CROSBY, A.; PERRY, D.; HUGHES, J.B.; HEBERT, A. Frequencies of micronuclei in mature and immature erythrocytes of fish as an estimate of chromosome mutation rates – results of field surveys on windowpane flounder, winter flounder, and Atlantic mackerel. **International Council Exploration of Sea**, New York, v. 1, p. 45-55, 1983.

LOPRIENO, N.; ADLER, I.D. Cooperative Programme of the EEC on short-term assays for mutagenicity. In: **MONTESANO, R.; BARTSCH, H.; TOMATIS, L. (eds.), Molecular and Cellular aspects of carcinogen screening tests**, France: Science Publisher, 1980. p. 331-341.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 334, p. 185-195, 1995.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.R. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, New York, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.

MCNAMEE, J.P.; MCLEAN, J.R.N.; FERRAROTTO, C.L; BELLIER, P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 466, p. 63-69, 2000.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 146, p. 3-15, 1995.

MATSUMOTO, S.T.; MALAGUTTI, M.I.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação genotóxica de um córrego, município de Franca/SP, que recebe efluente de curtume, utilizando *Alli cepa* como organismo-teste. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, Ribeirão Preto, 26, n. 2, p. 200, 2003.

MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination**. 1 ed. Estados Unidos: Lewis, 1990. 382p.

MCNAMEE, J.P.; MCLEAN, J.R.N.; FERRAROTTO, C.L; BELLIER, P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 466, p. 63-69, 2000.

MEISNER, L.F.; BELLUCK, D.A.; ROLLOFF, B.D. Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine *in vivo* and *in vitro*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 19, p. 77-82, 1992.

MEISNER, L.F.; ROLOFF, B.D.; BELLUCK, D.A. *In vitro* effects of N-nitrosoatrazine on chromosome breakage. **Environmental Toxicology**, New York, v. 24, p. 108-112, 1993.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. In: **CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (eds.) A célula 2001**, Brasil: Manole, 2001. 275p.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barb plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 367, n. 4, p. 245-251, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using the single-gel electrophoresis comet assay. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 41, p. 161-182, 1998.

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, n. 3-4, p. 97-103, 1995.

MORAES, D.S.L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 2000. 158 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MUNGER, R.; ISACSON, P.; HU, S.; BURNS, T.; HANSON, J.; LYNCH, C.F.; CHERRYHOLMES, K.; VANDORPE, P.; HAUSLER, Jr. W. J. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicides-contaminated drinking water supplies. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 105, p. 308-314, 1997.

MURNIK, M.R.; NASH, C.L. Mutagenicity of triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Toxicology Environmental Health**, [S.l.], v. 3, p. 691-697, 1977.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKMIN, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 35, p. 197-210, 1996.

NANTHAWAN, A.; RABINOWITS, C. MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 21-37, 2002.

NATARAJAN, A.T. Chromosome Aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, Leiden, v. 504, p. 3-16, 2002.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. **Radiation Research**, San Diego, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVE, P.L.; WLODEK, D.; BANÁTH, J.P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 51, p. 4671-4676, 1991.

OLIVE, P.L.; WLODEK, D.; DURAND, R.E.; BANÁTH, J.P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 198, p. 259-267, 1992.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, [S.l.], v. 123, p. 291-298, 1984.

PANDA, K.K.; PATRA, J.; PANDA, B.B. Persistence of cadmium-induced adaptive response to genotoxicity of maleic hydrazide and methyl-mercuric chloride in root meristem

cells of *Allium cepa* L.: differential inhibition by cycloheximide and buthionine sulfoximine. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 389, p. 129-139, 1997.

PAVANELLI, E.A.S. **Efeito de biocidas sobre a polinização e germinação de sementes de orquídeas dos gêneros *Cattleya* Lsl. e *Laelia* Lsl. (Orchidaceae)**. 1995. 179 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PEITSCH, M.C.; MANNHERZ, H.G.; TSCHOPP, J. The apoptosis endonucleases: clean up after cell death? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 4, p. 37-41, 1994.

PEÑA, L.F.M. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. 1996. 199 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; GENTILE, G.J.; GENTILE, J.M. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 136, p. 233-245, 1984.

POPA, N.E.; ZAKRZHEVSKAYA, A.M.; KOZHOKARU, R.V.; ENAKI, D.K. Cytogenetic effect of some herbicides on maize seedlings. **Weed Abstracts**, Farnham Royal, v. 35, n. 1, p. 50, 1986.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 283, p. 1-11, 2003.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Hemisphere**, Washington, v. 42, n. 1, p. 1-28, 1985.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v. 118, p. 49-53, 1987.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v. 118, p. 49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-Nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfone. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418, n. 3, p. 113-119, 1998.

RIBAS, G.; FRENZILI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage human lymphocytes evaluated by the single-gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 344, p. 41-54, 1995.

RIBAS, G.; SURRALLÉS, J.; CARBONELL, E.; CREUS, A.; XAMENA, N.; MARCOS, R. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 416, p. 93-99, 1998.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.

ROLOFF, B.D.; BELLUCK, D.A.; MEISNER, L.F. Cytogenetic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. **Environmental Toxicology**, New York, v. 22, p. 267-271, 1992.

SAKAMOTO, E.T.; TAKAHASHI, C.S. Efeitos dos fungicidas Dithane M-45, Benlate e Vitavax 75 PM sobre os índices mitóticos dos meristemas radiculares de *Allium cepa*. In: **Anais da SBPC**, São Paulo, v. 31, p. 573, 1979.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 388, p. 33-44, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1976. 53p.

SILVA, J.; FONSECA, M.B. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Brasil: Alcance, 2003. 471p.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINGH, N.P.; TICE, R.R.; STEPHENS, R.E.; SCHNEIDER, E.L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantification of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 252, p. 289-296, 1991.

SINHA, S.; PANNEERSELVAM, N.; SHANMUGAM, G. Fluchloralin is cytotoxic and genotoxic and induces apoptosis in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 31, n. 3, p. 257-262, 1998.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOUKAM, T.M.A.M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research: Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 38, n. 3-4, p. 171-179, 1997.

STALDEMANN, C.; LASSMANN, H. Detection of apoptosis in tissue sections. **Cell Tissue Research**, Berlin, v. 301, p. 19-31, 2000.

STEINERT, S.A. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 42, p.253-259, 1996.

SUDHAKAR, D.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 203, p. 11-21, 1998.

SUMMER, D.D.; CASSIDY, I.M.; SZOLICS, I.M.; MARCO, G.J. Evaluation of the mutagenic potential of corn (*Zea mays* L.) grown in untreated and a atrazine (A Atrex) treated soil in the field. **Drug Chemical and Toxicology**, [S.l.], v. 7, p. 243-257, 1984.

TAS, J.; WESTERNENG, G. Reagent for the fluorescent staining of nucleic acids. **Journal of Histochemical and Cytochemistry**, [S.l.], v. 29, p. 929, 1981.

TAVARES, D.C. **Estudos da possível ação genotóxica do alcalóide boldina em sistemas de células de mamífero “in vitro” e “in vivo”**. 1991. 205 f. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade do Estado de São Paulo, Ribeirão Preto.

TENNANT, A.H.; PENG, B; KLIGERMAN, A.D. Genotoxicity studies of triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single gel (SCG) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, p. 1-10, 2001.

TERRACINI, B. Valutazione della carcinogenecita degli idrocarburi clorutati usati come pesticide. **Tumori**, Milano, v. 53, p. 601-618, 1977.

TICE, R.R.; IVETT, J.L. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: **Toxicology of the blood and bone marrow**, 1 ed. Estados Unidos: Raven Press of New York, 1985, 140 p.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W.; SINGH, N.P. The single cell gel assay: A sensitive techniq for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: **SUNTHERLAN B.M.; WORDHEAD, A.D. (eds.). DNA damage and repair in human tissues**, Estad Unidos: Plenum Press of New York, 1990. p. 291-301.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to Toxicology**. 2. ed. Estados Unidos: Taylor & Franc 1999. 167p.

TORRES, C.; RIBAS, G.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity of four herbicides in *Drosophila* wing spot tests. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 280, p. 291-295, 1992.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic c in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 41, p. 385-393, 2003.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação: Microrganismos degradadores do herbicida atrazina**. 1 ed. Brasil: [s.n.], 1997. 545p.

USEPA. Atrazine: Carcinogenicity characterization and hazard assessment, office of pesticide programs, health effects division. 1999. [Http:// www.epa.gov/scipoly/sap/#jan](http://www.epa.gov/scipoly/sap/#jan)

VANDER WERF, H.M.G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, The Netherlands, v. 60, p. 81-96, 1996.

VEIGA, A.B. **O uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron**. 1995, 58 f. Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

VENTURA, B.C.; FERNANDES, T.C.C., MATSUMOTO, S.T.; SPINOSA, W.; MARIN-MORALES, M.A. O uso do *Allium cepa* na investigação da mutagenicidade derivada de possíveis persistências de agrotóxicos na sub-bacia do Pari-Veado. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 690, 2000.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do herbicida atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa***. 2002, 81 f. Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, Rio Claro.

VENTURA, B.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 5, 2002.

VENTURA, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação dos efeitos genotóxicos do herbicida atrazina, usando sistema-teste de *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology: Supplement**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 2, p. 202, 2003.

VIDAKOVIC, Z.; PAPES, D.; TOMIC, M. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, Canada, v. 69, p. 413-423, 1993.

VIJAYAN, M.M.; MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, [S.l.], v. 199, p. 2467-2475, 1996.

VOGEL, E.W. Assessment of chemically induced genotoxic events. **In: Prospectives and Limitations**, The Netherlands: Universitaire Pers Leiden, 1982. p. 24.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 437, 21-49, 1999.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemical and Citochemistry**, [S.l.], v. 41, p. 7-19, 1999.

WOODLE, E.S.; KULKARNI, S. Cell death. **Transplantation**, New York, v. 66, p. 681, 1998.

WORTHING, C.R.; WALKER, S.B. **The pesticide manual**. 7 ed. U.K.: The Lavenham Press, 1983. 589p.

WUU, K.D.; GRANT, W.F. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*). **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, [S.l.], v. 8, p. 481-501, 1966.

WUU, K.D.; GRANT, W.F. Chromosomal aberrations in somatic cells of *Vicia faba* by pesticides. **Nucleus**, [S.l.], v. 10, p. 37-46, 1967.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, [S.l.], v. 68, p. 251-306, 1980.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, [S.l.], v. 265, p. 3-20, 2002.

ZAMBRONE, F.A.D. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Perigosa família. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 44-48, 1986.