

**Lucilene Regina Maschio**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E  
MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO RIO PRETO NA ÁREA DE  
INFLUÊNCIA DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SP.**

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Genética do Instituto de  
Biotecnologia, Letras e Ciências  
Exatas da Universidade  
Estadual Paulista (IBILCE-  
UNESP) – São José do Rio  
Preto, para obtenção do título  
de Doutor em Genética.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-  
Oliveira

IBILCE- UNESP  
São José do Rio Preto  
Fevereiro de 2009

Maschio, Lucilene Regina.

Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto – SP / Lucilene Regina Maschio. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

194f.

Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

Co-orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Mutagênese (Genética) 2. Monitoramento ambiental. 3. Aberrações cromossômicas. 4. Cromossomos vegetais - Aberrações. 5. Ensaio do cometa. 6. Teste do micronúcleo. 7. Características nucleolares. I. Marin-Morales, Maria Aparecida. II. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 575.224.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

**LUCILENE REGINA MASCHIO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E  
MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO RIO PRETO NA ÁREA DE INFLUÊNCIA  
DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SP**

**COMISSÃO JULGADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Maria A.Marin-Morales\_\_\_\_\_

2° Examinador: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro\_\_\_\_\_

3° Examinador: Profa. Dra. Carmem S.F. Christofolletti\_\_\_\_\_

4° Examinador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida \_\_\_\_\_

5° Examinador: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama\_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, 20/02/2009.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP) e no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista (IB/UNESP), com apoio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Dedico esta tese.....*

*A DEUS, que por inúmeras vezes tem me segurado com firmeza pela mão e me guiado, com muito amor, pelos caminhos tortuosos da vida, conduzindo-me à descoberta dos momentos de felicidade ao longo deste percurso....*

*Ao meu esposo Claudinei Roberto Capato, por compartilhar comigo um amor construído nos alicerces do respeito, da paciência, do companheirismo, do carinho e do incentivo, sem os quais eu não poderia ter realizado este trabalho. Eu te amo.*

*“Plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida. Nossas dídivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”*

*William Shakespeare*

## Agradecimentos

Saber agradecer é uma atitude de reconhecimento e carinho por todos aqueles que de alguma maneira contribuíram à realização desta obra. É saber a importância de como, cada um, a sua maneira, contribuiu com este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, aos conhecimentos e as oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dados todos esses anos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, amiga e grande pesquisadora, meu agradecimento pela co-orientação segura, dedicação, confiança, incentivo e apoio nestes 4 anos que tive o privilégio de trabalhar sob sua co-orientação, que muito contribuíram para a minha formação científica e que enriqueceram-me como pessoa e como profissional.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, Profa. Dra. Carmem Sílvia Fontanetti Christofolletti, Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela aceitação e disponibilidade em avaliar o trabalho.

À Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas por ceder os peixes e os aquários para realização dos experimentos.

À Thaís Billalba Carvalho, pela incansável ajuda e dedicação, principalmente, durante a realização dos experimentos e análise estatística dos dados.

À Thaís Fernandes pela acolhida e cessão da sua casa nas minhas idas a Rio Claro e pelos esclarecimentos e sugestões durante as análises das lâminas.

À Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, por disponibilizar o laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas para realização dos ensaios de cometa.

À Profa. Dra. Mary Massumi Stoyama, pela amizade adquirida e pelas palavras de apoio e incentivo nesses anos. Muito obrigada pelas caronas!

Às minhas co-orientadas Maysa e Tamires, pelo generoso auxílio nas coletas e na realização deste trabalho. Agradeço o carinho e a amizade, indispensável nessa caminhada.



À amiga Rita Luiza Peruquetti, a quem tive o prazer de aproximar-me durante a realização deste trabalho, agradeço pela amizade e pelos momentos de descontração compartilhados.

À amiga Marilanda Ferreira Bellini, pela ajuda na realização do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo. Muito obrigada!

À Jaqueline e a Dânia, que sempre me receberam muito bem no laboratório de Mutagênese. Muito obrigada pelo auxílio e pela atenção prestada.

Aos companheiros do laboratório de Biologia Celular, Priscila, Weverson, Rita, Maysa, Jamires, Fernanda, Guilherme e Vanessa durante o tempo em que convivemos juntos.

Aos meus pais, Raul e Alice, muito obrigada, pelo amor e pela educação, que me proporcionaram meios de aprender com seus exemplos, gestos e atitudes, tornando-me capaz de lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos Luciana e Leandro, muito obrigada pela motivação constante para realização dos meus sonhos.

Ao meu esposo Claudinei, por ter me ajudado em todas as coletas realizadas sempre com muita disposição e amor. Pelo carinho, apoio e amor dado em todos os momentos da minha vida.

*“A ciência é conhecimento cumulativo. Cada geração de cientista trabalha para enriquecer o tesouro congregado por seus predecessores. Uma descoberta feita hoje não pode ter significado ou mesmo não será compreensível por si mesma, mas ela fará sentido associada às que foram conhecidas antes.”*

*Dobzhansky (1974)*

*“A água faz parte do patrimônio do planeta. Cada continente, cada povo, cada nação, cada região, cada cidade, cada cidadão é plenamente responsável diante de todos”*

*Declaração universal dos  
direitos da água*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Mutagênese Ambiental.....	01
1.2. <i>Allium cepa</i> como organismo-teste.....	03
1.3. Teste de aberrações cromossômicas.....	05
1.4. Características morfológicas nucleolares.....	06
1.5. Peixes como organismo-teste.....	07
1.6. Teste do micronúcleo.....	08
1.7. Ensaio do cometa.....	10
1.8. Genotoxicidade dos metais pesados.....	13
1.9. Caracterização da área de estudo e os padrões de qualidade de água segundo Resolução 357/2005 (CONAMA).....	16
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS</b> .....	20
<b>Artigo 1:</b> Aberrações cromossômicas e micronúcleo em <i>Allium cepa</i> , expostas em águas do rio Preto.....	21
<b>Artigo 2:</b> Danos genotóxicos e mutagênicos em <i>Oreochromis niloticus</i> (Peciformes, Cichlidae), por amostras de águas do rio Preto.....	50
<b>Artigo 3:</b> Biomonitoramento da poluição do rio Preto/SP, usando características nucleolares de <i>Allium cepa</i> .....	79

<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>108</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>137</b>
<b>Anexo 1</b>	
<b>A. Foto aérea da localização da represa Municipal de São José do Rio Preto/SP;</b>	
<b>B. Pontos de coleta ao longo do rio Preto.....</b>	<b>138</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>139</b>
<b>Anexo 2A. “Utilização dos testes de aberrações cromossômicas, micronúcleo e características nucleolares quantitativas em células de <i>Allium cepa</i> para avaliação dos efeitos danosos do cádmio (Cd).”.....</b>	<b>140</b>
<b>Anexo 2B. “Efeitos do chumbo (Pb), avaliados por meio de indução de aberrações cromossômicas, micronúcleos e características nucleolares quantitativas, no sistema-teste de <i>Allium cepa</i>.”.....</b>	<b>169</b>

## Resumo

Devido às crescentes expansões demográficas e industriais observadas nas últimas décadas, o meio ambiente tem recebido uma carga significativamente crescente de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, causando impactos severos nos ecossistemas e um potencial comprometimento à saúde humana. Dentre os efluentes domésticos, podemos citar uma gama de poluentes, tais como químicos de diversas categorias, além de contaminações por agentes biológicos diversos. Já os efluentes industriais contêm poluentes orgânicos e/ou inorgânicos, dependendo da atividade industrial. Baseando-se nestes dados, este trabalho teve como objetivo investigar, por meio de ensaios biológicos com dois organismos-teste, a possível presença de contaminantes com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, que são despejados ao longo do rio Preto, inclusive na Represa Municipal de São José do Rio Preto. O material biológico utilizado neste estudo constituiu-se de sementes de *Allium cepa* (cebola) e peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia). Coletas de águas foram realizadas, sazonalmente, nos meses de agosto de 2006 e 2007 (estação seca) e março de 2007 e 2008 (estação chuvosa), em seis pontos distintos: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1 km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local de despejo do esgoto; Ponto 4 (P4), margem oposta do despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1 km após o represamento. Análises químicas foram realizadas para todas as coletas realizadas. Para a realização do estudo, 100 sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação, em placa de Petri, em amostras de águas coletadas nos seis diferentes pontos do rio Preto, em água ultra pura (controle negativo) e em uma substância reconhecidamente aneugênica (Trifluralina - controle positivo), sempre à temperatura ambiente. As células dos meristemas radiculares de *Allium cepa*, expostos às amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, não apresentaram diferenças significativas de índice mitótico, para a maioria dos pontos de coleta e períodos estudados, quando comparados com os resultados do controle negativo. Além do potencial citotóxico, foi possível

avaliar o potencial genotóxico dos agentes químicos presentes nessas amostras de águas. Nesta avaliação, as aberrações cromossômicas mais frequentes foram: C-metáfases, anáfases com pontes, perdas e quebras cromossômicas, além de células binucleadas. Nossos resultados mostraram valores significativos de genotoxicidade para os períodos de agosto de 2006 (para os P3, P5 e P6), março de 2007 (para os P1, P2, P3 e P6), agosto de 2007 (para os P1, P3, P4 e P6) e março de 2008 (para os P1, P3 e P6). Valores significativos de mutagenicidade também foram registrados em agosto de 2006 (para o P6) e agosto de 2007 (para os P3 e P6), obtidos pelos ensaios do micronúcleo. Alterações morfológicas nucleolares foi outro parâmetro utilizado para avaliação da citotoxicidade dos poluentes presentes nas amostras de águas coletadas. No período de agosto de 2006, foi possível observar um aumento da área nucleolar nas células de *A. cepa*, em relação ao controle negativo. Em março de 2007, apenas as células expostas às águas do P3 mostraram aumento da área nucleolar. Já em agosto de 2007, águas do P3 causaram uma diminuição e do P6 um aumento da área de um único nucléolo, em relação ao controle negativo. Foi possível observar uma diminuição de células contendo um único nucléolo, para os ensaios com amostras de todos os pontos e períodos, acompanhada de um aumento do número de nucléolos por célula. Dos peixes, expostos por 72 horas as diferentes amostras de águas, foram retiradas amostras de sangue para a confecção de lâminas pelo método de esfregaço. As análises realizadas, para todos os períodos, não mostraram resultados significativos de células micronucleadas, em relação ao grupo controle, com exceção das células expostas à amostra de água do P3 (coleta de agosto de 2007). Alterações nucleares também foram registradas. Essas alterações foram: núcleo *notched*; núcleo *lobed*; *broken-eggs*; *blebbed*; cariólise e células binucleadas. Os resultados obtidos com a análise do ensaio do cometa mostraram escore significativo para os P3 e P6, para todos os períodos do estudo, confirmando a ação genotóxica registrada em *Allium cepa*, para as águas do rio Preto. Esses resultados podem ser explicados pelo fato desses pontos serem o ponto final da rede de esgoto. Nossos dados apontam

para um comprometimento das águas do rio Preto, decorrente de contaminação, principalmente, conferida por efluentes urbanos e industriais, além de também servir de alerta para a necessidade de um melhor monitoramento das águas deste recurso hídrico, para que o mesmo não venha conferir perigo aos que fazem uso de suas águas.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; *Oreochromis niloticus*; aberrações cromossômicas; nucléolo; anormalidades nucleares; micronúcleo; ensaio do cometa; poluição aquática.



## Abstract

Due to increasing population and industrial expansion observed in recent decades, the environment has received a significant increased burden of domestic industrial and agricultural sewerage, which can cause severe impacts on ecosystems, and a potential damage to human health as well. A wide range of harmful pollutants can be found in domestic effluent, such as chemicals from various categories, in addition to contamination by various biological agents. On the other hand, industrial effluents contain organic and / or inorganic pollutants, depending on industrial activity. Based on these data, this study aimed to investigate, by means of biological tests with two test-organism, the possible presence of contaminants with cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential, which are dumped along the Preto river, an important river that flows in the region of Sao Jose do Rio Preto/SP. The biological material used in this study consisted of seeds of *Allium cepa* (onion) and one specie of fish (Tilapia: *Oreochromis niloticus*). Water samples were taken seasonally in August 2006 and 2007 (dry season) and March 2007, and 2008 (rainy season), in six distinct sites: Site 1 (S1), 8 km before the damming, Site 2 (S2), 1 km before the damming, Site 3 (S3), place of sewerage discharge; Site 4 (S4), opposite margin of sewage discharge, Site 5 (S5), end of the damming; Site 6 (S6) 1 km after damming. Chemical analyses were performed for all collected samples. For the study, 100 seeds of *A. cepa* were submitted to germination in Petri dishes with samples water from six different sites of the Preto river, Ultra pure water (negative control), and with an aneugenic substance (Trifluralin - positive control). For most of collection points and periods studied, root meristems cells of *A. cepa*, exposed to water samples collected along the Preto river, showed no significant differences in mitotic index when compared to the results of the negative control. In addition to the cytotoxic potential, genotoxic potential of chemicals in samples of water was evaluated. Thus, the most frequent chromosomal aberrations were: C-metaphases, anaphase with bridges, chromosome breaks and losses, and binucleate cells. Our results showed significant genotoxicity for the periods from August 2006 (for the S3, S5 and S6),

March 2007 (for S1, S2, S3 and S6), August 2007 (for S1, S3, S4 and S6) and March 2008 (for S1, S3 and S6). Significant values of mutagenicity were also recorded in August 2006 (for the S6) and August 2007 (for S3 and S6), obtained by the micronucleus test. Nucleolar morphological changes were another parameter used to evaluate the cytotoxicity of pollutants in the water samples. In August 2006, an increase in the nucleolar area was observed in the cells of *A. cepa*, in relation to the negative control results. In March 2007, only the cells exposed to the waters of S3 showed increased nucleolar area. In August 2007, water caused a decrease in one single nucleolus area of S3, while increased area of a single nucleolus was found in S6, when compared to the negative control. A decrease of cells containing a single nucleolus was observed for tests with samples of all items and periods, accompanied by an increased number of nucleoli per cell. Blood samples of fishes under 72 hours exposed in the various samples of water were taken for the construction of the method of smear slides. All analyses showed no significant results concerning micronucleated cells in the control group, with the exception of cells exposed to the water sample of S3 (collection of August 2007). Nuclear changes were also recorded. These changes were notched nuclei, lobed nuclei; broken-eggs; blebbed; kariolysis and binucleate cells. Analysis of the comet assay scores showed significant results for S3 and S6, for all periods of the study, confirming the genotoxic action for *A. cepa*. These results can be explained by the fact that these points are the end point of the sewage network. Our data suggest that waters of the Preto river are endangered due to contamination, mainly by urban and industrial effluents, and also serve as a warning for the necessity of better monitoring of water resource, so that it will not expose users in danger when using its water.

Keywords: *Allium cepa*; *Oreochromis niloticus*; chromosomal aberrations; nucleolus; nuclear abnormalities; micronucleus; comet assay; water pollution.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Mutagênese ambiental**

Os seres vivos estão expostos às ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos. Estes agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos e podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995).

A toxicologia estuda a ação de compostos químicos e de outros agentes sobre os organismos, com ênfase especial aos efeitos adversos ou danosos (RAND; PETROCELLI, 1985). A genética toxicológica investiga os mecanismos de ação de agentes tóxicos que são capazes de induzir interações altamente específicas com os ácidos nucleicos, podendo resultar em danos genéticos, como mutação de ponto, erros durante o mecanismo de replicação do DNA, irregularidade mitótica, dentre outros (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais tem tido grande importância no cenário mundial, pois, embora possam ocorrer mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem pode estar exposto (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004), o que pode por em risco a sua saúde.

Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula de DNA. Essas alterações podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, mas, quando não reparadas ou reparadas erroneamente, originam mutações gênicas e cromossômicas (CONNOR; FERGUNSON, 1993; UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003). Mutações gênicas referem-se às mudanças de um ou poucos nucleotídeos do polímero de DNA, por deleções, duplicações e/ou alterações de pares de bases, que acabam modificando o funcionamento de um gene. Já nas mutações cromossômicas, há uma reorganização na estrutura do DNA por translocação, inversão, deleção, duplicação, fusão e fissão dos cromossomos, alterando o complemento cromossômico em estrutura e/ou número

(NATARAJAN; OBE, 1982; PAVLICA et al., 2000; ERDTMANN, 2003; JUNDI; FREITAS, 2003).

A maior parte das substâncias químicas, que apresentam potencial mutagênico, altera o material genético, em todas as fases do ciclo celular. Porém, para que as alterações cromossômicas se fixem, é necessário que haja um evento de replicação do DNA, logo após a ocorrência da alteração (OBE et al, 1982).

De acordo com Mitchelmore e Chipman (1998), a genotoxicidade, que é a capacidade de um agente tóxico danificar a molécula de DNA, está, de maneira geral, relacionada com eventos de poluição ambiental. Os compostos genotóxicos e mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo transferidos e acumulados nos seres vivos, via cadeia trófica, podendo causar efeitos deletérios aos organismos expostos (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

Existem muitas categorias de classificação das fontes de poluição ou das atividades humanas que alteram a qualidade da água. Dentre elas, temos as atividades industriais, a produção de energia, o transporte, a mineração, as atividades agrícolas e urbanas (FALKENMARK; ALLARD, 1991; OHE et al., 2004). Já, as substâncias poluidoras são classificadas em diferentes categorias como: ácidos e agentes acidificantes (SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>); nutrientes (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>); compostos orgânicos degradáveis; metais e metalóides, entre outros (FALKENMARK; ALLARD, 1991).

A toxicidade aguda caracteriza-se, segundo White et al. (1996), como o primeiro nível de impacto no ecossistema aquático. Os autores afirmam que, atualmente, muitas descargas industriais contêm diversas substâncias que, mesmo não tendo efeito agudo, são capazes de reduzir, em longo prazo, a sobrevivência de um organismo. A redução de sobrevivência pode ser devido aos danos causados no genoma das células somáticas e/ou germinativas, que promovem desordens genéticas e até mesmo o câncer.

Muitas técnicas, tais como a análise de aberrações cromossômicas, ensaio do cometa; teste do micronúcleo; quantificação dos adutos de DNA; análise das características morfológicas nucleolares, estão sendo desenvolvidas, por muitos

autores, para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de agentes poluidores (McCARTHY et al., 1989; DEPLEDGE, 1996; KHAIDAROVA; KALASHNIK, 1999; MATSUMOTO et al., 2005). Dependendo da mutação a ser investigada e do tipo de material a ser avaliado, é realizada a escolha do organismo e do teste mais adequado para o estudo (MATSUMOTO, 2003).

## **1.2. *Allium cepa* como organismo teste**

Os testes citogenéticos permitem a compreensão dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos-teste e mostram ser eficientes, quando utilizados no biomonitoramento da extensão da poluição (MORAES, 2000).

Vegetais superiores constituem um importante material para testes genéticos utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Atividades mutagênicas de químicos podem ser analisadas em diferentes sistemas testes vegetais como em *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*. Por meio desses sistemas vegetais, podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e testes citogenéticos (CONTE et al., 1998; TIMBREL, 1999; RANK et al., 2002). Bioensaios realizados com plantas têm sido considerados mais sensíveis e mais simples, quando comparados com os de animais. Esses organismos-teste têm sido validados em estudos de colaboração internacional entre os “United Nations Environmental Program” (UNEP), “World Health Organization” (WHO) e “US Environmental Protection Agency” (USEPA), que provaram a eficiência destes organismos no monitoramento de mutagenicidade causada por poluentes ambientais (FERNANDES et al., 2007).

Muitos vegetais têm sido considerados excelentes organismos indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas (SHARMA; PANNEERSELVAN, 1990). Desta forma, ensaios com este grupo de organismo são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgoto (GROVER; KAUR, 1999), águas de rios (RANK; NIELSEN, 1998) e solos contaminados (KOVALCHUCK et al., 1998; COTELLE et al., 1999).

O gênero *Allium* tem sido um sistema-teste bastante utilizado em estudos de mecanismos básicos e de determinação dos efeitos de alguns químicos. Entre as espécies de *Allium*, *A. cepa* é a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedidsh Academy of Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene Tox Program” (GRANT, 1982).

A espécie *A. cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004), sendo utilizada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1993; CHAUHAN et al., 1999, MATSUMOTO et al., 2006). Alterações cromossômicas em *A. cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos ou aneugênicos, classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIÉ-CIFREK et al., 2002).

*A. cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e mutagenicidade, devido ao conhecimento do seu ciclo celular, ao crescimento rápido de suas raízes, ao grande número de células em divisão, à sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, à sua disponibilidade durante o ano todo, ao seu fácil manuseio, por responder a inúmeros mutágenos conhecidos e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (FISKEJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987; GRANT, 1994; EGITO et al., 2007).

O uso do *A. cepa* como material teste foi, originalmente, introduzido por Levan em 1938 (apud FISKEJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993) e, a partir daí, tem sido utilizado para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente (FISKEJO, 1985). Essa espécie tem sido utilizada como vegetal teste indicador de mutagênese por diversos autores como Khors et al. (1997), Rank e Nielsen (1997), Smaka-Kincl et al. (1997), Kovalchuck et al. (1998), Fernandes et al. (2007), Matsumoto; Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al.

(2006), Caritá e Marin-Morales (2008), Leme e Marin-Morales, 2008, Leme et al. (2008), dentre outros.

Testes com *A. cepa* são adequados por oferecer parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, C-metáfases e micronúcleos, que podem se caracterizar em evidências de eventuais mutações no conteúdo genético celular. Segundo Fiskejö (1985), resultados positivos obtidos pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como uma indicação da potencialidade do químico testado em induzir também danos biológicos em outros organismos.

### **1.3. Teste de aberrações cromossômicas**

O teste de aberrações cromossômicas é uma das mais antigas ferramentas utilizadas no estudo de avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade. Esse teste, baseado na citogenética convencional, é um dos poucos métodos diretos para mensurar alterações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002), sendo considerado um ensaio muito sensível e confiável para estudo e monitoramento ambiental (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994; COTELLE et al., 1999; EVSEEVA et al., 2003; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Os testes de aberrações cromossômicas com *A. cepa* fornecem um rápido exame dos efeitos tóxicos de substâncias químicas complexas e de íons metálicos (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; FISKEJÖ, 1988; FISKEJÖ, 1993; GRANT, 1994; NIELSEN; RANK, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al. 2005, 2006). Este teste foi o primeiro dos nove ensaios com vegetais avaliados pelo programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (CONSTANTIN; OWENS, 1982; GRANT, 1994) e tem sido, amplamente, utilizado na avaliação de amostras ambientais complexas como rios (RANK; NIELSEN, 1998, 1999; SMAKA-KINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES,

2008; LEME et al., 2008 ), solos contaminados (COTELLE et al., 1999) e esgoto (GROVER; KAUR, 1999).

Pelo teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A.* cepa pode ser quantificada uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, o índice mitótico, a indução de micronúcleos e de anormalidades no ciclo celular, como C-metáfases, aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas, entre outras (GRANT, 1994; EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007).

A avaliação da frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células de meristemas radiculares fornece um método fácil e eficiente para se estudar os efeitos de diferentes agentes mutagênicos, como compostos de mercúrio, selênio, zinco, cromo e cádmio (FISKEJÖ, 1979; FISKEJÖ, 1988; GULATI et al., 1994; BORBOA; DE LA TORRE, 1996; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006).

#### **1.4. Características morfológicas nucleolares**

O nucléolo é o componente celular que reflete o estado de atividade da célula (FISCHER et al., 1991; GERRERO et al., 1989; HERNDEZ-VERDUM, 1991; RISUEÑO; MEDINA, 1986). Nessa organela, genes de DNA ribossomal são transcritos em RNA ribossomal, sendo, mais tarde, processados e empacotados em subunidades de ribossomos (MARTINI; FLAVELL, 1985; RISUEÑO; MEDINA, 1986).

O tamanho do nucléolo, freqüentemente, indica sua atividade total, mas também pode refletir o grau de coordenação de todos os processos que afetam o acúmulo das subunidades ribossomais no nucléolo (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985; KARPOVA et al., 2006). O número de nucléolo por célula corresponde ao número de sítios de síntese de RNA ribossomal ativo, ou seja, o número de regiões organizadoras nucleolares (RONs) ativas no núcleo em intérfase (SHERUDILO; SEMESHIN, 1969; LAZREVA, 1999; LEEK et al., 1991; RUSCHOFF et al., 1995).



Mudanças das características nucleolares podem servir de parâmetro para a avaliação da toxicidade de metais pesados (ARKHIPCHUK, 1995; ARKHIPCHUK et al., 2000; KARPOVA et al., 2006). Karpova et al. (2006), estudando células de *Bétula pendula* que cresceram expostas a poluição da cidade de Voronezh, observaram um aumento no número de células com três nucléolos. Um aumento no número de nucléolo por célula também foi observado para coníferas que cresceram sob condições de estresse (KHAIDAROVA; KALASHNIK et al., 1999), fenômeno este considerado como decorrente de adaptação destas plantas às condições ambientais submetidas.

Succi et al. (2008), estudando o efeito de diferentes concentrações de chumbo (0,025 mg/L e 0,034 mg/L), sobre células meristemáticas de *A. cepa*, observaram uma diminuição da área nucleolar, para as células expostas à concentração mais baixa, e um aumento desta área para a concentração mais elevada.

### **1.5. Peixes como organismo-teste**

Outro organismo teste bastante utilizado para o monitoramento de poluentes ambientais são os peixes. Segundo Powers (1989), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou para a evidência da poluição ambiental.

Peixes acumulam poluentes diretamente de águas contaminadas ou pela ingestão de organismos contaminados, uma vez que desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular, de forma direta, contaminantes dissolvidos na água, caracterizando uma via indireta de contaminação (MINISSI et al., 1996; ATTEQ et al., 2002).

A possibilidade dos peixes serem mantidos em laboratório e facilmente expostos às substâncias tóxicas, permite a utilização destes organismos na avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (HARSHBARGER; CLARK 1990).

De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) é um excelente sistema-teste para ensaios de avaliação da toxicidade de substâncias presentes em ecossistemas aquáticos. *O. niloticus* é uma espécie comumente encontrada no Brasil, particularmente no estado de São Paulo, e em estuários pelo mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

Os peixes são úteis na avaliação de atividades tóxicas de substâncias presentes em recursos hídricos, pois são sistemas biológicos que oferecem vários parâmetros de análise, caracterizados como endpoints eficientes de genotoxicidade e mutagenicidade. Dentre estes parâmetros temos: a indução de formação de adutos de DNA (SIKKA et al., 1990; STEIN et al., 1993), as análises de quebras de fita simples, avaliadas pelo ensaio do cometa (SHUGART et al., 1992) e a ação mutagênica, por meio do teste do micronúcleo.

#### **1.6. Teste do micronúcleo**

Uma das técnicas mais promissoras, baratas e rápidas para avaliação de mutagenicidade é o teste do micronúcleo (LANDOLT; KOCAN, 1983; HEDDLE et al., 1983). Hayashi et al. (1998) descreveram 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. O teste do micronúcleo foi, originalmente, desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976) e, mais tarde, estendido aos eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). Esse teste tem sido também aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes.

Segundo Fenech (2000), os micronúcleos podem ser resultantes de eventos celulares que levam a fragmentação do material genético, como, por exemplo, os fragmentos acêntricos, decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular (agente clastogênico); ou ainda de perdas de cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular, pela inativação do fuso mitótico (agente aneugênico). Assim, as substâncias indutoras de micronúcleo podem ser classificadas como de ação clastogênica ou aneugênica.

A utilização de técnicas moleculares, como sondas específicas para a região centromérica do cromossomo ou anticorpos anticinetocóricos, permite distinguir a origem dos micronúcleos, esclarecendo se são formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros, perdidos durante o processo de divisão celular (RIBEIRO, 2003). Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é, comumente, utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes de exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983).

De acordo com Stopper e Muller (1997), uma das causas do aparecimento de células micronucleadas seria a indução de alterações na maquinaria mitótica, principalmente, alteração no fuso e no cinetócoro. Para Kramer et al. (1990), os micronúcleos são capazes de sintetizar DNA, porém não está claro se a informação genética dentro do micronúcleo é acessível para a célula. Já para Obe e Beek (1982), micronúcleos decorrentes de aberrações cromossômicas, têm um ciclo celular retardado em relação ao núcleo principal. Se o micronúcleo contém cromossomos inteiros e a síntese de DNA do seu material genético for sincrônica à síntese de DNA do núcleo principal, é possível que haja uma reintegração do conteúdo genético do micronúcleo ao genoma nuclear (GUSTAVINO et al., 1994).

O mecanismo de formação dos micronúcleos é o mesmo para todos os organismos. Em plantas, como *A. cepa*, o teste do micronúcleo é avaliado, em células da região F1 (região não meristemática) ou ainda, conjuntamente, com as aberrações cromossômicas, em células meristemáticas (MA et al., 1995; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Tem se discutido que os micronúcleos possam ser uma forma de eliminação de algum tipo de dano sobre o material genético (STOPPER; MÜLLER, 1997; FERNANDES et al., 2007). Estudos realizados por Von-Hoff et al. (1992) em tumores humanos, foram observados a presença de oncogene amplificado nesses tumores, geralmente presentes em elementos acêntricos extracromossômicos. A eliminação desses elementos poderia ser acelerada pela formação de micronúcleos. Fernandes et al. (2007) demonstraram, por meio de

ensaios realizados com o herbicida trifluralina, sob o sistema teste de *Allium cepa*, que quando o material nuclear foi amplificado, em decorrência de ação aneugênica do herbicida, houve a eliminação do mesmo sob a forma de micronúcleos.

Os eritrócitos de peixes são especialmente usados em testes de micronúcleo, pois, por serem células nucleadas, facilitam, por comparação destas estruturas com o núcleo principal, a conclusão do tipo de ação que levou à sua formação (aneugênica ou clastogênica) (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Testes do micronúcleo realizados com eritrócitos de sangue periférico de *O. niloticus* são, particularmente, utilizados para avaliar a presença de mutágenos ambientais (GRISOLIA et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2006; VENTURA et al., 2008; HOSHINA et al., 2008).

Além da análise de micronúcleos, algumas alterações na morfologia e no envoltório nuclear, decorrentes de efeitos de substâncias químicas presentes na água podem ser observadas em eritrócitos de peixes. Carrasco et al. (1990) classificaram essas anormalidades, como: blebbed (evaginações sutis do envoltório nuclear); lobed (evaginações proeminentes do envoltório nuclear); notched (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim) e broken eggs (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por um pequeno filamento nucleoplasmático). Estas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade e/ou mutagenicidade de químicos ambientais (NAKANO; OKA, 1991; COMARK, 1991; FENECH, 2000) e, portanto, podem ser usadas como indicativas de reatividade com o material genético, complementando a análise de micronúcleo.

### **1.7. Ensaio do cometa**

O ensaio do cometa, realizado com eritrócitos de peixes, tem sido um teste muito usado para a avaliação da poluição ambiental (NACCI et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2007; VENTURA et al., 2008). Considerada por Monteith e Vanstone (1995) como uma das melhores

ferramentas para o biomonitoramento ambiental, o ensaio do cometa, pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, in vivo ou in vitro e podem ser aplicadas com o propósito de análises genotoxicológicas.

O ensaio do cometa é, particularmente, uma técnica valiosa que permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e reparo de DNA, em qualquer população de células eucarióticas que possa ser obtida por suspensão simples (SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK; ROKOSZ, 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). A técnica requer pequenas amostras celulares (1-10.000 células) e os resultados podem ser obtidos em um único dia. Ostling e Johanson (1984) e Olive et al. (1990) têm mostrado que a sensibilidade do ensaio do cometa, para detectar danos em células únicas, é comparável a outros métodos de avaliação, sendo usado na investigação da genotoxicidade de vários agentes (MATSUMOTO et al., 2005).

O ensaio do cometa, por ser considerado sensível, rápido, econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), tem sido indicado como um excelente método para se detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de empacotamento do material genético e a própria integridade do DNA (KOPPEN et al., 1999).

Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de eletroforese em gel para detectar danos de DNA, em teste com células únicas. Nessa técnica, as células embebidas em agarose são colocadas em uma lâmina de microscopia, lisadas por detergentes e sais, o que promove uma liberação do DNA para ser submetido à eletroforese, sob condições neutras. As células com uma alta frequência de duplas quebras de DNA mostram uma migração crescente das porções deste DNA, em direção ao ânodo. A migração de DNA é, então, quantificada por coloração com brometo de etídeo e pela medida da intensidade da fluorescência de duas posições fixas, dentro do padrão de migração, usando fotômetro microscópico. Como as condições neutras usadas limitam a aplicabilidade do teste, esta técnica foi modificada por Singh et al. (1988), que

desenvolveram uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE-single cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Com esta modificação foi possível evidenciar a ocorrência de quebras em cadeia simples do DNA. Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios, porém, Macnamee 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 ser similares àqueles previamente relatados, quando utilizaram o ensaio do cometa convencional.

Durante a última década, o ensaio do cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, sendo aplicadas como metodologia de biomonitoramento ambiental, avaliação dos efeitos da radiação sobre os organismos, investigação de processos de reparo do DNA e ecotoxicologia genética. Frenzilli et al. (2000) utilizaram o ensaio do 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 do DNA pode ser correlacionada com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos poluentes ambientais.

Bücker et al. (2006) avaliaram o potencial genotóxico e mutagênico do benzeno, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em peixes elétricos (*Eingenmannia virescens*), expostos a 50 ppm deste composto, em diferentes tempos de exposição. Os autores concluíram que o ensaio do cometa é mais sensível que o teste do micronúcleo, pois com o teste do micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos nos eritrócitos analisados. Em contrapartida, os dados obtidos pelo ensaio do cometa sugeriram a ação genotóxica do benzeno, devido um aumento progressivo no número de células com nucleóides de classes dois e três, de acordo com o gradual aumento de tempos de exposição, indicando um efeito tempo-dependente.

## **1.8. Genotoxicidade dos metais pesados**

Nos últimos anos, tem aumentado drasticamente a emissão de metais pesados no ambiente, causando impacto severo nos ecossistemas e um comprometimento grave à saúde humana. As principais atividades responsáveis pela contaminação por metais pesados em solos e em águas são derivadas de atividades industriais, agrícolas e urbanas, decorrendo em sérios problemas ambientais (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005). Segundo Pascalicchio (2002), além das atividades industriais, emissões naturais também podem estar relacionadas com a contaminação ambiental por metais pesados.

Os metais Se, Cd, Cr e Ni são encontrados na alimentação, normalmente, em quantidades baixas, mas quando estes metais estão presentes em excesso, podem levar a efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos (MINISSI; LOMBI, 1997). Alguns metais pesados induzem a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos, eventualmente, expostos (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005). Segundo Pascalicchio (2002), os metais pesados e seus metabólitos induzem alterações nas estruturas dos cromossomos, promovendo mutações de pontos tanto em procariotos como em eucariotos.

O cádmio (Cd) é um metal pesado comumente avaliado em estudos ambientais, devido à sua alta toxicidade, larga distribuição no ambiente e longo período de meia-vida (MARCANO et al., 2002). Este metal age no metabolismo celular e sua presença está relacionada com a alteração na diferenciação e proliferação celular. Por atuar no aparelho mitótico, o Cd, além de promover alterações do índice mitótico, contribui para a formação de células portadoras de micronúcleos (MARCANO et al., 2006; SETH et al., 2008).

Estudos realizados por Correia et al. (2008), com células meristemáticas de *A. cepa* expostas a duas diferentes concentrações de cádmio (0,007 mg/L e 0,017 mg/L), mostraram um aumento do índice mitótico destas células, em relação ao teste controle, um aumento no número de células com micronúcleos e com aberrações cromossômicas (anáfases multipolares, pontes e perdas cromossômicas e uma distribuição desigual dos cromossomos nas células-filhas), além de uma diminuição do número de células portadoras de nucléolos únicos. Por outro lado,

Seth et al. (2008), avaliando os efeitos de três concentrações de Cd, pelo teste de aberrações cromossômicas e do ensaio do cometa em células meristemáticas de *A. cepa*, relataram que as três concentrações foram capazes de inibir o índice mitótico e induzir a formação de aberrações cromossômicas e de micronúcleos.

Trabalhos realizados por Arkhipchuk e Garanko (2005), com duas diferentes concentrações de Cd (0,1 mg/L e 1,0 mg/L), em eritrócitos de *Carassius auratus gibelio*, mostraram um aumento no número de células com micronúcleos.

O cádmio tem mostrado efeito em vários níveis de transdução celular, como: sinais da membrana plasmática; o aumento do cálcio intracelular livre, que interfere no metabolismo da ATPase de vesículas celulares; a ativação da expressão oncogênica, pela indução de transcrição de oncogenes (BEYERSMANN et al., 1994).

O chumbo (Pb) é um elemento bastante abundante em toda a crosta terrestre, usado em processos industriais desde épocas muito antigas, e que teve, ao longo do tempo, seu uso progressivamente aumentando. A exposição ambiental ao chumbo aumentou, significativamente, após a revolução industrial e ao conseqüente aumento da mineração (ALLOWAYA; AYRES, 1994).

O Pb promove distúrbios mitóticos nas plantas (LEVAN 1945; AHLBERG et al., 1972; RAMEL, 1973; LIU et al., 1994), toxicidade sobre os nucléolos (LIU et al., 1994), indução de células binucleadas (SWIEBODA, 1976) e inibição do crescimento das raízes (LANE; MARTIN, 1980).

Jiang e Liu (2000), estudando o efeito de diferentes concentrações de Pb sobre células meristemáticas de *Zea mays*, observaram uma diminuição do índice mitótico, um aumento de células contendo micronúcleos e aberrações cromossômicas e indução da liberação do material nucleolar do núcleo para o citoplasma. Foi observado por Succi et al. (2008), em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações de Pb, um aumento significativo do índice mitótico, do número de células com aberrações cromossômicas e com micronúcleos e uma diminuição da área nucleolar.

O cobre (Cu) é um elemento essencial aos organismos, cuja ação do próprio sobre o organismo é regulada por mecanismos homeostáticos. Quando os



mecanismos de controle são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são deteriorados, o Cu passa de elemento essencial a elemento tóxico para a célula (PEDROZO; LIMA, 2001a).

As fontes antropogênicas de cobre incluem desde a emissão pelas atividades de mineração e fundição, até a queima de carvão como fonte de energia. Outras fontes incluem seu uso como agente antiaderente em pinturas, na agricultura (em fertilizante, algicida, suplemento alimentar) e excretas de animais incluindo a espécie humana (esgotos) (PEDROZO; LIMA, 2001a).

Os efeitos tóxicos do cobre foram diagnosticados para vários organismos aquáticos (BUTLER; ROESIJADI, 2001; FRANKLIN et al., 2002), inclusive peixes (PARIS-PALACIOS et al., 2000; SMITH et al., 2001; MANZL et al., 2003; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005). Rau et al. (2004) demonstraram que células de peixes são mais sensíveis ao cobre que células de mamíferos, dados estes corroborados pelos estudos realizados por Arkhipchuk e Garanko (2005), em eritrócitos de *Carassius auratus gibelio*, que mostraram um aumento do índice de micronúcleo, após exposição ao Cu.

O ferro (Fe) é tido como elemento essencial para todas as formas de vida, uma vez que também é um componente chave para a manutenção da homeostase celular. Inúmeros processos biológicos são intermediados por enzimas que requerem o ferro como co-fator (PEDROZO e LIMA, 2001b). Porém, em altas concentrações, o Fe pode se envolver na formação de radicais livres (reação de Fenton) e se tornar extremamente tóxico para a célula (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005)

Elevados níveis de Fe foram encontrados em tecidos de tilápias coletadas no lago Nasser (Egito) por Rashed (2001). A presença deste metal foi maior no estômago do que em outros tecidos. O autor sugere que o elevado índice de Fe neste lago seja decorrente de um aumento das descargas da agricultura nesta região, a qual inclui fertilizantes químicos e biocidas.

O alumínio (Al) é o terceiro metal mais abundante da crosta terrestre (ACHARY, et al., 2008). É um metal altamente citotóxico para as plantas (PEJCHAR et al., 2002), tendo como a mais importante consequência fisiológica

a interrupção do crescimento da raiz das plantas e a mudança na morfologia radicular (VOUTSINAS et al., 1997; DOVGALYUK et al., 2003; ACHARY, et al., 2008). Voutsinas et al. (1997) sugerem que o citoesqueleto seja a estrutura alvo do Al, pois este metal tem ação sobre a polimerização das tubulinas e, conseqüentemente, na formação do fuso mitótico.

Várias alterações celulares foram relatadas para *A. cepa*, após exposição ao Al, como diminuição no índice mitótico (FISKEJÖ, 1988; KAYMAK, 1996; CAMPOS; VICCINI, 2003), anáfases e telófases com pontes e quebras cromossômicas (FISKEJÖ, 1988; CAMPOS; VICCINI, 2003), células micronucleadas e binucleadas (FISKEJÖ, 1988; ROY et al., 1989) e dissolução nucleolar (FISKEJÖ, 1983).

O manganês (Mn) é um metal insolúvel em água, encontrado em abundância na natureza, sob a forma de óxidos, carbonatos e silicatos de manganês. Entre as principais aplicações industriais do manganês, destacam-se a fabricação de fósforos de segurança, pilhas secas, ligas não-ferrosas (com cobre e níquel), esmalte porcelanizado, fertilizantes, fungicidas, rações, eletrodos para solda, magnetos, catalisadores, vidros, tintas, cerâmicas, materiais elétricos e produtos farmacêuticos (cloreto, óxido e sulfato de manganês) (SALGADO, 1996).

Mukhopadhyay e Sharma (1990) observaram que o Mn causou um distúrbio no fuso mitótico em células meristemáticas de *A. cepa*. Os mesmos autores observaram que o metal causou um efeito clastogênico nas células em estudo, devido à presença de muitas quebras cromossômicas.

### **1.9. Caracterização da área de estudo e os padrões de qualidade de água segundo Resolução 357/2005 (CONAMA)**

De acordo com a resolução CONAMA 357/2005, “classe de qualidade de água” é o conjunto de condições e padrões de qualidade de água, necessários ao atendimento dos usos preponderantes, atuais ou futuros. A resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), nº 357 de 17 de março de 2005, dispõe

sobre a classificação dos corpos de águas doces, de acordo com seus usos preponderantes, em:

Classe 1: águas destinadas ao abastecimento doméstico, sem tratamento prévio ou com simples desinfecção;

Classe 2: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à irrigação de hortaliças ou plantas frutíferas e à recreação de contato primário (natação, esqui -aquático e mergulho);

Classe 3: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à preservação de peixes em geral e de outros elementos de fauna e da flora e à dessedentação de animais;

Classe 4: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento avançado, ou à navegação, à harmonia paisagística, ao abastecimento industrial, à irrigação e a usos menos exigentes.

O rio Preto é um rio localizado no interior do estado de São Paulo-Brasil (20° 55' 59" S e 49° 18' 59" W), cuja nascente situa-se entre os municípios de Cedral e Potirendaba. Ao longo do seu curso, recebe os afluentes: córregos da Lagoa Seca, da Invernada e do Baixadão, do Elias, das Damas e do Cedro. Passa pelo distrito de Engenheiro Schmidt e, antes de chegar a São José do Rio Preto, incorpora as águas de mais dois córregos (o Sem Nome e o da Onça ou da Lagoa). Em 1956, no trecho urbano da cidade de São José do Rio Preto, o rio foi represado, formando a represa municipal de, aproximadamente, 5Km<sup>2</sup> (com 4 Km de comprimento), com profundidade máxima de 2,5m (Anexo 1A) e que é responsável pelo abastecimento de água para 33% da população da cidade. Quando o rio passa por São José do Rio Preto, recebe água de diversos córregos como o da Canela, Borá, e Piedade, e, antes de terminar sua travessia pelo município, encontra-se com o córrego da Felicidade, passando por várias outras cidades, até desaguar no rio Turvo.

Segundo o Comitê das Bacias dos rios Turvo e Grande, o rio Preto, até encontrar o Córrego Piedade, em São José do Rio Preto, é um rio de classe 3, passando, deste ponto em diante, a ser considerado como de classe 4 (Jornal BOM DIA, 24/03/08).

Tendo em vista que estudos sobre possíveis impactos das águas do rio Preto, decorrentes de contaminantes com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico são bastante escassos, a abordagem proposta para este trabalho, certamente, trará uma contribuição adicional para a população, sobre os potenciais riscos que possam estar expostos, pelo uso inadequado deste recurso, nas várias atividades nele desenvolvidas.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a possível presença de agentes químicos com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, que são despejados ao longo do rio Preto/SP, inclusive na Represa Municipal de São José do Rio Preto/SP, por meio de bioensaios realizados com os sistemas-testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.

Objetivos específicos;

- ✓ Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, das águas do rio Preto, por meio das análises da frequência do índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos, em células meristemáticas de *A. cepa*;
- ✓ Avaliar o potencial de citotoxicidade de contaminantes químicos presentes nas águas do rio Preto, por meio do uso de características morfológica e quantitativa do nucléolo de células meristemáticas de *A. cepa*;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, das águas do rio Preto, por meio do ensaio do cometa, do teste do micronúcleo e de outras anormalidades nucleares, em eritrócitos de *O. niloticus*;
- ✓ Avaliar a influência da sazonalidade sobre os resultados obtidos.

### **3. ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS**

**Artigo 1:** Aberrações cromossômicas e micronúcleo em *Allium cepa*, expostas em águas do rio Preto

**Artigo 2:** Danos genotóxicos e mutagênicos em *Oreochromis niloticus* (Peciformes, Cichlidae), por amostras de águas do rio Preto

**Artigo 3:** Biomonitoramento da poluição do rio Preto/SP, usando características nucleolares de *Allium cepa*

**ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E MICRONÚCLEO EM *ALLIUM*  
*CEPA*, EXPOSTAS EM ÁGUAS DO RIO PRETO**

Lucilene Regina Maschio<sup>1</sup>, Maysa Succi<sup>1</sup>; Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro  
Correia<sup>1</sup>; Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>1</sup>; Maria Aparecida Marin-  
Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto,  
São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de  
Biociências (IB-UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.

O manuscrito será submetido à revista *Aquatic Toxicology*

## **Resumo**

Testes de toxicidade e genotoxicidade têm sido realizados em associação às análises físicas e químicas, a fim de estabelecer a qualidade da água e contribuir para a melhoria dos ecossistemas aquáticos. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos induzidos por poluentes derivados de despejos realizados ao longo do rio Preto/SP-Brasil, por meio da análise da variação do índice mitótico, de aberrações cromossômicas e da indução de células micronucleadas, sob o sistema teste de *Allium cepa*. Foram realizadas análises químicas das amostras de água coletadas nos meses de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e nos meses de agosto de 2006 e 2007 (estação seca), em seis pontos distintos do rio: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1 km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local do despejo de esgoto urbano; Ponto 4 (P4), margem oposta de despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1 km após represamento. Nestas análises, foram detectados valores que se encontram acima dos limites recomendados pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para os elementos químicos Cd, Pb, Fe, Al, NH<sub>3</sub>, Mn, Cu e Zn. O potencial genotóxico dos agentes químicos presentes nessas amostras de águas foi obtido pelas análises de aberrações cromossômicas, onde foram encontradas as anormalidades: C-metáfases; anáfases com pontes; perdas e quebras cromossômicas; além de células binucleadas e outras alterações celulares. Nossos resultados mostraram valores significativos de genotoxicidade para os períodos de agosto de 2006 (para os P3, P5 e P6), março de 2007 (para os P1, P2, P3 e P6), agosto de 2007 (para os P1, P3, P4 e P6) e março de 2008 (para os P1, P3 e P6). Valores significativos de mutagenicidade também foram registrados em agosto de 2006 (para o P6) e agosto de 2007 (para os P3 e P6), obtidos pelos ensaios do micronúcleo.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; aberrações cromossômicas; micronúcleo; genotoxicidade; mutagenicidade



## 1. Introdução

Com o crescimento da população humana e da produção industrial tem havido um aumento crescente das descargas poluidoras, que provocam a deterioração do meio ambiente. Dentre os ambientes impactados pela poluição ambiental, os ecossistemas aquáticos são os mais atingidos, pois acabam, de uma forma ou de outra, servindo como receptores temporários ou definitivos de uma enorme gama de substâncias. Quando a carga poluidora contém substâncias capazes de induzir danos no material genético de organismos expostos, pode também ocorrer uma transferência deste comprometimento para a população humana que, de alguma maneira, interage com este ecossistema aquático (Claxton et al., 1998; Andrade et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Egito et al., 2007).

Devido ao aumento da descarga química no ambiente, diversos estudos têm sido realizados, na tentativa de avaliar os efeitos que possam ser induzidos por estes agentes. Testes de toxicidade e genotoxicidade têm sido realizados em associação com análises físicas e químicas, para se estabelecer a qualidade de corpos d'água e/ou contribuírem para a melhoria dos ecossistemas aquáticos (Grant, 1994, 1999; Smaka-Kincl et al., 1996; Egito et al., 2007).

Plantas superiores constituem um importante material para ensaios citogenéticos realizados com o intuito de monitorar os poluentes ambientais. Vegetais superiores, incluindo *Allium cepa*, são reconhecidos como excelentes bioindicadores, para se determinar efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de químicos ambientais, incluindo metais pesados (Fiskejö, 1988; Steinkellner et al., 1998) e tem sido usado para o monitoramento de amostras complexas, como águas de rios (Rank e Nielsen, 1998; Matsumoto e Marin-Morales, 2004; Egito et al., 2007; Leme e Marin-Morales, 2008; Caritá e Marin-Morales, 2008), lagos (Grisolia et al., 2005), esgotos industriais e domésticos (Matsumoto e Marin-Morales, 2004) e solos contaminados (Cotelle et al., 1999).

Para Grant (1982) e Chauhan et al. (1999), *A. cepa* é um eficiente sistema teste para avaliar o potencial genotóxico de químicos presentes no

ambiente, devido sua sensibilidade e boa correlação com sistema teste de mamíferos, sendo indicado para ensaios de monitoramento ambiental, especialmente de ambientes aquáticos.

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos induzidos por poluentes derivados de despejos realizados ao longo do rio Preto/SP-Brasil, por meio da análise da variação do índice mitótico, de aberrações cromossômicas e da indução de células micronucleadas, sob o sistema teste de *Allium cepa*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Caracterização da área de estudo e locais de coleta das amostras de água**

A área escolhida no presente estudo foi o rio Preto (20° 55' 59" S/ 49° 18' 59" W), localizado no interior do estado de São Paulo-Brasil. Em São José do Rio Preto/SP- Brasil, no trecho urbano, o rio apresenta uma parte represada, formando a represa municipal responsável pelo abastecimento de água da população. A área total da represa municipal é de aproximadamente 5 Km<sup>2</sup> (com 4 Km de comprimento), com profundidade máxima de 2,5m. O rio Preto há vários anos, vem sofrendo com a poluição dada pelos emissários de esgotos não tratados, pelo despejo clandestino de lixos e pelo assoreamento decorrente, principalmente, da ausência da mata ciliar. Alguns acidentes foram registrados neste rio, especificamente na zona urbana de São José do Rio Preto, com registros de mortalidade de peixes decorrente de lançamentos irregularmente de efluentes industriais (CETESB – 03/2004 - São José do Rio Preto/SP).

Para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto, amostras de águas foram coletadas em de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e agosto de 2006 e 2007 (estação seca), em seis pontos distintos do rio Preto: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local de despejo do esgoto; Ponto 4 (P4), margem oposta do despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1 km após represamento (Figura1).

Galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram utilizados, para a coleta das amostras de águas aos ensaios de *Allium cepa*. Para as amostras de águas destinadas às análises de elementos químicos, frascos estéreis de vidro de 2L foram utilizados para coleta. O procedimento das coletas das amostras de águas foi realizado segundo a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue:

(1) Primeiramente, os galões foram submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado;

(2) Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume;

(3) Após coleta, as amostras foram levadas imediatamente ao laboratório para início dos experimentos.

Temperaturas médias, máximas e mínimas e índices pluviométricos foram obtidos, para todos os meses de coleta, junto ao Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI), da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (Tabela 1).

## **2.2. Material biológico**

O material biológico utilizado nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ( $2n = 2X = 16$  cromossomos) de uma única variedade (Baia Periforme) e de um mesmo lote, para evitar diferentes respostas durante os bioensaios.

## **2.3. Bioensaio**

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em amostras de águas coletadas nos pontos de coleta acima mencionados, em água Milli-Q

(controle negativo) e 0,0019ppm de uma substância reconhecidamente aneugênica (Trifluralina - controle positivo), em placas de Petri contendo, aproximadamente, 100 sementes cada. Os experimentos foram desenvolvidos em temperatura ambiente.

Após a germinação, quando as raízes de *A. cepa* atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 ácido acético – v:v), por um período de 24 horas. Posteriormente, para análise dos índices mitótico, de aberrações cromossômicas e de células com micronúcleos, as radículas fixadas foram submetidas à reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1978, com modificações), que compreende duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e a coloração pelo reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro. Para o preparo das lâminas, as pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração das células, foi adicionada aos meristemas uma gota de carmim-acético (2%). O material foi recoberto com lamínula e, com o auxílio de um estilete de madeira, submetido a uma leve pressão, para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina, sem o comprometimento das análises. O material foi analisado ao microscópio de luz, com aumento de 400 vezes.

Para análises dos efeitos genotóxicos, diversos tipos de aberrações cromossômicas foram consideradas, em diferentes estágios de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como C-metáfases, metáfases aderentes, perdas, pontes e quebras cromossômicas, anáfases multipolar e outras. As células com micronúcleos, observadas em células meristemáticas de *A. cepa*, foram utilizadas como um outro *endpoint*, considerado como resultante de efeito mutagênico dos químicos presentes nas águas utilizadas nos ensaios. O efeito citotóxico foi um terceiro parâmetro considerado, obtido pelas análises do índice de divisão celular, ou índice mitótico exibido pelas células, segundo a fórmula:

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{total de células observadas}} \times 100$$

Para todas as categorias analisadas, foram contabilizadas cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, obtidas de um total de 10 lâminas. Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **3. Análises químicas**

Foram realizadas análises químicas de todas as amostras de água coletadas ao longo do rio Preto. Para esta análise foram quantificados os elementos químicos: nitrato, nitrito, amônia, sulfatos, cloreto, chumbo, alumínio, manganês, ferro total, cobre, zinco, cromo e cádmio.

## **4. Resultados**

### **4.1. Parâmetros químicos**

Nas análises químicas foram detectados valores que se encontram acima dos limites recomendados pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para os elementos químicos Cd, Pb, Fe, Al, NH<sub>3</sub>, Mn, Cu e Zn (Tabela 2).

### **4.2. Indução dos efeitos citotóxicos**

Os índices mitóticos obtidos pelas análises realizadas em células de *A. cepa* não mostraram diferenças significativas quando comparados com os resultados do controle negativo em células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto (Tabela 3).

### **4.3. Indução de aberrações cromossômicas e nucleares**

Foram observadas células micronucleadas, exibindo diferentes tamanhos de micronúcleos (Figura 2b-g), além de células portadoras de quebras cromossômicas (Figura 2h, 2i - setas), que foram contabilizadas como *endpoint* de potencial mutagênico. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de quebras cromossômicas e de células micronucleadas para os ensaios realizados com as amostras de água do P3 (agosto de 2007) e P6 (agosto de 2006

e agosto de 2007), quando comparados com o controle negativo (Tabela 3 e Figura 3 A). O controle positivo apresentou valores significativos para todos os períodos estudados.

Na avaliação do potencial genotóxico, foram observadas as seguintes anormalidades: anáfase com perda cromossômica (Figura 2k, 2l - setas); C-metáfase (2n); anáfase com ponte cromossômica (Figura 2o); célula binucleada (Figura 2p); anáfase multipolar (Figura 2q, 2r), dentre outras. Células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às amostras de águas coletadas nos P3 e P6, exibiram freqüências de aberrações cromossômicas maiores que as do controle negativo, com diferenças estatisticamente significativas, para todos os períodos estudados (Tabela 3). Valores significativos também foram registrados para amostras de águas coletadas nos períodos de março de 2007-2008 e agosto de 2007, para o P1. Os P2 e P4, quando comparados com o controle negativo, apresentaram valores significativos nos períodos de março e agosto de 2007, respectivamente. Células meristemáticas expostas a amostra de água do P5 apresentaram valores estatisticamente significativos somente no mês de agosto de 2006 (Tabela 3 e Figura 3B).

Quando o número de cada tipo de anormalidades foi analisado individualmente, apenas a freqüência de pontes cromossômicas, encontrada para os ensaios realizados com amostras do P3 no período de agosto de 2007, mostrou resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (Tabela 4).

## **5. Discussão**

O despejo acidental e intencional de compostos químicos prejudiciais no ambiente aquático tem o potencial de perturbar a estrutura e o funcionamento do ecossistema natural (Vanzella et al., 2007). Existem muitas fontes poluidoras derivadas de várias atividades humanas que alteram a qualidade da água. Para Ohe et al. (2004), as atividades relacionadas com a indústria, a produção de energia, o

transporte, a mineração e agricultura constituem fontes poluidoras importantes dos recursos hídricos. Segundo Falkenmark e Allard (1991), as substâncias poluidoras podem ser classificadas em diferentes categorias como: ácidos e agentes acidificantes ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_n$ ); nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ); compostos orgânicos degradáveis; metais e metalóides.

O rio Preto, tido como modelo deste estudo, é um rio que, ao passar pelo trecho urbano da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil, recebe todo o esgoto gerado no município (de cerca de 480 mil habitantes), que equivale a quase 20 toneladas de detritos, sem tratamento, lançados, diariamente, neste manancial. As amostras de águas do rio Preto apresentaram índices acima dos recomendados dos elementos químicos: cobre (Cu) cádmio (Cd), ferro (Fe) e chumbo (Pb), em quase todos os pontos de coleta e períodos estudados, cujas concentrações diferiram entre as estações e entre as amostra de água. O Fe e o Cu foram encontrados em todas as amostras de águas coletadas, para todos os períodos do estudo, sempre em concentrações bem superiores às recomendadas pela legislação, pelo nível de classe que o rio se insere.

Em duas das coletas realizadas (agosto de 2007 e março de 2008), foi também observada a presença de Manganês, em concentrações superiores às recomendadas pela legislação. Em agosto de 2007, o Mn foi encontrado em todas as amostras coletadas, com exceção dos P2 e P4 e em março de 2008 só não foi registrado para o P4. Contudo, os índices aumentados deste metal não foram suficientes para explicar a indução dos efeitos genotóxicos observados, pois, mesmos nos pontos e períodos onde não foram quantificados níveis acima do padrão recomendado pela legislação, houve registros de aberrações cromossômicas, parâmetros indicativos da genotoxicidade da água do rio Preto.

O Pb apresentou diferenças entre as estações de verão e de inverno, para quase todos os pontos de coleta, apresentando valores maiores no inverno que no verão. O aumento desses valores na estação seca pode ser explicado pela perda do volume de água, comum na maioria dos reservatórios de água, durante a estiagem. Em contrapartida, na última coleta (verão de 2008), foram observados valores

superiores aos encontrados para as coletas anteriores, podendo este acréscimo estar relacionado com um aumento de emissão de efluentes contaminados com este metal neste período.

A distribuição dos compostos químicos, contaminantes ou não dos ambientes aquáticos, é controlada por processos químicos, físicos e biológicos que, acabam determinando sua concentração na coluna de água, nos sólidos suspensos e nos sedimentos (Sá, 2003; Santos et al., 2006).

Os níveis de citotoxicidade de um composto testado podem ser determinados pelo aumento ou decréscimo do índice mitótico (IM), que pode ser usado como um parâmetro de citotoxicidade em estudos de biomonitoramento ambiental (Fernandes et al., 2007). Índices mitóticos menores que o controle negativo podem indicar que o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos foram afetados pelos compostos testados. Por outro lado, índices mitóticos maiores que os encontrados no controle negativo são provenientes da indução do aumento da divisão celular, que podem caracterizar um evento detrimental para as células, produzindo uma proliferação descontrolada e, eventualmente, levar a uma posterior formação de tumor (Caritá e Marin-Morales, 2008)

De acordo com Caritá e Marin-Morales (2008), o aumento ou a diminuição do índice mitótico pode ser um importante indicador para monitorar os níveis de poluição em ambientes afetados, especialmente aqueles contaminados com compostos potencialmente tóxicos e citotóxicos.

Metais pesados introduzidos no ambiente de maneira natural e/ou antropogênica acumulam no solo e são absorvidos pelas plantas, induzindo a muitos efeitos tóxicos, especialmente, nas raízes. Foi mostrado que metais pesados como chumbo e cádmio inibiram o crescimento de raízes (Liu et al., 1994, 2003; Seregin et al., 2004) devido ao decréscimo no índice mitótico, valores estes acompanhados pela redução do número de células em metáfase e anáfase (Wierzbicka, 1988, 1989; Samardakiewicz e Woz'ny, 2005; Fusconi et al., 2006).



Segundo Seth et al. (2008), a interação do metal pesado cádmio com proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular pode ser a causa da inibição do índice mitótico. Inibição da síntese dessas proteínas pode também causar retardo no crescimento, como relatado, precocemente, em mostarda indiana exposta ao cádmio (Seth et al., 2007).

Na opinião de Wierzbicka's (1999), a redução no número de células em divisão, na presença de metais, resulta de distúrbios do ciclo celular conduzindo para seu prolongamento. Por exemplo, em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com chumbo, o ciclo celular foi alongado por 8,5h, quando comparado com controle negativo. Este aumento do ciclo mitótico se deu, principalmente, pela prolongação da fase S. A redução na proliferação celular também foi observada por Lerda (1992). O autor observou que a frequência de células em divisão foi diminuindo, progressivamente, com o aumento das concentrações de chumbo.

Segundo Glinska et al. (2007), os metais chumbo, cádmio e cromo diminuíram o índice mitótico e induziram numerosos distúrbios mitóticos em raízes meristemáticas de *A. cepa*, confirmando seus efeitos citotóxicos descritos para muitas plantas.

No presente estudo o teste de índice mitótico não se caracterizou em um bom parâmetro para avaliação deste tipo de poluição para este recurso hídrico, haja vista, que nenhum resultado apresentou-se estatisticamente significativo, quando comparado com o controle negativo.

Quanto à genotoxicidade dessas águas, uma elevada frequência de aberrações cromossômicas foi observada em todos os pontos e períodos de coleta. Aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos que podem ocorrer, espontaneamente, e como resultado de exposição a agentes físicos e químicos (Leme et al., 2008).

As aberrações cromossômicas mais observadas em nossos ensaios foram alterações em células em anáfase (ponte, perda, e multipolaridade), em metáfase

(C-metáfases), como também a presença de células binucleadas, células com micronúcleos e quebras cromossômicas.

Segundo Fenech e Crott (2002), micronúcleos podem ser resultados de fragmentos acêntricos (agentes clastogênico) ou de cromossomos inteiros (agente aneugênico) que não foram incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular. Desta maneira, uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos, pode ser considerada uma substância clastogênica ou aneugênica (Meng, 2003). A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular. Já a ação aneugênica acontece pela inativação do fuso mitótico, que levará a perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula (Fenech, 2000).

Yamamoto e Kikuchi (1980) mostraram que, medindo o diâmetro do micronúcleo, é possível determinar se o agente testado tem ação clastogênica ou aneugênica. Os autores mostraram que micronúcleos derivados de agentes clastogênicos eram menores que os micronúcleos derivados de ação aneugênica. Contudo este método não tem sido satisfatório para um grande número de micronúcleos, não mostrando confiança em muitos outros casos. Outros autores, como Combes et al., 1995; Fenech, 2000, concluíram que a utilização da análise do tamanho do micronúcleo, como um parâmetro para determinar clastogenicidade ou aneugenicidade de agentes diversos, poderia não ser confiável o suficiente, visto que, dependendo da espécie, o cariótipo pode ser assimétrico, sendo heterogêneo em relação ao tamanho do cromossomo, como, por exemplo, o cariótipo humano.

Contrariamente ao observado no homem, algumas espécies de plantas superiores, como *A. cepa*, possuem um padrão cariotípico simétrico, o qual apresenta homogeneidade quanto ao tamanho dos seus cromossomos, apresentando cromossomos grandes e em pequena quantidade ( $2n = 16$ ) (Grant, 1982; Fiskesjö, 1985). Desta forma, a metodologia proposta por Yamamoto e Kikuchi (1980), pode ser válida para o organismo teste de *A. cepa*, para a

detecção das ações aneugênica e/ou clastogênica de uma substância, em relação ao tamanho de seus micronúcleos.

Além disso, os micronúcleos presentes nas células mostraram tamanhos variados. Nem todos os micronúcleos observados apresentaram tamanho semelhante aos micronúcleos observados para os ensaios realizados com a Trifluralina, um herbicida de reconhecida ação aneugênica (Fernandes et al., 2007), sugerindo assim que alguns metais do presente estudo podem apresentar ação clastogênica e outros ação aneugênica, o que pode também ser reforçado pelos tipos de aberrações observadas (quebras e perdas cromossômicas), durante as análises. Estudos com girassóis relataram que, dependendo da concentração e do tempo de exposição ao alumínio, cádmio, cobre e níquel, aumenta o efeito clastogênico e aneugênico nessas plantas (Chakravarty e Srivastava, 1992). Também foi documentado que os metais chumbo, cádmio e cromo induziram micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*. (Lerda, 1992; Matsumoto et al, 2006; Glinska, 2007).

Os resultados mostraram um aumento significativo do número de micronúcleos em raízes expostas aos P3 (agosto de 2007) e P6 (agosto de 2006 e agosto de 2007), em relação ao controle negativo, mostrando o efeito mutagênico dos agentes químicos presentes nas amostras das águas destes pontos de coleta. Esses resultados podem nos indicar que a baixa pluviosidade observada na estação seca, pode ter promovido uma maior concentração dos metais presentes nas amostras destas águas e que águas derivadas desses pontos de coleta apresentaram maior potencialidade de indução de efeitos mutagênicos, decorrente do comprometimento ambiental, conferido pelo despejo direto de esgoto urbano nesses pontos.

Alterações como C-metáfases caracterizam uma evidência da presença de agentes aneugênicos, pois são decorrentes de uma completa inativação do fuso mitótico das células (Fiskejö, 1985; Fiskejö, 1993). Quando os fusos são completamente inativados, nenhuma placa equatorial é organizada e, conseqüentemente, a divisão do centrômero é bloqueada. Sendo assim, podemos

sugerir que muitas das C-metáfases observadas nos ensaios realizados com as diferentes amostras de água devem ser decorrentes da inativação do fuso mitótico destas células. De acordo com Fernandes et al., (2007), a presença de C-metáfases pode resultar em células multinucleadas, embora o resultados mais freqüente sejam a indução de células poliplóides e de células com micronúcleos.

Os resultados não mostraram valores significativos para C-metáfases, em células meristemáticas expostas a águas do rio Preto. Por outro lado, apresentaram aumento de micronúcleos de tamanho grandes em alguns pontos, confirmando a ação aneugênica dos químicos presentes nas amostras de águas coletadas. Glinska et al. (2007) mostraram que soluções de cádmio, chumbo e cromo, nas concentrações de 100 µM, induziram formação de C-metáfases e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*.

Pontes cromossômicas, segundo Marcano et al. (2004), podem ocorrer como consequência da aderência e uma subsequente falha na separação dos cromossomos na anáfase ou ainda ser atribuída a uma translocação desigual ou inversão dos segmentos cromossômicos. Uma vez aderidas, as cromátides permanecem unidas e, quando separadas, na anáfase, podem levar a ruptura do cromossomo. Essa sugestão esclareceria a presença de micronúcleos derivados de perdas de cromossomos inteiros, após tratamento com amostras de água do rio Preto.

De acordo com Rank e Nielsen (1998), as anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos de forma irregular, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão normal. Para Fernandes et al. (2007), as anáfases multipolares podem ser decorrentes de ação aneugênia de uma substância, que impede a polimerização dos fusos mitóticos, sem impedir a duplicação dos centros organizadores de microtúbulos. Quando a ação do agente é atenuada e a célula volta a normalidade de divisão, vai existir mais de dois centros organizadores de microtúbulos presentes, levando a multipolaridade na divisão.

De acordo com a literatura, tais alterações podem ser decorrentes da ação de certos metais pesados. Nos últimos anos, a emissão de metais pesados no ambiente tem aumentado, causando impacto severo nos ecossistemas e o comprometimento grave à saúde humana. As principais atividades responsáveis pela contaminação por metais pesados no solo e na água são as atividades industriais, agrícolas e urbanas, decorrendo em sérios problemas ambientais (Marcano et al., 2002; Matsumoto e Marin-Morales, 2005).

Os dados indicam aumento da genotoxicidade e mutagenicidade na época da estação seca comparada com a estação chuvosa, principalmente nos pontos 3 e 6 onde ocorrem descargas de efluentes.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

### **Referências bibliográficas**

Andrade, V.M., Freitas, T.R.O., Silva, J., 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp) and catfish (*Netuma* sp) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.* 560, 57-67.

Caritá, R., Marin-Morales, M. A., 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with zo dyes. *Chemosphere*, 72, 722-725.

Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI). São José do Rio Preto/SP, 01/12/2008.

Chakravarty, B., Srivastava, S., 1992. Toxicity of some heavy metal in vivo in *Helianthus annuus*. *Mutat. Res.* 283, 287-294.

Chauhan, L. K. S., Savena, P. M., Gupta, S. K., 1999. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. Environ. Experiment. Botany, 42, 181-189.

Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutat. Res. 410, 237-243.

Combes, R.D., Stopper, H., Caspary, W.J., 1995. The use of the L5178Y mouse lymphoma cells to assess mutagenic, clastogenic and aneugenic activity of chemicals. Mutagenesis, 10, 403-408.

(CETESB) Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. Coordenador Edmundo Garcia Agudo (et al.) São Paulo, 1987.

(CETESB) Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, São José do Rio Preto/SP, 03/2004.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*- micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. Mutat. Res. 426, 161-171.

Egito, L.C.M., Medeiros, M.G., Medeiros, S.R.B., Agnez-Lima, L.F., 2007. Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 30, 425-441.

Falkenmark, M., Allard, B., 1991. Water-quality and disturbances of natural freshwater. In: "The handbook of environmental chemistry. Part A – Water Pollution", 5, 46-78.

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81-95.

Fenech, M., Crott, J. W., 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504, 131-136.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 252-259.

Fiskejo, G., 1985. The *Allium* test. As a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112.

Fiskejo, G., 1988. The *Allium*-test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197, 243-260.

Fiskejö, G., Levan, A., 1993. Evaluation of the first tem MeIC chemicals in the *Allium cepa*. *Atlas*, 21, 139-149.

Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E., Berta, G., 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. *Environ. Exp. Bot.* 58, 253–260.

Glinska, S., Bartczaka, M., Oleksiaka, S., Wolskaa, A., Gabaraa, B., Posmykb, M., Janasb, K., 2007. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 343-350.

Grant, W. F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99, 273-291.

Grant, W.F., 1994. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310, 175-185.

Grant, W.F., 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.* 426, 107-112.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genet. Mol. Biol.* 28, 334-338.

Leme, D. M., Angelis, D. F., Marin-Morales, M. A., 2008. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in water impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat. Toxicol.* 88, 214-219.



Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. *Mutat. Res.* 650, 80-86.

Lerda, D., 1992. The effect of lead on *Allium cepa* L. *Mutat. Res.* 281, 89-92.

Liu, D., Jiang, W., Gao, X., 2003. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biol. Plant.* 47, 79–83.

Liu, D., Jiang, W., Wang, W., Zhao, F., Lu, C.H., 1994. Effects of lead on root growth, cell division and nucleus of *Allium cepa*. *Environ. Pollution*, 86, 1-4.

Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A., Montiel, X., 2002. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: na ultrastructural study. *Environ. Res.* 88, 30-35.

Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A., Montiel, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94, 221–226.

Matsumoto, S. T., Marin-Morales, M. A., 2004. Mutagenic potencial evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. *Cytologia*, 69, 399-408.

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.* 29, 148-158.

Matsumoto, S.T., Marin-morales, M.A., 2005. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. *Rev. Brasil. Toxicol.* 18, 77-85.

Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1978. The feulgen reaction. *Cienc. Cult.* 30, 665-676.

Meng, Z.; Yi, H., 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 537, 109-114.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in the surface water: a review. *Mutat. Res.* 567, 109-149.

Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Experim. Botany*, 52, 199-223.

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

Sá, F., 2003. Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no complexo estuarino da Baía de Paranaguá (PR). *Boletim Paranaense de Geociências*, 53, 83-92.

Samardakiewicz, S., Woz'ny, A., 2005. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. *Aquat. Bot.* 83, 289–295.

Santos, D.M., Bossini, J.A.T., Preussler, K.H., Vasconcelos, E.C., Carvalho-Neto, F.S., Carvalho-Filho, M.A.S., 2006. Avaliação dos metais pesados na Baía

de Paranaguá, PR, Brasil, sob influência das atividades antrópicas. J. Bras. Soc. Ecotoxicol.1, 157-160.

Seregin, I.V., Shpigun, L.K., Ivanov, V.B., 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. J. Plant Physiol. 51, 525–533.

Seth, C. S., Chaturvedi, P. K., Misra, V., 2008. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. Ecotoxicol. Environ. Saf. v. 71, n. 1, p. 76-85.

Seth, C. S., Misra, V., Chauhan, L. K. S., Singh, R. R., 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach, Ecotoxicol. Environ. Saf. v. 71, p. 711-716.

Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., Toman, M. J., 1996. The evaluation de waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. Mutat. Res. v. 368, 171-79.

Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Horak, O., Kundi, M., Knasmüller, S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comaparative investigation with plant biossays. Environ. Mol. Mutagen. 31, 183-191.

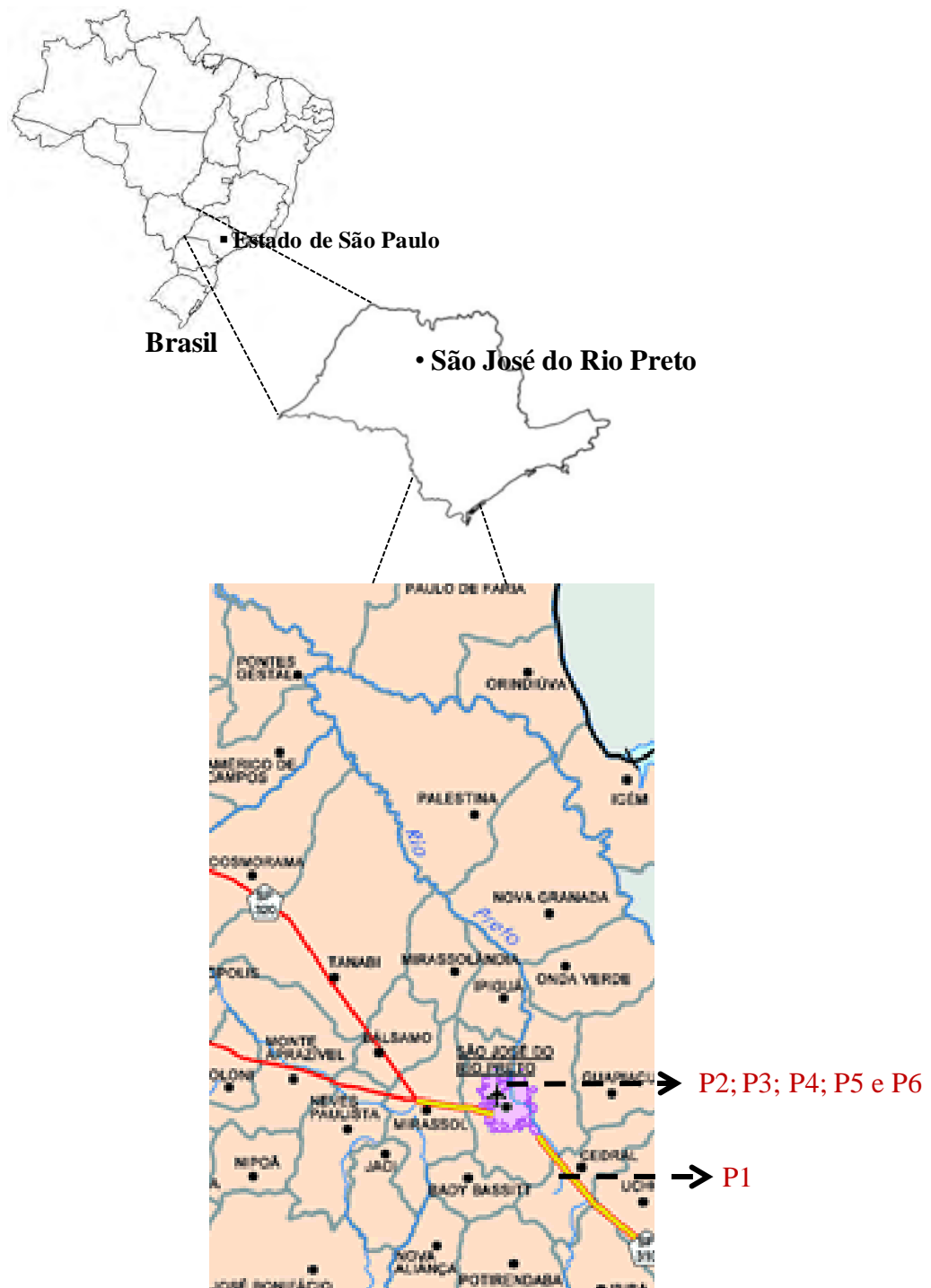
Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. Mutat. Res. 631, 36-43.

Wierzbicka, M., 1988. Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia*, 41, 143–160.

Wierzbicka, M., 1989. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Environ. Exp. Bot.* 29, 123–133.

Wierzbicka, M., 1999. The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa L.* *Protoplasma*, 207, 186–194.

Yamamoto, K. I., Kikuchi, Y., 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.* 71, 127-131.



**Figura 1:** Localização da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (latitude  $20^{\circ} 55' 59''$  S, longitude  $49^{\circ} 18' 59''$  W) e dos pontos de coleta ao longo do rio Preto. P1: 8 km antes do represamento; P2: 1 km antes do represamento; P3: local de despejo de esgoto; P4: margem oposta de despejo de esgoto; P5: saída do represamento e P6: 1 km após represamento.

**Tabela 1:** Dados meteorológicos da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil, referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Preto, obtidos junto ao CEPAGRI.

<b>Período de coleta</b>	<b>Média de temperatura máxima (°C)</b>	<b>Média de temperatura mínima (°C)</b>	<b>Índice de chuva (mm)</b>	<b>Nº total de dias chuvosos</b>
<b>Agosto 2006</b>	30.68	16.45	6.2	1
<b>Agosto 2007</b>	29.68	16.81	0	0
<b>Março 2007</b>	32.61	21.58	111.6	8
<b>Março 2008</b>	28.90	22.58	164.8	10

**Tabela2:** Análises químicas das amostras de águas coletadas em diferentes pontos ao longo do rio Preto, São José do Rio Preto/SP.

		Elementos químicos (mg/L)												
		Cd	Cloro	Pb	Al	NH3	Fe	Mn	Cr	Cu	Nitrato	Nitrito	Sulfato	Zn
<b>Estações e pontos</b>														
<b>Inverno 2006</b>														
P1		0,002*	3,8	0,019*	0,010	0,20	1,04*	0,063	0,01	0,05*	1,10	0,008	5,0	0,17
P2		0,002*	6,6	0,013*	0,020	0,74	1,69*	0,050	0,01	0,09*	2,20	0,037	7,0	0,16
P3		0,003*	4,8	0,013*	0,136*	0,17	0,67*	0,038	0,01	0,01*	3,00	0,033	16,0	0,16
P4		0,002*	3,0	0,007	0,214*	0,19	0,60*	0,034	0,01	0,02*	2,50	0,013	4,0	0,21*
P5		0,001	3,6	0,010*	0,021	0,19	0,36*	0,039	0,01	0,02*	2,60	0,012	4,0	0,20*
P6		0,001	4,3	0,025*	0,043	0,58	0,48*	0,031	0,01	0,05*	1,80	0,031	3,0	0,09
<b>Verão 2007</b>														
P1		0,002*	10,3	0,010*	0,043	1,05	2,05*	0,077	0,01	0,01*	1,90	0,098	0,0	0,02
P2		0,001	7,9	0,013*	0,065	0,65	2,17*	0,043	0,01	0,01*	2,10	0,053	7,0	0,01
P3		0,001	8,7	0,008	0,024	0,50	1,10*	0,056	0,01	0,02*	1,80	0,047	16,0	0,01
P4		0,002*	4,5	0,008	0,039	0,47	1,28*	0,067	0,01	0,01*	0,80	0,027	4,0	0,01
P5		0,003*	3,7	0,015*	0,043	0,41	0,81*	0,052	0,01	0,03*	0,80	0,032	4,0	0,01
P6		0,017*	5,5	0,011*	0,033	0,94	0,80*	0,039	0,01	0,01*	1,50	0,047	3,0	0,01
<b>Inverno 2007</b>														
P1		0,001	6,8	0,016*	0,030	2,66	2,34*	0,133*	0,01	0,03*	2,20	0,257	1,0	0,01
P2		0,001	4,7	0,010*	0,098	0,67	2,45*	0,093	0,01	0,03*	1,60	0,064	0,0	0,01
P3		0,007*	25,0	0,034*	0,013	3,62	0,42*	0,102*	0,01	0,13*	1,60	0,011	76,0	0,04
P4		0,002*	3,0	0,013*	0,054	0,23	0,95*	0,071	0,01	0,02*	0,80	0,005	0,0	0,01
P5		0,002*	4,1	0,021*	0,102*	0,78	1,08*	0,223*	0,01	0,03*	1,00	0,019	1,0	0,00
P6		0,002*	16,2	0,012*	0,084	3,74*	1,22*	0,216*	0,01	0,06*	1,40	0,032	16,0	0,02
<b>Verão 2008</b>														
P1		0,002*	5,7	0,032*	0,029	1,69	2,30*	0,284*	0,01	0,03*	1,80	0,067	0,0	0,00
P2		0,001	4,3	0,025*	0,042	0,89	2,49*	0,115*	0,01	0,02*	1,60	0,060	0,0	0,01
P3		0,001	9,4	0,030*	>0,250*	0,99	1,75*	0,118*	0,0	0,04*	1,60	0,036	10,0	0,01
P4		0,002*	4,3	0,028*	0,080	0,45	1,25*	0,101*	0,02	0,02*	1,80	0,029	4,0	0,01
P5		0,001	7,1	0,026*	0,173*	0,89	1,74*	0,133*	0,0	0,03*	1,60	0,029	4,0	0,01
P6		0,002*	9,6	0,026*	0,164*	2,00	1,47*	0,114*	0,01	0,08*	1,90	0,058	6,0	0,01
VMP		<b>0,001</b>	<b>250</b>	<b>0,01</b>	<b>0,1</b>	<b>3,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,009</b>	<b>10</b>	<b>1,0</b>	<b>250</b>	<b>0,18</b>

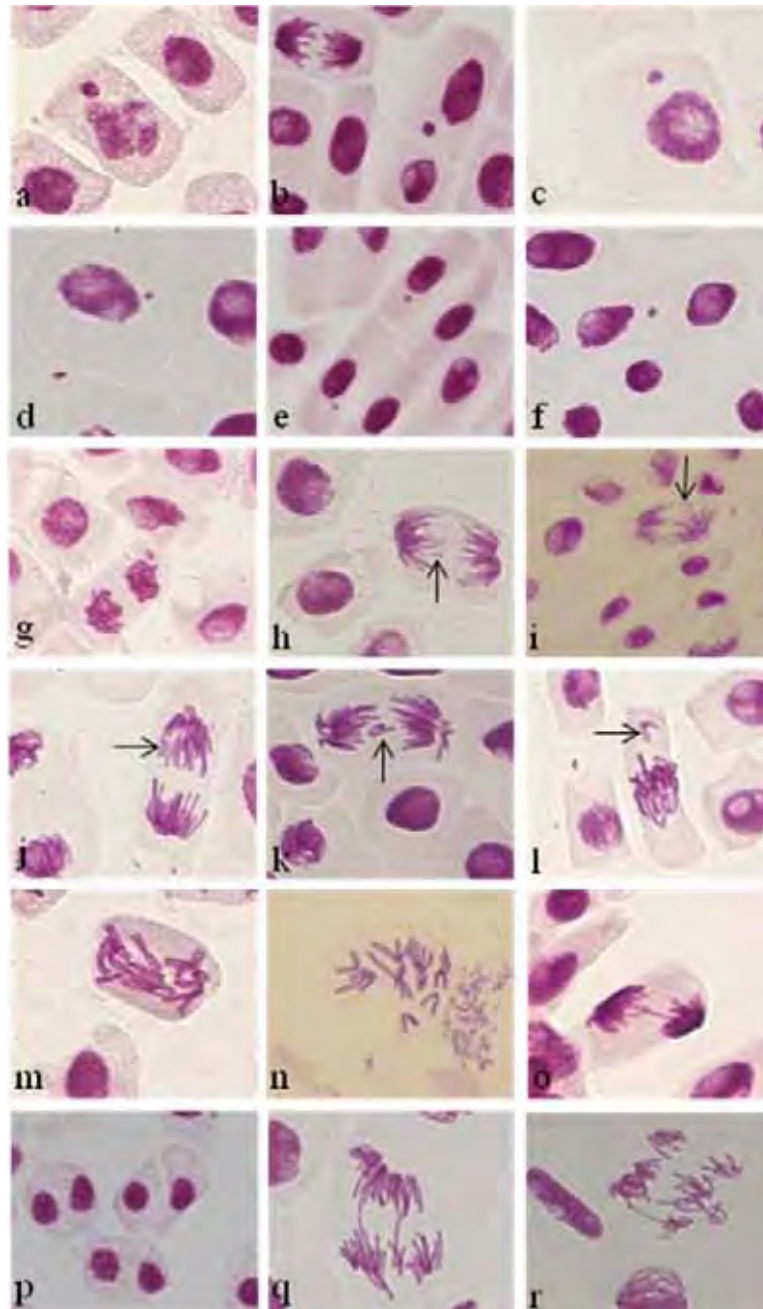
VMP: Valor Máximo Permitido ; \* Valores acima do recomendado pelo Conselho nacional do Meio Ambiente (CONAMA) - portaria 357/2005

**Tabela 3:** Médias e desvio-padrão dos efeitos citotóxicos (IM), genotóxicos (AC) e mutagênicos (MN+QC) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento com amostras de água coletadas ao longo do rio Preto, controle negativo e controle positivo.

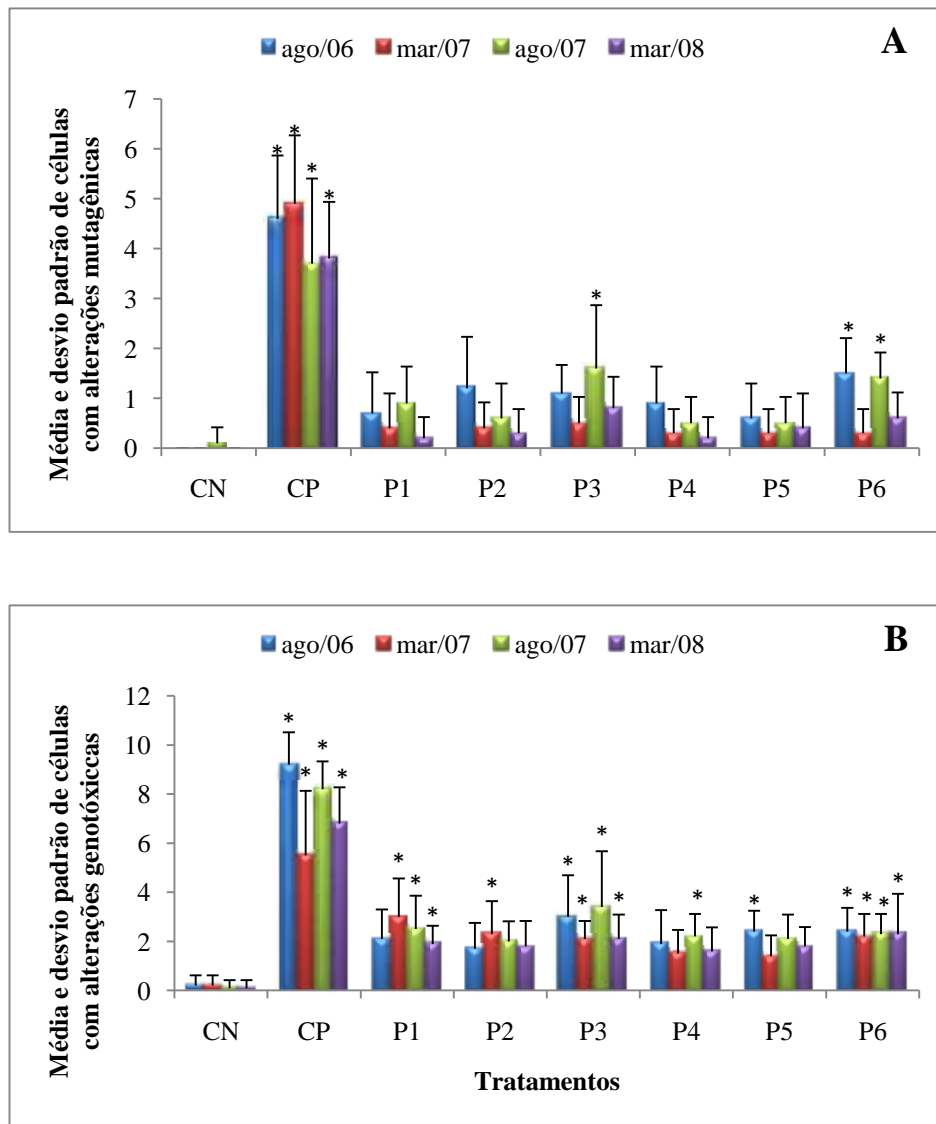
Coletas	Pontos	IM	AC	MN+QC
<b>Agosto 2006</b>	CN	0,49 ± 0,04	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,00
	CP	0,41 ± 0,02	9,8 ± 1,39*	4,6 ± 1,26*
	P1	0,46 ± 0,09	2,2 ± 1,03	0,7 ± 0,82
	P2	0,45 ± 0,09	1,8 ± 1,03	1,2 ± 1,03
	P3	0,44 ± 0,07	3,2 ± 1,68*	1,1 ± 0,56
	P4	0,45 ± 0,07	2,1 ± 1,28	0,9 ± 0,73
	P5	0,46 ± 0,04	2,6 ± 0,69*	0,6 ± 0,69
	P6	0,41 ± 0,08	2,6 ± 0,84*	1,5 ± 0,70*
<b>Março 2007</b>	CN	0,46 ± 0,06	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,00
	CP	0,40 ± 0,05	6,5 ± 1,95*	4,9 ± 1,37*
	P1	0,44 ± 0,07	3,2 ± 1,68*	0,4 ± 0,69
	P2	0,44 ± 0,06	2,3 ± 1,33*	0,4 ± 0,51
	P3	0,42 ± 0,07	2,3 ± 0,82*	0,5 ± 0,52
	P4	0,43 ± 0,06	1,6 ± 0,96	0,3 ± 0,48
	P5	0,46 ± 0,06	1,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48
	P6	0,43 ± 0,06	2,2 ± 0,92*	0,3 ± 0,48
<b>Agosto 2007</b>	CN	0,50 ± 0,09	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31
	CP	0,39 ± 0,04	8,9 ± 1,19*	3,7 ± 1,70*
	P1	0,47 ± 0,09	2,7 ± 1,33*	0,9 ± 0,73
	P2	0,47 ± 0,07	2,0 ± 0,81	0,6 ± 0,69
	P3	0,42 ± 0,05	4,2 ± 2,44*	1,6 ± 1,26*
	P4	0,44 ± 0,09	2,3 ± 1,06*	0,5 ± 0,52
	P5	0,47 ± 0,07	2,2 ± 0,92	0,5 ± 0,52
	P6	0,45 ± 0,08	2,6 ± 0,84*	1,4 ± 0,51*
<b>Março 2008</b>	CN	0,54 ± 0,09	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00
	CP	0,43 ± 0,07	7,5 ± 1,58*	3,8 ± 1,13*
	P1	0,56 ± 0,10	1,9 ± 0,73*	0,2 ± 0,42
	P2	0,60 ± 0,13	1,8 ± 1,03	0,3 ± 0,48
	P3	0,52 ± 0,05	2,3 ± 0,94 *	0,8 ± 0,63
	P4	0,53 ± 0,14	1,6 ± 0,96	0,2 ± 0,42
	P5	0,53 ± 0,05	1,8 ± 0,79	0,4 ± 0,69
	P6	0,50 ± 0,07	2,5 ± 1,58 *	0,6 ± 0,51

\* Valores estatisticamente significativos pelo teste de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ ; IM: Índice mitótico; AC: Aberração cromossômica; MN: micronúcleo; QC: quebra cromossômica; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.





**Figura 2:** Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao herbicida Trifluralina (a, j e m) e a águas coletadas ao longo do rio Preto (b-i, k-l, n-r). (a-g) Células micronucleadas exibindo diferentes tamanhos de micronúcleos; (h-j) anáfases com quebras cromossômicas (setas); (k-l) Células exibindo perdas cromossômicas (setas); (m-n) C-metáfases; (o) Anáfase com ponte cromossômica; (p) Célula binucleada; (q-r) Anáfases multipolares. Aumento de 1000X



\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$

**Figura 3:** Alterações mutagênicas (A) e genotóxicas (B) encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*, tratadas com água (CN), Trifluralina (CP) e amostras de águas (P1-P6) coletadas em diferentes pontos ao longo do rio Preto.

**Tabela 4:** Médias e desvio-padrão de aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição em amostras de água coletadas ao longo do rio Preto-SP, controle negativo e controle positivo em diferentes estações.

	PC	MP	PdC	CB	C-M	AdC	PeP	AMP
<b>Agosto 2006</b>								
CN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CP	1,4 ± 0,84*	1,1 ± 0,56*	1,4 ± 0,84*	1,6 ± 0,84*	1,1 ± 0,87	1,2 ± 0,42*	0,4 ± 0,70	1,1 ± 0,73*
P1	0,4 ± 0,51	0,4 ± 0,51	0,1 ± 0,31	0,7 ± 0,94	0,4 ± 0,51	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P2	0,5 ± 0,70	0,0 ± 0,48	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
P3	0,8 ± 0,63	0,5 ± 0,70	0,5 ± 0,97	0,3 ± 0,67	0,7 ± 1,05	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
P4	0,4 ± 0,51	0,2 ± 0,42	0,4 ± 0,51	0,6 ± 0,70	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
P5	0,6 ± 0,69	0,2 ± 0,42	0,6 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31
P6	0,6 ± 0,51	0,4 ± 0,69	0,4 ± 0,69	0,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
<b>Março 2007</b>								
CN	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CP	0,8 ± 0,79	0,8 ± 0,79	0,5 ± 0,72	0,6 ± 0,70	1,0 ± 0,94	0,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,8 ± 0,78
P1	0,7 ± 0,82	0,4 ± 0,52	0,3 ± 0,48	0,6 ± 0,69	0,6 ± 0,69	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,42
P2	0,8 ± 0,63	0,5 ± 0,52	0,0 ± 0,00	0,7 ± 1,05	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P3	0,6 ± 0,69	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,00	0,4 ± 0,52	0,3 ± 0,48	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
P4	0,3 ± 0,48	0,2 ± 0,42	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,3 ± 0,67	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00
P5	0,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,2 ± 0,63	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00
P6	0,8 ± 0,78	0,4 ± 0,51	0,0 ± 0,00	0,5 ± 0,84	0,4 ± 0,69	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
<b>Agosto 2007</b>								
CN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CP	1,1 ± 0,56*	1,3 ± 0,94*	0,9 ± 0,56	1,8 ± 0,92*	1,1 ± 0,73*	1,0 ± 0,47*	0,3 ± 0,50	0,7 ± 0,67
P1	1,0 ± 0,47	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,7 ± 0,94	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P2	0,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,5 ± 0,70	0,1 ± 0,31	0,3 ± 0,67	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P3	1,4 ± 1,07*	0,9 ± 1,59	0,5 ± 0,52	0,8 ± 1,39	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00
P4	0,9 ± 1,10	0,2 ± 0,42	0,4 ± 0,51	0,4 ± 0,51	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,48
P5	0,7 ± 0,67	0,1 ± 0,31	0,4 ± 0,51	0,5 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
P6	0,7 ± 0,67	0,4 ± 0,51	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,1 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31
<b>Março 2008</b>								
CN	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
CP	0,9 ± 0,74	0,8 ± 1,03	0,9 ± 0,73	0,7 ± 0,82	1,4 ± 0,51	0,8 ± 0,42	0,4 ± 0,69	0,9 ± 0,56
P1	0,7 ± 0,82	0,3 ± 0,48	0,2 ± 0,42	0,4 ± 0,69	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P2	0,5 ± 0,53	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,7 ± 0,82	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P3	0,4 ± 0,51	0,4 ± 0,70	0,3 ± 0,48	0,5 ± 1,27	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P4	0,5 ± 0,97	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,5 ± 0,84	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31
P5	0,4 ± 0,51	0,3 ± 0,48	0,3 ± 0,48	0,4 ± 0,69	0,3 ± 0,48	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
P6	0,4 ± 0,84	0,4 ± 0,51	0,2 ± 0,42	0,7 ± 0,95	0,4 ± 0,51	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,31

PC: pontes cromossômicas; MP: anáfase multipolar; PdC: perda cromossômica; CB: célula binucleada; AdC: aderência cromossômica; PeP: ponte e perda cromossômica; AMP: anáfase multipolar; AC: aberrações cromossômicas; CP: controle positivo; CN: controle negativo. \* Valores estatisticamente significativos pelo teste de Kruskal-Wallis, com  $p < ,05$ .

**DANOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM *OREOCHROMIS  
NILOTICUS* (PECIFORMES, CICHLIDAE), POR AMOSTRAS DE  
ÁGUAS DO RIO PRETO**

Lucilene Regina Maschio<sup>1</sup>, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>1</sup>; Maria  
Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de  
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto,  
São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista Departamento de Biologia, Instituto de  
Biotecnologia (IB-UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.

O manuscrito será submetido à revista Mutation Research

## **Resumo**

Em nosso estudo, os testes do micronúcleo, alterações nucleares e o ensaio do cometa foram aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), para avaliar o possível potencial mutagênico e genotóxico dos químicos contidos nos efluentes domésticos e urbano que são despejados ao longo rio Preto. Amostras de água foram coletadas em seis diferentes pontos do rio Preto nos meses de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e agosto de 2007 (estação seca) em seis pontos distintos do rio: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1 km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local do despejo de esgoto urbano; Ponto 4 (P4), margem oposta de despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1 km após represamento. As análises químicas dessas águas detectaram a presença dos elementos químicos Cd, Pb, Al, Fe, Mn, e Cu, em concentrações acima das recomendadas pela legislação. Para a realização dos testes, cinco espécimes de *O. niloticus* foram expostos, por 72 horas, a diferentes amostras de águas e a água de poço artesiano (controle negativo). Embora os resultados de mutagenicidade, desenvolvidos pelo teste do micronúcleo, tenha mostrado valor estatisticamente significativo somente em células expostas a amostra de água coletada em agosto de 2007 no ponto 3, foram registradas anormalidades nucleares em eritrócitos dos peixes, como: núcleos *notched*, *blebbed*, *lobed* e *broken-eggs*, além de cariólise e células binucleadas, em frequências, significativamente, mais altas que o teste controle, para alguns pontos e períodos estudados, sugerindo uma genotoxicidade dos compostos presentes nas águas deste rio, sob os organismos testados. Para o ensaio do cometa, foram observados resultados, significativamente, diferentes do controle negativo, para os pontos 3 e 6 em todos os períodos de coleta. Nossos dados apontam para um comprometimento das águas do rio Preto, alertando para a necessidade de um melhor monitoramento da qualidade deste importante recurso hídrico.

**Palavras-chave:** Teste do micronúcleo; alterações nucleares; mutagenicidade; ensaio do cometa; genotoxicidade; *Oreochromis niloticus*.

## 1. Introdução

O ambiente aquático tem sido o destino final de efluentes urbanos, industriais e agrícolas. Pelo possível potencial mutagênico e carcinogênico dos químicos presentes nesses efluentes, muitos pesquisadores têm desenvolvido pesquisas para avaliar os efeitos desta poluição aquática, tanto de ambientes marinhos como de água doce, nos organismos expostos, direta ou indiretamente, a ela (1-6). Neste contexto, muitos testes de toxicidade e de genotoxicidade têm sido realizados, complementando os dados obtidos com as análises físicas e químicas, conferindo uma melhor avaliação da qualidade da água, o que tem contribuído, significativamente, para a melhoria dos ecossistemas aquáticos (7-9).

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 substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental (10).

A espécie *Oreochromis niloticus* é um excelente organismo-teste usado em ensaios laboratoriais para investigação da toxicidade de substâncias químicas presentes em ecossistemas aquáticos (11). É uma espécie comumente encontrada em estuários do mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, às alterações ambientais (12).

O uso do teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos de peixes tornou-se extremamente vantajoso, quando comparado a outros biomarcadores de mutagenicidade realizados com estes organismos, tais como avaliação de troca entre cromátides irmãs e o teste de aberrações cromossômicas, uma vez que os peixes apresentam cromossomos pequenos, em grande quantidade e com baixo índice mitótico (13,14), o que pode dificultar as conclusões baseadas em resultados citogenéticos. O teste do MN tem sido realizado com grande sucesso em avaliações de potenciais mutagênicos de poluentes ambientais e de diferentes substâncias químicas (15).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido acrescentados aos testes de MN realizados com peixes, como, por exemplo, a avaliações da presença de anormalidades nucleares nas células destes organismos, quando estes são expostos a químicos ambientais (6,14,16-19). Carrasco et al. (16) descrevem algumas alterações na morfologia e no envoltório nuclear, decorrentes de efeitos de substâncias químicas presentes na água, como: *blebbed* (evaginações sutis do envoltório nuclear); *lobed* (evaginações proeminentes do envoltório nuclear); *notched* (invaginação do envoltório nuclear ou núcleo em forma de rim) e *broken eggs* (pequena porção nuclear ligada ao núcleo principal por um pequeno filamento nucleoplasmático). Estas alterações podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações decorrentes de genotoxicidade e/ou mutagenicidade de químicos ambientais (20-22) e, portanto, podem ser usadas como indicativas de reatividade com o material genético, complementando a análise de micronúcleo.

O ensaio do cometa é um teste que pode fornecer importantes informações sobre o potencial genotóxico de uma substância. O teste detecta pequenos danos no DNA e também apresenta vantagens quanto ao número de células para sua realização, além de ser de fácil e rápida aplicação, exigindo um curto período de tempo para a realização dos experimentos (23-28).

No presente estudo, os testes do micronúcleo, de alterações nucleares e o ensaio do cometa foram aplicados em eritrócitos de *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), que foram expostos a amostras de água de um importante recurso hídrico (rio Preto) da região de São José do Rio Preto –SP-Brasil, para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico da água deste rio, em decorrência dos efluentes que recebe ao longo do seu curso.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Caracterização da área de estudo e locais de coleta das amostras de águas**

O rio Preto é um importante recurso hídrico, localizado no interior do estado de São Paulo-Brasil, que, no trecho urbano da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil, apresenta uma parte represada (área total de, aproximadamente, 5Km<sup>2</sup> e profundidade máxima de 2,5m), formando a represa municipal responsável pelo abastecimento público da população local.

A área deste rio, escolhida para o presente estudo, está localizada entre as coordenadas 20° 55' 59" S/ 49° 18' 59" W. O rio Preto vem sofrendo, há vários anos, impactos decorrentes da poluição ambiental antropogênica, conferida, principalmente, pelos emissários de esgotos não tratados, pelo despejo clandestino de esgoto doméstico e pelo assoreamento decorrente da ausência da mata ciliar.

Amostras de águas foram coletadas nos meses de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e agosto de 2007 (estação seca), em seis pontos distintos do rio, como segue: Ponto 1 (P1) – 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2) - 1 km antes do represamento; Ponto 3 (P3) - local de despejo do esgoto; Ponto 4 (P4) - margem oposta do despejo do esgoto; Ponto 5 (P5) - saída do represamento; Ponto 6 (P6) – 1 km após represamento (Figura 1).

Galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram utilizados, para a coleta das amostras de águas aos ensaios de *Oreochromis niloticus*. Para as amostras de águas destinadas às análises de elementos químicos, frascos estéreis de vidro de 2L foram utilizados para coleta. O procedimento das coletas das amostras de águas foi realizado segundo a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue:

(1) Primeiramente, os galões foram submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado;

(2) Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes



aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume;

(3) Após coleta, as amostras foram levadas imediatamente ao laboratório para início dos experimentos.

Temperaturas médias, máximas e mínimas e índices pluviométricos foram obtidos, para todos os meses de coleta, junto ao Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI), da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (Tabela 1).

## **2.2. Material biológico**

Os organismos-teste usados para a realização da pesquisa foram espécimes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), com cerca de 12 cm de comprimento, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes foram obtidos junto à piscicultura da UNESP (Campus de São José do Rio Preto/SP), levados para o Biotério, aclimatados por uma semana em temperatura média de 23 °C, para, posteriormente, serem usados nos experimentos.

## **2.3. Bioensaio**

Foram utilizados, para a realização dos experimentos, sete aquários de vidro (capacidade de 50L), sendo um para o controle negativo, contendo apenas água de poço artesiano e os restantes destinados para cada um dos pontos de coleta. As amostras de águas coletadas foram diluídas, na proporção de 1:1 com água de poço artesiano, e acondicionadas nos aquários, sob constante aeração, por três dias. Após este período, cinco espécimes de *O. niloticus*, foram distribuídos, aleatoriamente, entre os aquários, onde permaneceram por 72 h, para estimar os possíveis efeitos genotóxico e mutagênico dos contaminantes presentes nas águas do rio Preto. Nenhum alimento foi fornecido aos peixes durante o experimento.

### **2.3.1. Teste do micronúcleo e teste de alterações nucleares**

Para a realização do teste do MN, foi realizada uma punção cardíaca, com seringa heparinizada, para a retirada de cerca de 3cc de sangue de cada espécime. Para o preparo das lâminas foi descartada a primeira gota de sangue da seringa, com o intuito de evitar a contaminação do sangue com o líquido corporal e muco. Três lâminas foram confeccionadas, pela técnica de esfregaço (extensões sangüíneas), para cada indivíduo. O material foi fixado, por 10 minutos, em metanol absoluto e, após 24 horas, foi submetido à reação de Feulgen, que compreende duas etapas: uma hidrolise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e, posteriormente, a submissão ao reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro.

Um total de 3.000 eritrócitos foi analisado para cada peixe do estudo (de todos os pontos de coleta e do controle) sob objetiva de imersão (100x). A média e o desvio padrão do número de eritrócitos com micronúcleo e outras alterações nucleares foram determinadas pela análise de 15.000 células por ponto de coleta do estudo. Os resultados obtidos foram comparados, estatisticamente, pelo teste Kruskal-Wallis.

### **2.3.2. Ensaio do cometa**

O mesmo sangue coletado para o teste de micronúcleo foi utilizado para o ensaio do cometa, seguindo a metodologia: Uma amostra de 10 µl de sangue foi diluída em 1.000 µl de solução fisiológica. As lâminas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37° C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, para 1L) em geladeira por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese. Para as corridas, adicionou-se tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM (pH ~13), por 20 minutos. Decorrido o tempo de relaxamento, as lâminas foram submetidas à eletroforese, por 20 minutos à 25V, 300mA. As lâminas foram, a seguir,

neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg/ml).

Para cada peixe foram analisados, 100 nucleóides, com a utilização de microscópio de fluorescência Leica, filtro B - 3<sup>4</sup> (excitação:  $\lambda = 420 - 490\text{nM}$ , barreira:  $\lambda = 520\text{nM}$ ), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0 (sem dano); classe 1 (pouco); classe 2 (dano médio) e classe 3 (grande dano), de acordo com a classificação de Kobayashi (29) (Figura 2). 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 a análise estatística, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ , comparando o número total de cometas, e as suas diferentes classes, entre os resultados dos tratamentos e o teste controle.

### **3. Análises químicas**

Foram realizadas análises químicas de todas as amostras de água coletadas ao longo do rio Preto. Para esta análise foram quantificados os elementos químicos: nitrato, nitrito, amônia, sulfatos, cloreto, chumbo, alumínio, manganês, ferro total, cobre, zinco, cromo e cádmio.

### **4. Resultados**

Nas análises químicas foram detectados valores que se encontram acima dos limites recomendados pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para os elementos químicos Cd, Pb, Fe, Al, NH<sub>3</sub>, Mn, Cu e Zn (Tabela 2).

Foram realizados, inicialmente, testes com amostras não diluídas das águas de todos os pontos de coleta, para estimar a toxicidade das mesmas. Todos os pontos mostraram ser tóxicos, pois levaram a morte de todos os peixes experimentados. Portanto, houve a necessidade da diluição das amostras, na

proporção de 1:1, com água de poço artesiano, para dar prosseguimento aos bioensaios.

Apenas os espécimes de *O. niloticus*, expostos às águas do P3, coleta de agosto de 2007, apresentaram frequências significativas de eritrócitos micronucleados, em relação ao controle negativo (Figs. 3 A-C (setas), 4 e Tabela 3).

Foram observados eritrócitos com alterações na morfologia nuclear, como núcleos *notched* (Fig. 3D), *lobed* (Fig. 3E), *Broken-eggs* (Fig.3F), *blebbed* (Fig.3G), além de células binucleadas (3H) e células em cariólise (Fig. 3I). Pelas nossas análises, pudemos registrar, para março de 2007, um número de células com núcleo *notched*, para P2 e P6, estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) das observadas no grupo controle. Valor significativo ( $p < 0,05$ ) de eritrócitos apresentando núcleos *blebbed* foi observado para P4, para o mesmo período.

Em agosto de 2007, para P4 e P6, o número de eritrócitos com núcleo *lobed* foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle. Peixes expostos em amostra de água do P3 apresentaram eritrócitos com núcleos *notched*, *blebbed* e *broken-eggs*, cujos valores diferiram, estatisticamente, do grupo controle.

No mês de março de 2008, foram observados valores significativos de eritrócitos com núcleos *lobed* e *blebbed* (P3), *notched*, *blebbed* e *broken-eggs* (P4), quando comparados com os resultados do teste controle.

O ensaio do cometa, realizado com as diferentes amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, indicaram, de maneira geral, uma potencialidade de indução de danos no DNA, quando comparados com o controle negativo. A frequência de nucleóides, em cada classe de migração, e o escore do dano foram utilizados como parâmetros para a avaliação da genotoxicidade. As diferentes classes encontradas estão expostas na Figura 2.

As médias dos escores obtidas nos experimentos realizados com as amostras de águas coletadas nos P3 e P6 apresentaram valores, significativamente, diferentes do teste controle, para todos os períodos estudados. Os P2 e P4

apresentaram escores significativos somente para março de 2008 e agosto de 2007 (Figura 5 e Tabela 5).

Em relação ao número total de células com cometa, pudemos observar que, em março de 2007, as amostras de águas coletadas nos P2 e P6 causaram danos estatisticamente significativos nas células. Os valores encontrados em P6 foram significativos em todos os períodos estudados e em P3, só não foram significativos para março de 2007 (Tabela 5).

## **5. Discussão**

Águas superficiais, tais como as de rios e lagos, recebem grandes quantidades de efluentes, sejam eles de origem agrícola, industrial e/ou doméstica. Essas águas que, na maioria das vezes, possuem compostos desconhecidos e com potencial mutagênico e/ou genotóxico, são utilizadas como água potável para o consumo humano, em atividades recreativas e na irrigação (30), podendo colocar em risco a saúde da população.

O uso de peixes como bioindicadores de impacto ambiental tem sido cada vez mais freqüente, pois estes organismos são eficientes para alertar sobre o perigo de substâncias químicas derivadas da poluição ambiental (31-32). A espécie *O. niloticus* tem sido largamente utilizada para este fim, por diversos autores (6,17-19) que estudam os comprometimentos da poluição.

Micronúcleos são estruturas celulares que aparecem na célula, em decorrência da ação de agentes que promovem quebras no material genético (agentes clastogênico) ou perdas de cromossomos inteiros (agente aneugênico), materiais estes que não são reincorporados ao núcleo principal da célula, durante o ciclo celular (33, 34). Além do teste do micronúcleo, também podem ser feitos outros testes para a avaliação de potencial genotóxico, como, por exemplo, o de indução de anormalidades nucleares. Estes testes têm sido, atualmente, realizados por vários autores, tanto para células humanas (35-36) como para células de peixe (6, 17, 18), e tem se caracterizado em bons indicadores de efeitos genotóxicos.

Contudo, os mecanismos de formação dessas anormalidades ainda não são bem conhecidos, mas diversos estudos indicam que as alterações nucleares possam aparecer em resposta à exposição a agentes genotóxicos (36,37). Alguns estudos mostram que um grande número de substâncias químicas pode interferir na síntese de DNA e levar ao aparecimento destas anormalidades nucleares (6, 18).

Em nosso estudo, o teste do micronúcleo, o de anormalidades nucleares e o do cometa foram aplicados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos às águas do rio Preto, para avaliação dos potenciais mutagênico e genotóxico dos químicos presentes neste rio.

Pelas análises realizadas com todas as amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, pudemos observar que as amostras do P3, realizada em agosto de 2007, apresentaram frequências de micronúcleos, significativamente, superiores às encontradas para o controle negativo.

Os resultados de anormalidade nucleares, observadas em eritrócitos de peixes tratados com águas do rio Preto, mostraram um aumento significativo nos valores de células com núcleos *notched*, *blebbed*, *lobed* e *broken-eggs*, para alguns pontos e períodos estudados. Alguns autores sugerem que uma amplificação gênica pode levar a alterações do tipo *lobed* e *blebbed*, via ponte-fusão-quebra, durante a eliminação do DNA amplificado dos núcleos das células (17). Alterações nucleares do tipo *notched*, provavelmente, podem estar associadas com eventos de aneuploidias (38).

Os resultados obtidos neste estudo podem ser decorrentes de dois eventos distintos: 1. que as concentrações dos metais presentes nas amostras de águas do rio Preto são genotóxicas mas não conferem efeito mutagênico no organismo testado, uma vez que houve resultados positivos para altas frequências de indução de anormalidades nucleares, em relação ao controle, para as águas de alguns pontos de coleta (P3 e P6), nos períodos de março de 2007-2008 e agosto de 2007, que não foram correspondentes aos resultados de indução de altas frequências de células micronucleadas (só observadas para o P3, em agosto de 2007); 2. que, como essas amostras de águas foram diluídas em água de poço artesiano, as concentrações finais dos metais podem não conferir mutagenicidade aos

organismos expostos e, por isso, não levaram à formação de MN nestes organismos.

Em relação às análises do ensaio do cometa, usando *O. niloticus* como sistema teste, pôde-se observar que apenas as águas dos pontos P3 e P6, para todos os períodos do estudo, revelaram resultados significativos, em relação ao controle negativo, o que confirma o efeito genotóxico dos metais presentes nestas águas, já detectados pelos outros bioensaios apresentados (Tabela 5).

Nossos resultados corroboram as pesquisas desenvolvidas por alguns autores (6, 23, 39,40), que mostraram que o ensaio do cometa, utilizando peixes como organismo teste, é uma ferramenta efetiva na detecção do potencial genotóxico de ambientes aquáticos. Segundo Nanthawan et al., (41), o ensaio do cometa é uma técnica indicada para detectar danos no DNA provocados por agentes químicos presentes no ambiente aquático.

Por meio das análises químicas realizadas com as águas do recurso hídrico em estudo, podemos sugerir que os metais, encontrados em concentrações mais elevadas que a legislação CONAMA (42), possam ser os responsáveis pelos efeitos genotóxicos observados no presente estudo.

A presença de metais pesados como o cromo, ferro, cobre, cádmio, chumbo e zinco em ecossistemas aquáticos caracteriza uma grande preocupação ambiental, devido a toxicidade e genotoxicidade destes elementos sob as diversas formas de vida (43). Um estudo realizado por Ergene et al. (44) sugeriu que os efeitos genotóxicos observados em eritrócitos de peixes estavam relacionados com os metais pesados contidos nas amostras de águas de lagos do Goksu Delta (Turquia), a qual os peixes foram expostos.

Em nosso estudo os metais pesados: cobre (Cu), cádmio (Cd), ferro (Fe) e chumbo (Pb) foram encontrados em concentrações superiores às recomendadas pela legislação brasileira, CONAMA (42), para quase todos os pontos e períodos estudados, porém suas concentrações diferiram entre as estações e entre as amostras realizadas. Concentrações de Cd e Pb, superiores às recomendadas pela legislação brasileira, também foram encontradas por Hoshina et al. (19) em

amostras de águas coletadas em um rio (Atibaia, estado de São Paulo-Brasil) que recebe efluentes de uma refinaria de petróleo.

O Fe e o Cu foram encontrados em todas as amostras de águas coletadas para todos os períodos do estudo, sempre em concentrações superiores às permitidas pela legislação. A toxicidade do Cu é dada pela sobrecarga nos mecanismos de controle homeostático celular e/ou por danificar os mecanismos de reparo da célula (45). Quando presente em elevadas concentrações na água, o Cu é capaz de intoxicar os organismos aquáticos, uma vez que o alvo deste metal parece ser a homeostase do sódio, influenciando na absorção de cloretos e na excreção de compostos nitrogenados (46).

Elevados níveis de Fe, decorrentes do uso de fertilizantes químicos e biocidas, também foram observados no lago Nasser (Egito) (47). Esta contaminação levou a um comprometimento de alguns tecidos dos peixes expostos (tilápia), sendo o estômago o órgão mais afetado.

Em duas das coletas realizadas (agosto de 2007 e março de 2008), o Manganês apresentou concentrações superiores às permitidas pela legislação brasileira. Em agosto de 2007 o Mn só não foi encontrado nas águas dos pontos P2 e P4. Este metal também não foi detectado no ponto P4, para a coleta de março de 2008.

Pelas análises químicas realizadas, foi observado que o Pb apresentou concentrações diferentes entre as estações de verão e inverno, para quase todos os pontos de coleta, sendo os maiores valores registrados para o período de inverno. O aumento desses valores pode ser explicado pela própria característica da estação, onde o volume d'água é reduzido, promovendo, assim, uma maior concentração dos elementos químicos. Em contrapartida, na coleta de verão de 2008 foram observados valores bem maiores de Pb, quando comparado com os resultados da coleta anterior, o que sugere um aumento do lançamento de efluentes contaminados com este metal. O Pb que é depositado nos lagos, rios e oceanos, pode ser proveniente da atmosfera ou de escoamento superficial do solo (fontes indiretas mas significativas de contaminação aquática), ou estar relacionado com fontes naturais e/ou antropogênicas. Dentre as fontes



antropogênicas mais importantes, destacam-se as atividades de mineração, de produção e processamento do metal, além das indústrias de ferro e aço (48).

Diante dos resultados apresentados, pudemos observar que as águas derivadas dos P3 e P6 apresentaram maior potencialidade de indução de efeitos genotóxico no sistema biológicos testado, provavelmente decorrente do comprometimento ambiental conferido pelo despejo de esgoto urbano da cidade de Rio Preto nos dois pontos de estudo.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto/SP-Brasil, à Profa Dra Eliane Gonçalves de Freitas por ceder os peixes dos experimentos, à bióloga Thaís Billalba pela ajuda nos experimentos e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

### **Referências Bibliográficas**

- (1) L.D. Claxton, V.S. Houk, T.J. Hughes, Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410 (1998) 237–243.
- (2) W. F. Grant, The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, *Mutat. Res.* 310 (1994) 175-185.
- (3) R. Caritá, M. A. Marin-Morales, Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 72 (2008) 722-725.

- (4) D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study, *Mutat. Res.* 650 (2008) 80-86.
- (5) T.Çavas, S. Ergene-Gözükara, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquat. Toxicol.* 64 (2005) 264-271.
- (6) B.C. Ventura, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae) detected by the micronuclei test and the comet assay, *Pestic. Biochem. Phys.* 90, (2008) 42-51.
- (7) W.F. Grant, Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, *Mutat. Res.* 426 (1999) 107-112.
- (8) V. Smaka-Kincl, P. Stegnar, M. Lovka, M. J. Toman, The evaluation de waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure, *Mutat. Res.* 368 (1996) 171-79.
- (9) L.C.M. Egito, M.G. Medeiros, S.R.B. Medeiros, L.F. Agnez-Lima, Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil, *Genet. Mol. Biol.* 30 (2007) 435-441.
- (10) D. A. Powers, Fish as model systems, *Science* 246 (1989) 352-358.

(11) J. R. M. Alves-Costa, Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. 2001. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

(12) M. M. Vijayan, J. D. Morgan, T. Sakamoto, E. G. Grau, G. K. Iwama, Food deprivation affects sweater acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes, *J. Experim. Biol*, 199, (1996) 2467-2475.

(13) A.D. Kligerman, Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: J.A. Heddle (ed). *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press (1982) 435-456.

(14) F. Ayllón, E. Garcia-Vasquez, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and *Poecilia latipinna*: an assessment of fish micronucleus test, *Mutat. Res.* 467 (2000) 177-186.

(15) G.I.V. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha haemocytes* for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquat. Toxicol.* 64 (2003) 15-23.

(16) k.R. Carrasco, k.L. Tilbury, M.S. Mayers, Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects, *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 47 (1990) 2123-2136.

- (17) T. Çavas, S. Ergene-Gözükara, Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent, *Mutat. Res.* 538 (2003) 81-91.
- (18) T.S. Souza, C.S. Fontanetti, Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* 605 (2006) 87-93.
- (19) M.M. Hoshina, D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* (2008), doi:10.1016/j.mrgentox.2008.07.004
- (20) T.M.D. Nakano, K.M.D. Oka, Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy, *Cancer* 68 (1991) 517-523.
- (21) D.H. Cormak, (Ed.), *Hans Histologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991, pp. 5-35.
- (22) M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81-95.
- (23) C.L. Mitchelmore, J.K. Chipman, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutat. Res.* 399 (1998) 135-147.

- (24) Y.F. Sasaki, F. Izumiyama, E. Nishidate, S. Ishibashi, S. Tsuda, N. Matsusaka, N. Asano, K. Saotome, T. Sofuni, M. Hayashi, Detection of genotoxicity of polluted seawater using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study, *Mutat. Res.* 393 (1997) 133-139.
- (25) M. Kozł-Vnenchak, K. Rokosz, The “comet” assay for detection of potential genotoxicity of polluted water, *Folia biologica* 45 (1997) 153-156.
- (26) R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- (27) G. Koppen, L.M. Toncelli, L. Triest, L. Verschaeve, The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves, *Mechanisms of Ageing and Development* 110 (1999) 13-24.
- (28) N.G. Lemos, A.L. Dias, A.T. Silva-Souza, M.S. Mantovani, Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*, *Environ. Toxicol. Pharm.* 19 (2005) 197-201.
- (29) H. Kobayashi, C. Sugiyama, Y. Morikama, M. Hayashi, T. Sofuni. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. *MMS Comm.* 3 (1995) 103-115.

- (30) D.S.L. Moraes, B.Q. Jordão, Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana, *Revista Saúde Pública*, 36 (2002) 370-374.
- (31) J. López-Barea, Biomarkers to detect environmental pollution, *Toxicol. Lett.* 88 (1996) 79.
- (32) R. Van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharm.* 13 (2003) 57-149.
- (33) M. Fenech, J. W. Crott, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutat. Res.* 504 (2002) 131-136.
- (34) Z. Meng, H. YI, Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*, *Mutat. Res.* 537 (2003) 109-114.
- (35) P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen, Micronuclei and other anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users, *Am. J. Epidemiol.* 134 (1991) 840-850.
- (36) P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen, Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development, *Mutat. Res.* 271 (1992) 69-77.
- (37) R. Montero-Montoya Serrano-Garcia, Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events, *Environ. Mol. Mutagen.* 38 (2001) 38-45.

(38) F.N. Ghandially, Ultrastructural pathology of the cell and matrix, Butterworths, (1982) 971p.

(39) D.E. Nacci, S. Cayula, E. Jackmin, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquat. Toxicol.* 35 (1996) 197-210.

(40) S.T. Matsumoto, M.S. Mantovani, M.I.A. Malagutti, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin-Morales, Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genet. Mol. Biol.* 29 (2006) 148-158.

(41) A. Nanthawan, C. Rabinowits, E. Moiseeva, B. Rinkevich, Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay, *Mutat. Res.* 518 (2002) 21-37.

(42) CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

(43) A.M. Florea, D. Busselberg, Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds, *Biometals* 19 (2006) 419-427.

(44) S. Ergene, T. Çavas, A. Çelik, N. Koleli, F. Kaya, A. Karahan, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution, *Ecotoxicology* 16 (2007) 385-391.

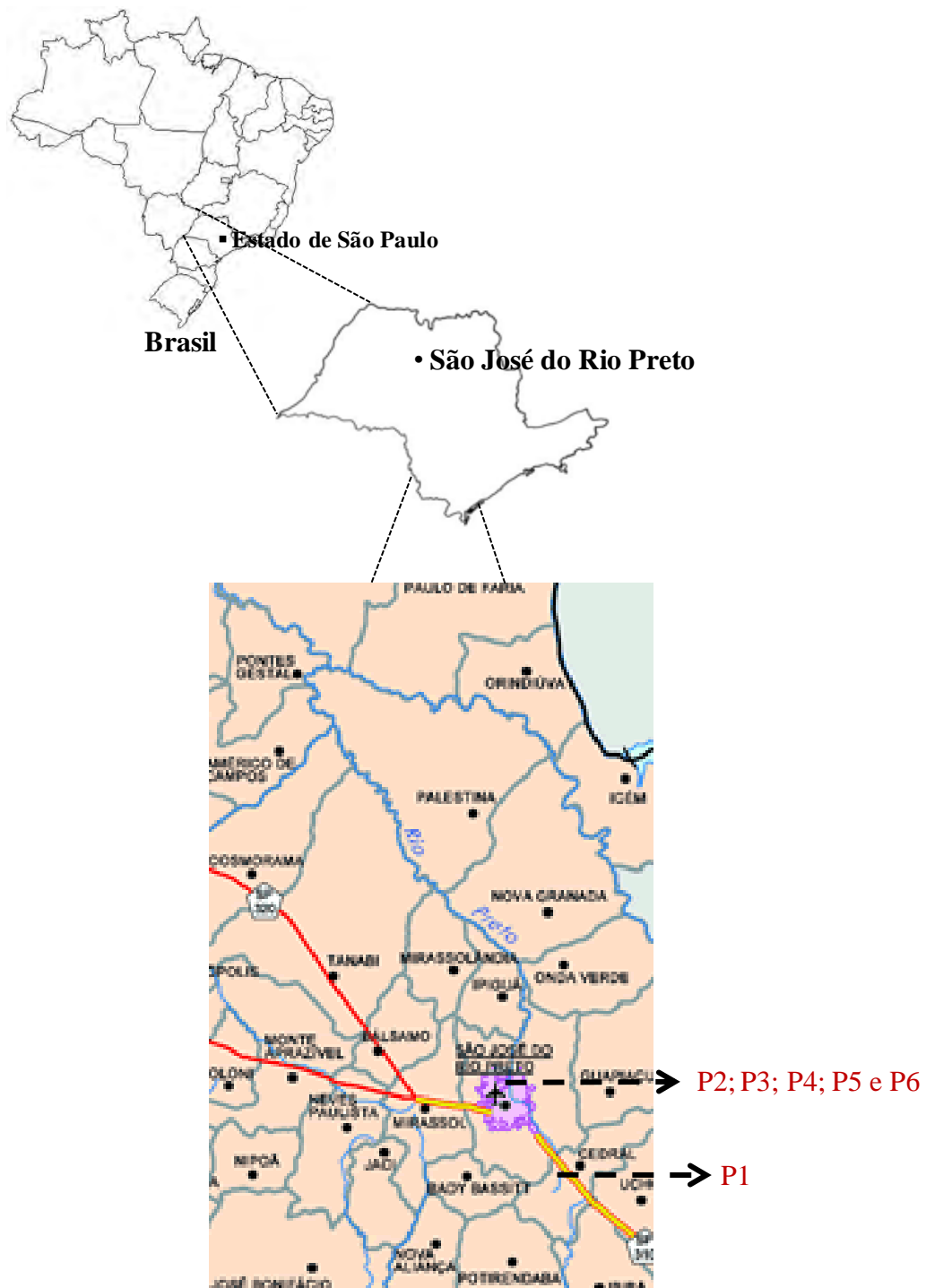
(45) M.F.M. Pedrozo, I.V. Lima, Ecotoxicologia do cobre e seus compostos, Série de Cadernos de Referência Ambiental 4 (2001) 128p.

(46) M. Grossel, C. Nielsen, A. Bianchini, Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals, Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133 (2002) 287-303.

(47) M.N. Rashed, Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake, Environment. Internat. 27 (2001) 27-33.

(48) M.F.M. Pedrozo, I.V. Lima, Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos, Série de Cadernos de Referência Ambiental 4 (2001) 128p.



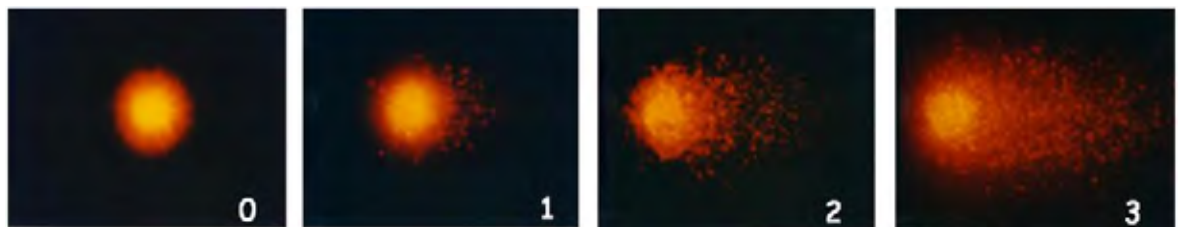


**Figura 1:** Localização da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (latitude  $20^{\circ} 55' 59''$  S, longitude  $49^{\circ} 18' 59''$  W) e dos pontos de coleta ao longo do rio Preto. P1: 8 km antes do represamento; P2: 1 km antes do represamento; P3: local de despejo de esgoto; P4: margem oposta de despejo de esgoto; P5: saída do represamento e P6: 1 km após represamento.

**Tabela 1:** Dados metereológicos da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Preto.

Meses de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Índice de chuvas (mm)	Nº total de dias chuvosos
Março 2007	32.61	21.58	111.6	8
Agosto 2007	29.68	16.81	0	0
Março 2008	28.90	22.58	164.8	10

Nota: Os valores acima foram obtidos a partir das médias diárias.

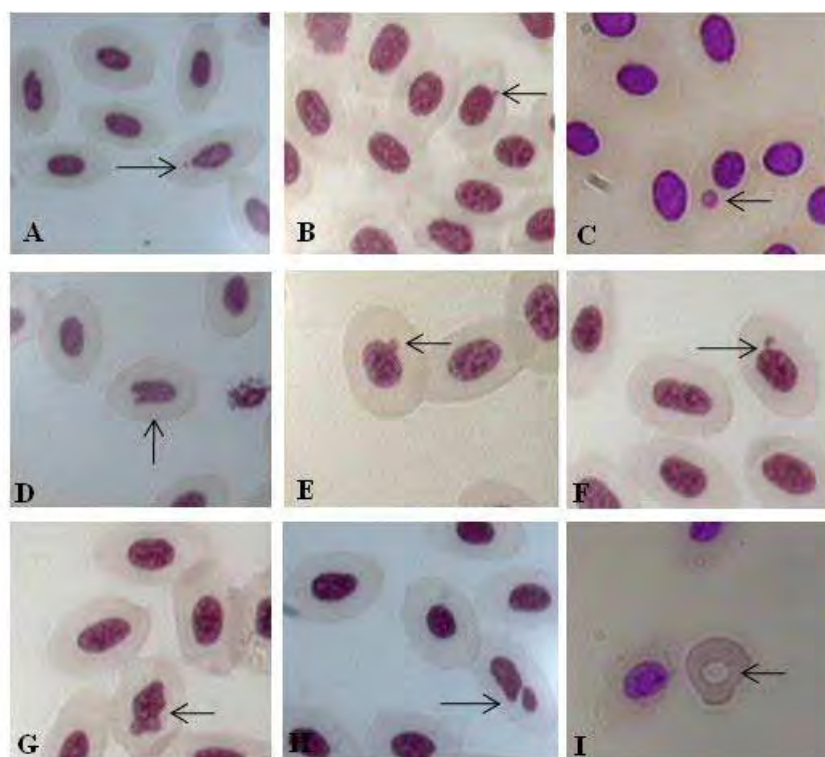


**Figura 2:** Classes do teste do cometa: classe 0 (sem dano); classe 1 (pouco); classe 2 (dano médio) e classe 3 (grande dano)

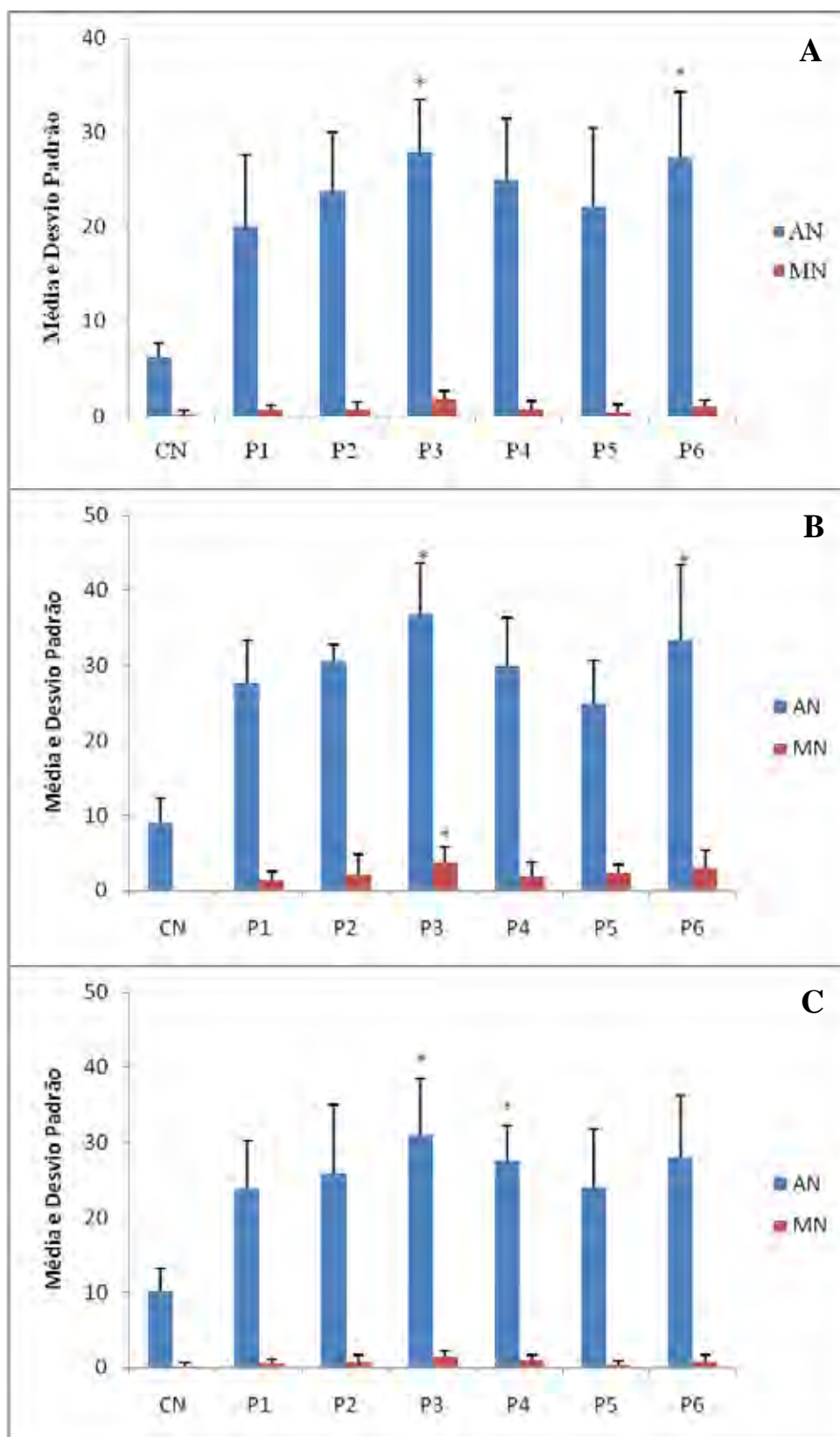
**Tabela2: Análises químicas das amostras de água coletadas em diferentes pontos ao longo do rio Preto, São José do Rio Preto/SP.**

		Elementos químicos (mg/L)												
		Cd	Cloro	Pb	Al	NH3	Fe	Mn	Cr	Cu	Nitrato	Nitrito	Sulfato	Zn
<b>Estações e pontos</b>														
<b>Inverno 2006</b>														
P1	0,002*	3,8	0,019*	0,010	0,20	1,04*	0,063	0,01	0,05*	1,10	0,008	5,0	0,17	
P2	0,002*	6,6	0,013*	0,020	0,74	1,69*	0,050	0,01	0,09*	2,20	0,037	7,0	0,16	
P3	0,003*	4,8	0,013*	0,136*	0,17	0,67*	0,038	0,01	0,01*	3,00	0,033	16,0	0,16	
P4	0,002*	3,0	0,007	0,214*	0,19	0,60*	0,034	0,01	0,02*	2,50	0,013	4,0	0,21*	
P5	0,001	3,6	0,010*	0,021	0,19	0,36*	0,039	0,01	0,02*	2,60	0,012	4,0	0,20*	
P6	0,001	4,3	0,025*	0,043	0,58	0,48*	0,031	0,01	0,05*	1,80	0,031	3,0	0,09	
<b>Verão 2007</b>														
P1	0,002*	10,3	0,010*	0,043	1,05	2,05*	0,077	0,01	0,01*	1,90	0,098	0,0	0,02	
P2	0,001	7,9	0,013*	0,065	0,65	2,17*	0,043	0,01	0,01*	2,10	0,053	7,0	0,01	
P3	0,001	8,7	0,008	0,024	0,50	1,10*	0,056	0,01	0,02*	1,80	0,047	16,0	0,01	
P4	0,002*	4,5	0,008	0,039	0,47	1,28*	0,067	0,01	0,01*	0,80	0,027	4,0	0,01	
P5	0,003*	3,7	0,015*	0,043	0,41	0,81*	0,052	0,01	0,03*	0,80	0,032	4,0	0,01	
P6	0,017*	5,5	0,011*	0,033	0,94	0,80*	0,039	0,01	0,01*	1,50	0,047	3,0	0,01	
<b>Inverno 2007</b>														
P1	0,001	6,8	0,016*	0,030	2,66	2,34*	0,133*	0,01	0,03*	2,20	0,257	1,0	0,01	
P2	0,001	4,7	0,010*	0,098	0,67	2,45*	0,093	0,01	0,03*	1,60	0,064	0,0	0,01	
P3	0,007*	25,0	0,034*	0,013	3,62	0,42*	0,102*	0,01	0,13*	1,60	0,011	76,0	0,04	
P4	0,002*	3,0	0,013*	0,054	0,23	0,95*	0,071	0,01	0,02*	0,80	0,005	0,0	0,01	
P5	0,002*	4,1	0,021*	0,102*	0,78	1,08*	0,223*	0,01	0,03*	1,00	0,019	1,0	0,0	
P6	0,002*	16,2	0,012*	0,084	3,74*	1,22*	0,216*	0,01	0,06*	1,40	0,032	16,0	0,02	
<b>Verão 2008</b>														
P1	0,002*	5,7	0,032*	0,029	1,69	2,30*	0,284*	0,01	0,03*	1,80	0,067	0,0	0,00	
P2	0,001	4,3	0,025*	0,042	0,89	2,49*	0,115*	0,01	0,02*	1,60	0,060	0,0	0,01	
P3	0,001	9,4	0,030*	>0,250*	0,99	1,75*	0,118*	0,0	0,04*	1,60	0,036	10,0	0,01	
P4	0,002*	4,3	0,028*	0,080	0,45	1,25*	0,101*	0,02	0,02*	1,80	0,029	4,0	0,01	
P5	0,001	7,1	0,026*	0,173*	0,89	1,74*	0,133*	0,0	0,03*	1,60	0,029	4,0	0,01	
P6	0,002*	9,6	0,026*	0,164*	2,00	1,47*	0,114*	0,01	0,08*	1,90	0,058	6,0	0,01	
VMP	<b>0,001</b>	<b>250</b>	<b>0,01</b>	<b>0,1</b>	<b>3,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,009</b>	<b>10</b>	<b>1,0</b>	<b>250</b>	<b>0,18</b>	

VMP: Valor Máximo Permitido ; \* Valores acima do recomendado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) - portaria 357/2005



**Figura 3:** Micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição a amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto. A-C. Células micronucleadas; D. Núcleo *notched* (seta); E. Núcleo *lobed* (seta); F. *Broken-eggs* (seta); G. Núcleo *blebbed* (seta); H. Célula binucleada (seta); I. Cariólise (seta).



**Figura 4:** Médias e desvio padrão de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN) encontradas em eritrócitos de *O. niloticus*, após 72 horas de exposição em amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto e água de poço artesiano nos períodos de (A) março de 2007, (B) agosto de 2007 e (C) março de 2008.

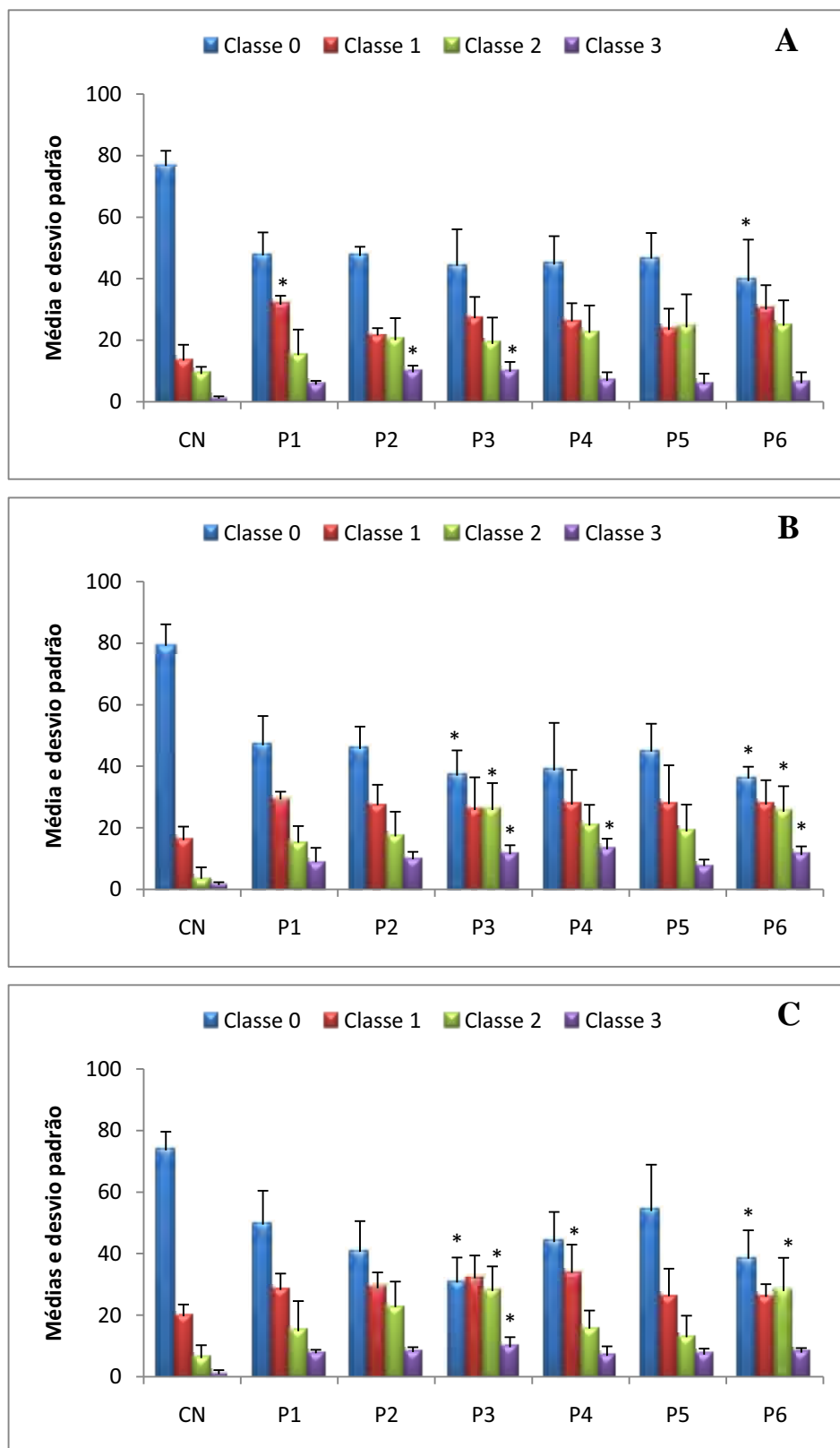
**Tabela 3:** Número, médias e desvio padrão de micronúcleos (MN) encontrados em eritrócitos de *O. niloticus* expostos, por 72 horas, a amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto/SP.

Amostras	Pontos	Número de eritrócitos analisados	Número de MN	Média ± S.D
<b>Março 2007</b>	Controle	15000	01	0,2 ± 0,55
	Ponto 1	15000	03	0,6 ± 0,54
	Ponto 2	15000	03	0,6 ± 0,54
	Ponto 3	15000	09	1,8 ± 0,83
	Ponto 4	15000	04	0,8 ± 0,84
	Ponto 5	15000	02	0,4 ± 0,90
	Ponto 6	15000	05	1,0 ± 0,70
<b>Agosto 2007</b>	Controle	15000	00	0,0 ± 0,00
	Ponto 1	15000	07	1,4 ± 1,14
	Ponto 2	15000	11	2,2 ± 2,59
	Ponto 3	15000	19	3,8 ± 1,92*
	Ponto 4	15000	09	1,8 ± 2,05
	Ponto 5	15000	12	2,4 ± 1,14
	Ponto 6	15000	15	3,0 ± 2,34
<b>Março 2008</b>	Controle	15000	01	0,2 ± 0,44
	Ponto 1	15000	03	0,6 ± 0,54
	Ponto 2	15000	04	0,8 ± 0,83
	Ponto 3	15000	07	1,4 ± 0,89
	Ponto 4	15000	05	1,0 ± 0,70
	Ponto 5	15000	02	0,4 ± 0,54
	Ponto 6	15000	04	0,8 ± 0,83

**Tabela 4:** Incidências de alterações nucleares (médias e desvio-padrão) encontradas em eritrócitos de *O. niloticus*, após 72 horas de exposição em diferentes amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto/SP.

Alterações	CN	PI	P2	P3	P4	P5	P6
<b>Março 2007</b>							
BN	0,4 ± 2,6	0,6 ± 0,54	0,4 ± 0,54	0,8 ± 0,83	0,6 ± 0,89	0,2 ± 0,44	1,4 ± 1,67
LB	2,6 ± 0,54	8,6 ± 5,31	8,6 ± 3,64	11,2 ± 3,56	9 ± 3,53	8,2 ± 4,20	10,4 ± 3,43
NT	2,6 ± 1,34	7,6 ± 3,04	11,6 ± 3,43*	11,4 ± 5,72	9,4 ± 5,02	10,6 ± 5,59	13 ± 5,83*
BL	0,4 ± 0,54	1,8 ± 0,44	2 ± 1,22	3 ± 1,58	4,2 ± 1,92*	2,2 ± 0,83	1,2 ± 0,83
BE	0,0 ± 0,00	0,8 ± 0,83	0,4 ± 0,54	0,8 ± 0,83	1,4 ± 0,54	0,4 ± 0,54	0,4 ± 0,54
CA	0,2 ± 0,44	0,8 ± 0,83	0,8 ± 0,83	0,8 ± 0,83	0,4 ± 0,54	0,6 ± 0,54	1 ± 1,22
MT	6,2 ± 1,48	20,2 ± 7,42	23,8 ± 6,26	28 ± 5,43*	25 ± 6,44	22,2 ± 8,31	27,4 ± 6,87*
TA	31	101	119	140	125	111	137
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>Agosto 2007</b>							
BN	0,4 ± 0,54	0,8 ± 0,83	1,2 ± 0,83	3,0 ± 1,87	0,8 ± 0,83	1,2 ± 1,30	1,4 ± 0,89
LB	3,0 ± 1,58	9,6 ± 2,40	11,4 ± 2,70	10,8 ± 2,38	12,2 ± 3,63*	10,8 ± 5,93	12,6 ± 3,57*
NT	5,0 ± 2,54	9,8 ± 1,92	10,8 ± 2,16	12,6 ± 2,78*	9,2 ± 3,89	9,2 ± 1,92	11,6 ± 4,82
BL	0,4 ± 0,54	4,0 ± 2,12	4,6 ± 3,20	5,4 ± 2,07*	4,6 ± 2,07	2,2 ± 0,83	5,0 ± 3,16
BE	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,89	1,2 ± 0,83	2,2 ± 1,09*	1,8 ± 0,83	0,6 ± 0,89	1,8 ± 0,83
CA	0,2 ± 0,44	2,0 ± 0,1	1,4 ± 1,67	2,8 ± 1,69	1,4 ± 0,54	1,0 ± 1,22	1,0 ± 0,70
MT	9 ± 3,31	27,8 ± 5,54	30,6 ± 2,19	36,8 ± 6,76*	30,0 ± 6,44	25,0 ± 5,78	33,4 ± 9,98*
TA	45	139	153	184	150	125	167
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>Março 2008</b>							
BN	0,4 ± 0,54	0,6 ± 0,89	0,6 ± 0,89	1,4 ± 0,54	0,8 ± 0,83	1,6 ± 0,89	1,2 ± 1,64
LB	5,2 ± 1,78	11,2 ± 2,38	12,4 ± 3,97	13,6 ± 5,17*	9,4 ± 2,07	7,8 ± 3,96	12,4 ± 2,79
NT	4,0 ± 1,22	8,6 ± 4,03	9,6 ± 5,17	11,4 ± 5,12	11,4 ± 3,84*	10,6 ± 5,59	10,8 ± 5,54
BL	0,4 ± 0,54	1,4 ± 0,54	2,2 ± 0,83	3,2 ± 0,83*	4,2 ± 1,92*	2,4 ± 1,14	1,8 ± 1,64
BE	0,0 ± 0,00	0,8 ± 0,44	0,6 ± 0,54	0,6 ± 0,54	1,4 ± 0,54*	0,6 ± 0,54	0,4 ± 0,54
CA	0,2 ± 0,44	1,2 ± 1,09	0,6 ± 0,54	0,8 ± 0,44	0,4 ± 0,54	1,0 ± 0,70	1,4 ± 1,14
MT	10,2 ± 2,94	23,8 ± 6,53	26,0 ± 9,05	31,0 ± 7,51*	27,6 ± 4,66*	24,0 ± 7,71	28,0 ± 8,18
TA	51	119	130	155	138	120	140
NCA	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000

BN: binucleada; LB: núcleo lobed; NT: núcleo notched; BL: núcleo blebbed; BE: broken-eggs; CA: cariólise; MT: média total; TA: total de células analisadas com alteração; NCA: número total de células analisadas. \* p < 0,05, pelo teste Kruskal-Wallis.



\* valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis.

**Figura 5:** Médias e desvio padrão de nucleóides com danos, para cada classe considerada, encontrada em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição em diferentes amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, nos meses de (A) março de 2007, (B) agosto de 2007 e (C) março de 2008.



**Tabela 5:** Variações nucleares, após aplicação do ensaio do cometa, em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a amostras de águas coletadas em março de 2007-2008 e agosto de 2007 ao longo do rio Preto.

Coletas	Tratamentos	Total de células com cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
<b>Março/2007</b>	CN	23,4±4,98	76,6±4,97	13,4±5,07	9±2,34	1±0,70	34,2±5,89
	P1	54,8±7,15	47,6±7,40	31,6±2,88*	15,2±8,29	5,6±1,14	78,8±15,77
	P2	60,6±2,61*	47,4±2,96	21,6±2,30	20±7,17	9,6±2,07*	90,4±8,08
	P3	55,8±11,81	44,2±11,81	27,2±6,90	18,8±8,58	9,8±3,11*	94,2±23,14*
	P4	55,4±4,23	44,6±9,23	26,2±5,80	22,4±8,90	6,8±2,77	91,4±18,18
	P5	53,4±8,20	46,6±8,20	23,4±6,89	24,2±10,68	5,8±3,27	89,2±21,87
	P6	60,8±13,46*	39,2±13,46*	30±7,90	24,8±8,19	6±3,53	97,6±24,08*
<b>Agosto/2007</b>	CN	20,8±6,97	79,2±6,97	16±4,41	3,4±3,78	1,4±0,89	27±10,31
	P1	53,2±9,52	46,8±9,52	29,2±2,58	15,2±5,35	8,8±4,65	85±23,27
	P2	54,4±7,30	45,6±7,30	27,4±6,58	17,2±7,98	9,8±2,38	89,4±12,40
	P3	63±8,12*	37,8±8,12*	25,8±10,59	25,8±8,78*	11,4±2,96*	115,6±15,32*
	P4	61,4±15,53	38,6±15,53	27,6±11,23	20,8±6,68	13±3,46*	109±24,47*
	P5	55,2±9,03	44,8±9,03	27,75±12,57	18,8±8,78	7,6±2,07	89,2±15,02
	P6	64±3,80*	36±3,80*	27,6±7,82	25,2±8,34*	11,2±2,77*	111,4±10,03*
<b>Março/2008</b>	CN	26,4±6,06	73,6±6,06	19,6±3,84	6±4,18	0,8±1,30	34±10,22
	P1	50,6±11,03	49,4±11,03	28,2±5,31	14,8±9,73	7,6±1,14	80,6±19,19
	P2	59,4±9,98	40,6±9,98	28,8±5,11	22,6±8,29	8±1,58	98,6±17,08*
	P3	69,4±8,17*	30,6±8,17*	32±7,34	27,8±8,01*	9,6±3,20*	109,2±30,37*
	P4	56,2±9,73	43,8±9,73	33,8±9,09*	15,6±5,85	6,8±3,03	83±18,20
	P5	46,2±15,07	53,8±15,06	26,2±8,89	12,8±6,97	7,2±1,92	73,4±24,46
	P6	61,6±9,15*	38,4±9,15*	26±4,06	27,8±10,87*	7,8±1,48	103±16,53*

\* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ .

**BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO DO RIO PRETO/SP, USANDO  
CARACTERÍSTICAS NUCLEOLARES DE *ALLIUM CEPA***

Lucilene Regina Maschio<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>, Maria Tercília Vilela de Azeredo-  
Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências,  
Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista Departamento de Biologia, Instituto de Biociências (IB-  
UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.

## Resumo

O nucléolo é um componente celular que reflete o estado de atividade da célula. Nessa organela genes de DNA ribossomal (DNAr) são transcritos em RNA ribossomal (RNAr) que mais tarde são processados e empacotados em subunidades ribossomais. No presente estudo as características nucleolares (número de nucléolo por célula, a área de um único nucléolo e a quantidade de células apresentando pareamento heteromórfico de nucléolo - PNhet) foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade dos poluentes derivados de despejos realizados ao longo do rio Preto/SP-Brasil. Para a realização do estudo, amostras de água foram coletadas nos meses de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e agosto de 2006 e 2007 (estação seca) em seis pontos distintos, como seguem: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1 km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local de despejo do esgoto; Ponto 4 (P4), margem oposta do despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1km após represamento. Sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação em águas coletadas nos pontos acima mencionados, em água pura (controle negativo) e em uma substância reconhecidamente mutagênica (Trifluralina - controle positivo). A análise das células dos meristemas radiculares de *A. cepa*, expostas às amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, mostraram mudanças significantes das características nucleolares, quando comparadas com o controle negativo, como o aumento e o decréscimo da área nucleolar, diminuição do número de células contendo um único nucléolo e o aumento do número de células contendo três, quatro, cinco e seis nucléolos. Nossos resultados confirmam que o uso de características nucleolares, usando células de *A. cepa* como organismo teste, pode caracterizar um eficiente biomarcador de citotoxicidade, sendo uma valiosa ferramenta para ensaios de biomonitoramento de águas contaminadas com químicos ambientais.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; citotoxicidade, número de nucléolo; nucléolo heteromórfico, qualidade de água.

## 1. Introdução

A poluição dos recursos hídricos é um problema sério e atual. Dentre os problemas mais graves que afetam a qualidade da água de rios e lagos encontram-se os esgotos domésticos tratados de forma inadequada; o controle inadequado de efluentes industriais e as atividades agrícolas, que constituem, indiscutivelmente, as maiores fontes antropogênicas de emissão de compostos químicos sobre os corpos d'água (VEGA et al., 1996; CLAXTON et al., 1998; MORAES; JORDÃO, 2002).

Muitos desses efluentes constituem misturas complexas, com características tóxicas, tais como os agrotóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais pesados e uma enorme gama de substâncias que, conjuntamente, podem agravar ainda mais as condições ambientais e, conseqüentemente, todo o ecossistema (VEGA et al., 1996).

O risco que os metais pesados conferem ao ambiente e à saúde humana tem estimulado, há vários anos, investigações que possam contribuir para uma melhor compreensão dos reais efeitos que estes químicos possam promover sobre os organismos. Muitos estudos sobre a avaliação da potencialidade de indução de danos no material genético, como os obtidos por meio de testes citogenéticos, tem sido desenvolvidos (BAUCHINGER et al., 1976; LERDA, 1992; GABARA et al. 1995; DOVGALYUK et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006), o que levaram ao conhecimento de que estes compostos podem ser potencialmente mutagênicos e estão seriamente envolvidos com a poluição ambiental. Alguns metais pesados induzem, comprovadamente, a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos, eventualmente, expostos (SUNDERMAN, 1984; FRIBERG et al., 1985; WISE et al., 2004). As contaminações por metais pesados mais observadas no ambiente são aquelas causadas pelo alumínio, arsênico, bário, cádmio, chumbo, níquel, mercúrio e cromo (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005).

O nucléolo é o componente celular que reflete o estado de atividade da célula (FISCHER et al., 1991; GERRERO et al., 1989; HERNANDEZ-VERDUM, 1991; RISUEÑO; MEDINA, 1986). Nessa organela, genes de DNA ribossomal são transcritos em RNA ribossomal, sendo mais tarde processados e empacotados em subunidades ribossomais (MARTINI; FLAVELL, 1985; RISUEÑO; MEDINA, 1986). O tamanho do nucléolo, freqüentemente, indica sua atividade total, mas também pode refletir o grau de coordenação de todos os processos que afetam o acúmulo das subunidades ribossomais no nucléolo (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985; KARPOVA et al., 2006).

Na espécie *A. cepa*, dois ou raramente três nucléolos são formados durante a telófase, sendo que na intérfase eles podem permanecer distintos ou se fundirem, formando um único nucléolo (CHOUINARD; LEBLOND, 1967; PANZERA et al., 1996).

Diversos fatores, usando várias técnicas, têm demonstrado que as características morfológicas nucleolares são importantes indicadoras de processos genéticos e moleculares e são utilizadas como marcadores do metabolismo celular (ROMANENKO et al., 1992). O teste nucleolar têm se mostrado mais sensível a diferentes efeitos negativos causados nas células, quando comparado com outros testes citogenéticos (ARKHIPCHUCK et al, 1992; BUTORINA; KALAEV, 2000). Mudanças das características nucleolares em células de plantas, incluindo *Allium cepa* e animais, têm sido utilizadas na avaliação da toxicidade de metais pesados (ARKHIPCHUK, 1995; ARKHIPCHUK et al., 2000).

Características nucleolares foram utilizadas, com sucesso, na detecção de danos causados a células de peixes expostas a radiação e na avaliação da citotoxicidade de substâncias orgânicas e inorgânicas sob células de plantas e invertebrados (GABARA et al., 1995; ARKHIPCHUK, 1995; ARKHIPCHUK et al., 2000; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2002; ÇAVAS; ERGENE 2003; KARPOVA et al., 2006).

No presente estudo as características nucleolares (número de nucléolo por célula, a área de nucléolos únicos e a quantidade de células apresentando pareamento heteromórfico de nucléolo - PNhet) foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade dos poluentes derivados de despejos realizados ao longo do rio Preto/SP-Brasil.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Caracterização da área de estudo e locais de coleta das amostras de água**

A área escolhida no presente estudo foi o rio Preto (20° 55' 59" S/ 49° 18' 59" W), localizado no interior do estado de São Paulo-Brasil. Em São José do Rio Preto/SP- Brasil, no trecho urbano, o rio apresenta uma área represada, formando a represa municipal responsável pelo abastecimento de água da população. A área total do represamento é aproximadamente 5Km<sup>2</sup> (com 4 Km de comprimento), com profundidade máxima de 2,5m. O rio Preto vem, há vários anos, sofrendo com a poluição dada pelos emissários de esgotos não tratados, pelo despejo clandestino de lixos e pelo assoreamento decorrente, principalmente, da ausência da mata ciliar. Alguns acidentes foram registrados neste rio e, em um deles, houve o registro de uma grande mortalidade de peixes na altura da zona urbana de São José do Rio Preto, que pode ter sido ocasionada por lançamentos irregularmente de efluentes industriais (CETESB, São José do Rio Preto/SP, 03/2004).

Amostras de água foram coletadas nos meses de março de 2007 e 2008 (estação chuvosa) e agosto de 2006 e 2007 (estação seca), em seis pontos distintos, como segue: Ponto 1 (P1), 8 km antes do represamento; Ponto 2 (P2), 1km antes do represamento; Ponto 3 (P3), local de despejo do esgoto; Ponto 4 (P4), margem oposta do despejo do esgoto; Ponto 5 (P5), saída do represamento; Ponto 6 (P6), 1 km após represamento (Figura 1).

Galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram utilizados, para a coleta das amostras de águas aos ensaios de *Allium cepa*. Para as amostras de águas destinadas às análises de elementos químicos, frascos estéreis de vidro de 2L foram utilizados para coleta. O procedimento das coletas das amostras de águas foi realizado segundo a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987), como segue:

(1) Primeiramente, os galões foram submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado;

(2) Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume;

(3) Após coleta, as amostras foram levadas imediatamente ao laboratório para início dos experimentos.

Temperaturas médias, máximas e mínimas e índices pluviométricos foram obtidos, para todos os meses de coleta, junto ao Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI), da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (Tabela 1).

## **2.2. Material biológico**

O material biológico utilizado como organismo teste neste estudo constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ( $2n = 2X = 16$  cromossomos) de uma única variedade (Baia Periforme) e de um mesmo lote, para evitar diferentes respostas durante o andamento dos bioensaios.

## **2.3. Bioensaio**

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em águas coletadas nos pontos de coleta acima mencionados, em água pura (controle negativo - CN) e em uma substância reconhecidamente mutagênica (Trifluralina, 0,0019ppm - controle positivo - CP), em placas de Petri, contendo aproximadamente 100 sementes cada e sempre a temperatura ambiente.

Após a germinação, quando as raízes de *A. cepa* atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, aproximadamente cinco dias após o início do experimento, elas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 ácido acético – v:v), por um período de 24 horas. Posteriormente, para análise das características nucleolares (número de nucléolo por célula, a área de um único nucléolo e a quantidade de células apresentando um par de nucléolo heteromórfico PNhet), as radículas fixadas foram submetidas à técnica de impregnação por íons prata – AgNOR (Howell; Black, 1980, com modificações), que compreende duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e, posteriormente, submetidas a impregnação por íons prata. As pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a fixação das células, foi adicionada uma gota de ácido acético 45%. O material foi recoberto por lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina. Essa pressão foi bem suave, para que não houvesse comprometimento das análises.

O número de nucléolos foi contabilizado em 1000-1300 células interfásicas de cada tratamento em microscópio de luz com aumento de 1000x. A área de um nucléolo único foi medida em 200 células de cada tratamento, sob microscopia de luz, com aumento de 1000x, utilizando o sistema IMAGE J- *Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.4 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para as células portadoras de um número par de nucléolos, foi realizada uma análise adicional, classificando os nucléolos em homomórficos (quando os nucléolos apresentaram tamanho aproximadamente iguais) e heteromórficos – PNhet (quando exibiram tamanhos diferente entre si). Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **3. Análises químicas**

Foram realizadas análises químicas de todas as amostras de água coletadas ao longo do rio Preto. Para esta análise foram quantificados os elementos: nitrato, nitrito, amônia, sulfatos, cloreto, chumbo, alumínio, manganês, ferro total, cobre, zinco, cromo e cádmio.

#### 4. Resultados

Os resultados das análises químicas das amostras de águas derivadas das coletas realizadas nos anos de 2006, 2007 e 2008 estão dispostos na Tabela 2. Foram detectados valores que se encontram acima dos limites recomendados pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para os elementos químicos Cd, Pb, Al, Fe, NH<sub>3</sub>, Mn, Cu e Zn.

Os resultados do número de nucléolos por células meristemáticas de *A. cepa*, expostas a diferentes amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4.

Em agosto de 2006, células expostas à amostra de água do P3 apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de núcleos contendo quatro nucléolos, quando comparada com o CN. Esse aumento foi significativo também para o CP e P4. A amostra de água do P4 também apresentou valores estatisticamente significativos para células contendo dois nucléolos e PNhet. Outro ponto de coleta que apresentou valores significativos ( $p < 0,05$ ) para células contendo PNhet foi o P5. O CP apresentou uma frequência, estatisticamente, significativa de células com cinco nucléolos, quando os resultados foram comparados com o teste controle negativo.

Para a amostra de água coletada no P3, em março de 2007, e para o teste CP foi observada uma diminuição, estatisticamente, significativa do número de células com um e dois nucléolos, em relação ao CN. Por outro lado a amostra de água do P6 causou um aumento significativo do número de células com dois nucléolos. As amostras de águas do P1 e CP causaram um aumento estatisticamente significativo de células contendo quatro nucléolos, quando comparadas com o CN.

Para agosto de 2007, o número de células com um nucléolo foi menor, em relação ao CN, para todos os ensaios realizados, porém, com dados estatisticamente significativos somente para o P3 e CP. Ensaios realizados com amostras de águas dos P2, P3 e P6, mostraram uma incidência significativamente menor de células com dois nucléolos. As águas dos P2, P5, P3 e o CP induziram a um aumento significativo no número de células com PNhet e com três nucléolos. Todas as amostras de águas causaram aumento no número de células com quatro nucléolos, porém esses valores apresentaram-se estatisticamente significantes somente para as amostras dos P3, P6 e CP. A frequência de células com cinco nucléolos só foi, estatisticamente, significativa para os ensaios realizados com o CP.

Em março de 2008, as amostras de águas do P3 e do CP causaram uma diminuição de células contendo um nucléolo, dados estes significativos em relação ao CN. Em contrapartida, na amostra do P6 foi observado um aumento significativo de células contendo três nucléolos, quando comparada com o CN.



Os resultados das avaliações referentes às áreas de nucléolos únicos das células meristemáticas de *A. cepa*, expostas as diferentes amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto estão expostos na Figura 5.

Em agosto de 2006, as células expostas às águas coletadas nos P3 e P6 e ao CP apresentaram um aumento estatisticamente significativo da área nucleolar (nucléolo único), quando comparadas com o CN. Nas células expostas às águas dos P3 e P4 também foi verificado um aumento da área nucleolar em relação ao P1. Nas células expostas às amostras do P5 foi observada uma diminuição significativa da área nucleolar em relação às amostras do P3. Na amostra coletada em P6 foi constatado um aumento, estatisticamente, significativo da área nucleolar em relação ao P2 e P5.

Em março de 2007, um aumento significativo da área nucleolar foi observado em células expostas à amostra do P3 e ao CP, quando comparados com o CN. Para as amostras coletadas em P3, P4 e P6, foi verificado um aumento significativo da área de um único nucléolo, em relação à amostra do P1. Um aumento da área nucleolar também foi constatado nas células meristemáticas expostas à amostra do P3, quando comparado com o P2.

No período de agosto de 2007, células expostas às águas do P3, P6 e ao CP sofreram uma diminuição (P3) e um aumento (P6 e CP) significativos, da área nucleolar em relação ao CN. Nas células expostas à amostra do P3, também foi verificada uma diminuição, significativa, da área nucleolar, quando comparada com as células da amostra do P1. Por outro lado, amostras do P4 e P5 causaram um aumento significativo no tamanho do nucléolo, em relação ao P3. Amostra do P6 causou um aumento, estatisticamente, significativo da área nucleolar, em relação ao P1, P2, P3, P4 e P5.

Em março de 2008, apenas células expostas ao CP apresentaram um aumento significativo em relação ao CN. Já nas células das amostras do P3, P4 e P6 houve um aumento da área nucleolar, quando comparado com as células da amostra do P2.

## **5. Discussão**

Em nosso estudo os metais pesados: cobre (Cu) cádmio (Cd), ferro (Fe) e chumbo (Pb) foram encontrados em quase todos os pontos e períodos estudados, porém suas concentrações diferiram entre as estações e de uma amostra de água para outra (Tabela 2). O Fe e o Cu foram encontrados em todas as amostras de águas coletadas para todos os períodos do estudo, sempre em concentrações bem superiores às permitidas pela legislação CONAMA, 2005.

Em duas das coletas realizadas (agosto de 2007 e março de 2008), foi possível observar que o Manganês apresentou uma concentração superior à considerada normal para este metal. Em agosto de 2007, o Mn só não foi encontrado nas amostras dos P2 e P4 e, em março de 2008, só não esteve presente nas análises do ponto P4. Contudo, os índices aumentados deste metal não foram suficientes para explicar a indução dos efeitos citotóxicos observados nos ensaios realizados, pois, mesmo nos pontos e períodos onde não foram quantificados níveis de Mn acima do padrão estabelecido pela legislação, houve registros de alterações nucleolares, parâmetros indicativos da citotoxicidade da água do rio Preto.

As análises químicas detectaram que o Pb apresentou diferença de concentração entre as estações verão e inverno, para quase todos os pontos de coleta, apresentando valores maiores no inverno do que no verão. O aumento desses valores na estação seca pode ser explicado pela perda do volume de água, comumente observado na maioria dos reservatórios de água doce, durante os períodos de estiagem. Em contrapartida, na coleta de verão de 2008 foram observados valores bem maiores que os encontrados nas coletas anteriores, podendo sugerir um aumento do lançamento de efluentes com este metal.

Regiões organizadoras nucleolares (RONs) são segmentos dos cromossomos, nos quais os genes ribossomais estão localizados e que correspondem às constrições secundárias. Durante a intérfase, as RONs estão localizadas nos centros fibrilares e estão intimamente associadas ao componente fibrilar denso do nucléolo. Estas estruturas contêm todos os componentes necessários para a síntese de rRNA e, portanto, genes para a transcrição de RNAr 18S, 5,8S e 28S, independente do local onde se encontram nos cromossomos (SUMNER, 1990; HERNANDEZ-VERDUN, 2006a; HERNANDEZ-VERDUN, 2006b).

O conjunto de características das regiões organizadoras nucleolares reflete diferentes mecanismos de regulação do nucléolo. Por exemplo, o número de nucléolo por célula corresponde ao número de sítios de síntese de RNA ribossomal ativo, ou seja, o número de regiões organizadoras nucleolares (RONs) ativas no núcleo em intérfase (SHERUDILO; SEMESHIN, 1969; LAZREVA, 1999; LEEK et al., 1991; RUSCHOFF et al., 1995); o tamanho de um único nucléolo reflete a atividade transcricional dos sítios de DNA ribossômico (LAFARGA et al., 1985; MELLINK et al., 1994; DZIDZIGURI et al., 1994) e a porcentagem de células com PNhet caracteriza o mecanismo específico de regulação das regiões organizadoras nucleolares pares no núcleo em intérfase (ARKHIPCHUCK; PALAMARCHUK, 1996; ARKHIPCHUCK; GARANKO, 2005).

Em células de *A. cepa*, dois ou raramente três nucléolos são formados durante a telófase, sendo que na intérfase podem permanecer distintos ou se fundirem formando um único nucléolo

(CHOUINARD; LABLOND, 1967; PANZERA et al., 1996). Nessa espécie, cinco RONS estão presentes nos cromossomos, sendo uma no telômero do braço longo do cromossomo 8, no qual não existe constrição secundária, e as outras quatro localizadas nos cromossomos satélites do cromossomo 6 (PANZERA, 1996).

Para Rawlins e Shaw (1990), a presença de células multinucleoladas pode estar associada a dois fatores: 1. que pode estar relacionado com um estágio intermediário entre telófase (células contendo mini nucléolos) e intérfase (células com um único nucléolo grande); 2. que pode não ter ocorrido a fusão completa do material nucleolar nessas células, devido a ação de substâncias estranhas ao organismo. Segundo Arkhipchuck (1998) a formação de um único nucléolo é mediada, principalmente, pela fusão de duas regiões organizadoras funcionais. A fusão do nucléolo no núcleo em intérfase é fortemente correlacionada com a atividade metabólica das células (POPP; WACHTLER, 1983; WACHTLER et al., 1984).

No presente trabalho foi observado uma diminuição no número de células portadoras de um único nucléolo e um aumento de células com dois, três, quatro, cinco e seis nucléolos, principalmente, para todas as coletas realizadas no período de inverno (estação seca), no controle positivo, diferentemente do controle negativo, que apresentou um grande número de células portadoras de nucléolos únicos e nenhuma célula apresentando quatro, cinco e seis nucléolos. Esse fato pode ter ocorrido devido à presença de metais pesados nas amostras de águas, em concentrações superiores às consideradas normais pela legislação. Esses metais podem ter ocasionado um aumento descontrolado do número de centros ativos de síntese de RNA ribossomal, causando um aumento do número de nucléolos, por não permitir a fusão do material nucleolar nessas células. Uma fusão normal foi observada para as células do CN, que apresentaram um maior número de células portadoras de nucléolos únicos, em relação aos ensaios com as amostras de águas contaminadas com metais pesados.

Podemos sugerir que esse aumento no número de nucléolos, observado para a estação de inverno, possa estar relacionado com as características da própria estação (seca), onde pode ter ocorrido uma perda do volume de água, comum na maioria dos reservatórios de água do estado de São Paulo, durante os períodos de estiagem, proporcionando uma menor diluição dos metais e de outros poluentes presentes neste recurso hídrico estudado.

Karpova et al. (2006) estudando células de *Bétula pendula*, que cresceram expostas a poluição da cidade de Voronezh, observaram um aumento no número de células com três nucléolos. Aumento no número de nucléolo por célula também foi observado em coníferas que cresceram sob

condições de estresse (KHAIDAROVA; KALASHNIK et al, 1999). Os mesmos autores acreditam que este fenômeno seja uma característica adaptativa das coníferas sob condições de estresse.

Células da nadadeira caudal de *Cyprinus carpio* L., expostas aos metais pesados cádmio e cobre, apresentaram um aumento do número de nucléolos (ARKHIPCHUCK; GARANKO, 2005). Uma alta porcentagem de células meristemáticas de *Pisum sativum*, contendo três nucléolos, foi observada por Gabara et al. (1995), após tratamento com chumbo.

Em relação à área nucleolar estudada no presente trabalho, a maioria das amostras de águas testadas induziu a um aumento, estatisticamente, significativo das áreas nucleolares, quando comparadas com o CN, com exceção da amostra do P3 (inverno de 2007), que apresentou uma diminuição significativa das áreas nucleolares se suas células.

O volume nucleolar está ligado à atividade de cada RON (MARTINI; FLAVELL, 1985), como por exemplo, ao número de genes ativos para codificar RNAr (FLAVELL; O'DELL, 1979; MARTINI et al., 1982). Dessa forma, o aumento do tamanho nucleolar pode ser devido à amplificação dos genes ribossomais e/ou a alta atividade transcricional desses genes, como também pode estar relacionado a um problema na liberação dos produtos da transcrição dos genes ribossomais para o núcleo. Ambos os processos podem resultar do impacto de poluentes sobre plantas (CHELIDZE; ZATSEPINA, 1988; SOBOL', 2001). Por outro lado a diminuição na área nucleolar, observada no presente estudo, pode indicar uma possível inibição do funcionamento dos genes ribossomais, devido à presença de poluentes nas águas do recurso hídrico analisado.

Para Gabara et al. (1995), outro fator que pode colaborar para a diminuição da área nucleolar seria a ausência da região satélite no cromossomo (que contém informação para codificar RNA ribossômico), em células expostas a metais pesados como cádmio, chumbo e cromo, uma vez que o tratamento com essas substâncias causam anormalidades mitóticas como quebras, perdas e pontes cromossômicas.

Variações periódicas na síntese de RNAr, acúmulo no nucléolo e transporte para o citoplasma (JENNANE et al., 1987; MORENO et al., 1989; WILLIAMS; JORDAN, 1980), durante o ciclo celular, pode também induzir mudanças no tamanho e na composição dos componentes nucleolares. Portanto, nucléolos grandes estão presentes em células ativas e nucléolos pequenos em células inativas.

As mudanças no volume nucleolar, observadas no presente trabalho, pode ser uma consequência dos danos causados às RONs pelos poluentes presentes nas amostras de águas. Pode ser sugerido que o aumento da área nucleolar nas células de *A. cepa* tenha ocorrido devido à alta atividade transcricional dos genes ribossomais, estimulada pela presença dos poluentes, uma vez

que nucléolos grandes são presentes em células ativas. Por outro lado, duas hipóteses para a diminuição da área nucleolar podem ser indicadas: a) a perda do cromossomo satélite, uma vez que aberrações cromossômicas do tipo perda e quebra foram observadas no presente trabalho, pela técnica de Feulgen; b) promoção de efeitos inibitórios sobre os sítios contendo genes para transcrição do RNAr, como consequência da ação dos metais presentes nas amostras de águas.

Succi et al. (2008), estudando o efeito do chumbo em diferentes concentrações (0,025 mg/L e 0,034 mg/L), sobre células meristemáticas de *A. cepa*, observaram uma diminuição e um aumento, respectivamente, da área nucleolar nessas células. O tamanho de um único nucléolo diminuiu, consideravelmente, em células de *Allium fistulosum*, após 15 minutos de radiação a laser (ARKHIPCHUK, 1995). As células de *A. cepa* expostas ao metal pesado mercúrio também apresentaram uma diminuição da área nucleolar (ARKHIPCHUK; GARANKO 2002). Também, foi verificado que o metal cádmio, em diferentes concentrações, causou aumento da área nucleolar, diminuição de células com um único nucléolo e aumento de células com dois, três, quatro e cinco nucléolos (CORREIA et al., 2008)

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, corroboram vários trabalhos citados da literatura, que indica que as características nucleolares (número, tamanho e área) são extremamente úteis e confiáveis para a avaliação de toxicidade de poluentes ambientais.

## Referências bibliográficas

ARKHIPCHUK, V. V. The use of nucleolar characteristics in biotesting. **Tsitology Genetics**, v. 29, p. 12, 1995.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N.N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v.17, p.187-194, 2002.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 42-52, 2005.

ARKHIPCHUK, V. V.; MALINOVSKAYA, M.V.; GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuate* cells, **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338-334, 2000.

ARKHIPCHUK, V. V.; ROMANENKO, V.D.; ARKHIPCHUK, M. V.; KIPNIS, L.S. A cytogenetic method of determining the effect of threshold values of antropogenic factors on plant and animal genome, **Doklady Akademii Nauk**, v.326, n.5, p.908-910, 1992.

ARKHIPCHUK, V.V. Peculiar changes of nucleolar quantitative characteristics in fish cells. **Cytobios**, v. 94, p. 81-96, 1998.

ARKHIPCHUK, V.V; PALAMARCHUK, J.V. Heteromorphic-paired nucleoli in fish cells. **Cytobios**, v. 88, p. 229-238, 1996.

BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; EINBRODT, H. J.; DRESP, J. Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. **Mutation Research**, v. 40, n.1, p. 57-61, 1976.

BUTORINA, A.K.; KALAEV, V.N. Analysis of sensitive of different criteria in cytogenetic monitoring. **Ecology**, v. 3. p. 206-210, 2000.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nucleolar and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, v. 534, p. 93-99, 2003.

Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI). São José do Rio Preto/SP, 01/12/2008.

CHELIDZE, P.V.; ZATSEPINA, O.V.; Morphofunctional system of nucleoli. **UspeKHi Sovremennoi Biologii**, v. 105, p. 252-268, 1988.

CHOUINARD, L.A.; LEBLOND, C.P. Sites of protein synthesis in nucleoli of root meristematic cells of *Allium cepa* as shown by radioautography with [3H] arginine. **Journal Cell Science**, v. 2, p. 473-70, 1967.

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents.

**Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, p. 237-243, 1998.

(CETESB) Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. Coordenador Edmundo Garcia Agudo (et al.) São Paulo, 1987.

(CETESB) Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, São José do Rio Preto/SP, 03/2004.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

CORREIA, T.F.V.C.C.; MASCHIO, L.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Study of the nucleolar alterations in cells of *Allium cepa* after treatment with cadmium heavy metal. In: **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Biologia Celular**, p. 203-203, 2008.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME Ya. B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, v. 27, n.3, p. 193-195, 2003.

DZIDZIGURI, D.V.; CHELIDZE, P.V.; ZARANDIA, M.A.; CHERKEZIA, E.C.; TUMANISHVILI, G.D. Transcriptional activity and ultrastructure of morphologically different types of nucleoli isolated from hepatocytes of normal and hepatectomized rats. **Epithelial Cell Biology**, v. 3, p. 54-60, 1994.

FISCHER, D.; WEISENBERGER, D., SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma**, v. 101, p. 133-140, 1991.

FLAVEL, R.B.; O'DELL, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. **Chromosoma**, v. 71, p. 135-152, 1979.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. Handbook on the toxicology of metals. Amsterdam, 1985.

GABARA, B.; KRAJEWSKA, M.; STECKA, E. Calcium effect on number, dimension and activity of nucleoli in cortex cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots after treatment with heavy metals. **Plant Science**, v. 111, p. 153-161, 1995.

GUERRERO, F.; DE LA TORRE, C.; GARCIA-HERDUGO, G. Control of nucleolar growth during interphase in higher plant meristem cells. **Protoplasma**, v. 152, p. 96-100, 1989.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolus: from structure to dynamics. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 125, p. 127-137, 2006a.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal Cell Science**, v. 99, p. 465-471, 1991.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, p. 135-148, 2006b.

HOWELL, W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: al-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JENNANE, A.; LANDRÉ, P.; NOUGAREDÈ, A. Nucleolus activation in pea cotyledonary buds during 24 h after decapitation of the main stem: cytochemical studies. **Protoplasma**, v. 136, p. 29-36, 1987.

KAIDAROVA, T.G.; KALASHNIK, N.A. Nucleolar organizers of chromosomes as adaptive elements of conifer species. **Tsitology**, v. 41, n. 12, p. 1086, 1999.



KARPOVA, S.S.; KALAEV, V.N.; ARTYUKHOV, V.G.; TROFIMOVA, V.A.; OSTASHKOVA, L.G.; SAVKO, A.D. The use of nucleolar morphological characteristics of birch seedlings for the assessment of environmental pollution. **Ecology**, v. 33, n. 1, p. 73-80, 2006.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Nucleolar size and the activity of rRNA transport in the course of morphogenetic reduction of cell dimensions. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 135-144, 1985.

LAFARGA, M.; VILLEGAS, J.; CRESPO, D. Changes in nucleolar morphology and volume of the supraoptic nucleus neurons during postnatal development of the rat. **Brain Research**, v. 354, n. 2, p. 310-313, 1985.

LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF C.E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **Journal Pathology**, v. 165, p. 43-51.

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 281, n.2, p.89-92, 1992.

MARTINI, G.; FLAVELL, R.B. The control of nucleolus volume in wheat: a genetic study at three developmental stages. **Heredity**, v. 54, p. 111-120, 1985.

MARTINI, G.; O'DELL, M.; FLAVEL, R.B. Partial inactivation of wheat nucleolus organizers by the nucleolus organizer chromosomes from *Aegilops umbellulata*. **Chromosoma**, v. 84, p. 697-700, 1982.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148–158, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p.77-85, 2005.

MELLINK, C.H.; BOSMA, A.A, DE HAAN, N.A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas**, v. 120, p. 141-149, 1994.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n.3, p. 370-374, 2002.

MORENO, F.J.; RODRIGO, R.M.; GARCIA-NAVARRO, F.; GARCIA-HERDUGO, G. Nucleolar components behaviour in plant cells under different physiological conditions. A morphological, cytochemical and ultrastructural study. **Biology Cell**, v. 65, p. 27-34, 1989.

PANZERA, F.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; CUADRADO, A.; SHAW, P.J.; BEVEN, A.F.; CÁNOVAS, J.L.; DE LA TORRE, C. Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* chromosomes. **Chromosoma**, v. 105, n.1, p. 12-19, 1996.

POPP, W.; WACHTLER, F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes. **Cell Tissue Research**, v. 234, p. 377-388, 1983.

RAWLINS, D.J.; SHAW, P.J. Three-dimensional organization of ribosomal DNA in interphase nuclei of *Pisum sativum* by *in situ* hybridization and optical tomography. **Chromosoma**, v. 99, p. 143-151, 1990.

RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J. The nucleolar structure in plant cells. **Revisiónes Sobre Biología Celular**, v. 7, p. 1-140, 1986.

ROMANENKO, V.D.; ARKHIPCHUK, V. V.; SOLOMATINA, V.D.; MALINOVSKAYA, M.V.; MAKAROVA, T.A. Use of nucleolar morphological characteristics to evaluate metabolic processes in fish body, **Doklady Akademii Nauk**, v. 326, n. 3, p. 562-565, 1992.

RUSCHOFF, J.; ELSASSER, H.P.; ADLER, G. Correlation of nucleolar organizer regions secretory and regenerative process in experimental cerulean-induced pancreatitis in the rat. **Pancreas**, v. 11, p. 154-159, 1995.

SHERUDILO, A.I.; SEMESHIN, V.F. Certain patterns of nucleolar fusion in the interphase nucleus. **Genetika**, v. 5, n. 4, p. 65-72, 1969.

SOBOL', M.A. The role of the nucleolus in plant cell responses to environmental physical factors. **Tsitology Genetics**, v. 35, p. 72-84, 2001.

SUCCI, M.; MASCHIO, L.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. The use of nucleolar morphological characteristics in cells of *Allium cepa* after treatment with cadmium heavy metal. In: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Biologia Celular, p. 203-204, 2008.

SUMNER, A.T. Chromosome Banding, London: Unwin Hyman, 1990.

SUNDERMAN, J. R., F.W. Recent advances in metal carcinogenesis. **Annual Clinic Science**, v. 14, p. 93-122, 1984.

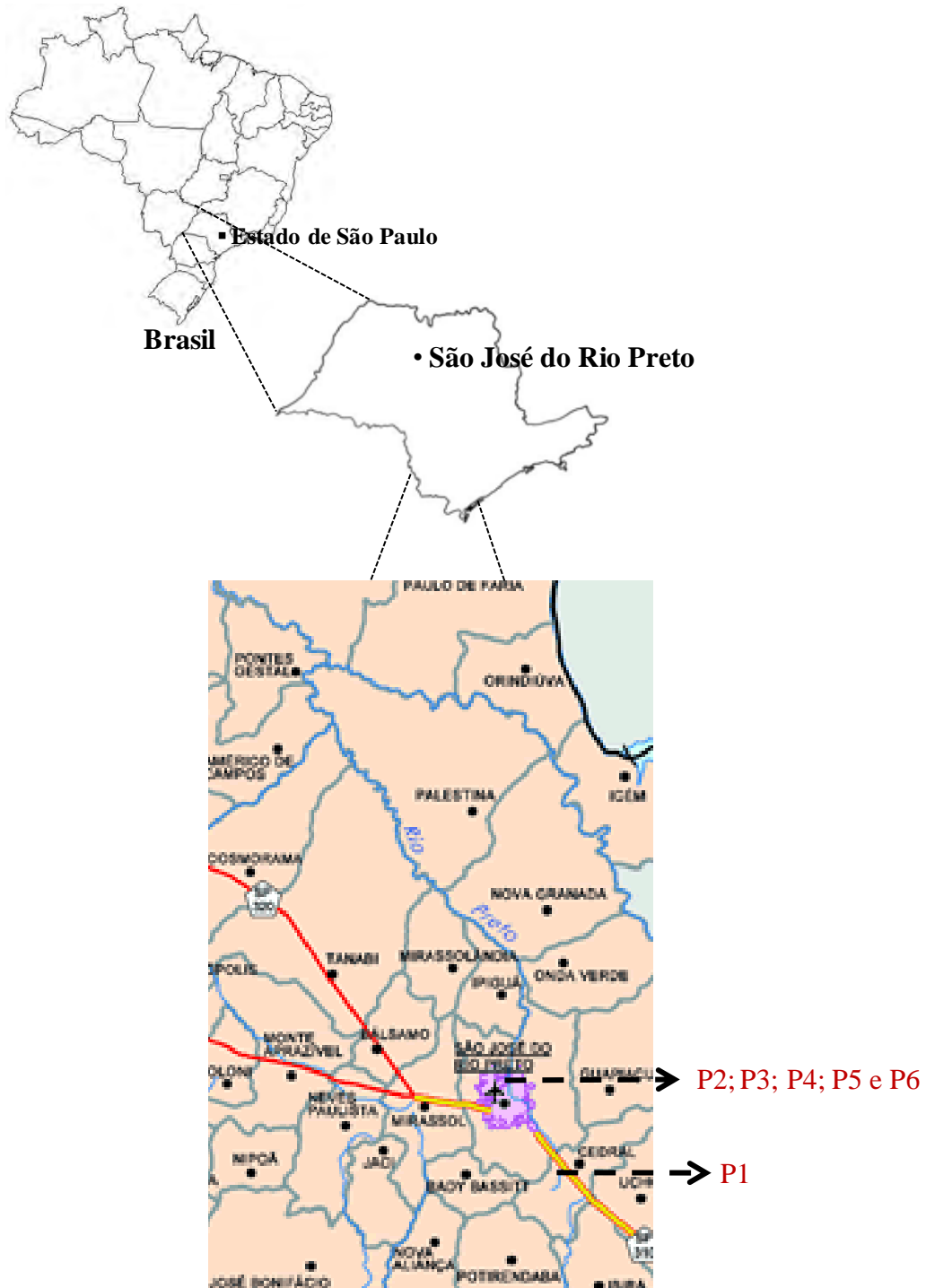
VEGA, M.M.; FERNDEZ, T.B.; TARAIZANO, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, Barking, v.92, n.2, p.135-139, 1996.

WACHTLER, F.; SCHWARZACHER, H.G.; SMETANA, K. On the fusion of nucleoli in interphase. **Journal Cell Biology**, v. 34, p. 190-192, 1984.

WILLIAMS, L.H.; JORDAN, E.E. Nuclear and nucleolar size changes and nuclear pore frequency in cultured explants of Jerusalem artichote tubers. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, p. 1613-1619, 1980.

WISE, S. S.; HOLMES, A. L.; KETTERER, M. E.; HARTSOCK, W. J.; FOMCHENKO, E.; KATSIFIS, S.; THOMPSON, W. D., WISE, J. P. Chromium is the proximate clastogenic species

for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. **Mutation Research**, v. 560, p. 79-89, 2004.



**Figura 1:** Localização da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil (latitude 20° 55' 59" S, longitude 49° 18' 59" W) e dos pontos de coleta ao longo do rio Preto.

**Tabela 1:** Dados meteorológicos da cidade de São José do Rio Preto/SP-Brasil, referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Preto, obtidos junto ao CEPAGRI.

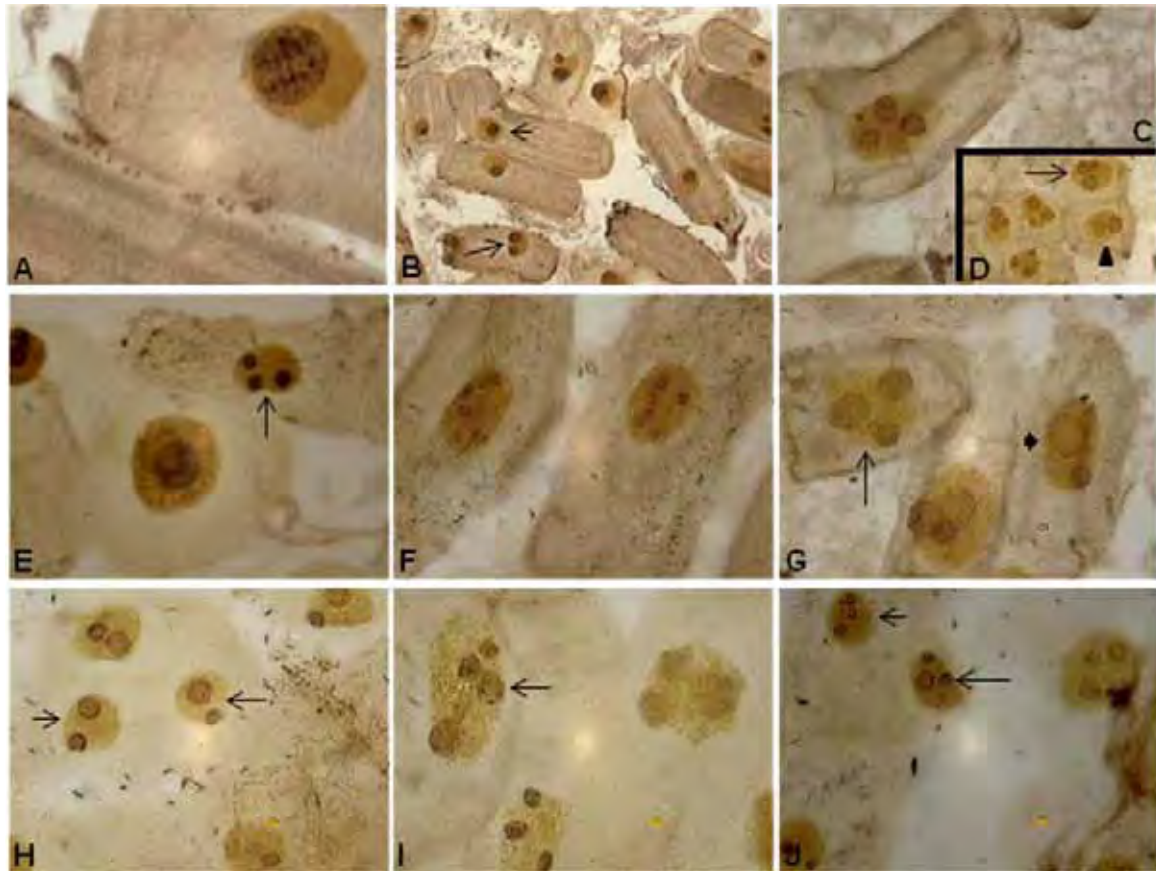
<b>Período de coleta</b>	<b>Média de temperatura máxima (°C)</b>	<b>Média de temperatura mínima (°C)</b>	<b>Índice de chuva (mm)</b>	<b>Nº total de dias chuvosos</b>
<b>Agosto 2006</b>	30.68	16.45	6.2	1
<b>Março 2007</b>	32.61	21.58	111.6	8
<b>Agosto 2007</b>	29.68	16.81	0	0
<b>Março 2008</b>	28.90	22.58	164.8	10

Nota: Os valores da tabela acima foram obtidos a partir das médias diárias

**Tabela2:** Análises químicas das amostras de águas coletadas em diferentes pontos ao longo do rio Preto, São José do Rio Preto/SP.

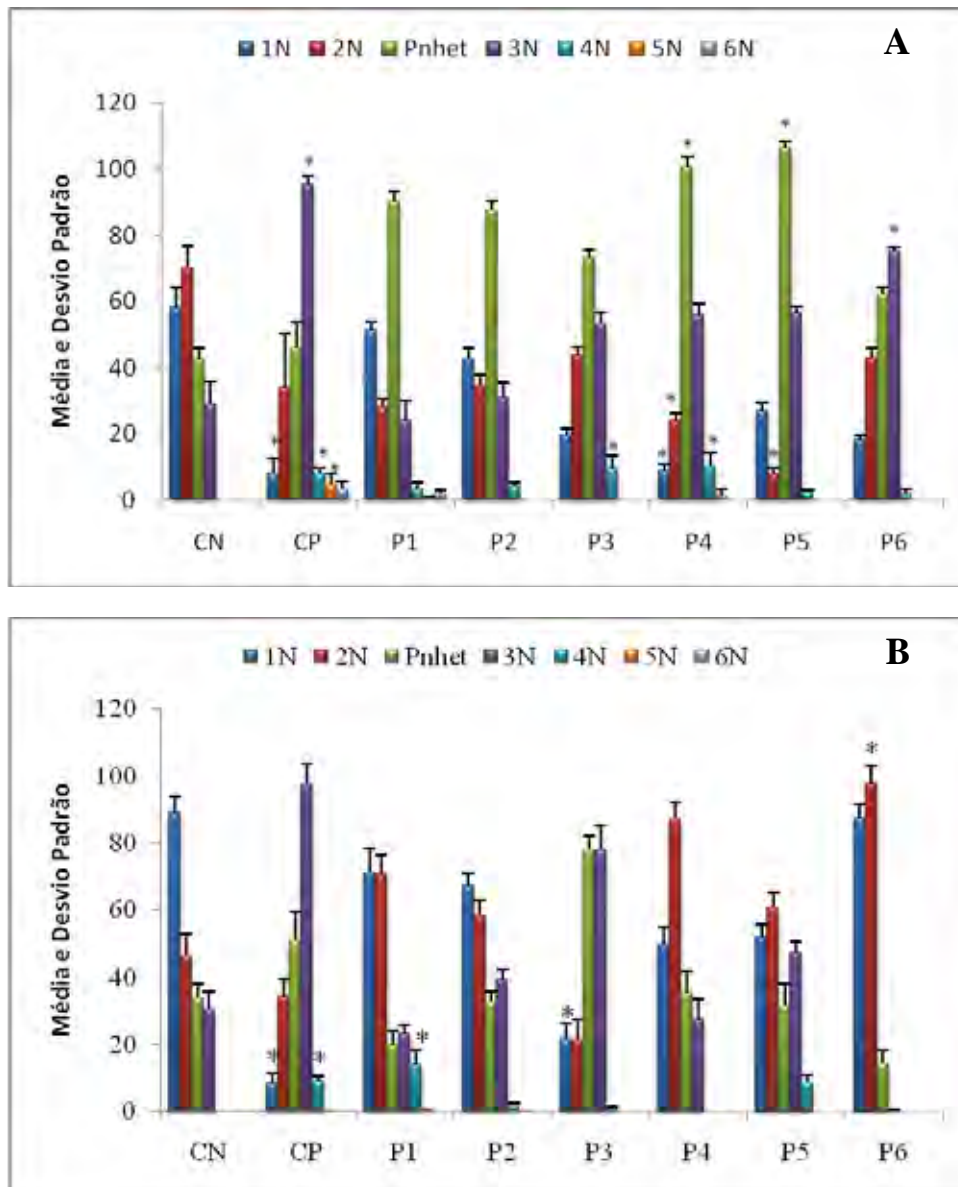
		Elementos químicos (mg/L)												
		Cd	Cloro	Pb	Al	NH3	Fe	Mn	Cr	Cu	Nitrato	Nitrato	Sulfato	Zn
<b>Estações e pontos</b>														
<b>Inverno 2006</b>														
P1		0,002*	3,8	0,019*	0,010	0,20	1,04*	0,063	0,01	0,05*	1,10	0,008	5,0	0,17
P2		0,002*	6,6	0,013*	0,020	0,74	1,69*	0,050	0,01	0,09*	2,20	0,037	7,0	0,16
P3		0,003*	4,8	0,013*	0,136*	0,17	0,67*	0,038	0,01	0,01*	3,00	0,033	16,0	0,16
P4		0,002*	3,0	0,007	0,214*	0,19	0,60*	0,034	0,01	0,02*	2,50	0,013	4,0	0,21*
P5		0,001	3,6	0,010*	0,021	0,19	0,36*	0,039	0,01	0,02*	2,60	0,012	4,0	0,20*
P6		0,001	4,3	0,025*	0,043	0,58	0,48*	0,031	0,01	0,05*	1,80	0,031	3,0	0,09
<b>Verão 2007</b>														
P1		0,002*	10,3	0,010*	0,043	1,05	2,05*	0,077	0,01	0,01*	1,90	0,098	0,0	0,02
P2		0,001	7,9	0,013*	0,065	0,65	2,17*	0,043	0,01	0,01*	2,10	0,053	7,0	0,01
P3		0,001	8,7	0,008	0,024	0,50	1,10*	0,056	0,01	0,02*	1,80	0,047	16,0	0,01
P4		0,002*	4,5	0,008	0,039	0,47	1,28*	0,067	0,01	0,01*	0,80	0,027	4,0	0,01
P5		0,003*	3,7	0,015*	0,043	0,41	0,81*	0,052	0,01	0,03*	0,80	0,032	4,0	0,01
P6		0,017*	5,5	0,011*	0,033	0,94	0,80*	0,039	0,01	0,01*	1,50	0,047	3,0	0,01
<b>Inverno 2007</b>														
P1		0,001	6,8	0,016*	0,030	2,66	2,34*	0,133*	0,01	0,03*	2,20	0,257	1,0	0,01
P2		0,001	4,7	0,010*	0,098	0,67	2,45*	0,093	0,01	0,03*	1,60	0,064	0,0	0,01
P3		0,007*	25,0	0,034*	0,013	3,62	0,42*	0,102*	0,01	0,13*	1,60	0,011	76,0	0,04
P4		0,002*	3,0	0,013*	0,054	0,23	0,95*	0,071	0,01	0,02*	0,80	0,005	0,0	0,01
P5		0,002*	4,1	0,021*	0,102*	0,78	1,08*	0,223*	0,01	0,03*	1,00	0,019	1,0	0,0
P6		0,002*	16,2	0,012*	0,084	3,74*	1,22*	0,216*	0,01	0,06*	1,40	0,032	16,0	0,02
<b>Verão 2008</b>														
P1		0,002*	5,7	0,032*	0,029	1,69	2,30*	0,284*	0,01	0,03*	1,80	0,067	0,0	0,0
P2		0,001	4,3	0,025*	0,042	0,89	2,49*	0,115*	0,01	0,02*	1,60	0,060	0,0	0,01
P3		0,001	9,4	0,030*	>0,250*	0,99	1,75*	0,118*	0,0	0,04*	1,60	0,036	10,0	0,01
P4		0,002*	4,3	0,028*	0,080	0,45	1,25*	0,101*	0,02	0,02*	1,80	0,029	4,0	0,01
P5		0,001	7,1	0,026*	0,173*	0,89	1,74*	0,133*	0,0	0,03*	1,60	0,029	4,0	0,01
P6		0,002*	9,6	0,026*	0,164*	2,00	1,47*	0,114*	0,01	0,08*	1,90	0,058	6,0	0,01
VMP		<b>0,001</b>	<b>250</b>	<b>0,01</b>	<b>0,1</b>	<b>3,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,009</b>	<b>10</b>	<b>1,0</b>	<b>250</b>	<b>0,18</b>

VMP: Valor Máximo Permitido ; \* Valores acima do permitido pelo Conselho nacional do Meio Ambiente (CONAMA) - portaria 357/2005



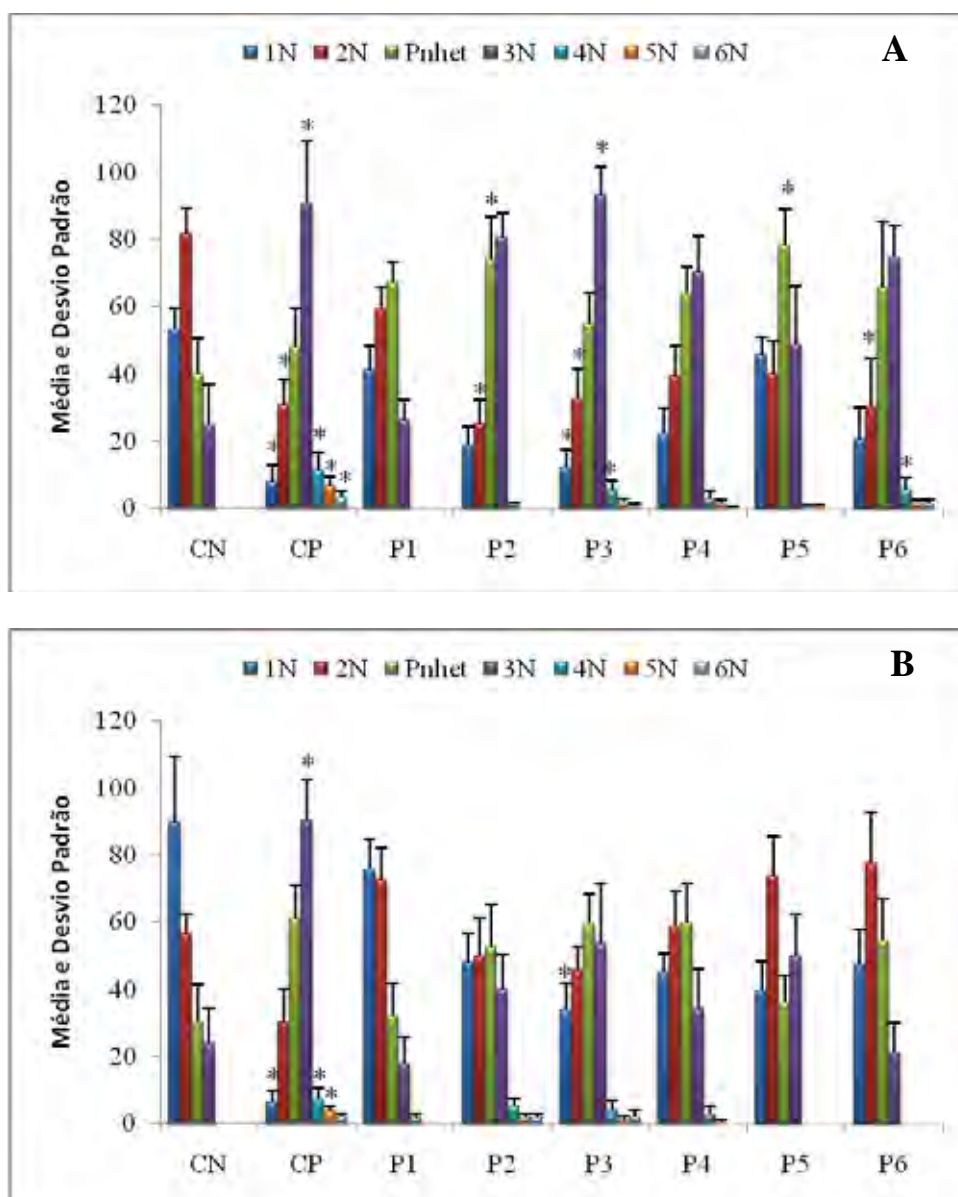
**Figura 2:** Alterações nucleolares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*. A-B. Controle negativo; C-F. Controle positivo; G-J. Amostras de águas (P1-P6). A. Célula com único nucléolo; B. Células com único nucléolo (seta menor) e célula com dois nucléolos (seta maior); C. Célula com três nucléolos; D. Células com dois (cabeça de seta) e três (seta) nucléolos; E. Célula com três nucléolos (seta); F. Células com seis nucléolos; G. Células com três (seta maior) e dois (seta menor) nucléolos; H. Células com nucléolo heteromórfico (seta maior) e nucléolo homomórfico (seta menor); I. Célula com quatro nucléolos (seta); J. Célula com três (seta maior) e quatro (seta menor) nucléolos. Aumentos: B e D: 400X; A, C, E, F, G, H, I, J: 1000X.





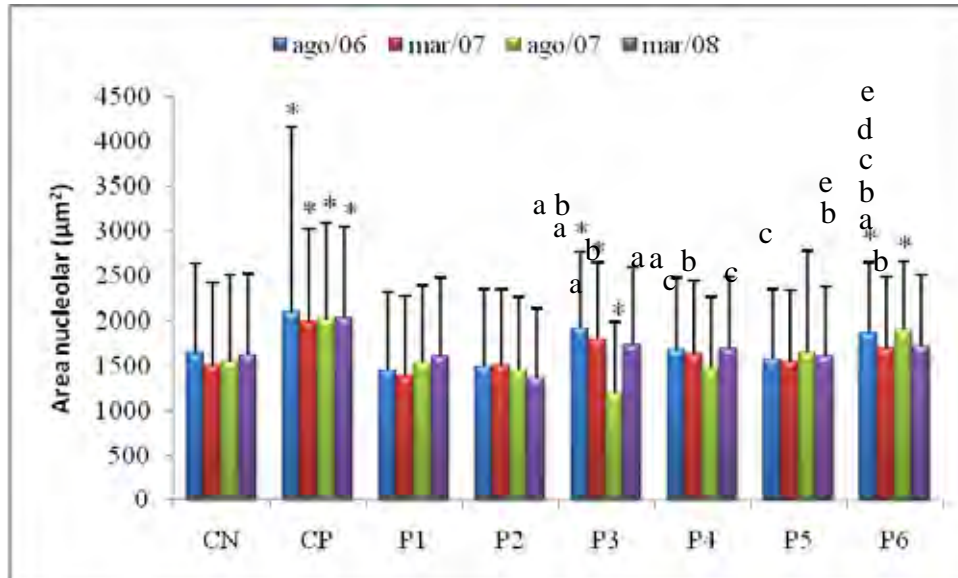
\* significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes do controle negativo pelo método Kruskal Wallis. 1N: 1 nucléolo; 2N: dois nucléolos; Pnhet: nucléolos heteromórficos; 3N: três nucléolos; 4N: quatro nucléolos; 5N: cinco nucléolos e 6N: seis nucléolos.

**Figura 3:** Médias e desvio padrão do número de nucléolos, em células de *A. cepa*, após exposição a diferentes amostras de águas (P1-P6), controle negativo (CN) e controle positivo (CP), nos meses de agosto de 2006 (A) e março de 2007 (B).



\* significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes do controle negativo pelo método Kruskal Wallis. 1N: 1 nucléolo; 2N: dois nucléolos; PNhet: nucléolos heteromórficos; 3N: três nucléolos; 4N: quatro nucléolos; 5N: cinco nucléolos e 6N: seis nucléolos.

**Figura 4:** Médias e desvio padrão do número de nucléolos em células de *A. cepa*, após exposição a diferentes amostras de águas (P1-P6), controle negativo (CN) e controle positivo (CP), nos meses de agosto de 2007 (A) e março de 2008 (B).



\* significativamente diferente do controle negativo; <sup>a</sup> significativamente diferente da amostra de água do ponto 1; <sup>b</sup> significativamente diferente da amostra de água do ponto 2; <sup>c</sup> significativamente diferente da amostra de água do ponto 3; <sup>d</sup> significativamente diferente da amostra de água do ponto 4; <sup>e</sup> significativamente diferente da amostra de água do ponto 5.

**Figura 5:** Médias e desvio padrão da área de um único nucléolo, em células meristemáticas de *A. cepa*, após tratamento com amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto, nos períodos de março de 2007-2008 e agosto de 2006-2007.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Coletas de águas sazonais foram realizadas nos meses de agosto de 2006 e 2007, representando a estação seca, e março de 2007 e 2008, representando a estação chuvosa. Na cidade de São José do Rio Preto/SP as duas estações são bem caracterizadas, como demonstrado pelos dados meteorológicos. Portanto, as coletas foram realizadas nestes períodos, com o objetivo de avaliar a influência da sazonalidade no recurso hídrico em estudo.

A presença de metais foi detectada por meio de análises químicas realizadas. Os metais Cd, Pb, Fe, Cu foram detectados, para todas as coletas realizadas, em concentrações acima das permitidas pela legislação (CONAMA 357/2005). O Al foi encontrado em concentrações acima das permitidas pela legislação nas coletas de agosto de 2006 e de 2007 e março de 2008, enquanto que o Mn foi detectado em agosto de 2007 e março de 2008. De acordo com a literatura, esses metais podem ser encontrados em recursos hídricos, em decorrência da contaminação ambiental dada por despejos domésticos e industriais (CLAXTON et al., 1998; WHITE et al., 1998; MARCANO et al., 2002).

O Pb apresentou diferenças entre as estações de verão e de inverno, para quase todos os pontos de coleta, apresentando valores maiores no inverno que no verão. O aumento desses valores na estação seca pode ser explicado pelo baixo volume de água, comumente observado para a maioria dos reservatórios de água, durante a estiagem. Em contrapartida, na coleta de verão de 2008, foram observados valores superiores aos encontrados para as coletas anteriores, o que sugere uma possível relação com o aumento de emissão de efluentes contaminados com este metal neste período.

Uma vez que o vegetal superior *A. cepa* e o teleósteo *O. niloticus* representam excelentes organismos-teste para o monitoramento de ambientes aquáticos (FISKEJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987; GRANT, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007), esses foram utilizados no presente estudo, para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto. Para estas análises foram realizados os testes de aberrações cromossômicas, de

micronúcleo e de características nucleolares quantitativas, em células de *A. cepa* expostas em amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto. Essas amostras também foram utilizadas para realização dos testes de micronúcleo e de anormalidades nucleares em eritrócitos de *O. niloticus*, para avaliação do potencial mutagênico dessas águas. Também foi aplicado o ensaio do cometa nesses eritrócitos, para avaliação do potencial genotóxico das águas do recurso hídrico em estudo.

No presente estudo o teste de índice mitótico, realizado no sistema-teste de *A. cepa*, não se caracterizou em um bom parâmetro para avaliação de citotoxicidade dos químicos presentes neste recurso hídrico, pois nenhum resultado apresentou diferença, estatisticamente, significativa, quando comparado com o controle negativo.

Também foi possível avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto, pela presença de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*. As aberrações cromossômicas mais observadas em nossos ensaios foram alterações em células em anáfase (ponte, perda, e multipolaridade), em metáfase (C-metáfases), como também a presença de células binucleadas, células com micronúcleos e quebras cromossômicas. Como citado em trabalhos realizados (LEME et al., 2008), aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos de um organismo, que podem ocorrer, tanto espontaneamente como em resultado de exposição a agentes físicos e químicos.

Células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às amostras de águas coletadas nos pontos P3 e P6, exibiram frequências de aberrações cromossômicas maiores que as do controle negativo, com diferenças estatisticamente significativas, para todos os períodos estudados.

Foram registrados resultados estatisticamente significativos de células micronucleadas, como resultado da exposição de meristemas de *A. cepa*, às águas das coletas realizadas no P6, em agosto de 2006, e nos P3 e P6, em agosto de 2007. Estes resultados sugerem que a alta pluviosidade no período de verão, pode ter promovido uma significativa diluição dos metais pesados presentes nas amostras de águas, cujas

concentrações foram insuficientes para desencadear efeitos mutagênicos sob estas células expostas.

Mudanças na área nucleolar e no número de nucléolos por núcleo também foram observadas nessas células. Um aumento significativo na área nucleolar foi observado em células de *A. cepa*, expostas a amostra de água dos P3, em agosto de 2006 e 2007. Por outro lado, em março de 2007 foi observada uma diminuição significativa da área nucleolar de células expostas às águas do mesmo ponto. Amostras de águas do P6 causaram um aumento da área nucleolar, em agosto de 2006 e 2007. Outro parâmetro nucleolar observado foi a mudança no número total de nucléolos por célula, para os ensaios realizados com as águas dos P3 e P6, em todos os períodos de coleta, sendo que os maiores números de nucléolos foram observados para as células expostas às águas coletadas na estação seca.

Com o objetivo de acrescentar subsídios para reforçar os resultados encontrados no presente trabalho, foi utilizado o mesmo organismo-teste para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células meristemáticas de *A. cepa* de dois metais pesados (Cd e Pb), encontrados em concentrações acima do permitido pela legislação em todos os pontos de coleta. Foram testadas duas concentrações para cada metal, sendo 0,007mg/L e 0,017mg/L, para o Cd e 0,025mg/L e 0,034mg/L, para o Pb. Nesses trabalhos também foi verificado que ambos os metais atuaram de maneira deletéria sobre a atividade metabólica das células testadas. Esses trabalhos, a serem submetidos à publicação, constam no anexo 2 – 2A (Cd) e 2B (Pb) e fizeram parte das atividades do programa de iniciação científica de duas acadêmicas do curso de Ciências Biológicas (IBILCE/UNESP).

Para o organismo-teste *O. niloticus*, o potencial mutagênico e genotóxico foi evidenciado pelo teste do micronúcleo, associado às anormalidades nucleares e ao ensaio do cometa. Foi observado um aumento significativo do número de micronúcleos, coleta de agosto de 2007, para células expostas às amostras de água do P3. Esses micronúcleos podem ter sido formados por um atraso na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso, ou, ainda, pela fragmentação cromossômica, resultantes de quebras no material genético (AL-SABATI e METCALFE, 1995).

As anormalidades nucleares mais observadas para ambas as estações e pontos de coleta foram núcleos *lobed*, *notched*, *blebbed*, *broken-eggs*, células binucleadas e cariólise. Essas alterações foram descritas por Carrasco et al. (1990) e, de acordo com Çavas e Gözükkara (2003), podem ser consideradas como anormalidades decorrentes de danos genotóxicos promovidos por químicos ambientais. O aumento no número de células apresentando essas anormalidades foi estatisticamente maior que o controle negativo para os P3 e P6, nos meses de março de 2007 e agosto de 2007, e para os P3 e P4, no mês de março de 2008.

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa, aplicado em eritrócitos de *O. niloticus*, revelaram escores estatisticamente maiores que o controle negativo, para as células expostas às amostras de águas dos pontos de coleta P3 e P6. Segundo Nanthawan et al. (2002), o ensaio do cometa é uma técnica indicada para detectar danos no DNA provocados por agentes químicos presentes no ambiente aquático.

Pelos resultados obtidos neste estudo, para os dois sistemas-testes utilizados, podemos afirmar que existem diferenças sazonais consideráveis que podem estar afetando, drasticamente, o recurso hídrico estudado, e interferindo na qualidade de suas águas, visto as diferenças observadas nos resultados dos bioensaios realizados. Para o sistema teste *A. cepa*, foram encontradas mudanças quanto ao número de nucléolos por célula, havendo uma indução de um maior número de nucléolo para as células expostas às coletas realizadas na estação seca, confirmando uma maior concentração de contaminantes presentes neste recurso hídrico, para os períodos de estiagem.

Também podemos afirmar que águas derivadas dos P3 e P6, apresentaram maior potencialidade de indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos para todos os períodos de estudo, em ambos os sistemas biológicos testados. Este efeito pode ser decorrente do comprometimento ambiental, conferido pelo despejo de esgoto urbano, próximo a esses dois pontos de estudo.

## **5. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- Os dois organismos-teste utilizados no presente estudo e os testes aplicados mostraram ser adequados para estudos de monitoramento ambiental.
- Dentre os bioensaios realizados, o ensaio do cometa e o teste de anormalidades nucleolares foram os que se mostraram mais sensíveis aos efeitos causados



pelos poluentes do rio Preto, confirmando os dados da literatura, que dizem que estes testes são bastante sensíveis aos efeitos negativos de substâncias tóxicas.

- A avaliação dos elementos químicos mostrou ser um bom indicador na presença de outros compostos que podem também conferir características tóxicas.
- As análises realizadas com amostras de águas coletadas ao longo do rio Preto mostraram que os pontos de coleta 3 e 6 apresentaram um efeito genotóxico para todos os períodos do estudo, sendo maior nos períodos de seca, quando a pluviosidade é sempre mais baixa.
- Águas derivadas dos pontos 3 e 6 apresentaram maior potencialidade de indução de efeitos genotóxico nos sistemas biológicos testados, provavelmente decorrentes do comprometimento ambiental, conferido pelo despejo de esgoto urbano da cidade de Rio Preto nos dois pontos de estudo.
- Não foram registrados efeitos mutagênicos para as águas do rio Preto nos ensaios desenvolvidos com o organismo teste *A. cepa*, para o período de verão. Este resultado pode ser explicado pela alta pluviosidade neste período, o que deve ter promovido uma significativa diluição dos metais presentes nas amostras destas águas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 300-310, 2008.

AHLBERG, J.C.; RAMEL, C.; WACHTMEISTER, C. Organolead compounds shown to be genetically active. **Ambio**, v. 1, p. 29-32, 1972.

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

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***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.G. Transport and behavior of pollutants in the environment. In: ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C.(eds) Chemical principles of environmental pollution. **Blackie Academic & Professional**, New York, p. 16-42, 1994.

ARKHIPCHUK, V.V. The use of nucleolar characteristics in biotesting. **Tsitology Genetics**, v. 29, p. 12, 1995

ARKHIPCHUK, V.V., GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 62, 42-52, 2005.

ARKHIPCHUK, V.V.; MALINOVSKAYA, M.V. GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* cells. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338-344, 2000.

ARNAIZ, R. R. Las Toxinas Ambientais y sus Efectos Genéticos. 2. ed. México: La Ciencia/124, 1995. 95p.

BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; MALVIYA, A. Effects of cadmium on nuclear protein kinase C. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 177-180, 1994.

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of ZN (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytology**, v. 134, p. 481-486, 1996.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 357-364, 2006.

BUTLER, R.A.; ROESIADI, G. Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. **Toxicology Science**, v. 59, p. 101-107, 2001.

CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. Cytotoxicity of aluminium on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 67-73, 2003.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with zo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile Mill effluent. **Mutation Research**, v. 538, p. 81-91, 2003.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São José do Rio Preto/SP, [www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v.410, p. 237-242, 1998.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357/2005. Disponível - <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

CONNOR, J.A.; FERGUNSON, M.A. Essential Medical Genetics. **Smith Blackwell Scientific Publications**. London, 260pp. 1993.

CONSTANTIN, M. J.; OWENS, E. T. Introduction and perspective of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 13-36, 1982.

CONTE, C., MUTTI, I., PUGLISI, P., FERRARINI, A., REGINA, G., MAESTRI, E., MARMIROLI, N. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, p. 2739-2749, 1998.

CORREIA, T.F.V.B.C.; MASCHIO, L.R.; MARIN-MORALES, M.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Detecção de mutagenicidade do cádmio (Cd) em diferentes concentrações no organismo teste *Allium cepa*. In: III Workshop de Ecotoxicologia. **Holos Environmental**, v. 8, p. 5-5, 2008

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. 161-171, 1999.

CHAUHAN, L. K. S.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, [S.1.], v. 42, p. 181-189, 1999.

DEPLEDGE, M.H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v.200, p. 57-66, 1996.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME, Ya.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, v. 27, p. 193-195, 2003.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potencial os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 425-441, 2007.

ERDTMANN, B. Genética Toxicológica. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, p.28-35.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 68, p. 235-248, 2003.

FALKENMARK, M.; ALLARD, B. Water-quality and disturbances of natural freshwater. In: "The handbook of environmental chemistry. Part A – **Water Pollution**", Berlim, v. 5, p. 46-78, 1991.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FISCHER, D.; WEISENBERGER, D., SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma**, 101, 133-140, 1991.

FISKEJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* test. **Hereditas**, v. 64, p. 142-146, 1979.

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

FISKEJÖ, G. The *Allium*-test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 197, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 508-511, 1983.

FRANKLIN, N.M.; STAUBER, J.L.; LIM, R.P.; PETOEZ, P. Toxicity of metal mixture to a tropical freshwater alga (*Chorella* sp): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 21, p. 2412-2422, 2002.

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.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, p. 175-185, 1994.

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

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of waster samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 469, p. 183-18, 1999.

GUERRERO, F.; DE LA TORRE, C.; GARCIA-HERDUGO, G. Control of nucleolar growth during interphase in higher plant meristem cells. **Protoplasma**, 152, 96-100, 1989.

GULATI, A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S. P. Genotoxicity testing for relative efficiency of selected pesticides on *Allium cepa*. **Journal Environmental Biology**, v. 15, p. 89-95, 1994.

GUSTAVINO, B.; DEGRASSI, F.; FILIPPONI, R.; MODESTI, D.; TANZARELLA, C.; RIZZONI, M. Mitotic indirect-non-disjunction in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. **Mutagenesis**, New York, v. 9, p. 17-21, 1994.



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.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal of Cell Science**, 99, 465-471, 1991.

JIANG, W.; LIU, D. Effects of Pb(2+) on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 6, p. 786-793, 2000.

JORNAL BOM DIA. ETE dá vida ao rio Preto, que polui 40% da bacia do Turvo: Sem esgoto, água terá oxigênio e melhor nível de pureza na escala da CETESB. 24/03/2008.

JUNDI, T.A.R.E.; FREITAS, T.R.O. Toxocologia Evolutiva. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, p.101-113.

KARPOVA, S.S.; KALAEV, V.N.; ARTYUKHOV, V.G.; TROFIMOVA, V.A.; OSTASHKOVA, L.G.; SAVKO, A.D. The use of nucleolar morphological characteristics of birch seedlings for the assessment of environmental pollution. **Ecology**, v. 33, p. 73-80, 2006.

KHAIDAROVA, T.G.; KALASHNIK, N.A. Nucleolar organizers of chromosomes as adaptative elements of conifer species. **Tsitologiya**, v. 41, p. 1086, 1999.

KHAIDAROVA, T.G.; KALASHNIK, N.A. Nucleolar organizers of chromosomes as adaptative elements of conifer species. **Tsitologiya**, v. 41, p. 1086, 1999.

KHORS, S. S.; PANDA, K. K.; PANDA, B. B. Genotoxicity of tetrodotoxin from buffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. **Mutagenesis**, [S.I.], v. 12, p. 265-9, 1997.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L. M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 110, n. 1-2, p. 13-24, 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K.; The comet assay for detection of potential 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. 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, p. 47-57, 1998.

KRAMER, J.; SCHAICH-WALCH, G.; NÜSSE, M. DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labeling and anti-BrdU antibodies. **Mutagenesis**, Amsterdam, v. 5, p. 491-495, 1990.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Nucleolar size and the activity of rRNA transport in the course of morphogenetic reduction of cell dimensions. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 135-144, 1985

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.

LANE, S.D.; MARTIN, E.S. Further observations on the distribution of lead in juvenile roots of *Raphanus sativus*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 97, p. 145-152, 1980.

LAZAREVA, E.M. **Dynamics of the nucleolus in the cell cycle of diploid and polyploidy cells from different tissues of wheat *Triticum aestivum***. Dissertation, Moscow University, 1999.

LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating tissues. **Journal of Pathology**, v. 165, p. 43-51, 1991.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in water impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v.650, p. 80-86, 2008.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v. 156, p. 751-752, 1945.

LEVAN, A. The effect of colchicines on roots mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAO, F.; LU, C.H. Effects of lead on root growth, cell division and nucleus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, v. 86, p. 1-4, 1994.

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.

MAcNAMEE, 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.

MANZL, C.; EBNER, H.; KOCK, G.; DALLINGER, R.; KRUMSCHNABEL, G. Copper, but not cadmium, is acutely toxic for trout hepatocytes: short-term effects on energetic and ion homeostasis. **Toxicology Applied Pharmacology** v. 191, p. 235-244, 2003.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: na ultrastructural study. **Environmental Research**, v. 88, p. 30-35, 2002.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; FÉRNANDEZ, Y.; MONTIEL, X.; TORREALBA, Z. Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. **Biocell**, v. 30, p. 259-267, 2006.

MARTINI, G.; FLAVELL, R.B. The control of nucleolus volume in wheat: a genetic study at three developmental stages. **Heredity**, v. 54, p. 111-120, 1985.

MATSUMOTO, S. T. **Efeitos tóxicos e genotóxicos de metais pesados, especificamente do cromo trivalente e hexavalente.** 2003. Monografia (doutorado) Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto-SP.

MATSUMOTO, S. T., MALAGUTI, M., MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxic potencial due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, p. 40-46, 2005.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potencial evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, v.69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p.77-85, 2005.

McCARTHY, J. F.; JACOBSON, D. N.; SHUGART, L. R.; JIMENEZ, B. D. Preexposure to 3-Methylcholanthrene increases benzol [A] Pyrene Adducts on Dna of Bluegil Sunfish. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 28, n. 1-4, p.323-328, 1989.

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

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sedments. **Mutation Research**, Amsterdam, v.39, p.317-321, 1997.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p.135-147, 1998.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel eletrophoresis 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 da águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. Dissertação, para

obtenção do título de mestre junto ao Curso de Genética e Melhoramento da UEL – Londrina/Pr. 158p. 2000.

MUKHOPADHYAY, M.I.; SHARMA, A. Comparison of different plants in screening for Mn clastogenicity. **Mutation Research**, v. 242, n. 2, p. 157-161, 1990.

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**, 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**, v. 518, p. 21-37, 2002.

NATARAJAN, A.T.; OBE, G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells. In: **Citogenetic Assays in Mutagenicity New Horizons in Genetic Toxicology**. Ed. By J.A. Heddle. Academic Press, New York, 213pp, 1982.

NIELSEN, M. N.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of *Allium* test. **Hereditas**, Lund, v. 121, p. 249-254, 1994.

OBE, G.; BEEK, B. Premature chromosome condensation in micronuclei. New York: Academic Press, 1982.

OBE, G.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Role of DNA doublestrand breaks in the formation of radiation – induced chromosomal aberrations. **Progress in Mutation Research**, Amsterdam, v. 4, p.1-9, 1982.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in the surface water: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA and repair in human tissues. New York: **Plenum**, p. 291-301, 1990.

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

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 109-124, 2000.

PASCALICCHIO, A.E. Contaminação por metais pesados. Ed. Annablume, São Paulo/SP, 2002, 132pp.

PAVLICA, M.; BESENDORFER, V.; ROSA, J.; PAES, D. The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 41, p.1519-27, 2000.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v. 4, 2001a, 128p.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do ferro e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v. 4, 2001b, 122p.



PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, v. 32, p. 554-556, 2002.

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

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátides hermanas.** Tese de Doutorado, Universidade de Complutense, Madri, 276p. 1987.

RAMEL, C. The effect of metal compounds on chromosome segregation. **Mutation Research**, v. 21, p. 45-46, 1973.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G. M. e PETROCELLI, S. R.; (Ed). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, New York: **Chemosphere**, p.1-28, 1985.

RANK, J., LOPEZ, L. C., NIELSEN, M. H., MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 13-18, 2002.

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 hydrazid, Sodium azide and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-27, 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, c. 3, p. 113-9, 1998.

RASHED, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake, **Environmental International**, v. 27, p. 27-33, 2001.

RAU, M.A.; WHITAKER, J.; FREEDMAN, J.H.; DI GIULIO, R.T. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. **Toxicology Pharmacology**, v. 137, p. 335-342, 2004.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, 355p.

RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J. The nucleolar structure in plant cells. **Revisiónes Sobre Biología Celular**, v. 7, p. 1-140, 1986.

ROY, A.K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*. **Mutation Research**, v. 227, n. 4, p. 221-226, 1989.

RUSCHOFF, J.; ELSASSER, H.P.; ADLER, G. Correlation of nucleolar organizer regions with secretory and regenerative process in experimental cerulein-induced pancreatitis in the rat. **Pancreas**, 11, 154-159, 1995.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, p. 154-172, 1996,

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel eletrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 1-2, p. 133-139, 1997.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (Hollanender, A., ed.). New York: Plenum Press, v. 4, p. 31-53, 1976.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 711–716, 2008.

SHARMA, C. B. S. R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Crit. Ver. Plant. Sci.**, v. 9, p. 409-442, 1990.

SHERUDILO, A.I.; SEMESHIN, V.F. Certain patterns of nucleolar fusion in the interphase nucleus. **Genetika**, v. 5, n. 4, p. 65-72, 1969.

SHUGART, L.; BICKMAN, J; JACKIM, G.; MACMAHON, G.; RIDLEY, W.; STAIN, J.; STEINART, S. DNA Alterations. In: R. Huggett, R. Kimerle, P. Mehrle and H. Bergman. (eds.). *Biomarkers: Biochemical, Phsiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Ann Arbor: Lewis Publ, p. 125-154, 1992.

SIKKA, H. C.; RUTKOWSKI, J. P.; KANDASWAMI, C.; KUMAR, S.; EARLEY, K.; GUPTA, R. C. Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 49, p. 81-87, 1990.

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

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, c. 3-4, p. 171-9, 1997.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation de waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 368, p. 171-79, 1996.

SMITH, R.W.; BLANEY, S.C.; DOWLING, K.; STURM, A.; JONSSON, M.; HOULIHAN, D.F. Protein synthesis costs could account for the tissue-specific effects of sub-lethal copper on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 265-277, 2001.

SOUZA, T.S; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.

STEIN, J. E.; REICHERTm W. L.; FRENCH, B.; VARANASI, U. <sup>32</sup> P-postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole exposed to benzo[a]pyrene and 7H-dibenzo(c,g)-carbazole. **Chemistry Biology Interactive**, Limerick, v. 88, p. 55-69, 1993.

STOPPER, H.; MÜLLER, S. O. Micronuceli as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 11, p. 661-667, 1997.

SUCCI, M.; MASCHIO, L.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. The use of nucleolar morphological characteristics in cells of *Allium cepa* for the assessment of the lead (Pb) toxicity. Anais do XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, p. 203-204, 2008.

SUCCI, M.; MASCHIO, L.R.; MARIN-MORALES, M.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Avaliação da influência do chumbo (Pb) em sistema-teste de *Allium cepa*, por meio de características nucleolares quantitativas e aberrações cromossômicas. In: III Workshop de Ecotoxicologia. **Holos Environmental**, v. 8, p. 18-18.

SWIEBODA, M. The use of biological tests for establishing the influence of the dust form lead and zink work on plant development. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 45, p. 17-31, 1976.

TIMBRELL, J. A. **Introduction to Toxicology**. 2. ed. Taylor e Francis Ed, 1999, p. 167.

ÜNYAYAR, S.; ÇELİK, A.; ÇEKİÇ, F.; GÖZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, vol. 21, n. 1, p. 77-81, 2006.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – **Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2003, p. 327-344.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VIDAKOVIĆ- CIFREK, Z.; PVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 43, p. 284-291, 2002.

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

VON-HOFF, D.D.; MCGILL, J.R.; FORSETH, B.J.; DAVIDSON, K.K.; BRADLEY, T.P.R.V.D.D.; WAHL, G.M. Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 89, p. 8165-8169, 1992.

VOUTSINAS, G.; ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Horedum vulgare*. **Cell Biology International**, v. 21, n. 7, p. 411-418, 1997.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J.B.; BLAISE, C. Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.27, p. 116-39, 1996.

## **7. ANEXOS**

**Anexo 1:** A.Foto aérea da localização da Represa Municipal de São José do Rio Preto/SP. B. Pontos de coleta ao longo do rio Preto.

**Anexo 2:** Artigos a serem submetidos

**Anexo 2.A:** Efeitos do chumbo (Pb), avaliados por meio de indução de aberrações cromossômicas, micronúcleos e características nucleolares quantitativas, no sistema-teste de *Allium cepa*

**Anexo 2.B:** Utilização dos testes de aberrações cromossômicas, micronúcleo e características nucleolares quantitativas em células de *Allium cepa* para avaliação dos efeitos danosos do cádmio (Cd).

## ANEXO 1



**B**





**A.** Foto aérea da localização da Represa Municipal de São José do Rio Preto/SP (em destaque no círculo). **B.** Pontos de coleta ao longo do rio Preto. P1: ponto 1, P2: ponto 2, P3: ponto 3, P4: ponto 4, P5: ponto 5 e P6: ponto 6 (no detalhe, esgoto sendo despejado) .

## ANEXO 2

Trabalhos originados e complementares do presente trabalho de doutorado, co-orientados pela autora da tese, e que fizeram parte das atividades do Programa de Iniciação Científica das acadêmicas Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro Correia (Anexo 2A) e Maysa Succi (Anexo 2B).

**Anexo 2A:** Utilização dos testes de aberrações cromossômicas, micronúcleo e características nucleolares quantitativas em células de *Allium cepa* para avaliação dos efeitos danosos do cádmio (Cd).

**Anexo 2B:** Efeitos do chumbo (Pb), avaliados por meio de indução de aberrações cromossômicas, micronúcleos e características nucleolares quantitativas, no sistema-teste de *Allium cepa*.

## **ANEXO 2A**

**UTILIZAÇÃO DOS TESTES DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS,  
MICRONÚCLEO E CARACTERÍSTICAS NUCLEOLARES QUANTITATIVAS  
EM CÉLULAS DE *ALLIUM CEPA* PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS  
DANOSOS DO CÁDMIO (Cd).**

Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro Correia<sup>1</sup>, Lucilene Regina Maschio<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências (IB-UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.

## Resumo

No presente estudo foram realizados testes de aberrações cromossômicas, micronúcleo e características nucleolares quantitativas (número de nucléolo por célula, a área de nucléolos únicos e quantidade de células com nucléolos heteromórficos - PNhet) para a avaliação da ação do cádmio (Cd). Sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação, em temperatura ambiente, a duas diferentes concentrações de Cd (0,007mg/L e 0,017mg/L), em água pura (controle negativo) e em uma substância reconhecidamente aneugênica (Trifluralina - controle positivo), em placas de Petri, contendo aproximadamente 100 sementes cada. A análise das células dos meristemas radiculares de *A. cepa*, expostas às diferentes concentrações mostrou uma diminuição, significativa ( $p < 0,05$ ) do número de células com um único nucléolo, quando comparado com o controle negativo, além de um aparente aumento do número de células com três, quatro e cinco nucléolos, sendo este aumento significativo somente para os registros de células com três nucléolos, após exposição à maior concentração do metal. Também foi observado um aumento da área nucleolar das células expostas aos tratamentos realizados. Por meio do teste de aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo, foi possível observar um aumento significativo de células micronucleadas e células aberrantes, em relação ao controle negativo, para a maior concentração testada. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do índice mitótico nas duas concentrações testadas. Nossos resultados indicaram que características nucleolares, realizadas com organismos teste *A. cepa*, podem caracterizar em uma eficiente ferramenta para estudos de biomonitoramento ambiental de locais contaminados com metais pesados. Diante desses resultados nós podemos concluir também que o uso de características nucleolares de células em interfase, associadas aos testes do micronúcleo e de aberrações cromossômicas em *A. cepa* pode constituir bons indicadores de toxicidade ambiental por cádmio devendo ser usados como testes rotineiros em locais com potencialidade de contaminação por este metal.

**Palavras-chave:** Cádmio (Cd); *Allium cepa*; Aberrações Cromossômicas, Micronúcleo, Características Nucleolares.

## 1. Introdução

Os seres vivos estão expostos à ação de numerosos agentes físicos, químicos ou biológicos com potencialidade tóxica, que pode provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995).

Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais vêm tendo grande importância, pois, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem pode estar exposto (MATSUMOTO, 2004).

A emissão de metais pesados no ambiente vem causando, nos últimos anos, um grande impacto nos ecossistemas. As principais atividades responsáveis pela contaminação do solo e da água, por metais pesados, são as atividades industriais, agrícolas e urbanas (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005). Os metais selênio (Se), cádmio (Cd), cromo (Cr) e níquel (Ni) são encontrados, normalmente, em quantidades baixas, mas necessárias, na alimentação. Porém, quando esses elementos se encontram em excesso no ambiente, podem induzir efeitos deletérios sobre os organismos, por apresentarem potencialidade carcinogênica e/ou mutagênica (MINISSI; LOMBI, 1997). Os metais pesados e seus metabólitos induzem, tanto *in vivo* como *in vitro*, alterações nas estruturas dos cromossomos, promovendo mutações de pontos em procariotos e eucariotos (PASCALICCHIO, 2002).

O cádmio (Cd) é um metal pesado presente no meio ambiente, encontrado em baixas concentrações nos solos. No entanto, a utilização desse metal em processos industriais e em fertilizantes tem aumentado a emissão desse poluente no ambiente. (PRASAD, 1995; ALMEIDA et al., 2001; MARCANO et al., 2002). O cádmio é considerado um dos poluentes ambientais mais tóxicos, por afetar, citogeneticamente, vários organismos (ÜNYAYAR et al., 2006). Além disso, é um poluente particularmente perigoso, devido à sua alta toxicidade e ótima solubilidade em água (DUXBURY, 1985; JIANG et al., 2001).

O acúmulo de cádmio nas células pode ser perigoso para vários tipos de organismos (FUSCONI et al., 2006). Embora o Cd não seja um elemento essencial para os processos biológicos do crescimento de plantas, ele é rapidamente absorvido pelas raízes destes organismos. (DAS et al., 1997). Desta forma, as plantas superiores

constituem um material importante para realização de testes genéticos, que visam a monitoração de poluentes ambientais. Ensaio de avaliação genotóxica realizados com plantas têm se mostrado eficientes e equiparáveis aos realizados com animais (FUSCONI et al., 2006), com a vantagem de serem mais sensíveis, de fácil execução e por apresentar baixo custo experimental (FISKESJÖ, 1997; PANDA; PANDA, 2002).

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* é um organismo teste bem aceito para a avaliação do potencial genotóxico de vários poluentes, sendo rotineiramente usado pela sua alta sensibilidade, pelo grande número de células em divisão, pelo baixo número e tamanho uniforme de seus cromossomos (SETH et al., 2008). A espécie *A. cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al.; 2008), sendo utilizada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996) e apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1993; CHAUHAN et al., 1999).

A germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de raízes são estágios importantes do crescimento da planta, além de serem também os estágios que respondem, mais sensivelmente, às mudanças que ocorrem no ambiente (CHEN et al., 2003).

Testes de aberrações cromossômicas com *A. cepa*, foram padronizados por Fiskesjö (1985), embora sejam usados para este fim desde a década de 30. Estes testes permitem uma avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas, por meio do registro de atividade mitótica (índice mitótico) e das anormalidades do ciclo celular das células meristemáticas das raízes dessas plantas (VIDAKOVIĆ-CIFREK, 2002).

Outro teste que tem sido utilizado para avaliação da toxicidade de poluentes ambientais, inclusive de metais pesados, é o que usa como parâmetro as características nucleolares da célula (CALIN; DRAGOMIR, 1980; GABARA et al., 1995; ARKHIPCHUK, 1995a; ARKHIPCHUK, 1995b; ARKHIPCHUK et al., 2000; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2002; KARPOVA et al., 2006).

O nucléolo é um componente celular que reflete o estado da atividade da célula (RISUEÑO; MEDINA, 1986; GUERRERO et al., 1989; FISCHER et al., 1991; HERNANDEZ-VERDUN, 1991), mas que pode sofrer uma desorganização de sua estrutura e um desequilíbrio da sua atividade, quando em condições de estresse (GABARA et al., 1995). Nessa organela, os genes de DNA ribossomal são transcritos em RNA ribossomal e, mais tarde, processados e empacotados em subunidades ribossomais (MILLER, 1981; RISUEÑO; MEDINA, 1986). De acordo com Gabara et al. (1995), o número de nucléolos é determinado pelo número de regiões organizadoras nucleolares (RON). O autor ainda afirma que, quanto mais forte for a sobrecarga funcional, maior será o número de nucléolo apresentado pela célula.

Atividades antropogênicas estão introduzindo grandes quantidades de metais pesados nos ambientes, que, por serem facilmente acumulados nas plantas, acabam sendo transferidos para outros organismos, via cadeia alimentar (WIERZBICKA; ANTOSIEWICZ, 1993). Desta forma, cada vez mais se tornam necessários estudos que enfatizem a toxicidade desses metais, para que possa sensibilizar os órgãos governamentais da necessidade de uma política de controle de emissão destas substâncias no meio ambiente.

O presente estudo teve como objetivo a avaliação da ação de diferentes concentrações de cádmio (Cd) sobre células meristemáticas de *Allium cepa*, por meio do teste de aberrações cromossômicas, teste de micronúcleos e com base na análise de características nucleolares quantitativas.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Material Biológico**

O material biológico utilizado neste estudo, para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das diferentes concentrações de cádmio, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ( $2n = 2X = 16$  cromossomos) de uma única variedade (Baia Periforme) e de um mesmo lote, para evitar diferentes respostas durante o andamento dos bioensaios.

## **2.2. Bioensaio**

Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em duas diferentes concentrações de cádmio (0,007mg/L e 0,017mg/L), em água pura (controle negativo) e em uma substância reconhecidamente aneugênica (Trifluralina - controle positivo), em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 100 sementes cada. Os experimentos foram desenvolvidos em temperatura ambiente. As concentrações utilizadas no presente estudo foram baseadas em análises químicas realizadas em amostras de água de um recurso hídrico contaminado com este metal e que foi investigado por Maschio et al. (2008).

Após a germinação, quando as raízes de *A. cepa* atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, aproximadamente cinco dias após o início do experimento, elas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 ácido acético – v:v), por um período de 24 horas.

### **2.2.1. Indução de efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico**

Para análise do índice mitótico, de aberrações cromossômicas e de células micronucleadas, as radículas fixadas foram submetidas à reação de Feulgen (Mello; Vidal, 1978, com modificações), que compreendeu duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e a exposição pelo reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro. No preparo das lâminas, as pontas das raízes foram seccionadas para extração de suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração das células, foi adicionado aos meristemas uma gota de carmim-acético (2%). O material foi recoberto com lamínula onde, com o auxílio de um estilete de madeira, fez-se uma leve pressão, para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina, sem prejuízo das análises. O material foi analisado ao microscópio de luz, com aumento de 400 vezes.

Foram analisadas células em intérfase e em divisão, para posterior cálculo do índice mitótico, assim como células portadoras de aberrações cromossômicas, como anáfases anormais (com ponte e multipolar), bem como perdas e fragmentos cromossômicos, células micronucleadas e células binucleadas. O tamanho dos



micronúcleos encontrados também foi observado. Para todas as categorias analisadas, foram contabilizadas cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, obtidas de um total de 10 lâminas. Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **2.2.2 Parâmetros nucleolares**

Para análise das características nucleolares (número de nucléolo por célula, a área de um único nucléolo e a quantidade de células apresentando um par de nucléolo heteromórfico - PNhet), as radículas fixadas foram submetidas à técnica de impregnação por íons prata - AgNOR (Howell; Black, 1980 com modificações), que compreende duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e, posteriormente, submetidas a impregnação por íons prata. As pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a fixação das células, foi adicionada uma gota de ácido acético 45%. O material foi recoberto por lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina.

O número de nucléolos, entre 1000-1300, foi contabilizado em células interfásicas, por microscopia de luz, em aumento de 1000x. A área de um único nucléolo foi medida em 200 células de cada tratamento, usando o sistema IMAGE J – *Image Processing and Analysis in Java*. Versão 1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As células que apresentaram um número par de nucléolos tiveram uma análise adicional, onde os nucléolos foram classificados em homomórficos (tamanho aproximadamente igual entre eles) e heteromórficos - PNhet (tamanho diferente). Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados**

Os ensaios para avaliação dos efeitos genotóxicos, realizados com os meristemas radiculares de *A. cepa*, após o tratamento com ambas as concentrações de cádmio,

revelaram um aumento do índice mitótico, das alterações cromossômicas e do número de micronúcleos, quando comparados com o controle negativo (Figura 1 e Tabela 1). As anormalidades encontradas foram: células com micronúcleos (Fig. 2B), células com perdas de cromossomos (Fig. 2D), com quebras cromossômicas (Fig. 2E), anáfases com pontes (Fig. 2F), células binucleadas (Fig. 2G) e anáfases multipolares.

Quanto ao índice mitótico, houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), em ambas as concentrações testadas. Pelas nossas análises foram observadas células com anormalidades cromossômicas e células com micronúcleo em maior número que o controle nas duas concentrações testadas, mas o resultado só foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para a maior concentração (Tabela 1).

A maior parte dos micronúcleos encontrados foi de tamanho, relativamente, pequeno, para ambas as concentrações, quando comparados com o controle positivo (Tabela 2).

Quanto às características nucleolares, a técnica de coloração por íons prata (AgNOR) mostrou que as radículas de *A. cepa*, tratadas com as diferentes concentrações de cádmio, apresentaram mudanças no número de nucléolo de suas células (Figura 3,4 e Tabela 3). O tratamento (0,007mg/L e 0,017mg/L) reduziu, significativamente ( $p < 0,05$ ), a proporção de células com um único nucléolo (Tabela 3). A concentração 0,017mg/L causou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no número de células com três nucléolos.

#### **4. Discussão**

No presente estudo, foram realizados ensaios com o intuito de avaliar o efeito do cádmio sobre o organismo-teste, por meio da análise dos índices mitóticos, de aberrações cromossômicas, de células com micronúcleos e de alterações nas características nucleolares quantitativas.

Muitos estudos indicam que o cádmio causa danos na estrutura nucleolar, no DNA e RNA de células animais e vegetais (MISRA et al., 1998; HARTWIG; SCHWERDTLE, 2002; JONAK et al., 2004).

Nosso estudo revelou que as duas concentrações testadas de cádmio provocaram um aumento estatisticamente significativo do índice mitótico. Segundo Fernandes et al.

(2007), o potencial citotóxico de um composto pode ser determinado pela sua capacidade de interferir no índice mitótico. Tanto o aumento como o decréscimo do índice mitótico podem ser utilizados como parâmetros de citotoxicidade em estudos de biomonitoramento ambiental, afirmações corroboradas por (HOSHINA, 2002), que cita ser o IM um importante indicador para monitoramento do nível de poluição, especialmente de ambientes contaminados por compostos potencialmente tóxicos e citotóxicos.

Índices mitóticos menores que o do controle negativo indicam que o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos foram afetados pelo composto testado (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Por outro lado, índices maiores que o do controle negativo podem caracterizar um efeito tóxico capaz de promover uma proliferação anormal da célula e a capacidade de formação de tumores (HOSHINA, 2002).

Ünyayar et al. (2006) relataram que altas concentrações de Cd diminuíram o índice mitótico em *Allium sativum* e *Vicia faba*, enquanto que no presente trabalho, foram as baixas concentrações de Cd (0,007mg/L e 0,017mg/L) que promoveram o aumento deste o índice. Estudos anteriores, desenvolvidos por Misra et al. (2003) corroboram esses resultados. Os autores afirmam que células da próstata de mamíferos, expostas a concentrações de cádmio, acima de 0.112mg/L, inibe a síntese de DNA e a divisão celular. Contudo, em concentrações menores acontece o inverso, há um aumento da síntese de DNA e, conseqüentemente da proliferação celular (VON ZGLINICKI et al., 1992).

Seth et al. (2008), estudando o efeito do cádmio em células de *A. cepa*, para concentrações bem maiores que as testadas no presente trabalho, observaram uma inibição do índice mitótico. O mesmo resultado foi observado por Çelik et al. (2008) em células de *Allium sativum*, onde altas concentrações de cádmio causaram uma diminuição do índice mitótico.

Chen et al. (2003) relataram que cádmio, na concentração de 20 mg/L, inibiu a taxa de germinação e crescimento das raízes de duas espécies de plantas.

Com relação à genotoxicidade desse metal, no presente trabalho foi observado um aumento do número de aberrações cromossômicas para as duas concentrações,

porém, com resultados significativos somente para a maior concentração testada. Esses resultados sugerem que, como descrito por Seth et al. (2008), aberrações cromossômicas indicam a ação primária do Cd sobre o fuso mitótico, o que leva a uma indução de anormalidades como anáfase multipolar, atraso cromossômico, pontes e distribuição desigual dos cromossomos. A atividade danosa ao DNA pelo Cd pode estar associada à geração de radicais livres (ROS – Reactive Oxygen Species), substâncias extremamente reativas que promovem quebras no DNA e danos irreversíveis em proteínas envolvidas com a replicação, com o reparo, a recombinação e a transcrição do DNA (WATANABLE; SUZUKI, 2002; LIN et al., 2007).

Os efeitos do Cd sobre a estabilidade genômica parecem ser indiretos, sendo provenientes, principalmente, do aumento do estresse oxidativo, fator este que pode levar a danos no DNA (BERTIN; AVERBECK, 2006). Hossain e Huq (2002) sugerem que é possível um efeito direto do Cd sobre o DNA, envolvendo a ligação do metal com as bases nitrogenadas G, A e T.

Células micronucleadas foram encontradas em maior número para as duas concentrações testadas de cádmio, quando comparadas ao controle negativo. Porém, apenas a maior concentração causou um aumento significativo do número de micronúcleos, mostrando um efeito mutagênico do cádmio para as células de *A. cepa*, quando este organismo teste foi exposto à maior concentração do metal.

Muitos estudos mostram que o teste do micronúcleo é uma técnica eficiente para se avaliar os danos causados por certos poluentes ambientais e toxicidade de substâncias, como pesticidas e metais pesados, tanto em células vegetais quanto animais (HAZEN; GUITERREZ GONZALVEZ, 1988; KHORA et al., 1997; ÇELIK et al., 2003a,b; ABOU-EISHA et al., 2004; MARTINEZ et al., 2004; YI et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; ÇELIK et al., 2008). Fragmentos cromossômicos ou até mesmo cromossomos inteiros, que sofreram atrasos durante a divisão celular, resultam em micronúcleos (ÜNYAYAR et al., 2006). Estudos realizados por Çelik et al. (2008) com *A. sativum* mostraram que o cádmio induziu a formação de micronúcleos nas células deste organismo.

Uma substância capaz de induzir o aparecimento de células com micronúcleos pode ser considerada clastogênica ou aneugênica, dependendo do evento relacionado

com a formação desta estrutura (MENG, 2003). A ação clastogênica é detectada pela presença de micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas, durante o processo de divisão celular. Já, a ação aneugênica acontece pela inativação do fuso mitótico, que levará a perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula (FENECH, 2000).

De acordo com Zhang e Yang (1994); Cardova Rosa et al. (2003) e Gichner et al. (2003, 2004), a indução de quebras cromossômicas e danos ao DNA comprovam o potencial clastogênico do Cd. A maior parte dos micronúcleos encontrada neste estudo foi de tamanho, relativamente, pequeno, em comparação com o controle positivo (substância reconhecidamente aneugênica), o que corrobora o potencial clastogênico do cádmio.

Quanto às características nucleolares quantitativas, foram observadas alterações no número e na área do nucléolo. Na espécie *A. cepa*, dois e, raramente, três nucléolos são formados durante a telófase. Na intérfase subsequente estes nucléolos podem permanecer distintos ou se fundirem formando um único nucléolo (CHOUINARD; LEBLOND, 1967; PANZERA et al., 1996). Em *A. cepa*, cinco RONS (Regiões Organizadoras Nucleolares) estão presentes nos nucléolos das células, sendo uma no telômero do braço longo do cromossomo 8, onde não existe constrição secundária, e as outras quatro na região satélite do cromossomo 6 (PANZERA et al., 1996).

As características nucleolares refletem mecanismos diferentes envolvidos na regulação da atividade nucleolar, isto é, o número de nucléolo por célula tem sido proposto como um marcador do número de regiões organizadoras nucleolares ativas (SHERUDILO; SEMESHIN, 1969; LAZAREVA, 1999; RUSCHOFF et al., 1995). Já o tamanho do nucléolo reflete a atividade transcricional dos clusters de DNAr (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985a; DZIDZIGURI et al., 1994; MELLINK et al., 1994). A proporção de células com PNhet caracteriza o mecanismo específico de regulação entre os pares das regiões organizadoras nucleolares (ARKHIPCHUK; PALAMARCHUK, 1996).

Alguns estudos apontam que o aumento ou a diminuição no número de nucléolo, por célula, pode estar relacionado às características adaptativas de certas plantas a uma

condição de estresse (MURATOVA; SEDEL'NIKOVA, 1999; KHAIDAROVA; KALASHNIK, 1999; KARPOVA et al., 2006).

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações testadas induziram o aumento da área nucleolar, embora essa alteração do tamanho não tenha sido significativa. Esse aumento da área de um único nucléolo foi também observado por Gabara et al. (1995), ao analisarem células meristemáticas de *Pisum sativum* L, expostas ao cádmio. De acordo com Chelidze e Zatsepina (1988) e Sobol' (2001), o aumento no tamanho do nucléolo pode ser devido à amplificação dos genes ribossomais e/ou sua alta atividade transcricional devido à presença de fatores externos, como por exemplo, alguns metais pesados, drogas e temperatura (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985a; KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985b; KARPOVA et al., 2006).

Os resultados das análises do presente estudo estão coerentes com a literatura disponível, em relação à ação do cádmio sob o material genético e nucleolar de organismos expostos. As duas concentrações testadas apresentaram efeito tóxico sobre as células meristemáticas de *Allium cepa*, reforçando a preocupação com as emissões de resíduos deste metal no ambiente. As duas concentrações de cádmio testadas reduziram, significativamente, a proporção de células com um único nucléolo, sendo também observado um aumento significativo de células com três nucléolos, para a maior concentração do metal.

Karpova et al. (2006), estudando células de *Bétula pendula*, expostas a poluição da cidade de Voronezh, observaram um aumento no número de células com três nucléolos. O aumento no número de nucléolo por célula também foi observado em coníferas que cresceram sob condições de estresse (KHAIDAROVA; KALASHNIK et al., 1999). Os autores citados acreditam que este fenômeno seria decorrente de uma característica adaptativa das coníferas, sob condições de estresse. Células da nadadeira caudal *Cyprinus carpio* L., expostas ao cádmio e cobre, também apresentaram um aumento do número de nucléolos (ARKHIPCHUCK; GARANKO, 2005).

A presença de células multinucleoladas, para Rawlins e Shaw (1990), pode estar associada a dois fatores: 1. serem oriundas de um estágio intermediário entre telófase (células contendo mini nucléolos) e intérfase (células com um grande e

único nucléolo); 2. não ter ocorrido a fusão completa do material nucleolar nessas células, devido à ação de substâncias estranhas sobre o organismo.

Segundo Arkhipchuck (1998), a formação de um único nucléolo é mediada, principalmente, pela fusão de duas regiões organizadoras funcionais. A fusão do nucléolo em núcleos interfásicos está, fortemente, correlacionada com a atividade metabólica das células (POPP; WACHTLER, 1983; WACHTLER et al., 1984).

Em nosso estudo, podemos sugerir que o cádmio atuou de maneira deletéria sobre a atividade metabólica das células meristemáticas de *A. cepa*, impedindo a fusão nucleolar. Esta afirmação pode ser justificada pela diferença de células de nucléolos únicos observados entre os tratamentos e o controle negativo.

Diante desses resultados, nós podemos concluir que o uso de características nucleolares de células interfásicas, juntamente com o teste do micronúcleo e de aberrações cromossômicas, caracteriza bons parâmetros para estudos de toxicidade de metais, especificamente do cádmio, podendo oferecer importantes informações sobre os perigos de emissões destas substâncias por atividades industriais, agrícolas e urbanas, pelos sérios problemas que podem promover ao meio ambiente.

## 5. Referências bibliográficas

ABOU-EISHA, A.; MARCOS, R.; CREUS, A. Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 564, p. 65–74, 2004.

ALMEIDA, J.A; NOVELLI, E.L.B; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, v.114, p.169-175, 2001.

ARKHIPCHUK, V.V. Changes in the nucleolar characteristics in fish embryo cells under the action of low doses of radiation, **Radiatsionnaia Biologiia, Radioecologiia**, v. 35, p.512-517, 1995a.

ARKHIPCHUK, V.V. The use of nucleolar characteristics in biotesting. **Tsitology Genetics**, v. 29, p. 12, 1995b.

ARKHIPCHUK, V.V.; PALAMARCHUK, J.V. Heteromorphic-paired nucleoli in fish cells. **Cytobios**, v. 88, p. 229-238, 1996.

ARKHIPCHUK, V.V. Peculiar changes of nucleolar quantitative characteristics in fish cells. **Cytobios**, v. 94, p. 81-96, 1998.

ARKHIPCHUK, V.V.; MALINOVSKAYA, M.V. GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* cells. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338-344, 2000.

ARKHIPCHUK, V.V., GARANKO, N.N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 187-194, 2002.

ARKHIPCHUK, V.V., GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 62, p. 42-52, 2005.

ARNAIZ, R.R. Las Toxinas Ambientais y sus Efectos Genéticos. **México: La Ciencia/124**, 2. ed., 95p., 1995.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochemistry**, v. 88, p. 1549-1559, 2006.



CALIN, D.; DRAGONMIR, C.T. Chromatin structure, number, volume and position of nucleoli in rat hepatocyte after treatment with benzo(a)pyrene and N-acetylaminoflourene. **Neoplasma**, v. 27, p. 549-555, 1980.

CARDOVA-ROSA, E.V.; VALGAS, C.; SOUZA-SIERRA, M.M.; CORREA, A.X.R.; RADETSKI, C.M. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 645–649, 2003.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, n. 5, p.722-725, 2008.

ÇELİK, A.; ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in gasoline station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v. 18, p. 417–421, 2003a.

ÇELİK, A.; MAZMANCI, B.; ÇAMLICA, Y.; ASKIN, A.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü. Cytogenetic effects of Lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. **Mutation Research**, v. 539, p. 91–97, 2003b.

ÇELİK, A.; ÜNYAYAR, S.; ÇEKİÇ, F.O.; GÜZEL, A. Micronucleus frequency and lipid peroxidation in *Allium sativum* root tip cells treated with gibberellic acid and cadmium. **Cell Biology Toxicology**, v. 24, p. 159-164, 2008.

CHAUHAN, L.K.S.; SAVENA, P.M.; GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, v. 42, p. 181-9, 1999.

CHELIDZE, P.V.; ZATSEPINA, O.V.; Morphofunctional system of nucleoli. **Uspekhi Sovremennoi Biologii**, v. 105, p. 252-268, 1988.

CHEN, Y.X.; HE, Y.F.; LUO, Y.M.; YU, Y.L.; LIN, Q.; WONG, M.H. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. **Chemosphere**, v. 50, p. 789-793, 2003.

CHOUINARD, L.A.; LEBLOND, C.P. Sites of protein synthesis in nucleoli of root meristematic cells of *Allium cepa* as shown by radioautography with [3H] arginine. **Journal Cell Science**, v. 2, p. 473-70, 1967.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, v. 98, p. 29–36, 1997.

DUXBURY, T. Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. **Advances in Microbial Ecology**, v. 8, p. 185–235, 1985.

DZIDZIGURI, D.V.; CHELIDZE, P.V.; ZARANDIA, M.A.; CHERKEZIA, E.C.; TUMANISHVILI, G.D. Transcriptional activity and ultrastructure of morphologically different types of nucleoli isolated from hepatocytes of normal and hepatectomized rats. **Epithelial Cell Biology**, v. 3, p. 54-60, 1994.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FISCHER, D.; WEISENBERGER, D., SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma**, v. 101, p. 133-140, 1991.

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

FISKESJÖ, G., *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wuncheng, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, NY, pp. 307–333, 1997.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 253-260, 2006.

GABARA, B.; KRAJEWSKA, M.; STECKA, E. Calcium effect on number, dimension and activity of nucleoli in cortex cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots after treatment with heavy metals. **Plant Science**, v. 111, p. 153-161, 1995.

GICHNER, T.; PATKOVÁ, Z.; JIN, K.K. DNA damage measured by the Comet assay in eight agronomic plants. **Biology Plantarum**, v. 47, p. 185–188, 2003.

GICHNER, T., PATKOVÁ, Z., SZÁKOVÁ, J., DEMNEROVÁ, K. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombinations in tobacco leaves. **Mutation Research**, v. 559, p. 49–57, 2004.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GUERRERO, F.; DE LA TORRE, C.; GARCIA-HERDUGO, G. Control of nucleolar growth during interphase in higher plant meristem cells. **Protoplasma**, v. 152, p.96-100, 1989.

HARTWIG, A.; SCHWERDTLE, T. Interaction by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 47–54, 2002.

HAZEN, M.J.; GUITERREZ GONZALVEZ, M.G. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, v. 3, p. 333–335, 1988.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal Cell Science**, v. 99, p. 465-471, 1991.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002, 52p.

HOSSAIN, Z.; HUQ, F. Studies on the interaction between Cd(2+) ions and nucleobases and nucleotides, **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 90, p. 97–105, 2002.

HOWELL, W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: al-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JIANG, W.; LIU, D.; HOU, W. Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.). **Bioresource Technology**, v. 76, p. 9–13, 2001.

JONAK, C.; NAKAGAMI, H.; HIRT, H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3276–3283, 2004.

KARPOVA, S.S.; KALAEV, V.N.; ARTYUKHOV, V.G.; TROFIMOVA, V.A.; OSTASHKOVA, L.G.; SAVKO, A.D. The use of nucleolar morphological characteristics of birch seedlings for the assessment of environmental pollution. **Ecology**, v. 33, p. 73-80, 2006.

KHAIDAROVA, T.G.; KALASHNIK, N.A. Nucleolar organizers of chromosomes as adaptative elements of conifer species. **Tsitologiya**, v. 41, p. 1086, 1999.

KHORA, S.S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Genotoxicity of tetrodotoxin from puffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. **Mutagenesis**, v. 12, p. 265–269, 1997.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Nucleolar size and the activity of rRNA transport in the course of morphogenetic reduction of cell dimensions. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 135-144, 1985a.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Functional and structural heterogeneity of nucleoli: the dependence of the activity of transport of newly synthesized rRNA on nucleolar size and phase of the cell cycle. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 117-126, 1985b.

LAZAREVA, E.M. **Dynamics of the nucleolus in the cell cycle of diploid and polyploidy cells from different tissues of wheat *Triticum aestivum***. Dissertation, Moscow University, Moscow, 1999.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v.650, p. 80-86, 2008.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in water impacted by na oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LIN, AI-JUN, XU-HONG, ZHANG, MEI-MEI, CHEN, QING, CAO. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. **Journal Environmental Science**, v. 19, p. 596–602, 2007.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. **Environmental Research**, v.88, p. 30-35, 2002.

MARTINEZ, V.; CREUS, A.; VENEGAS, W.; ARROYO, A.; BECK, J.P.; GEBEL, T.W., SURRALLES, J.; MARCOS, R. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. **Mutation Research**, v. 564, p. 65–74, 2004.

MARTINI, G.; FLAVELL, R.B. The control of nucleolus volume in wheat: a genetic study at three developmental stages. **Heredity**, v. 54, p. 111-120, 1985.

MASCHIO, L.R.; SUCCI, M.; CORREIA, T.F.V.B.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to water samples contaminated by pollutants. Anais do XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, São Paulo, p. 204-204, 2008.

MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca - SP.** Dissertação para a obtenção de título de doutor em Genética – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p.77-85, 2005.

MELLINK, C.H.; BOSMA, A.A, DE HAAN, N.A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas**, v. 120, p. 141-149, 1994.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. The feulgen reaction. **Ciência e Cultura**, v. 30, p.665–676, 1978.

MENG, Z.; YI, H. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.

MILLER, O.L. The nucleolus chromosomes and visualization of gene activity. **Journal Cell Biology**, v. 91, p. 15-27, 1891.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v.39, p.317-321, 1997.

MISRA, R.R.; SMITH, G.T.; WAALKES, M.P. Evaluation or the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. **Toxicology**, v. 126, p. 103–114, 1998.

MISRA, U.K.; GAWDI, G.; PIZZO, S.V. Induction of mitogenic signalling in the 1LN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium+. **Cellular Signalling**, v. 15, p. 1059–1070, 2003.

MURATOVA, E.N.; SEDEL'NIKOVA, T.S. Structural rearrangements of chromosomes and polymorphism of nucleolar regions as factors of resistance of coniferous species to extreme forest conditions, in *Metody otsenki sostoyaniya i ustoichivosti lesnykh ekosistem (Methods for Evaluation of Forest Ecosystem Status and Stability)*, p. 116-117, 1999.

PANDA, B.B.; PANDA, K.K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. In: PRASAD, M.N.V., Strza\_ka, K. (Eds.), **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**, p. 395–414, 2002.

PANZERA, F.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; CUADRADO, A.; SHAW, P.J.; BEVEN, A.F.; CÁNOVAS, J.L.; DE LA TORRE, C. Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* chromosomes. **Chromosoma**, v. 105, n.1, p. 12-19, 1996.

PASCALICCHIO, A.E. Contaminação por metais pesados. Ed. Annablume, São Paulo/SP, 132p., 2002.

POPP, W.; WACHTLER, F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes. **Cell Tissue Research**, v. 234, p. 377-388, 1983.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, p. 525-545, 1995.



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

RAWLINS, D.J.; SHAW, P.J. Three-dimensional organization of ribosomal DNA in interphase nuclei of *Pisum sativum* by in situ hybridization and optical tomography. **Chromosoma**, v. 99, p. 143-151, 1990.

RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J. The nucleolar structure in plant cells. **Revisiones Sobre Biología Celular**, v. 7, p. 1-140, 1986.

RUSCHOFF, J.; ELSASSER, H.P.; ADLER, G. Correlation of nucleolar organizer regions with secretory and regenerative process in experimental cerulein-induced pancreatitis in the rat. **Pancreas**, v. 11, p. 154-159, 1995.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-79, 1996.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 711-716, 2008.

SHERUDILO, A.I.; SEMESHIN, V.F. Certain patterns of nucleolar fusion in the interphase nucleus. **Genetika**, v. 5, n. 4, p. 65-72, 1969.

SOBOL', M.A. The role of the nucleolus in plant cell responses to environmental physical factors. **Cytology Genetics**, v. 35, p. 72-84, 2001.

ÜNYAYAR, S.; ÇELİK, A.; ÇEKİÇ, F.; GÖZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 77-81, 2006.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 284-291, 2002.

VON ZGLINICKI, T.; EDWALL, C.; OSTLUND, E.; LIND, B.; NORDBERG, M.; RINGERTZ, N.R.; WROBLEWSKI, J. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth, **Journal Cell Science**, v. 103, p. 1073–1081, 1992.

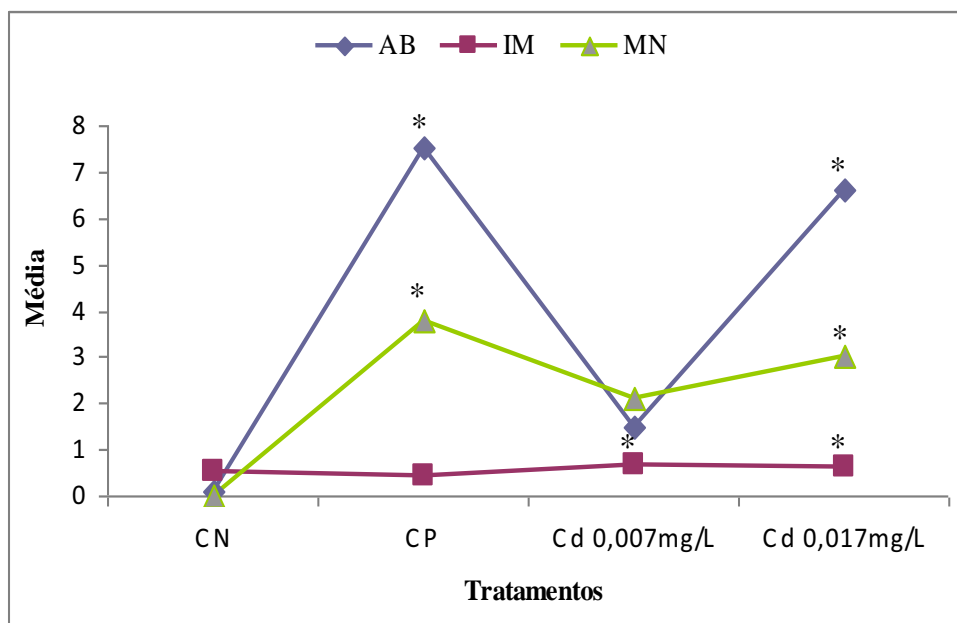
ZHANG, Y.X. e YANG, X.L. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, v. 312, p. 121–126, 1994.

YI, H.; LIU, J.; ZHENG, K. Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 62, p. 421–426, 2005.

WATANABLE, M.; SUZUKI, T. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C—Toxicology Pharmacology*, v. 4, p. 491–500, 2002.

WACHTLER, F.; SCHWARZACHER, H.G.; SMETANA, K. On the fusion of nucleoli in interphase. **Journal Cell Biology**, v. 34, p. 190-192, 1984.

WIERZBICKA, M.; ANTOSIEWICZ, D. How lead can easily enter the food chain: a study of plant roots. **Science Total Environmental Supply - Part 1**, p.423– 429, 1993.



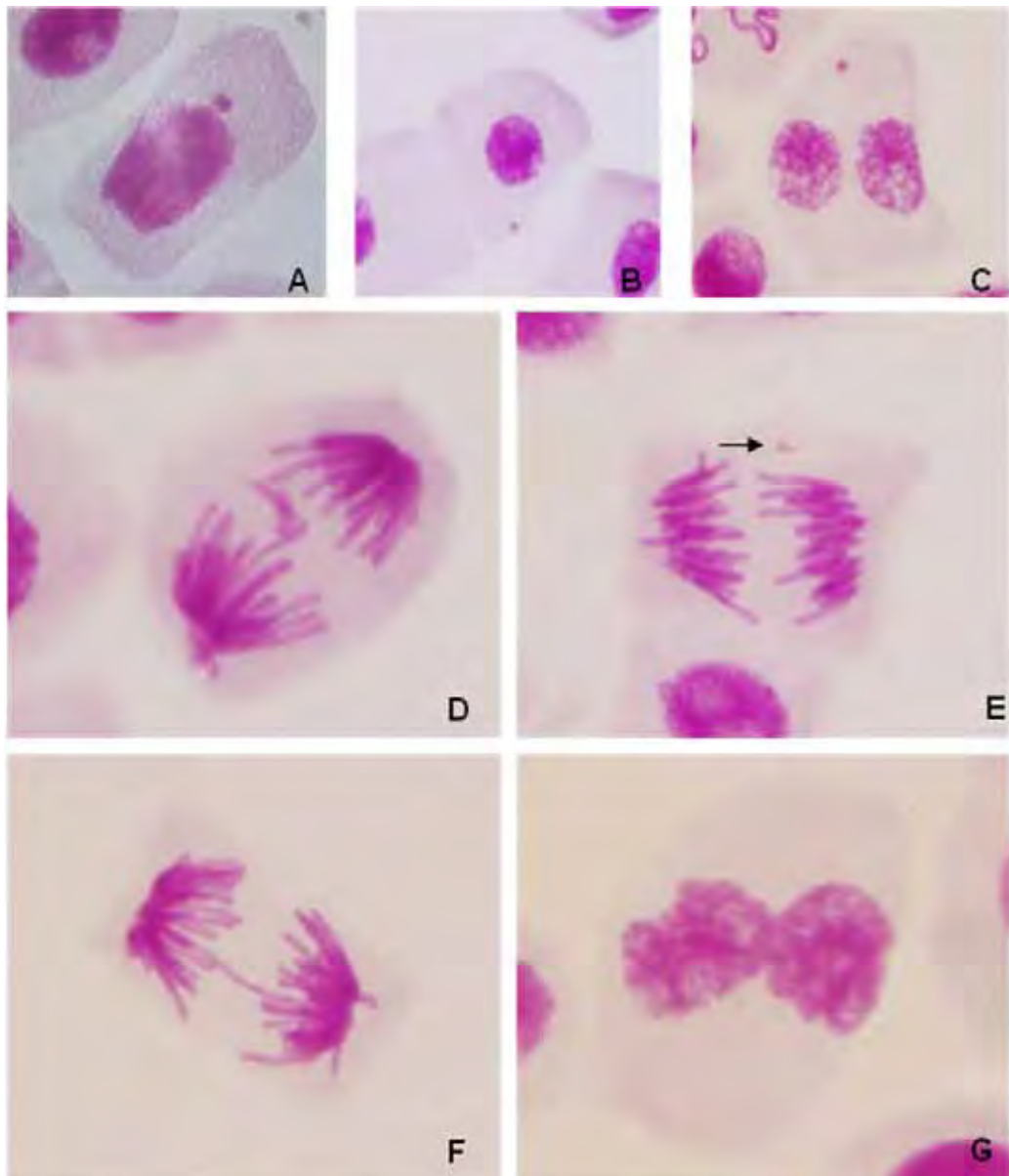
\* Significativo para  $p < 0,05$  de acordo com o teste Kruskal-Wallis; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

**Figura 1:** Médias das aberrações cromossômicas (AB), micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM), observados em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento com duas concentrações de cádmio (Cd).

**Tabela 1:** Médias e desvio-padrão obtidos dos efeitos citotóxicos (IM), genotóxicos (AC) e mutagênicos (MN) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento com duas diferentes concentrações de cádmio.

	IM	AC	MN
<b>Controle negativo</b>	0,54 ± 0,09	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00
<b>Controle positivo</b>	0,43 ± 0,07	7,5 ± 1,58*	3,8 ± 1,13*
<b>Cd 0,007mg/L</b>	0,67 ± 0,07*	1,5 ± 1,05	2,1 ± 2,18
<b>Cd 0,017mg/L</b>	0,60 ± 0,08*	6,6 ± 5,08*	3,0 ± 1,63*

Análise de 5000 células por tratamento. Média ± Desvio-padrão. \* Significativo para  $p < 0,05$  de acordo com o teste Kruskal-Wallis. **IM:** Índice mitótico; **AC:** Aberrações cromossômicas; **MN:** Célula com micronúcleo.

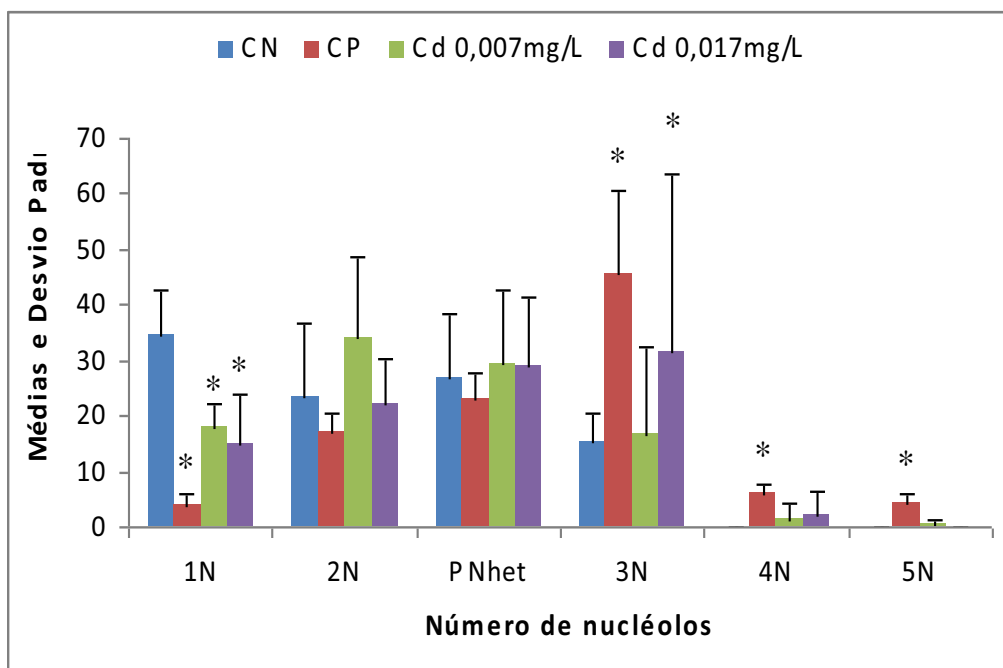


**Figura 2:** Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento em duas concentrações de cádmio. A. Controle positivo; B a G. Concentrações testadas. A e B. Células micronucleadas; C. Célula binucleada com micronúcleo; D. Anáfase com perda cromossômica; E. Quebra cromossômica (seta); F. Anáfase com ponte cromossômica; G. Célula binucleada. Aumentos: 1000X

**Tabela 2:** Médias e desvio-padrão, referentes aos tamanhos dos micronúcleos encontrados para duas concentrações testadas de cádmio.

Micronúcleo	Cádmio 0,007mg/L	Cádmio 0,017mg/L
<b>Maior</b>	0,8 ± 1,03	1,5 ± 0,85
<b>Menor</b>	1,2 ± 1,55	1,7 ± 1,57

Média ± Desvio-padrão.



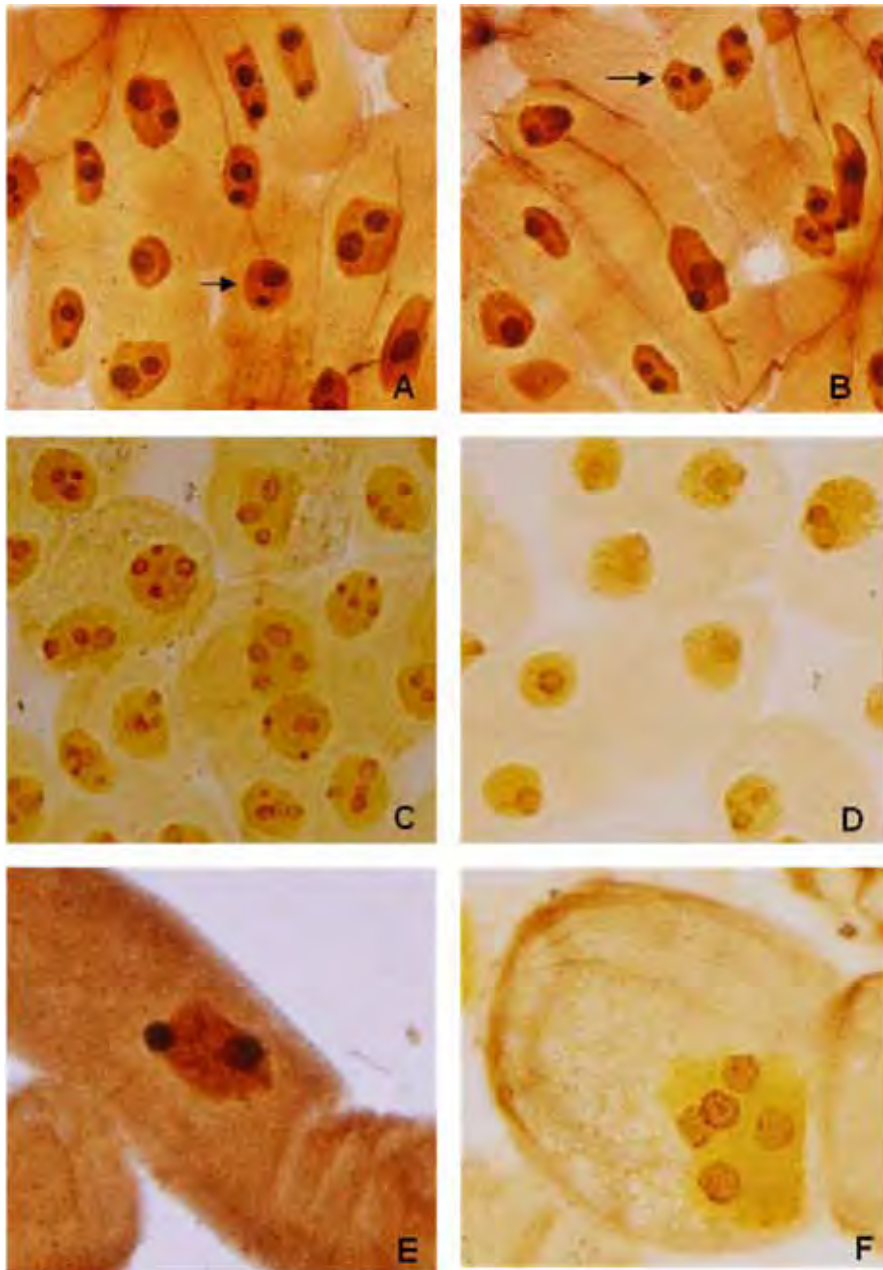
\* Significativo para  $p < 0,05$  de acordo com o teste Kruskal-Wallis; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

**Figura 3:** Médias e desvio-padrão do número de nucléolos em células de *Allium cepa*, expostas a duas diferentes concentrações de cádmio (Cd).

**Tabela 3:** Médias e desvio-padrão do número de nucléolos e da área de nucléolos único de células de *Allium cepa*, após exposição das radículas a duas diferentes concentrações de cádmio (Cd).

	CN	CP	Cd 0,007mg/L	Cd 0,017mg/L
<b>A</b>	1652,42 ± 992,68	2035,53 ± 1089,74*	1734,05 ± 1123,83	1786,69 ± 983,80
<b>1N</b>	34,4 ± 8,33	4,0 ± 2,16 *	18,1 ± 4,07*	14,9 ± 9,15*
<b>2N</b>	23,3 ± 13,44	17,0 ± 3,62	34,3 ± 14,32	22,1 ± 8,05
<b>2N-PNhet</b>	27,0 ± 11,35	23,0 ± 4,83	29,5 ± 13,09	29,0 ± 12,47
<b>3N</b>	15,3 ± 5,05	45,7 ± 14,83 *	16,5 ± 15,81	31,7 ± 31,93*
<b>4N</b>	0,0 ± 0,00	5,8 ± 2,09 *	1,3 ± 3,09	2,3 ± 4,03
<b>5N</b>	0,0 ± 0,00	4,3 ± 1,49 *	0,3 ± 0,95	0,0 ± 0,00

Análise de 1000 células por tratamento. Média ± Desvio-padrão. \* Significativo para  $p < 0,05$ , de acordo com o teste Kruskal-Wallis. **CN:** Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo; **A:** Área do nucléolo ( $\mu\text{m}^2$ ); **1N:** Núcleo com um nucléolo; **2N:** Núcleo com um par de nucléolos homomórficos; **2N-PNhet:** Núcleo com um par de nucléolos heteromórficos; **3N:** Núcleo com três nucléolos; **4N:** Núcleo com quatro nucléolos; **5N:** Núcleo com cinco nucléolos.



**Figura 4:** Alterações nucleolares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento em duas diferentes concentrações de cádmio. A – C e E –F. Concentrações testadas; D. Controle negativo. A. Células com nucléolos heteromórficos (seta); B. Célula com núcleos homomórficos (seta); C. Núcleos com três e quatro nucléolos; D. Células com um e dois nucléolos; E. Nucléolos heteromórficos; F. Núcleo com cinco nucléolos. Aumentos: A-D: 400X; E-F: 1000X.

## **ANEXO 2B**

### **EFEITOS DO CHUMBO (Pb), AVALIADOS POR MEIO DE INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, MICRONÚCLEOS E CARACTERÍSTICAS NUCLEOLARES QUANTITATIVAS, NO SISTEMA- TESTE DE *ALLIUM CEPA***

Maysa Succi<sup>1</sup>, Lucilene Regina Maschio<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>, Maria  
Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto, São  
Paulo, Brasil

<sup>2</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de  
Biociências (IB-UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.



## **Resumo**

Nos últimos anos, a emissão de metais pesados no ambiente tem aumentado, causando impactos severos para o ecossistema e graves comprometimentos à saúde humana. Testes utilizando vegetais superiores constituem ensaios muito sensíveis e confiáveis para o monitoramento ambiental dos potenciais genotóxico, citotóxico e mutagênico dessas substâncias. O presente estudo avaliou a potencialidade do chumbo (Pb) em induzir alterações no material genético de células meristemáticas de *Allium cepa*, expostas a duas diferentes concentrações de chumbo (0,025mg/L e 0,034mg/L). Também foram realizadas observações da atividade mitótica (índice mitótico), anormalidades no ciclo celular, bem como características nucleolares quantitativas (número de nucléolo por célula, área de nucléolos únicos e a quantidade de células com heteromorfismo nucleolares - PNhet). Nossos resultados mostraram que ambas as concentrações testadas levaram a um aumento do índice mitótico, de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, quando comparado com o controle negativo. Em relação às características nucleolares, foi observado um aumento significativo da área dos nucléolos de células expostas à maior concentração do chumbo. Por outro lado, um decréscimo estatisticamente significativo da área nucleolar foi observado para a menor concentração. Nossos dados mostram, para as duas concentrações testadas, uma diminuição no número de células contendo um único nucléolo, assim como um aumento de células com PNhet, com três e com quatro nucléolos, para a maior concentração testada. Pelos resultados obtidos, podemos inferir que o chumbo exerceu uma ação tóxica sobre o mecanismo de divisão celular, que, provavelmente, pode levar a um efeito irreversível para as células afetadas.

**Palavras-chave:** Chumbo (Pb); *Allium cepa*; Aberrações Cromossômicas, Micronúcleo, Nucléolo.

## 1. Introdução

Nos últimos anos, a emissão de metais pesados no ambiente tem aumentado causando impactos severos para o ecossistema e grave comprometimento à saúde humana, devido ao seu potencial mutagênico. Metais pesados são introduzidos no ambiente por meio de várias atividades humanas, especialmente aquelas relacionadas com a indústria, a produção de energia, o transporte, a mineração e a agricultura (OHE et al., 2004; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005).

O risco potencial de metais pesados sob a saúde humana e sob o ambiente há vários anos, tem estimulado pesquisadores a investigar os efeitos destes químicos sob o material genético de organismos expostos, usando como ferramenta de investigação avaliações citogenéticas (BAUCHINGER et al., 1976; LERDA, 1992; GABARA et al., 1995; DOVGALYUK et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006). Alguns metais pesados induzem, comprovadamente, a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos, eventualmente, expostos (SUNDERMAN, 1984; FRIBERG et al., 1985; WISE et al., 2004). As contaminações por metais pesados mais observadas no ambiente são aquelas causadas por alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, níquel, mercúrio e cromo (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005).

O chumbo é um metal pesado que tem causado uma crescente poluição ambiental (HALL, 2002), sendo considerado extremamente tóxico para humanos (WIERZBICKA, 1999), cuja toxicidade também tem sido comprovada para diversas plantas (LERDA, 1992; ARAMBASIC et al., 1995; JIANG; LIU, 2000; PATRA et al., 2004; WIERZBICKA et al., 2007).

Plantas superiores constituem um importante material para ensaios citogenéticos realizados com o intuito de monitorar os poluentes ambientais. Vegetais superiores, incluindo *Allium cepa*, são conhecidos como excelentes bioindicadores para se determinar efeitos citotóxico, mutagênico e genotóxico de químicos ambientais, incluindo metais pesados (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ, 1988; STEINKELLNER et al., 1998).

Grant (1982) e Chauhan et al. (1999) descreveram *A. cepa* como um eficiente sistema teste, rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de

químicos no ambiente, devido à sua sensibilidade e boa correlação com o sistema teste de mamíferos. Contudo, *A. cepa* é um organismo teste eficaz para o monitoramento ambiental, especialmente em ambiente aquático (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Testes de aberrações cromossômicas, utilizando-se *A. cepa* como organismo teste, foram padronizados por Fiskesjö (1985), mas são realizados desde o final da década de 30. Esses testes constituem um ensaio muito sensível e confiável para o monitoramento ambiental. O teste é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas em espécies do gênero *Allium*, por meio do registro de atividade mitótica (índice mitótico) e anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes dessas plantas (VIDAKOVIĆ-CIFREK, 2002).

Outro teste também utilizado nos últimos anos para avaliação da toxicidade de poluentes ambientais, inclusive dos metais pesados, tem como parâmetro características nucleolares quantitativas (CALIN; DRAGOMIR, 1980; GABARA et al., 1995; ARKHIPCHUK, 1995a; ARKHIPCHUK, 1995b; ARKHIPCHUK et al., 2000). Diversos estudos, utilizando várias técnicas, demonstram que as características morfológicas nucleolares são importantes indicadores de processos genéticos e moleculares, e são utilizados como marcadores do metabolismo celular (CHENTSOV, 1978; CHELIDZE, 1985; ROMANENKO et al., 1992). O teste nucleolar tem se mostrado mais sensível a diferentes efeitos negativos que outros métodos citogenéticos (ARKHIPCHUK et al, 2000).

O nucléolo pode sofrer uma desorganização na sua estrutura e um desequilíbrio da sua atividade, quando em condições de estresse (GABARA et al., 1995), quando, por exemplo, estão sob a ação de drogas (BUSH; SMETANA, 1970), de metais pesados (ARKHIPCHUK et al., 2000) e de diferenças de temperatura (FRANSELOT et al., 1979; GABARA, 1980; SATO; KURIHARA, 1986). Nessa organela, genes de DNA ribossomal são transcritos em RNA ribossomal e, mais tarde, processados e empacotados em subunidades ribossomais (MILLER, 1981; RISUEÑO; MEDINA, 1986). Seu tamanho, geralmente, indica o estado funcional da célula, mas também pode refletir o grau de coordenação de todos os processos que afetam o acúmulo das

subunidades ribossomais dentro do nucléolo (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985a; KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985b; HERNANDEZ-VERDUN, 2006b).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de diferentes concentrações de chumbo (Pb), sobre células meristemáticas de *Allium cepa*, por meio do teste de aberrações cromossômicas, teste do micronúcleo e também de características nucleolares quantitativas,.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material Biológico**

O material biológico utilizado nesse estudo para se avaliar o possível efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico das diferentes concentrações de chumbo, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ( $2n = 2X = 16$  cromossomos) de uma única variedade (Baia Periforme) e de um mesmo lote, o que evitou diferentes respostas durante o desenvolvimento dos bioensaios.

### **2.2. Bioensaio**

Sementes de *A. cepa* foram colocadas para germinar em duas diferentes concentrações de chumbo (0,025mg/L e 0,034mg/L), em água pura (controle negativo) e em uma substância reconhecidamente aneugênica (Trifluralina - controle positivo), em placas de Petri contendo aproximadamente 100 sementes cada e sempre em temperatura ambiente. As concentrações utilizadas no presente estudo foram baseadas em análises químicas realizadas em amostras de água de um recurso hídrico contaminado com este metal e que foi investigado por Maschio et al. (2008).

Após a germinação, quando as raízes atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, cerca de cinco dias após o início do experimento, elas foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 ácido acético – v:v) por um período de 24 horas.

#### **2.2.1. Indução de efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico**

Para análise do índice mitótico, de aberrações cromossômicas e de células micronucladas, as radículas fixadas foram submetidas à reação de Feulgen (Mello;

Vidal, 1978, com modificações), que compreendeu duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e a exposição pelo reagente de Schiff, por 2 horas, em local escuro. No preparo das lâminas, as pontas das raízes foram seccionadas para extração de suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração das células, foi adicionado aos meristemas uma gota de carmim-acético (2%). O material foi recoberto com lamínula onde, com o auxílio de um estilete de madeira, fez-se uma leve pressão, para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina, sem prejuízo das análises. O material foi analisado ao microscópio de luz, com aumento de 400 vezes.

Foram analisadas células em intérfase e em divisão, para posterior cálculo do índice mitótico, assim como células portadoras de aberrações cromossômicas, como anáfases anormais (com ponte e multipolar), bem como perdas e fragmentos cromossômicos, células micronucleadas e células binucleadas. Os diferentes tamanhos dos micronúcleos encontrados também foram observados. Para todas as categorias analisadas, foram contabilizadas cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, obtidas de um total de 10 lâminas. Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **2.2.2. Parâmetros nucleolares**

Para análise das características nucleolares (número de nucléolo por célula, a área de um único nucléolo e a quantidade de células apresentando um par de nucléolo heteromórfico - PNhet), as radículas fixadas foram submetidas à técnica de impregnação por íons prata - AgNOR (Howell e Black, 1980, com modificações), que compreende duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 1M a 60° C, durante 11 minutos e, posteriormente, submetidas a impregnação por íons prata. As pontas das raízes foram seccionadas, em lâmina, para extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a fixação das células, foi adicionada uma gota de ácido acético 45%. O material foi recoberto por lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina.

O número de nucléolos, entre 1000-1300, foi contabilizado em células interfásicas, por microscopia de luz, em aumento de 1000x. A área de um único nucléolo foi medida em 200 células de cada tratamento, usando o sistema IMAGE J – *Image Processing and Analysis in Java*. Versão 1.4 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As células que apresentaram um número par de nucléolos tiveram uma análise adicional, onde os nucléolos foram classificados em homomórficos (tamanho aproximadamente igual entre eles) e heteromórficos - PNhet (tamanho diferente). Os dados foram comparados, usando o teste Kruskal-Wallis, em um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

As análises microscópicas dos meristemas radiculares de *A. cepa*, após o tratamento com ambas as concentrações de chumbo (0,025mg/L e 0,034mg/L) indicaram um aumento do índice mitótico e do número de micronúcleos, assim como a presença de células aberrantes, portadoras de alterações cromossômicas. Na tabela 1 e Figura 1 estão apresentados o índice mitótico (IM), as médias das alterações cromossômicas (AC: anáfases com ponte; anáfase multipolar; perdas de cromossomos inteiros; quebras cromossômicas e células binucleadas) e o número de micronúcleos (MN) encontrados em cada concentração testada.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) dos valores obtidos para o índice mitótico nas duas concentrações testadas, quando comparados ao controle negativo (Tabela 1 e Figura 1).

Na avaliação do potencial genotóxico, foram observadas células portadoras de anáfase com ponte (Fig. 2F), anáfase multipolar (Fig. 2E), perdas de cromossomos inteiros (Fig. 2H-I), quebra cromossômica (Fig. 2D) e células binucleadas (Fig. 2G). Célula com quebra cromossômica foi visualizada em apenas uma célula tratada com a menor concentração (Figura 2D), não sendo este resultado estatisticamente significativo. A concentração de Pb 0,025mg/L mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de aberrações cromossômicas, quando comparada com o controle negativo (Tabela 1 e Fig. 1).

Células micronucleadas (Fig. 2A-C) tiveram um aumento significativo nas duas concentrações de chumbo analisadas (0,025mg/L e Pb 0,034mg/L), quando comparadas com o controle negativo (Tabela 1 e Fig. 1). A maior parte dos micronúcleos encontrados em células tratadas com as duas concentrações de chumbo foi de tamanho relativamente pequeno, diferentemente dos observados para o controle positivo (Tabela 2).

Em relação às características nucleolares, foram observadas mudanças na área e no número de nucléolos (Figura 3 e Tabela 3). Na concentração de 0,025mg/L foi verificada uma diminuição significativa na área nucleolar (Tabela 3).

Na concentração de 0,034mg/L foi observado um aumento significativo do número de células com PNhet, três e quatro nucléolos (Tabela 3). O aumento na área nucleolar das células tratadas com essa concentração mostrou valores significativos, quando comparado com o controle negativo (Tabela 3 e Figura 3H). Também foi possível observar uma redução estatisticamente significativa da proporção de células com um único nucléolo (Tabela 3).

#### **4. Discussão**

O problema da genotoxicidade causada pelos metais pesados tem adquirido novas dimensões com o advento da era industrial. Esses chegam à biosfera através do ar, da água e do solo. Os metais são essenciais para a manutenção e evolução de todas as formas de vida, pois medeiam os estágios de disseminação da informação genética por meio do código genético. Ao mesmo tempo, os mesmos metais podem, quando presentes em excesso, ou em condições e lugares inapropriados, produzirem erros no sistema de informação genética (PATRA et al., 2004).

O efeito do chumbo sobre as células é dependente da concentração utilizada, tipo de sais associados, propriedades do solo e da espécie envolvida. Em geral, os efeitos são mais severos em altas concentrações e em longo período de exposição (PATRA et al., 2004).

Segundo Wierzbicka (1999), a redução do número de células em divisão, na presença de metais, é resultado de distúrbios do ciclo celular, decorrente do

prolongamento do evento de divisão. Por exemplo, em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com chumbo, o ciclo celular foi alongado por 8,5 h quando comparado com controle negativo. Este aumento do ciclo mitótico deu-se, principalmente, pela prolongação da fase S (WIERZBICKA, 1999).

O índice mitótico reflete a frequência de divisão das células e é considerado um importante parâmetro na determinação da taxa do crescimento da raiz (JIANG e LIU, 2000). Índices mitóticos menores que o controle negativo podem indicar que o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos foram afetados pelos compostos testados. Por outro lado, índices mitóticos maiores que aqueles encontrados no controle negativo são provenientes do aumento da divisão celular, que podem caracterizar um evento prejudicial às células, o que pode levar a uma proliferação descontrolada e posterior formação de tumor (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008).

Neste trabalho, as duas concentrações testadas mostraram valores de índices mitóticos maiores que os encontrados no controle negativo, podendo indicar que essas concentrações podem ter causado uma proliferação descontrolada de células meristemáticas de *A. cepa*. Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que tais concentrações apresentam potencial citotóxico para o organismo teste *A. cepa*.

Quanto à genotoxicidade do chumbo, foi observado um aumento do número de aberrações cromossômicas como anáfase com ponte, anáfase multipolar, perdas cromossômicas e células binucleadas para as duas concentrações testadas, porém, esse resultado foi significativo somente para a maior concentração. Lerda (1992) estudando o efeito de diferentes concentrações de chumbo em células meristemáticas de *A. cepa*, observou que somente a concentração maior foi capaz de causar um aumento na frequência de aberrações cromossômicas.

Pelos resultados obtidos, foi observado um aumento no número de células portadoras de MN, para as duas concentrações testadas. Contudo, a maior parte dos MN apresentou um tamanho, relativamente, menor, quando comparados com o teste controle positivo, feito com o herbicida trifluralina, que é, segundo Fernandes et al. (2007), um químico de reconhecida ação aneugênica.



Segundo Fenech e Crott (2002), micronúcleos podem resultar de fragmentos acêntricos (agente clastogênico) ou de cromossomos inteiros (agente aneugênico) que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular. Desta maneira, uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos pode ser considerada uma substância clastogênica ou aneugênica (MENG, 2003). A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular. Já a ação aneugênica acontece pela inativação do fuso mitótico, que levará a perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula (FENECH, 2000).

Dessa maneira, pelos resultados obtidos no presente estudo, podemos inferir que o chumbo também apresenta um efeito clastogênico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*, uma vez que houve um grande número de células portadoras de micronúcleos pequenos, provavelmente decorrentes de quebras cromossômicas ocorridas durante o ciclo celular. A baixa frequência de células com quebras cromossômicas, observadas em nossas análises, pode ser explicada pela rápida descondensação do material genético das porções perdidas, levando a formação, quase que imediata, dos pequenos micronúcleos observados. Esses resultados confirmam os experimentos de Lerda (1992), no qual o chumbo induziu efeitos clastogênicos em células meristemáticas de *A. cepa*.

A função do nucléolo é produzir ribossomos, sendo que o tamanho e a forma dessa organela dependem do estado funcional celular, variando entre e intra espécies, de tecido para tecido e de célula para célula (HERNADEZ-VERDUN, 2006b). Além disso, sabe-se que o nucléolo é o centro metabólico de RNA (JIANG e LIU, 2000).

Regiões organizadoras nucleolares (RONs) são porções cromossômicas, observadas na metáfase, onde estão localizados os genes ribossomais e que correspondem às constrições secundárias. Durante a intérfase, as RONs estão localizadas nos centros fibrilares e estão, intimamente, associadas ao componente fibrilar denso do nucléolo. Estas estruturas contêm todos os componentes necessários para a síntese de rRNA e, portanto, genes para a transcrição de rRNA 18S, 5,8S e 28S, independente do local onde se encontrem nos cromossomos (SUMNER, 1990; HERNANDEZ-VERDUN, 2006a; HERNANDEZ-VERDUN, 2006b).

As características nucleolares utilizadas neste estudo podem refletir diferentes mecanismos envolvidos na regulação da atividade nucleolar, uma vez que o número de nucléolos representa o número de regiões organizadoras nucleolares ativas; o tamanho do nucléolo mostra a atividade transcricional dessas regiões e a porcentagem de PNhet caracteriza o mecanismo específico de regulação da atividade das células com nucléolo duplo (ARKHIPCHUK e PALAMARCHUK, 1997).

As células telofásicas de *A. cepa* apresentam dois e, eventualmente, três nucléolos, que, durante a intérfase, podem permanecer distintos ou se fundirem, formando uma estrutura única (CHOUINARD; LABLOND, 1967; PANZERA et al., 1996). Nessa espécie, cinco RONS estão presentes nos nucléolos das células, sendo uma do telômero do braço longo do cromossomo 8, no qual não existe constrição secundária, e as outras quatro da região satélite do cromossomo 6 (PANZERA, 1996).

Nossos resultados mostraram que as concentrações de chumbo, testadas neste estudo, induziram mudanças significativas na área nucleolar, porém, distintas entre as concentrações. A concentração de 0,025mg/L apresentou uma área nucleolar menor, quando comparada com o controle negativo, enquanto que a concentração maior causou um aumento da área do nucléolo.

De acordo com Chelidze e Zatssepina (1998) e Sobol' (2001), o aumento no tamanho do nucléolo pode ser resultado da amplificação dos genes ribossomais e/ou de sua alta atividade transcricional, devido à presença de fatores externos como, por exemplo, alguns metais pesados, drogas, temperatura (KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985a; KWIATKOWSKA; MASZEWSKI, 1985b; KARPOVA et al., 2006). Em contra partida, esses mesmos fatores podem promover a diminuição do tamanho nucleolar, que pode estar relacionada à inibição do processo de acúmulo das subunidades ribossomais na célula, devido à expulsão do material nucleolar do núcleo para o citoplasma (WILLIAMS; JORDAN, 1980; JENNANE et al., 1987; MORENO et al., 1989; JIANG; LIU, 2000).

Gabara et al. (1995), analisando células meristemáticas de *Pisum sativum* L., observaram que o tamanho do único nucléolo da célula aumentou, após o tratamento com chumbo e cádmio. Experimentos com células meristemáticas de *A. cepa*,

realizados por Fiskesjö (1983), também revelaram mudanças no volume nucleolar devido à ação de metal pesado, no caso, o alumínio.

O número de nucléolos por célula corresponde ao número de região organizadora nucleolar ativa e, objetivamente, caracteriza a atividade proliferativa da célula (LEEK et al., 1991; MAMAEV; MAMAEVA, 1992; RUSCHOFF et al., 1995). Alguns autores acreditam que o aumento ou a diminuição no número de nucléolo por célula esteja relacionado com características adaptativas de certas plantas em condições de estresse (MURATOVA; SEDEL'NIKOVA, 1999; KHAIDAROVA, 1999; KARPOVA et al., 2006).

No presente estudo na concentração de 0,034mg/L foi verificado um aumento significativo de células com PNhet, três e quatro nucléolos e uma diminuição significativa de células contendo um e dois nucléolos homomórficos, quando comparadas com o controle negativo. Células de *Pisum sativum* L, expostas ao chumbo, apresentaram uma maior porcentagem de células com três nucléolos (GABARA et al., 1995).

A fusão de nucléolos no núcleo em intérfase está fortemente correlacionada com a atividade metabólica das células (POPP; WACHTLER, 1983; WACHTLER et al., 1984). O Pb pode ter ocasionado um aumento descontrolado do número de centros ativos de síntese de RNA ribossomal, causando um aumento do número de nucléolos, impedindo a fusão do material nucleolar nessas células. O CN, no entanto, apresentou um maior número de células portadoras de nucléolos únicos.

Dessa forma, nossos resultados sugerem que as diferentes concentrações de chumbo exerceram uma ação tóxica sobre as células meristemáticas de *Allium cepa*, uma vez que aberrações cromossômicas e alterações nucleolares são sinais evidentes da ação tóxica de químicos, sobre o material genético de organismos expostos, o que, provavelmente, pode levar a um efeito irreversível para a célula.

## Referências Bibliográficas

ARAMBASIC, M.B.; BJELIC, S.; BAKOV, G.; Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidum sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. **Water Research**, v. 29, p. 497-403, 1995.

ARKHIPCHUK, V.V. Changes in the nucleolar characteristics in fish embryo cells under the action of low doses of radiation, **Radiatsionnaia Biologiya Radioecologiya**, v. 35, p.512-517, 1995a.

ARKHIPCHUK, V.V. The use of nucleolar characteristics in biotesting. **Tsitologiya i Genetika**, v. 29, p. 12, 1995b.

ARKHIPCHUK, V.V.; PALAMARCHUK, J.V. **Cytobios**, v. 88, p. 229-238, 1997.

ARKHIPCHUK, V.V.; MALINOVSKAYA, M.V. GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* cells. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338-344, 2000.

BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; EINBRODT, H.J.; DRESP, J. Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. **Mutation Research**, v. 40 (1), p. 57-61, 1976.

BORBOA, L.; De La Torre, C. The genotoxicity of Zn (II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells, **New Phytology**, v. 134, p. 481-486, 1996.

BUSH, H.; SMETANA, K. The nucleolus. **Academic Press**, New York, London, p. 472-510, 1970.

CALIN, D.; DRAGONMIR, C.T. Chromatin structure, number, volume and position of nucleoli in rat hepatocyte after treatment with benzo(a)pyrene and N-acetylaminoflourene. **Neoplasma**, v. 27, p. 549-555, 1980.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, n. 5, p.722-725, 2008.

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

CHENTSOV, Y.S. General cytology. Moscow: Moscow State University, p. 344, 1978.

CHELIDZE, P.V. Ultrastructure and function of a nucleolus in interphase cell. Tbilisi, Georgia: Metzniereba, p. 119, 1985.

CHELIDZE, P.V.; ZATSEPINA, O.V.; Morphofunctional system of nucleoli. **Uspekhi Sovremennoĭ Biologii**, v. 105, p. 252-268, 1988.

CHOUINARD, L.A.; LEBLOND, C.P. Sites of protein synthesis in nucleoli of root meristematic cells of *Allium cepa* as shown by radioautography with [3H] arginine. **Journal Cell Science**, v. 2, p. 473-70, 1967.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME Ya. B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, v. 27 (3), p. 193-195, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2002.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in poplyploidy cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* test. **Hereditas**, v. 64, p. 142-146, 1979.

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 508-511, 1983.

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

FISKESJÖ, G. The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

FRANSELOT, S.; DELTOUR, R.; BRONCHART, R.; VAN DE WALLE, C. Changes in ultrastructure and transcription induced by elevated temperature in *Zea mays* embryonic root cells. **Planta**, v. 146, p. 7-18, 1979.

FRIBERG, L; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Amsterdam, 1985.

GABARA, B. Effect of low temperature on the nucleolus of larkspur (*Delphinium ajacis* L.) meiocytes. **Folia Histochemica et Cytochemica**, v. 18, p. 259-266, 1980.

GABARA, B.; KRAJEWSKA, M.; STECKA, E. Calcium effect on number, dimension and activity of nucleoli in cortex cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots after treatment with heavy metals. **Plant Science**, v. 111, p. 153-161, 1995.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GULATI, A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S.P. Genotoxicity testing for relative efficiency of selected pesticides on *Allium cepa*, **Journal Environmental Biology**, v. 15, p. 89-95, 1994.

HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal Experimental Botanic**, v. 53, p. 1-11, 2002.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolus: from structure to dynamics. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 125, p. 127-137, 2006a.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, p. 135-148, 2006b.

HOWELL, W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: al-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JENNANE, A.; LANDRÉ, P.; NOUGAREDÈ, A. Nucleolus activation in pea cotyledonary buds during 24 h after decapitation of the main stem: cytochemical studies. **Protoplama**, v. 136, p. 29-36, 1987.

JIANG, W.; LIU, D. Effects of  $Pb^{2+}$  on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 6, p. 786-793, 2000.

KARPOVA, S.S.; KALAEV, V.N.; ARTYUKHOV, V.G.; TROFIMOVA, V.A.; OSTASHKOVA, L. G.; SAVKO, A. D. The use of nucleolar morphological characteristics of birch seedlings for the assessment of environmental pollution. **Biology Bulletin**, v. 33, p. 73-80, 2006.

KHAIDAROVA, T.G.; KALASHNIK, N.A. Nucleolar organizers of chromosomes as adaptative elements of conifer species. **Tsitologiya**, v. 41, p. 1086, 1999.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Nucleolar size and the activity of rRNA transport in the course of morphogenetic reduction of cell dimensions. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 135-144, 1985a.

KWIATKOWSKA, M.; MASZEWSKI, J. Functional and structural heterogeneity of nucleoli: the dependence of the activity of transport of newly synthesized rRNA on nucleolar size and phase of the cell cycle. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 23, p. 117-126, 1985b.

LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating tissues. **Journal of Pathology**, v. 165, p. 43-51, 1991.

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 281, n. 2, p.89-92, 1992.



MAMAEV, N.N.; MAMAIEVA, S.E. The structure and function of the chromosomal nucleolus organizer regions: the molecular, cytological and clinical aspects. **Tsitologiia**, v. 34, p. 3-25, 1992.

MASCHIO, L.R.; SUCCI, M.; CORREIA, T.F.V.B.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to water samples contaminated by pollutants. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, São Paulo-SP, p. 204, 2008.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p.77-85, 2005.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. The feulgen reaction. **Ciência e Cultura**, v. 30, p.665–676, 1978.

MENG, Z.; YI, H. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research** v. 537, p. 109-114, 2003.

MILLER, O.L. The nucleolus chromosomes and visualization of gene activity. **Journal Cell Biology**, v. 91, p. 15-27, 1981.

MORENO, F.J.; RODRIGO, R.M.; GARCIA-NAVARRO, F.; GARCIA-HERDUGO, G. Nucleolar components behaviour in plant cells under different physiological conditions. A morphological, cytochemical and ultrastructural study. **Biology Cell**, v. 65, p. 27-34, 1989.

MURATOVA, E.N.; SEDEL'NIKOVA, T.S. Structural rearrangements of chromosomes and polymorphism of nucleolar regions as factors of resistance of coniferous species to extreme forest conditions, in Medoty otsenki sostoyaniya i ustoychivosti lesnykh ekosistem (**Methods for Evaluation of Forest Ecosystem Status and Stability**), p. 116-117, 1999.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in the surface water: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.

PANZERA, F.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; CUADRADO, A.; SHAW, P. J.; BEVEN, A. F.; CÁNOVAS, J. L.; DE LA TORRE, C. Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* chromosomes. **Chromosoma**, v. 105, n.1, p. 12-19, 1996.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p.199-223, 2004.

POPP, W.; WACHTLER, F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes. **Cell Tissue Research**, v. 234, p. 377-388, 1983.

RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J. The nucleolar structure in plant cells. **Revisiónes Sobre Biología Celular**, v. 7, p. 1-140, 1986.

ROMANENKO, V.D.; ARKHIPCHUK, V.V.; SOLOMATINA, V.D.; MALINOVSKAYA, M.V.; MAKAROVA, T.A. Using the morphological nucleolus characteristics for estimation of metabolic processes in the fish organism. **Academic Science**, v. 326, p. 562-565, 1992.

RUSCHOFF, J.; ELSASSER, H.P.; ADLER, G. Correlation of nucleolar organizer regions with secretory and regenerative process in experimental cerulein-induced pancreatitis in the rat. **Pancreas**, v. 11, p. 154-159, 1995.

SATO, S.; KURIHARA, M. Argyrophilic nucleolus associated chromatin in epidermal cells of *Vicia faba* induced by cold treatment. **Protoplasma**, v. 133, p. 73-82, 1986.

SOBOL', M.A. The role of the nucleolus in plant cell responses to environmental physical factors. **Tsitologiya i Genetika**, v. 35, p. 72-84, 2001.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 31, p. 183-191, 1998.

SUMNER, A.T. Chromosome Banding, London: Unwin Hyman, 1990.

SUNDERMAN, J. R., F.W. Recent advances in metal carcinogenesis. **Annual Clinic Science**, v. 14, p. 93-122, 1984.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 284-291, 2002.

WACHTLER, F.; SCHWARZACHER, H.G.; SMETANA, K. On the fusion of nucleoli in interphase. **Europe Journal Cell Biology**, v. 34, p. 190-192, 1984.

WIERZBICKA, M. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. **Environmental Pollution**, v. 104 (1), p. 41-52, 1999.

WIERZBICKA, M.H.; PRZEDPEŁSKA, E.; RUZIK, R.; OUERDANE, L.; POŁEĆ-PAWLAK, K.; JAROSZ, M.; SZPUNAR, J.; SZAKIEL, A. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. **Protoplasma**, v. 231, p. 99-111, 2007.

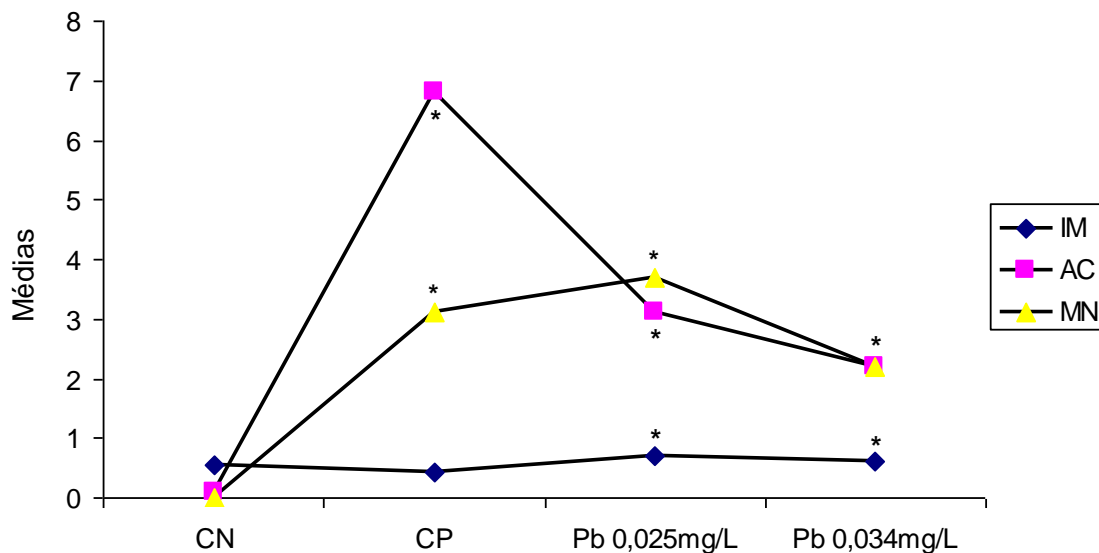
WILLIAMS, L.H.; JORDAN, E.E. Nuclear and nucleolar size changes and nuclear pore frequency in cultured explants of Jerusalem artichote tubers. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, p. 1613-1619, 1980.

WISE, S.S.; HOLMES, A.L.; KETTERER, M.E.; HARTSOCK, W.J.; FOMCHENKO, E.; KATSIFIS, S.; THOMPSON, W.D., WISE, J.P. Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate induced clastogenicity in human bronchial cells. **Mutation Research**, v. 560, p. 79-89, 2004.

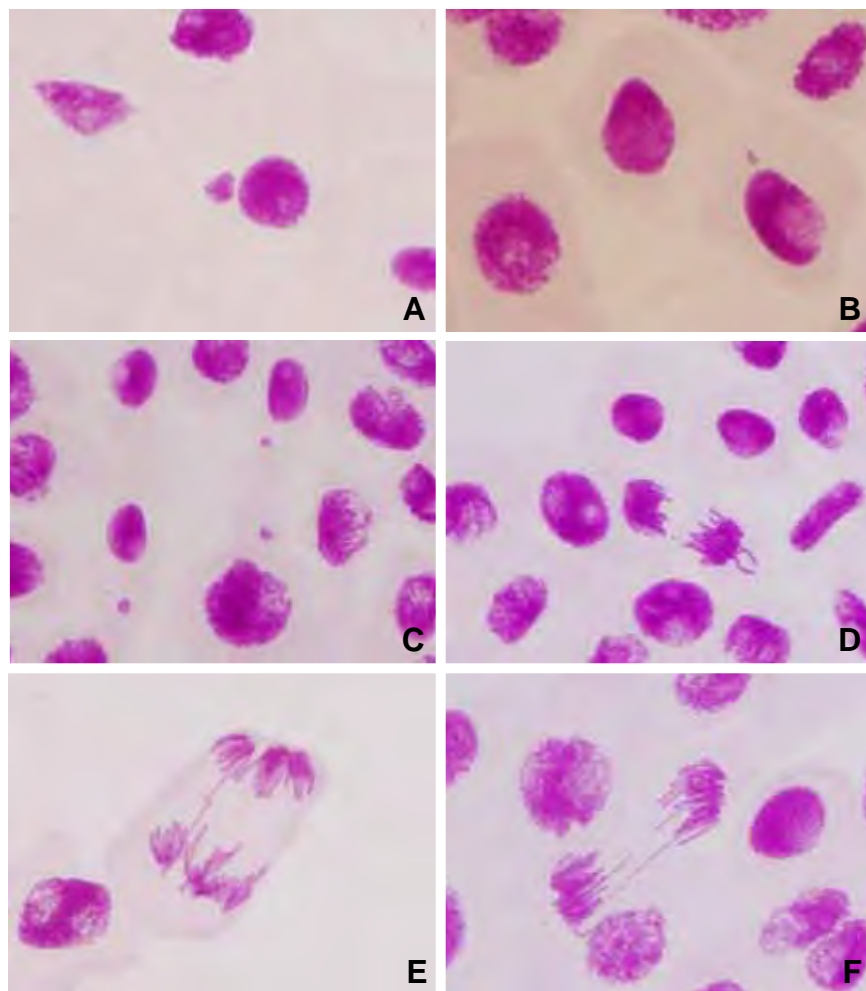
**Tabela 1:** Médias e desvio-padrão dos efeitos citotóxicos (IM), genotóxicos (AC) e mutagênicos (MN) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento com duas diferentes concentrações de chumbo.

	Controle Negativo	Controle Positivo	Chumbo 0,025mg/L	Chumbo 0,034mg/L
<b>IM</b>	0,54 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,69 ± 0,10*	0,61 ± 0,12*
<b>AC</b>	0,1 ± 0,32	6,8 ± 1,47*	3,1 ± 1,52*	2,2 ± 2,04
<b>MN</b>	0,0 ± 0,00	3,1 ± 0,87*	3,7 ± 2,67*	2,2 ± 1,62*

Análise de 5000 células por tratamento. Média ± Desvio-padrão. \* Significativo para  $p < 0,05$ , de acordo com o teste Kruskal-Wallis. **IM:** Índice mitótico; **AC:** Aberrações cromossômicas; **MN:** Célula com micronúcleo.



**Figura 1:** Médias dos efeitos citotóxicos (IM), genotóxicos (AC) e mutagênicos (MN) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após tratamento com duas diferentes concentrações de chumbo. Análise de 5000 células por tratamento. \*Significativo para  $p < 0,05$ , de acordo com o teste Kruskal-Wallis. **IM:** Índice mitótico; **AC:** Aberrações cromossômicas; **MN:** Célula com micronúcleo; **CN:** Controle negativo; **CP:** Controle positivo.



**Figura 2:** Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* após tratamento em diferentes concentrações de chumbo. A, B e C. Células micronucleadas; D. Anáfase com quebra cromossômica; E. Anáfase Multipolar; F. Anáfase com ponte cromossômica; G. Célula binucleada (seta); H e I. Anáfases com perda cromossômica. Aumentos: A, B, C, D, E, F, G, H -1000X; I – 400X.

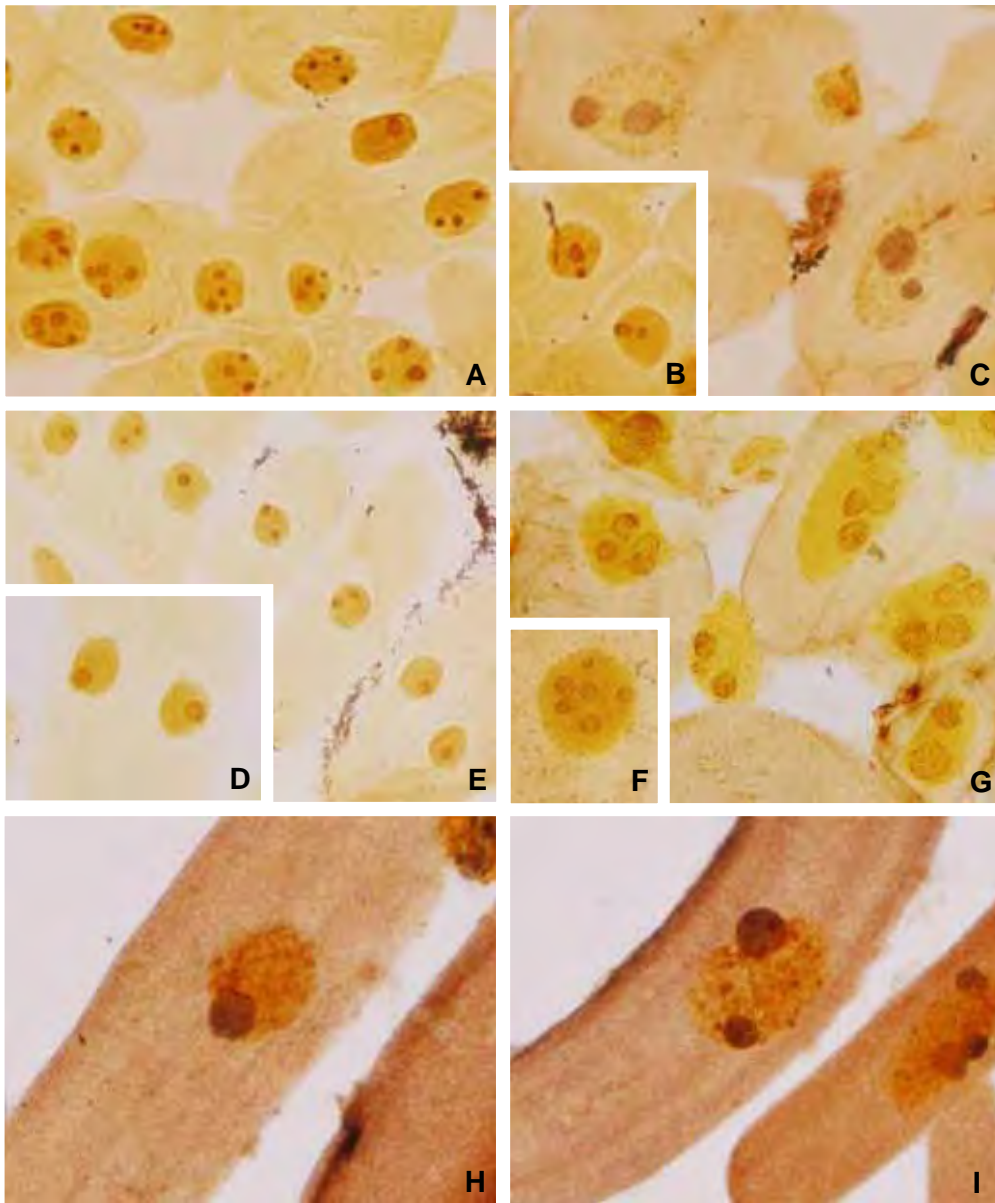
**Tabela 2:** Médias e desvio-padrão referentes aos tamanhos dos micronúcleos (MN) encontrados em cada concentração de chumbo testada.

	Chumbo 0,025mg/L	Chumbo 0,034mg/L
MN grande	1,3 ± 1,42	0,5 ± 0,71
MN pequeno	2,4 ± 1,78	1,7 ± 1,42

**Tabela 3:** Valores médios das características nucleolares em células de *Allium cepa* sob controle e condições experimentais.

	Controle Negativo	Controle Positivo	Chumbo 0,025mg/L	Chumbo 0,034mg/L
<b>A</b>	1652,42 ± 992,688	2035,53 ± 1089,74	1458,18 ± 924,557	1998,53 ± 1376,933 *
		*	*	
<b>1N</b>	34,4 ± 8,33	4,0 ± 2,16 *	30,5 ± 7,60	8,9 ± 5,34 *
<b>2N</b>	23,3 ± 13,44	17,0 ± 3,62	26,2 ± 14,72	9,5 ± 11,72 *
<b>2N-</b>	27,0 ± 11,35	23,0 ± 4,83	28,7 ± 14,92	43,1 ± 13,54 *
<b>PNhet</b>				
<b>3N</b>	15,3 ± 5,05	45,7 ± 14,83 *	13,5 ± 16,36	31,2 ± 17,76 *
<b>4N</b>	0,0 ± 0,00	5,8 ± 2,09 *	1,0 ± 1,88	7,3 ± 6,22 *
<b>5N</b>	0,0 ± 0,00	4,3 ± 1,49 *	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,00

Análise de 1000 células por tratamento. Média ± Desvio-padrão. \* Significativo para  $p < 0,05$ , de acordo com o teste Kruskal-Wallis. **A:** Área do nucléolo ( $\mu\text{m}^2$ ); **1N:** Núcleo com um nucléolo; **2N:** Núcleo com um par de nucléolos homomórficos; **2N-PNhet:** Núcleo com um par de nucléolos heteromórficos; **3N:** Núcleo com três nucléolos; **4N:** Núcleo com quatro nucléolos; **5N:** Núcleo com cinco nucléolos.



**Figura 3:** Alterações nucleolares induzidas pelo chumbo (Pb) em células meristemáticas de *Allium cepa*. A e B. Controle Negativo; C e D. Controle Positivo; E, F, G, H e I. Ação do chumbo. A. Células com um nucléolo; B. Células com um e dois nucléolos homomórficos; C. Núcleocomseis nucléolos; D. Células com dois (PNhet), três, quatro, cinco e seis nucléolos; E. Células com um, três e quatro nucléolos; F e G. Células com nucléolos heteromórficos - PNhet; H. Núcleo com um único nucléolo (concentração 0,034mg/L); I. Células com PNhet e três nucléolos (concentração 0,034mg/L). Aumentos: B, E, F - 400X; A, C, D, G, H, I - 1000X.