**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Daniel Pizzaia

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

Daniel Pizzaia
Biólogo

Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Pizzaia, Daniel

Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Daniel
Pizzaia. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2013.
97 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cromossomos - Anomalias 2. Estresse oxidativo 3. Metais pesados 4. Mutação
5. Plantas 6. Proteínas 7. Tomate 8. Toxicidade I. Título

CDD 635.642
P695g

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha mãe **Sônia** e ao meu pai **José Roberto**, por
todo incentivo e apoio, amor e dedicação, que me
possibilitaram chegar até aqui,*

DEDICO

*À minha irmã **Deise**, ao meu cunhado **Daniel** e ao
meu sobrinho **Danielzinho**, por serem pessoas
especiais em minha vida,*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, pela infraestrutura que torna a vida dos estudantes mais fácil e agradável, tais como ótimas bibliotecas, restaurante universitário de qualidade, serviços médico, odontológico, psicológico e foterapêutico, museus, herbário, centro de convivência, entre muitos outros serviços.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, do Departamento de Genética, ESALQ/USP, pela orientação e por me receber em seu laboratório, tendo me proporcionado ótimas instalações laboratoriais para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado, em momentos diferentes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por concessão de recursos para a realização deste trabalho, através do Projeto Temático intitulado “Estresse Oxidativo Induzido por Metais – Novas Abordagens”, de responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

Ao Dr. Fernando Angelo Piotto, colega de laboratório, pelo apoio e ensinamentos sobre os tomateiros.

À Dra. Salete Aparecida Gaziola, pelo apoio durante a realização da parte laboratorial deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, coordenador do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplica a Agricultura (NAP/MEPA), do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, pelo uso do microscópio de fluorescência.

*À Profa. Dra. **Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar Perecin**, do Departamento de Genética, ESALQ/USP, pelos ensinamentos na área de citogenética vegetal.*

*Aos **docentes** do Departamento de Genética, ESALQ/USP, pelos ensinamentos nas várias disciplinas cursadas.*

*Aos **funcionários** do Departamento de Genética, ESALQ/USP, pela convivência e apoio técnico.*

*Aos amigos do **Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas**, do Departamento de Genética, ESALQ/USP, e também aos que já deixaram o laboratório, em ordem alfabética, **Aline Caetano, Amerivam C. Nazareno, Berenice K. Alcantara, Daiana Schimidt, Fernando A. Piotto, Georgia B. Pompeu, Giselle de Carvalho, Jackeline P. Borges, Leila P. Peters, Lucas A. de Souza, Lucéia Borgo, Luiz Felipe Boareto, Manuela N. Dourado, Milca B. Rolão, Mônica R. Franco, Paula F. Martins, Priscila L. Gratão, Rogério F. Carvalho, Roberta C. Nogueirol, Sandra C.C. Arruda e Vanessa Rizzi**, por me acolherem de braços abertos durante a realização deste trabalho.*

*Aos amigos que de alguma forma passaram pelo Departamento de Genética, ESALQ/USP, **Millor Fernandes do Rosário, Renato Morelli Patrício, Maria Cecília Perantoni Fuchs, Larissa Mara de Andrade, Renata Fernandes, Marielle Vitti e Verônica Britto Silva**, pela maravilhosa companhia e momentos de descontração.*

*A todos os outros **amigos e colegas** do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP, pela convivência.*

*Aos ex-membros da **Associação dos Pós-graduandos da ESALQ/USP (APG-ESALQ)**, Gestão 2011-2012, à qual fiz parte, pela amizade e aprendizado profissional.*

*E a **todos** que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE PRANCHAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A importância do tomateiro.....	19
1.2 O cádmio no ambiente	20
1.3 Os efeitos do cádmio.....	23
1.4 Estresse oxidativo causado pelo cádmio.....	24
1.5 Genotoxicidade	25
Referências	28
2 CÁDMIO PROVOCA ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NO TOMATEIRO	35
Resumo.....	35
Abstract	35
2.1 Introdução	36
2.2 Material e Métodos	39
2.2.1 Material vegetal	39
2.2.2 Alterações citogenéticas em células meristemáticas de raiz.....	39
2.2.2.1 Índice Mitótico (IM)	40
2.2.2.2 Aberrações Cromossômicas (ACs)	41
2.2.2.3 Micronúcleos (Ms)	41
2.2.2.4 Anormalidades Nucleares	41
2.2.3 Documentação de imagens.....	41
2.2.4 Softwares empregados.....	42
2.2.5 Análise estatística	42
2.3 Resultados e Discussão	42
2.3.1 Índice Mitótico (IM)	42
2.3.2 Aberrações Cromossômicas (ACs)	44
2.3.3 Micronúcleos e anormalidades nucleares	50
2.4 Conclusão	51
Referências	52
3 DANOS AO DNA DO TOMATEIRO INDUZIDOS PELO CÁDMIO	59

Resumo	59
Abstract.....	59
3.1 Introdução.....	60
3.2 Material e Métodos	62
3.2.1 Material Vegetal.....	62
3.2.2 Tratamento das raízes	62
3.2.3 Ensaio de Cometa (EC)	63
3.2.3.1 Suspensão Nuclear.....	63
3.2.3.2 Preparação das Lâminas	64
3.2.3.3 Eletroforese	65
3.2.3.4 Visualização dos Cometas.....	65
3.2.3.4.1 Fixação	65
3.2.3.4.2 Coloração	65
3.2.3.4.3 Bloqueio da Coloração.....	66
3.2.3.5 Contagem e Classificação dos Cometas	66
3.2.4 Análise estatística	67
3.3 Resultados e Discussão	67
3.4 Conclusão.....	71
Referências.....	72
4 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE A ORGANIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS EM TOMATEIRO	77
Resumo	77
Abstract.....	77
4.1 Introdução.....	78
4.2 Material e Métodos	81
4.2.1 Material Vegetal.....	81
4.2.2 Tratamento com Cádmio (Cd)	81
4.2.3 Imunodeteção de α -tubulina.....	81
4.2.4 Documentação de Imagens	83
4.2.5 Softwares empregados	83
4.3 Resultados e Discussão	83
4.4 Conclusão.....	93
4.5 Considerações Finais	94
Referências.....	95

RESUMO

Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O cádmio (Cd) é um metal pesado encontrado naturalmente no meio ambiente em níveis da ordem de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. No entanto, atividades humanas têm aumentado sua concentração na biosfera, por meio de efluentes industriais não tratados. Essa elevação pode causar estresse oxidativo nas plantas, conferindo aberrações cromossômicas, danos ao DNA e alterações nos microtúbulos das células. Pesquisas têm avaliado os efeitos do Cd em diversas espécies de plantas. Entretanto, o tomateiro ainda não tem sido alvo de tais pesquisas mesmo sendo considerada uma planta modelo em outras áreas. Dessa forma, justifica-se a condução de experimentos que avaliem a genotoxicidade do Cd nesta espécie através de abordagens baseadas na citogenética. Este estudo foi conduzido para avaliar efeitos genotóxicos do Cd em células meristemáticas de raízes de tomateiro do cultivar Micro-Tom através da investigação de aberrações cromossômicas, grau de danos causados ao DNA e anormalidades das fibras do fuso mitótico e do citoesqueleto. Evidenciou-se que a partir da dose mínima de Cd empregada (variou de $0,018$ a 13 mg.L^{-1}), foram observadas aberrações cromossômicas, tais como quebras, perdas, adesões e pontes. Ainda empregando-se as mesmas doses de Cd, constataram-se danos ao DNA por meio do ensaio de cometa. Porém, de acordo com a dose de $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd, os microtúbulos de α -tubulinas sofreram modificações em sua estrutura que alteram a organização do citoesqueleto celular, do fuso mitótico e da citocinese. Em geral, o tomateiro apresentou sensibilidade em baixas concentrações de Cd, o que possibilita considerá-lo como uma importante planta modelo com potencial para estudos de genotoxicidade aplicados ao monitoramento ambiental e testes de compostos tóxicos.

Palavras-chave: Metal pesado; Toxicidade; Aberração cromossômica; Mutação; Tubulina; Planta; Estresse oxidativo

ABSTRACT

Cadmium genotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Cadmium (Cd) is a heavy metal found naturally in the environment at low levels (around 0.5 mg.L^{-1}). Some human activities have increased its concentration in the biosphere due to untreated industrial effluents. This increase may induce oxidative stress in plants and potentially causing chromosomal aberrations, DNA damage and changes in the cell microtubules. Researchers have evaluated the Cd effects in several plant species. However, tomato has not been the target of these researches even though it is considered as a plant model in others areas. Therefore, experiments are needed to assess the genotoxicity of Cd in this plant species through cytogenetical approaches. The present work was carried out to assess the Cd genotoxic effects on root-meristem cells of Micro-Tom based on chromosomal aberrations, DNA damage and abnormal mitotic spindle fibers and cytoskeleton. Low Cd concentrations (ranging from 0.018 to 13 mg.L^{-1}) were able to induce chromosomal aberrations such as breaks, losses, stickiness and bridges. At the same concentrations, DNA damage was evidenced using the comet assay. Concentrations of 3.7 mg.L^{-1} Cd induced structural modifications of the microtubules of α -tubulin that altered the organization of the cytoskeleton, the mitotic spindle fibers and cytokinesis. In general, tomato presented sensitivity to low concentrations of Cd. These results suggest that tomato is also a good model for studies of genotoxicity to be applied on environmental monitoring and toxic compounds assays.

Keywords: Heavy metal; Toxicity; Chromosome aberration; Mutation; Tubulin; Plant; Oxidative stress

LISTA DE PRANCHAS

- Prancha 2.1 - Aberrações cromossômicas na metáfase. (A) Fase normal da metáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da metáfase. (B, C, D) C-metáfases. (E, F, G, H) Perdas cromossômicas. (I, J) Adesões cromossômicas. (K, L) Poliploidias. Barra = 5 μm 47
- Prancha 2.2 - Aberrações cromossômicas na anáfase. (A) Fase normal da anáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da anáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J) Perdas cromossômicas. (B, C) Setas indicam as quebras cromossômicas. (K, L) Pontes cromossômicas. (I, J, L) Multipolaridade. Barra = 5 μm 48
- Prancha 2.3 - Aberrações cromossômicas na telófase. (A) Fase normal da telófase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da telófase. (B, C, D, E, K, L) Adesão cromossômica. (F, G, H, I, J) Perdas cromossômicas. (K, L) Pontes cromossômicas. Barra = 5 μm 49
- Prancha 2.4 - Aberrações cromossômicas na interfase e na prófase. (A) Interfase normal. (B) Interfase anormal, com núcleo apresentando alterações morfológicas. (C) Prófase normal. (D) Prófase anormal, com ausência de membrana nuclear. Barra = 5 μm 51
- Prancha 3.1 - Classes de Cometas. (A) Classe 0. (B) Classe 1. (C) Classe 2. (D) Classe 3. (E) Classe 4. 68
- Prancha 4.1 - Organização dos microtúbulos de α -tubulina na interfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle apresentando vários MTs corticais orientados transversalmente ao longo eixo da célula. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd: os MTs apresentam-se levemente

ondulados, alguns curtos devido às falhas de continuidade, distribuídos randomicamente, pouco organizados e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m. 86

Prancha 4.2 - Organização dos microtúbulos de α -tubulina na prófase inicial. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle mostrando a formação de uma banda de MTs ao redor do núcleo. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd: os MTs apresentam-se ondulados, alguns mais curtos devido às falhas de continuidade, desorganizados e vários feixes com fluorescência intensa. (D2, E2) MTs com orientações contrárias, acompanhando o sentido longitudinal dos eixos das células. Barra = 5 μ m. 87

Prancha 4.3 - Organização dos MTs de α -tubulina na metáfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle. (A2) Fibras do fuso mitótico. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B1) C-metáfase. (B2) Ausência de fibras do fuso mitótico. (C1, D1) Adesão cromossômica. (C2, D2, E2) MTs curtos devido às falhas de continuidade e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m. 88

Prancha 4.4 - Organização dos MTs de α -tubulina na anáfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle, cromossomos e MTs. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B1) Seta indica a perda cromossômica. (C1) Divisão desigual dos cromossomos. (D1, E1) Pontes cromossômicas. (B2, C2, D2) MTs curtos devido às falhas de continuidade,

desorganizados e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. (E2) Setas indicam multipolaridade. Barra = 5 μ m. 89

Prancha 4.5 - Organização dos MTs de α -tubulina na telófase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle. (A2) MTs do fragmoplasto. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B2, C2, D2, E2) Falhas na formação dos MTs do fragmoplasto e alguns feixes de MTs exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Limites máximos de Cd aceitos pelas determinações do CONAMA nos vários ambientes	21
Tabela 1.2 - Concentração de Cd nas águas superficiais dos Rios Piracicaba e Tietê e do Aquífero Guarani	22
Tabela 2.1 - Contagem de células tratadas com diferentes concentrações de Cd por 24 horas para análise do Índice Mitótico (IM)	42
Tabela 2.2 - Comparação da contagem de células normais e anormais (porcentagens de células aberrantes) em diferentes concentrações de Cd.....	44
Tabela 2.3 - Identificação e contagem dos tipos de Aberrações Cromossômicas encontradas durante o estabelecimento do IM	45
Tabela 3.1 - Frequências de núcleos normais e anormais (porcentagem de núcleos anormais)	68
Tabela 3.2 - Frequência de núcleos normais e anormais em cada classe de cometa em função das concentrações de Cd	69

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma espécie vegetal que apresenta importância agrícola em decorrência de sua elevada produção mundial e também pelo fato de seus frutos serem consumidos de forma *in natura* ou processada. Além dessa importância, o tomateiro tem sido uma planta modelo para que estudos relacionados à avaliação dos efeitos de metais pesados possam ser conduzidos, que é foco do presente trabalho.

Tem sido observado que os metais chumbo, cromo, níquel e o cádmio (Cd) estão aumentando na natureza em função de resíduos provenientes de atividades industriais. Dessa forma, pesquisadores têm se preocupado com a contaminação do meio ambiente por estes metais, já que seres humanos podem ser contaminados por eles através do consumo de alimentos produzidos em áreas de descarte de resíduos industriais não devidamente tratados. Essas áreas poderão ser utilizadas para o cultivo de vegetais, entre eles o tomateiro, podendo ser o elo entre estes metais presentes no solo e a contaminação dos seres humanos e outros animais.

1.1 A importância do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é rico em licopeno, substância antioxidante que combate os radicais livres retardando o envelhecimento, e que protege contra alguns tipos de câncer como o de próstata, pulmão e estômago. Além do licopeno, também contém vitaminas A, B e C, e sais minerais como fósforo, ferro e potássio. Por possuir baixo valor calórico, é indicado em dietas nutricionais, sendo mais consumido nas formas de saladas e molhos. Ele pode também ser preparado nas formas de purês, doces, geleias e sucos (GIOVANNUCCI, 1999).

Esta espécie é a segunda maior cultura agrícola no mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010), totalizando 151 milhões de toneladas, das quais o Brasil produziu cerca de 4,1 milhões de toneladas (2,7%).

Além dessa importância, o tomateiro tem sido uma planta modelo, tanto para pesquisas básicas quanto aplicadas (RICK; YODER, 1988), a qual foi potencializada com a criação do cultivar Micro-Tom, cujo propósito inicial era seu uso como planta

ornamental (SCOTT; HARBAUGH, 1989), tornando-se posteriormente um dos mais importantes modelos de estudos em genética e fisiologia de plantas cultivadas (MEISSNER et al., 1997; MARTÍ et al., 2006).

De forma geral, o cultivar Micro-Tom possui fácil adaptação em uma ampla gama de ambientes, ciclo de vida curto, insensibilidade ao fotoperíodo, alta fertilidade e homozigotidade, bom potencial produtivo, facilidade no controle da polinização e hibridação, condição diploide com genoma relativamente pequeno (950 Mbp) (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; PETERSON; PEARSON; STACK, 1998), facilidade para regeneração e reprodução da planta inteira (McCORMICK et al., 1986; FILLATTI et al., 1987), aptidão para desenvolver haploides (ZAGORSKA et al., 1998) e disponibilidade de uma ampla gama de mutantes (MENDA et al., 2004) e estoques gênicos incluindo espécies selvagens (UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA, 2013).

O tomateiro possui mapas genéticos bem estruturados e altamente saturados (FOOLAD, 2007), sendo uma das poucas espécies que reúne esforços de uma cooperação internacional para sequenciamento de seu genoma (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS, 2013). Além disso, o tomateiro possui protocolos de mutagênese bem definidos (WATANABE et al., 2007; MATSUKURA et al., 2007; PINO-NUNES et al., 2009), os quais tornam este modelo extremamente valioso para obtenção de novos mutantes, inclusive para tolerância a metais pesados, dentre eles, o Cd (PIOTTO, 2012).

1.2 O cádmio no ambiente

O Cd ocorre naturalmente na crosta da Terra a uma abundância de 0,1 a 0,5 mg.L⁻¹ e é comumente associado ao zinco, chumbo e minério de cobre. Também é um constituinte natural de água do mar, com valores médios entre 5 e 110 ng.L⁻¹ (MORROW, 2010).

De acordo com a legislação vigente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio de Resoluções normativas, estabelece teores máximos permitidos de Cd presentes em diferentes ambientes (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Limites máximos de Cd aceitos pelas determinações do CONAMA nos vários ambientes

Meio	Concentrações	Comentário	Referências
Solo	3 mg.kg ⁻¹	Cenário agrícola	CONAMA
(valores em relação ao peso seco)	8 mg.kg ⁻¹	Cenário residencial	Resolução nº 420
	20 mg.kg ⁻¹	Cenário industrial	(BRASIL, 2009)
Água Potável	0,005 mg.L ⁻¹	Padrão de potabilidade	Ministério da saúde Portaria 2914 (BRASIL, 2011)
Águas subterrâneas	0,005 mg.L ⁻¹	Consumo humano	CONAMA Resolução nº 396 (BRASIL, 2008)
	0,05 mg.L ⁻¹	Consumo animal	
	0,01 mg.L ⁻¹	Irrigação	
	0,005 mg.L ⁻¹	Recreação	
Águas doces	0,001 mg.L ⁻¹	classes 1 e 2	
	0,01 mg.L ⁻¹	classe 3	
Águas salinas	0,005 mg.L ⁻¹	classe 1	CONAMA
	0,04 mg.L ⁻¹	classe 2	
Águas salobras	0,005 mg.L ⁻¹	classe 1	Resolução nº 357 (BRASIL, 2005)
	0,04 mg.L ⁻¹	classe 2	
Ambientes aquáticos	0,2 mg.L ⁻¹	Lançamento de efluentes pelas indústrias	

As classes citadas na Resolução CONAMA nº 357 representam graus de variação relativos aos ambientes aquáticos, de acordo com parâmetros como turbidez, odor, conteúdo de corantes, resíduos sólidos, coliformes termotolerantes, entre outros, e quanto maiores as classes, mais elevados são estes parâmetros.

Entretanto, o que tem sido evidenciado na prática é diferente da legislação vigente. Em relatórios anuais publicados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), ligada à Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, que é responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, evidencia-se um aumento na concentração de Cd nos últimos anos em amostras de água provenientes dos rios Piracicaba e Tietê e do aquífero Guarani, no estado de São Paulo (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Concentração de Cd em sedimentos dos Rios Piracicaba e Tietê e em águas subterrâneas do Aquífero Guarani

Meio	Concentrações	Anos de análises	Ano das Referências
Rio Piracicaba	0,0022 a 0,0029 mg.L ⁻¹	1989 a 2000	2001
Rio Tietê	0,003 a 0,01 mg.L ⁻¹		
Rio Piracicaba	< 0,5 mg.kg ⁻¹	2007	2008
Rio Piracicaba	< 0,5 mg.L ⁻¹	2008	2009
Rio Piracicaba	0,77 mg.kg ⁻¹	2009	2010
Rio Tietê	< 0,55 mg.kg ⁻¹		
Rio Piracicaba	0,4 mg.kg ⁻¹	2010	2011
Rio Tietê	0,49 mg.kg ⁻¹		
Rio Tietê	1,1 mg.kg ⁻¹	2011	2012
Aquífero Guarani	< 0,0001 mg.L ⁻¹	2001 a 2003	2004
Aquífero Guarani	0,0001 a 0,004 mg.L ⁻¹	2007 a 2009	2010

O Rio Tietê teve como ponto de coleta a região metropolitana de São Paulo.

Esse aumento na concentração de Cd evidenciado na Tabela 1.2 tem como uma das principais causas as atividades industriais, caracterizadas pela deposição de resíduos sólidos e líquidos não tratados e descartados de forma inadequada no meio ambiente. Dessa forma, as chances de utilização de áreas (e irrigação com água de corpos d'água contaminados) contaminadas com Cd para cultivo de espécies vegetais, são grandes, e, conseqüentemente, há uma maior possibilidade de contaminação de seres humanos e animais por esse metal.

1.3 Os efeitos do cádmio

Em humanos, o Cd favorece a geração de radicais livres e a formação de cálculos renais, aumento da pressão arterial, interferências no sistema imunológico e nervoso, com consequências nos sistemas visual e olfativo, enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (GHOSHROY et al., 1998).

Em plantas, humanos e animais, um destes efeitos é a bioacumulação, que se caracteriza pelo acúmulo de metais pesados em níveis milhares de vezes maiores que os presentes no ambiente (GONÇALVES et al., 2009; GRATÃO et al., 2009), ou podendo se acumular no corpo por um período superior a 10 anos (SALT et al., 1995).

Quando as concentrações destes metais atingem níveis acima de dez vezes do detectado naturalmente, efeitos deletérios sobre o DNA e estruturas celulares podem ser evidenciados, com danos irreversíveis (AZEVEDO; AZEVEDO, 2006; HUANG; HUANG, 2008).

Nesse contexto, o Cd é, provavelmente, um dos metais pesados mais tóxicos, pois afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas, particularmente, quando em altas concentrações, como por exemplo, entre 14 e 183 mg.L⁻¹ de Cd aplicados a tomateiros, com exposição de 40 a 95 dias, evidenciado em estudos de tolerância durante o desenvolvimento das plantas até a produção de frutos (GRATÃO et al., 2008).

Este metal pesado tem tido suas concentrações aumentadas no ambiente pelas atividades de mineração, adubação com lodo de esgoto e efluentes industriais contaminados (PAGE; BINGHAN; NELSON, 1972), fabricação de baterias de automóveis, aplicações militares e aeroespaciais, estabilização de plástico e formulação de pigmentos, entre outras (PRASAD, 1995).

O Cd já foi detectado em mais de mil espécies de plantas e animais aquáticos e terrestres (VIG et al., 2003). Embora seja tóxico para a maior parte das plantas, existem espécies como *Arabidopsis halleri*, que são naturalmente tolerantes a esse metal (WEBER; TRAMPCZYNSKA; CLEMENS, 2006; ZHAO et al., 2006), e espécies que são hiperacumuladoras como é o caso de *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey. (LOCHLAINN et al., 2011 ; MONSANT et al., 2011).

Este metal pode afetar outros processos, tais como aqueles relacionados ao transporte de água, fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, fotossíntese e conteúdo de clorofila (VITÓRIA; CUNHA; AZEVEDO, 2006), dependendo da concentração, da espécie de planta, do órgão/tecido e da duração da exposição (BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005). Além disso, o Cd é capaz de induzir estresse oxidativo resultando em uma variedade de respostas antioxidativas (GRATÃO et al., 2008). Os efeitos tóxicos do Cd podem ser rapidamente notados devido aos sintomas apresentados por raízes de plantas que entraram em contato com este metal, tais como escurecimento, torção, desaparecimento de raízes laterais e uma progressiva redução no seu crescimento (WÓJCIK; TUKENDORF, 1999).

1.4 Estresse oxidativo causado pelo cádmio

Plantas não estressadas (em condições normais de seu metabolismo), normalmente, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a reações bioquímicas naturais da célula. Entretanto, aquelas que são colocadas em situação que podem gerar algum estresse, por exemplo, por exposição a metais pesados, produzem de forma intensificada estas EROs que devem ser desintoxicadas por respostas celulares ao estresse, para que possam sobreviver e se desenvolver, devido ao fato destas EROs serem muito tóxicas.

O estresse oxidativo provocado pelo efeito tóxico do Cd em plantas causa danos celulares que são irreversíveis e desencadeiam o processo de morte celular programada (GALLEGO et al., 2012). Isto pode ser reflexo da ação das EROs sobre macromoléculas levando à alteração dos ácidos nucleicos, inclusive com quebras cromossômicas. Este aspecto praticamente não tem sido investigado em plantas na relação entre metal, estresse oxidativo e DNA. Na literatura são descritos vários aspectos da resposta das plantas a este estresse, porém, de forma surpreendente, informações citogenéticas são raras, apesar da sua inegável importância. Estas alterações citogenéticas podem estar diretamente relacionadas a danos no processo de divisão celular, comprometendo o ciclo de vida das plantas, e assim podem influenciar na perda de produtividade de certas culturas agrícolas, devido a alta toxicidade do Cd que contamina solos e recursos hídricos pela ação humana.

1.5 Genotoxicidade

Em decorrência do estresse oxidativo, outros efeitos podem ser evidenciados em plantas tratadas com metais pesados. Estudos citogenéticos de organismos contaminados por tais metais demonstram como os efeitos genotóxicos prejudicam o ciclo das divisões celulares, gerando células mutantes ou causando a apoptose (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O efeito genotóxico é caracterizado por agentes que promovem danos ao DNA de uma célula, como quebras cromossômicas e deleções de sequências de nucleotídeos. Isto pode ocorrer quando as substâncias tóxicas entram em contato direto com o DNA nuclear ou também de forma indireta, afetando o metabolismo celular, levando à divisão incorreta da célula. Quando estas alterações não são devidamente reparadas pelo sistema celular, tais células acumularão mutações que, em número elevado, poderão perder o controle celular e, assim, desencadear processos carcinogênicos ou a apoptose (MATSUMOTO et al., 2006).

Dentre os efeitos genotóxicos, são evidenciados vários tipos de alterações citogenéticas, que podem ser constatadas através de índices mitóticos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008), aberrações cromossômicas (RUSSEL, 2002), formação de micronúcleos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007) e alterações morfológicas dos núcleos em interfase (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

O índice mitótico se caracteriza pelo número total de células em divisão e em relação ao número total de células encontradas num determinado tecido, como por exemplo, o tecido meristemático de raízes. Assim, este índice permite avaliar a citotoxicidade de agentes mutagênicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse índice é amplamente empregado em análises que contribuem para o estudo de toxicidade de uma substância (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; SETH et al., 2008).

O estudo das aberrações cromossômicas representa uma das análises mais empregadas para as avaliações de genotoxicidade de substâncias (RUSSEL, 2002), pois se obtêm dados confiáveis acerca do potencial genotóxico de certos compostos e é amplamente aplicado no monitoramento ambiental (EGITO et al., 2007; CARITÁ;

MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Tais análises são conduzidas através de citogenética convencional e representa um método direto para mensuração das alterações citogenéticas (RANK et al., 2002).

Outros sinais de aberrações citogenéticas são os micronúcleos. Os micronúcleos são pequenas estruturas celulares formadas a partir de perdas cromossômicas (aneugênese) ou por fragmentos cromossômicos (clastogênese), gerados pelas aberrações cromossômicas e também devido às alterações na conformação estrutural das fibras do fuso mitótico (FENECH, 2000). Os micronúcleos podem, ainda, se originar durante os eventos de poliploidização, na tentativa da célula restabelecer sua condição diploide (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Ao se observarem núcleos de células expostas a compostos tóxicos, são constatadas anormalidades nucleares, que se caracterizam pelas alterações conformacionais dos núcleos interfásicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). Outra forma de se constatar o efeito genotóxico de certas substâncias é através do ensaio de cometa, que avalia o grau de danos sofridos pelo DNA.

Este ensaio obtém vários graus de resposta celular em relação aos danos causados pelos compostos genotóxicos. Esta abordagem é consideravelmente sensível, barata e rápida e requer poucas células para a detecção de tais danos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Outros efeitos ligados à resposta de compostos genotóxicos são os danos causados à estrutura da célula, como as alterações sofridas pelos microtúbulos de tubulinas que organizam as fibras do fuso de divisão celular, citoesqueleto e fragmoplasto. Assim, há evidências de que as interferências causadas pelos metais pesados sobre os microtúbulos podem modificar a arquitetura e a função das células (WASTENEYS, 2004).

Células meristemáticas de raízes, geralmente, apresentam maior resposta à ação de metais pesados (LIU; KOTTKE, 2004). No entanto, os mecanismos de inibição do crescimento induzidos por esses metais são pouco conhecidos.

Devido à toxicidade do Cd e a sua distribuição no meio ambiente, esse metal pesado tem sido estudado nos diversos meios (MARCANO et al., 2002). A literatura

disponível sobre genotoxicidade do Cd apresenta diversos trabalhos publicados na área médica, devido a sua relevância para estudos de células cancerígenas (ROZGAJ; KASUBA; FUCIC, 2002). Apesar de a importância dos vegetais para a alimentação e também por serem os recipientes primários de muitos compostos poluentes, os estudos ainda são escassos na literatura (GICHNER et al., 2004).

Efeitos citogenéticos também foram evidenciados em plantas expostas ao Cd, o qual inibiu a divisão celular, promoveu alterações nos cromossomos (aberrações cromossômicas) e induziu heterocromatização de cromossomos em células vegetais (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; SETH et al. 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Outras alterações causadas pelo Cd em plantas foram observadas em microtúbulos de tubulinas. Essas estruturas proteicas foram afetadas direta ou indiretamente pelo Cd através de reações bioquímicas decorrentes do estresse oxidativo. Tais anormalidades podem gerar alterações na conformação das fibras do fuso mitótico, no citoesqueleto da célula, na citocinese, entre outros (LIU; JIANG; GAO, 2003/2004; FUSCONI; GALLO; CAMUSSO, 2007).

Diante do exposto, este estudo foi conduzido a fim de avaliar efeitos genotóxicos do Cd sobre células meristemáticas de raízes de tomateiros do cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. MT, $2n=24$). Tais efeitos foram evidenciados através da análise de anormalidades citogenéticas, grau de danos causados ao DNA e anormalidades das fibras do fuso mitótico e do citoesqueleto.

Portanto, este trabalho é composto por três capítulos que empregaram o tomateiro como planta modelo, exposto a diferentes concentrações de Cd. Dentro desse contexto, os objetivos destes capítulos são:

- 1- Investigar as aberrações cromossômicas por meio de técnicas convencionais de citogenética;
- 2- Testar a sensibilidade desta espécie empregando o ensaio de cometa;
- 3- Caracterizar a organização dos microtúbulos através de imunodeteção.

Referências

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, p. 208-218, 1991.

AZEVEDO, J.A.; AZEVEDO, R.A. Heavy metals and oxidative stress: where do we go from here? **Communications in Biometry Crop Science**, Meghalaya, v. 1, p. 135-138, 2006.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 21-34, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em: 17 out. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 420, de 29 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 17 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf>. Acesso em: 17 out. 2012.

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**, Oxford, v. 72, p. 722–725, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2000**. São Paulo. São Paulo, 2001. 214p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007.** São Paulo. São Paulo, 2008. 537p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2008.** São Paulo. São Paulo, 2009. 528p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório da qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2009.** São Paulo. São Paulo, 2010. 310p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório da qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2010** São Paulo. São Paulo, 2011. 298p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório da qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2011.** São Paulo. São Paulo, 2012. 356p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório da qualidade das águas subterrâneas no estado de São Paulo 2001-2003.** São Paulo. São Paulo, 2004. 137p. (CETESB. Série Relatórios).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório da qualidade das águas subterrâneas no estado de São Paulo 2007-2009.** São Paulo. São Paulo, 2010. 258p. (CETESB. Série Relatórios).

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS. Sol Genomics Network. **USDA:** base de dados da Boyce Thompson Institute. Disponível em: <<http://www.sgn.cornell.edu>>. Acesso em 05 jun 2013.

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, 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**, San Diego, v. 88, p. 252–259, 2007.

FILLATTI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 5, p. 726-730, 1987.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 19 out. 2012.

FOOLAD, M.R. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 7, p. 1-53, 2007.

FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 632, p. 9–19, 2007.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, M.F.; ROSALES, E.O.; ZAWOZNIK, M.S.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 83, p. 33– 46, 2012.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, Malden, v. 13, p. 591-602, 1998.

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

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 91, p. 317-331, 1999.

GONÇALVES, J.F.; ANTES, F.G.; MALDANER, J.; PEREIRA, L.B.; TABALDI, L.A.; RAUBER, R.; ROSSATO, L.V.; BISOGNIN, D.A.; DRESSLER, V.L.; FLORES, E.M.M.; NICOLOSO, F.T. Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, p. 814-821, 2009.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p. 321-333, 2008.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, p. 387-394, 2009.

HUANG, T.L.; HUANG, H.J. ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, p. 1377–1385, 2008.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, 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.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, p. 71–81, 2009.

LIU, D.; JIANG, W.; GAO, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tips of garlic. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, p. 79–83, 2003/2004.

LIU, D.; KOTTKE, I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, p. 153–158, 2004.

LOCHLAINN, S.Ó.; BOWEN, H.C.; FRAY, R.G.; HAMMOND, J.P.; KING, G.J.; WHITE, P.J.; GRAHAM, N.S.; BROADLEY, M.R. Tandem Quadruplication of HMA4 in the Zinc (Zn) and Cadmium (Cd) Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, p. 1-9, 2011.

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**, San Diego, v. 88, p. 30-35, 2002.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S.; GARCIA-MARTÍNEZ, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2037–2047, 2006.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; KOBAYASHI, Y.; YIN, Y.G.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L. cultivar Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, p. 39-44, 2007.

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, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148–158, 2006.

McCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 5, p. 81-84, 1986.

- MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for Tomato Genetics. **Plant Journal**, Oxford, v.12, p. 1465-1472, 1997.
- MENDA, N.; SEMEL, Y.; PELED, D.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 861-872, 2004.
- MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998.
- MONSANT, A.C.; KAPPEN, P.; WANG, Y.D.; PIGRAM, P.J.; BAKER, A.J.M.; TANG, C.X. *In vivo* speciation of zinc in *Noccaea caerulescens* in response to nitrogen form and zinc exposure. **Plant and Soil**, The Hague, v. 348, p. 167-183, 2011.
- MORROW, H. Cadmium and Cadmium Alloys. In: KROSCWITZ, J.I.; HOWE-GRANT, M. (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: John Wiley, 2010. Chap. 1, p. 1-36.
- PAGE, A.L.; BINGHAN, F.T.; NELSON, C. Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 1, p. 288-292, 1972.
- PETERSON, D.G.; PEARSON, W.R.; STACK, S.M. Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using *in vitro* and *in situ* DNA reassociation. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 346-356, 1998.
- PINO-NUNES, L.E.; FIGUEIRA, A.V.O.; NETO, A.T.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F.A.; SILVA, J.A.; BERNARDI, W.F.; PERES, L.E.P. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 821, p. 63-72, 2009.
- PIOTTO, F.A. **Avaliação de tolerância ao cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2012. 144p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity ad tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 35, p. 525-545, 1995.
- 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.
- RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988.
- ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; FUCIC, A. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. **Journal of Trace Elements**, Berne, v. 16, p. 187-192, 2002.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutations. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. San Francisco: Pearson Education, 2002. Chap. 35, p. 595–621.

SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Washington, v. 109, p. 1427-1433, 1995.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. A miniature dwarf tomato. Micro-Tom – a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.

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 and Environmental Safety**, New York, v. 71, p. 711–716, 2008.

UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA. Tomato Genetics Resource Center. **TGRC**: base de dados da Universidade da Califórnia. Disponível em: <<http://tgrc.ucdavis.edu>>. Acesso em: 04 jan 2013.

VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their actives in soil: a review. **Advances in Environmental Research**, New York, v. 8, p. 121-135, 2003.

VITÓRIA, A.P.; CUNHA, M.; AZEVEDO, R.A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 58, p. 47-52. 2006.

WASTENEYS, G.O. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 7, p. 651–660, 2004.

WATANABE, S.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, p. 33-38, 2007.

WEBER, M.; TRAMPCZYNSKA, A.; CLEMENS, S. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 950-963, 2006.

WÓJCIK, M.; TUKENDORF, A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 21, p. 99–107, 1999.

ZAGORSKA, N.A.; SHTEREVA, A.; DIMITROV, B.D.; KRULEVA, M.M. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 968-973, 1998.

ZHAO, F.J.; JIANG, R.F.; DUNHAM, S.J.; MCGRATH, S.P. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 172, p. 646-654, 2006.

2 CÁDMIO PROVOCA ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NO TOMATEIRO

Resumo

Aberrações cromossômicas (ACs), tais como quebras, perdas, adesões e pontes, podem ser encontradas em plantas que foram expostas a metais pesados, como por exemplo, o cádmio (Cd). Estudos ambientais têm avaliado sua genotoxicidade em diversas espécies de plantas, mas não em tomateiro que é uma planta modelo para a condução de experimentos em outras áreas. Este trabalho investigou os efeitos do Cd em células meristemáticas de raiz de tomateiro cultivar Micro-Tom, baseados em aberrações cromossômicas. Raízes recém-germinadas, com cerca de 1 cm, foram tratadas com solução de CdCl_2 contendo 0, 0,018, 1,8, 3,7, 5,5, 7,3 e 13 mg.L^{-1} por 24 horas e, em seguida foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) e coradas com Reativo de Schiff. Lâminas permanentes foram preparadas utilizando-se apenas as regiões meristemáticas das raízes. Para cada concentração, os parâmetros avaliados foram: Índice Mitótico (IM) e ACs. Empregaram-se triplicatas em todas as etapas e as comparações entre controle e as doses de Cd foram conduzidas através do teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Com o aumento na concentração de Cd houve uma diminuição no IM. Para todas as concentrações de Cd, cada fase da mitose apresentou mais células aberrantes do que o controle. Em geral, as concentrações de Cd acima de 5,5 mg.L^{-1} apresentaram apenas células mitóticas aberrantes para a análise de ACs. Já a partir da dose mínima (0,018 mg.L^{-1}) constatou-se ACs, tais como quebras, perdas, adesões e pontes. Possivelmente, estas ACs estejam associadas ao estresse oxidativo resultantes das espécies reativas de oxigênio, as quais geram radicais livres nas células, causando quebras e danos permanentes ao DNA.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Metal pesado; Planta; Cromossomo; Micro-Tom; Estresse oxidativo

Abstract

Chromosomal aberrations (CAs) such as breaks, losses, stickiness and bridges, may be found in plants exposed to heavy metals, for example, cadmium (Cd). Environmental studies have assessed its genotoxicity in several plant species, but not in tomato, which is a plant model used often in experiments in other areas. This study investigated the Cd effects in root-meristem cells of tomato cultivar Micro-Tom based on chromosomal aberrations. Roots from young seedlings were treated with CdCl_2 solution (0, 0.018, 1.8, 3.7, 5.5, 7.3 and 13 mg.L^{-1}) for 24 hours when ~ 1 cm was reached, and then fixed in ethanol: acetic acid (3:1) and stained with Schiff reactive. Slides were prepared using only the meristematic regions of the roots. For each concentration, the parameters evaluated were: Mitotic Index (MI) and CAs. Triplicates were used in all stages and comparisons among control and Cd concentrations were carried out using Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). With the increase in Cd concentration a decrease of MI was observed. For all Cd concentrations, each mitotic phase presented more aberrant cells than the control. Cd concentrations over

5.5 mg.L⁻¹ resulted in only aberrant mitotic cells for CAs. CAs such as breaks, losses, stickiness and bridges were observed even at the lowest Cd concentration used (0.018 mg.L⁻¹). These ACs are probably associated with oxidative stress resulting from excess reactive oxygen species production, which generate free radicals in the cells causing breaks and permanent DNA damage.

Keywords: Genotoxic; Heavy metal; Plant; Chromosome; Micro-Tom; Oxidative stress

2.1 Introdução

As aberrações cromossômicas (ACs) são caracterizadas por mudanças estruturais de um ou mais cromossomos, ocorrendo de forma natural ou como resultado da exposição destes a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). Tais mudanças estruturais podem ser induzidas por diversos fatores, como quebras e a inibição da síntese do DNA e/ou sua replicação (ALBERTINI et al., 2000), as quais são frequentemente corrigidas pelo mecanismo de reparo do DNA da célula. No entanto, quando não reparadas ou reparadas erroneamente, estas mudanças originam mutações gênicas e cromossômicas (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2006) através de eventos como translocação, inversão, deleção, duplicação, fusão e fissão dos cromossomos, alterando o complemento cromossômico em estrutura e/ou número (PAVLICA et al., 2000; ERDTMANN, 2003; JUNDI; FREITAS, 2003). Também são evidenciadas aneuploidias e poliploidias como consequência da segregação anormal dos cromossomos em espécies expostas a compostos tóxicos, como o cádmio (Cd) (ALBERTINI et al., 2000).

A maioria das ACs são letais para as células, mas existem muitas delas que, mesmo causando danos genéticos permanentes em células somáticas ou germinativas, mantém as células viáveis (SWIERENGA et al., 1991), como por exemplo, na espécie *Arabidopsis halleri* (WEBER; TRAMPCZYNSKA; CLEMENS, 2006; ZHAO et al., 2006). A ação aneugênica provoca a inativação de estruturas citoplasmáticas, como o fuso mitótico (FENECH, 2000), que leva a uma segregação anormal dos cromossomos, tendo como consequência a formação de células aneuplóides ou poliplóides (ALBERTINI et al., 2000). Outra alteração diz respeito à ação clastogênica, que é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas

durante a divisão celular (FENECH, 2000), ocasionando alterações cromossômicas estruturais (ALBERTINI et al., 2000).

As ACs resultam principalmente em diminuição da produção de novas células, devido à atividade mitótica em meristemas apicais (ZHANG; YANG, 1994; ZHANG; XIAO, 1998; LIU; JIANG; GAO, 2003/2004), e à inibição das células de alongamento das raízes nas regiões meristemáticas (PRASAD, 1995; VOUTSINAS; ZARANI; KAPPAS, 1997). Juntamente com a diminuição da atividade mitótica nos meristemas apicais, aberrações mitóticas baseadas em C-metáfases, pontes na anáfase, adesões, perdas e quebras cromossômicas e micronúcleos (ZHANG; YANG, 1994; FISKESJÖ, 1997; PANDA; PANDA, 2002), apoptose e necrose (BEHBOODI; SAMADI, 2004) podem ser evidenciadas.

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 ACs se fixem, é necessário que haja um evento de replicação do DNA, logo após a ocorrência da aberração (OBE; NATARAJAN; PALITTI, 1982).

Os compostos genotóxicos podem ainda interferir na diferenciação de células durante o ciclo de divisão, podendo sofrer endoreduplicação, que é o processo mais comum de poliploidização celular em plantas e ocorre em até 90% das angiospermas durante a diferenciação de tecidos com atividade metabólica elevada (D'AMATO, 1998).

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, 2006). Dessa forma, atualmente, trabalhos que estudam a ação de compostos mutagênicos ambientais têm tido 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 também pode estar exposto (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2005).

Uma das ferramentas que vem sendo empregada no estudo de avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade é o teste de ACs. Esse teste, baseado na citogenética convencional, é um dos poucos métodos diretos que mensura alterações em sistemas expostos a compostos com potencial mutagênico ou carcinogênico (RANK et al., 2002), sendo considerado um ensaio sensível e confiável para estudo e monitoramento ambiental (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994;

COTELLE; MASFARAUD; FÉRARD, 1999; EVSEEVA; GERAS'KIN; SHUKTOMOVA, 2003; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

As vantagens do teste de ACs não se restringem, apenas, à possibilidade de identificação dos diferentes tipos de alterações cromossômicas, mas também oferece a possibilidade de estimar, precisamente, os modos de ação dos compostos químicos testados (GROVER; KAUR, 1999; MATEUCA et al., 2006).

Muitos vegetais têm sido considerados excelentes organismos indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas, tais como cebola (*Allium cepa*), ervilha (*Pisum sativum*) e *Tradescantia* spp. (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; MASFARAUD; FÉRARD, 1999), além de testes com fármacos, defensivos agrícolas, metais, entre outros.

A maioria dos cromossomos danificados está relacionada com a clastogênese e sua análise pode ser utilizada em ensaios de genotoxicidade em curto prazo. Ensaio com plantas demonstraram correlação positiva com aqueles baseados em animais. Eles são altamente sensíveis, relativamente fáceis e baratos de serem aplicados. Portanto, tais ensaios são de particular relevância nos países em desenvolvimento (FISKESJÖ, 1997; PANDA; PANDA, 2002).

Dentre os organismos utilizados para tais testes, um dos mais conhecidos e adotados emprega cebola para proceder às análises. Pelo teste de ACs em células meristemáticas dessa planta pode-se quantificar 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 cromossômicas, como C-metáfases, adesões, pontes e fragmentações cromossômicas, entre outras (GRANT, 1994; EVSEEVA; GERAS'KIN; SHUKTOMOVA, 2003; EGITO et al., 2007). A eficiência desse modelo se dá pelo conhecimento do seu ciclo celular, crescimento rápido de suas raízes, elevado número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio, por responder a inúmeros mutagênicos conhecidos e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994; EGITO et al., 2007).

Outras espécies também são utilizadas como plantas modelo para avaliação de compostos potencialmente genotóxicos, como por exemplo, espécies do gênero *Vicia* e *Arabidopsis*. Já em animais, os peixes são um dos mais empregados (FISKEJÖ, 1985).

O 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). Apesar de o Cd ser um dos metais pesados mais estudados, sua ação sobre os tomateiros ainda não foi investigada através de técnicas relacionadas à citogenética. Sendo assim, devido os vegetais serem os alimentos que representam uma das ligações entre os seres humanos e este metal pesado, torna-se necessária uma melhor compreensão de como os ciclos de divisões celulares são afetados pelo Cd em tomateiro.

Portanto, este capítulo visou investigar as ACs em tomateiro decorrentes do cultivo de sementes nutridas com diferentes doses de Cd.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas raízes com cerca de 1 cm de comprimento obtidas a partir da germinação de sementes de tomateiro em Gerbox, do cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. MT), em BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

2.2.2 Alterações citogenéticas em células meristemáticas de raiz

As sementes recém-germinadas e com raízes com cerca de 1 cm de comprimento foram distribuídas em Gerbox contendo papel de alta absorção embebidos em soluções de CdCl₂ (J.T. Baker®), nas concentrações de 0,018, 1,8,

3,7, 5,5, 7,3 e 13 mg.L⁻¹, pH 5,6 (ou, 0,1, 10, 20, 30, 40 e 70 µM, respectivamente), além do controle, e mantidas em BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

Após 24 horas de exposição às diversas concentrações de CdCl₂, as raízes foram coletadas diretamente em fixador Carnoy (álcool etílico absoluto em ácido acético PA, na proporção de 3:1, respectivamente) permanecendo em processo de fixação por 24 horas a temperatura ambiente.

A seguir, foram confeccionadas lâminas para cada concentração de Cd mais o controle, de acordo com o procedimento de coloração através do método de Feulgen (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924), descrito abaixo.

A coloração pelo método de Feulgen empregou a hidrólise ácida das raízes, em ácido clorídrico (HCl) a 1 N a 60°C durante 8 minutos. Depois de lavadas por 3 vezes de 5 minutos em água destilada, as raízes foram transferidas para um pequeno frasco escuro contendo cerca de 5 mL de Reativo de Schiff, para que ocorresse a coloração das células das regiões meristemáticas, durante 45 minutos. Em seguida, as raízes foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos em água sulfurosa, podendo também ser água de torneira. Para a preparação das lâminas, as raízes passaram por mais uma hidrólise ácida em ácido acético a 60%, por 2 minutos, e então, uma ponta de raiz foi macerada em cada lâmina contendo uma gota de Carmim acético a 1%. As preparações foram cobertas por lamínulas de vidro e esmagadas através de leve pressão com as pontas dos dedos sobre as lamínulas. As lamínulas foram removidas em ácido acético a 45% e cada lâmina recebeu uma gota de Entellan (Merck), sendo cobertas por lamínulas de vidro novas, para se tornarem permanentes.

Foram avaliadas três repetições de cada concentração mais o controle para cada variável estudada, a saber: índice mitótico, aberrações cromossômicas, micronúcleos e anormalidades nucleares, que são descritas a seguir.

2.2.2.1 Índice Mitótico (IM)

O IM avalia a citotoxicidade dos agentes mutagênicos através da elevação ou diminuição desse índice. Para a determinação do IM, foi feita a contagem de 5000 células (1000/lâmina) para cada uma das três repetições de cada concentração, identificando a fase mitótica que se encontrava cada célula. O IM é

expresso em porcentagem, gerada pelo número de células em divisão dividido pelo número total de células contadas, vezes 100.

2.2.2.2 Aberrações Cromossômicas (ACs)

As ACs são caracterizadas pelas mudanças na estrutura ou em número de cromossomos. Elas foram avaliadas através da identificação de 500 células (100/lâmina) nas fases de metáfase, anáfase e telófase, para cada repetição.

2.2.2.3 Micronúcleos (Ms)

Os Ms se originam pela formação da membrana nuclear ao redor de cromossomos inteiros ou de seus fragmentos que se perderam devido às ACs e a alterações de conformação das fibras do fuso mitótico.

A análise das frequências de Ms se deu através da contagem de 5000 células (1000/lâmina) na fase de interfase para cada uma das três repetições.

2.2.2.4 Anormalidades Nucleares

Caracterizam-se pelas anormalidades e/ou alterações morfológicas dos núcleos em interfase. Foram observadas 5000 células (1000/lâmina) em interfase, para cada repetição.

2.2.3 Documentação de imagens

As preparações foram analisadas em um microscópio óptico e de contraste de fase Axio Scope. A1 (Carl Zeiss). As imagens foram capturadas através da câmera Axio Cam MRc (Carl Zeiss).

2.2.4 Softwares empregados

O *software* Axio Vision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss) foi empregado para a captura de imagens oriundas da metodologia de Feulgen. Este *software* realiza contagem de tipos celulares e insere escalas micrométricas para todos os graus de magnitude.

A montagem de pranchas e outros tratamentos de imagens foram realizados com o auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated).

2.2.5 Análise estatística

Para a análise do índice mitótico e das aberrações cromossômicas, as comparações entre o controle e os tratamentos com Cd foram feitas empregando o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Índice Mitótico (IM)

Através da análise do IM, *Solanum lycopersicum* cv. MT apresentou 4,7% de células em divisão mitótica no tratamento controle (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Contagem de células tratadas com diferentes concentrações de Cd por 24 horas para análise do Índice Mitótico (IM)

Concentrações (mg.L ⁻¹)	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
Controle	5069	94	106	19	21	4,7a
0,018	5256	20	29	6	11	1,2b
1,8	5285	12	36	9	10	1,3b
3,7	5384	19	44	14	12	1,6b
5,5	5258	6	29	3	17	1,0b
7,3	5060	0	23	4	13	0,8b
13	5285	8	12	7	8	0,7b

Médias seguidas de letras diferentes são significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)

Os demais tratamentos, que incluíram diferentes doses de Cd, apresentaram diferença para este índice em relação ao controle. Essa variação foi de 0,7 (13 mg.L⁻¹) a 1,6% (3,7% mg.L⁻¹).

A partir da menor dose de Cd empregada (0,018 mg.L⁻¹) foi possível observar uma redução no IM em relação ao controle. De acordo com a Tabela 1.1 apresentada no capítulo 1, essa dose mínima está abaixo das concentrações máximas permitidas para este metal pesado encontrado no solo de áreas agrícolas (3 mg.kg⁻¹), residenciais (8 mg.kg⁻¹) e industriais (20 mg.kg⁻¹), nas águas salobras (0,04 mg.L⁻¹) e salinas (0,04 mg.L⁻¹) de classe 2, na água subterrânea (0,05 mg.L⁻¹) para consumo animal e nos ambientes aquáticos (0,2 mg.L⁻¹) em que são lançados efluentes industriais. Além disso, a dose de 0,018 mg.L⁻¹ de Cd discutida neste capítulo está muito próxima das concentrações máximas permitidas em águas subterrâneas (0,01 mg.L⁻¹) para irrigação e em águas doces (0,01 mg.L⁻¹) de classe 3.

Com o aumento das doses de Cd, o IM diminui para várias espécies vegetais, como relatado no trabalho de Seth et al. (2008), no qual foram estudadas três concentrações de Cd (1,8, 3,7 e 7,3 mg.L⁻¹) utilizando células meristemáticas de cebola, em que constataram redução e até inibição do IM. Correia, Maschio e Azeredo-Oliveira (2008) também relataram na mesma espécie que em concentrações de 0,007 e 0,017 mg.L⁻¹ de Cd houve aumento do IM.

Em alguns casos, a resposta de certas plantas ao Cd diverge dos resultados comumente encontrados na literatura. Esse é o caso de um trabalho realizado por Fusconi et al. (2006), em que constataram um aumento do IM de acordo com o aumento das concentrações de Cd (0,046, 0,09, 0,18, 0,46, 4,6 e 46 mg.L⁻¹), em células meristemáticas de ervilha.

Segundo Seth et al. (2008), a interação do Cd com proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular pode ser a causa da inibição do IM. A inibição da síntese de proteínas envolvidas na divisão celular pode também causar atraso no crescimento, como relatado em mostarda indiana (*Brassica juncea*) exposta ao Cd (SETH; CHATURVEDI; MISRA, 2007).

2.3.2 Aberrações Cromossômicas (ACs)

As ACs são encontradas naturalmente na natureza e são caracterizadas pelas mudanças na estrutura ou no número de cromossomos. Na Tabela 2.2 observa-se a contagem de células tratadas em diferentes concentrações de Cd em tomateiro.

Tabela 2.2 - Comparação da contagem de células normais e anormais (porcentagens de células aberrantes) em diferentes concentrações de Cd

Concentrações (mg.L ⁻¹)	Metáfase	Metáfase	Anáfase	Anáfase	Telófase	Telófase
	Normal	Anormal	Normal	Anormal	Normal	Anormal
Controle	177	121 (40)a	50	31 (38)a	97	40 (29)a
0,018	45	252 (84)b	21	54 (72)b	80	50 (38)b
1,8	52	256 (83)b	27	69 (72)b	77	48 (38)b
3,7	22	280 (92)b	6	78 (93)b	45	78 (63)b
5,5	0	295 (100)b	0	45 (100)b	0	202 (100)b
7,3	0	353 (100)b	0	64 (100)b	0	91 (100)b
13	0	287 (100)b	0	67 (100)b	0	148 (100)b

Médias seguidas de letras diferentes são significativas pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

O tratamento controle apresentou células anormais em porcentagem inferior aos demais tratamentos. Nas diferentes doses de Cd, essa porcentagem variou de 84 a 100 na metáfase, de 72 a 100 na anáfase e de 38 a 100 na telófase.

Na Tabela 2.3 é possível verificar que algumas das ACs são numericamente mais abundantes do que outras. Assim, as C-metáfases se destacam em número e em seguida destacam-se as perdas cromossômicas em qualquer uma das fases da divisão mitótica e as adesões cromossômicas na metáfase.

Tabela 2.3 - Identificação e contagem dos tipos de Aberrações Cromossômicas encontradas durante o estabelecimento do IM

Tipos de Aberrações e Fases da Mitose	Controle	Concentrações de Cd (mg.L ⁻¹)					
		0,018	1,8	3,7	5,5	7,3	13
Adesão Cromossômica							
Metáfase	16	51	51	85	119	165	106
Anáfase	37	0	0	0	0	0	0
Telófase	0	0	7	7	32	14	41
Ponte Cromossômica							
Anáfase	6	1	0	9	12	18	0
Telófase	5	0	0	1	0	0	0
Quebra Cromossômica							
Metáfase	0	10	9	1	0	0	0
Anáfase	0	10	15	6	0	0	0
Telófase	1	7	7	6	16	7	0
Perda Cromossômica							
Prófase	2	1	0	0	10	0	0
Metáfase	38	45	78	89	97	85	74
Anáfase	23	40	62	56	28	46	54
Telófase	7	43	34	64	85	70	107
C-metáfase	63	143	103	97	151	90	82
C-anáfase	3	0	0	0	0	0	0
Multipolaridade							
Anáfase	2	3	0	7	5	1	13
Poliploidia							
Metáfase	3	4	15	9	2	14	25

Médias dos dados da análise de três repetições por tratamento.

Alterações como C-metáfases caracterizam uma evidência da presença de agentes aneugênicos, pois são decorrentes de uma completa inativação do fuso mitótico das células (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ, 2006). Quando os fusos mitóticos são completamente inativados, os cromossomos não são organizados na placa equatorial da célula e, conseqüentemente, a divisão dos centrômeros e a separação das cromátides irmãs para polos opostos não ocorre. Sendo assim, sugere-se que muitas das C-metáfases observadas nos ensaios realizados com as diferentes concentrações de Cd (Prancha 2.1, Figuras B, C e D) possivelmente são decorrentes da inativação do fuso mitótico destas células. De acordo com Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007), a presença de C-metáfases pode resultar em células multinucleadas, embora os resultados mais frequentes sejam a indução de células poliploides, como as observadas na Prancha 2.1, Figuras K e L, e de células com micronúcleos.

De acordo com Fiskesjö e Levan (1993), Marcano e Del-Campo (1995) e Marcano et al. (1998), a adesão cromossômica é um sinal comum da ação tóxica sobre material genético e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula. A adesão é um tipo de anormalidade que envolve a matriz proteica da cromatina e não, propriamente, a molécula de DNA. A adesão cromossômica (Prancha 2.1, Figuras I e J), por ser um processo irreversível, geralmente promove a morte da célula (FISKESJÖ, 1988, 1995, 1997).

Já as perdas cromossômicas podem ser geradas a partir das falhas parciais na formação das fibras do fuso mitótico (FISKESJÖ, 1985, 1993). Tais perdas cromossômicas podem ser observadas na Prancha 2.1, Figuras E, F, G e H.

Prancha 2.1 - Aberrações cromossômicas na metáfase. (A) Fase normal da metáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da metáfase. (B, C, D) C-metáfases. (E, F, G, H) Perdas cromossômicas. (I, J) Adesões cromossômicas. (K, L) Poliploidias. Barra = 5 μ m

Pontes cromossômicas como as vistas na Prancha 2.2, Figuras K e L, podem ocorrer como consequência da adesão e uma subsequente falha na separação dos cromossomos na anáfase ou ainda serem atribuídas a uma translocação desigual ou inversão dos segmentos cromossômicos (MARCANO et al., 2004). Uma vez aderidas, as cromátides permanecem unidas e, quando a célula entra em anáfase, pode ocorrer quebras cromossômicas, como as observadas na Prancha 2.2, Figuras B e C, apontadas pelas setas.

Outra estrutura que pode ser formada em decorrência do mau funcionamento do fuso mitótico são as anáfases multipolares, que distribuem os cromossomos de forma irregular, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células (RANK; NIELSEN, 1998). A multipolaridade pode ser vista na Prancha 2.2, Figuras I, J e L. Além disso, falhas no fuso mitótico podem provocar perdas cromossômicas, como vistas na Prancha 2.2, Figuras B, C, D, E, F, G, H, I e J. As anáfases multipolares podem ser decorrentes de ação aneugênica de uma substância, que impede a

polimerização das fibras dos fusos mitóticos, sem impedir a duplicação dos centros organizadores de microtúbulos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Quando a ação do agente é atenuada e a célula volta à normalidade de divisão, vai existir mais de dois centros organizadores de microtúbulos presentes, levando à multipolaridade na divisão.

Prancha 2.2 – Aberrações cromossômicas na anáfase. (A) Fase normal da anáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da anáfase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J) Perdas cromossômicas. (B, C) Setas indicam as quebras cromossômicas. (K, L) Pontes cromossômicas. (I, J, L) Multipolaridade. Barra = 5 µm

De acordo com Giacomelli (1999), as pontes cromossômicas resultantes de adesão podem ser múltiplas e persistirem até a telófase, como pode ser observado na Prancha 2.3, Figuras K e L. Pelas mesmas razões que na anáfase, também ocorrem adesões (Prancha 2.3, Figuras B, C, D, E, K e L) e perdas cromossômicas na telófase (Prancha 2.3, Figuras F, G, H, I e J).

Prancha 2.3 – Aberrações cromossômicas na telófase. (A) Fase normal da telófase. (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) Fases anormais da telófase. (B, C, D, E, K, L) Adesão cromossômica. (F, G, H, I, J) Perdas cromossômicas. (K, L) Pontes cromossômicas. Barra = 5 µm

Através dos estudos citogenéticos de espécies expostas ao Cd e outros compostos tóxicos muitas informações estão disponíveis sobre os problemas funcionais que os cromossomos sofrem. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos exatos de atuação do Cd dentro das células.

Segundo Christie e Costa (1984) e Sobkowiak e Deckert (2003), as ACs podem ser resultado do efeito direto do Cd sobre o DNA e RNA. Isto explica a forte inibição da mitose em células meristemáticas de raízes depois de prolongados tratamentos com Cd a uma concentração elevada (LIU; JIANG; GAO, 2003/2004).

Danos causados pelos metais pesados às plantas estão relacionados a sua concentração disponível no meio e à variação genotípica das diferentes espécies vegetais. Além disso, é de se esperar que as propriedades químicas de cada metal pesado determinem diferentes mecanismos de estresse oxidativo e de resposta dos organismos à exposição ao mesmo, conforme demonstrado por Cuypers, Vangronsveld e Clijsters (1999).

Muitas das consequências dos danos causados ao DNA pelo Cd podem estar associadas com a geração de radicais livres durante o estresse oxidativo. Esse estresse produz as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar quebras e danos irreversíveis ao DNA, além de interferirem nas proteínas que estão envolvidas na replicação, reparo, recombinação e transcrição do DNA (WATANABLE; SUZUKI, 2002; LIN et al., 2007). Além disso, causam interferência sobre as tubulinas, que representam uma família de proteínas importantes que estão presentes nos processos de replicação das células, atuando na organização e transporte dos cromossomos, e sobre os componentes da ultraestrutura do citoesqueleto dessas células. As EROs também podem causar a desarmonia das ligações entre o DNA e determinadas proteínas (ZHANG; XIAO, 1998; TUTEJA et al., 2001).

Adicionalmente, outra forma de atuação do Cd nas células vegetais se dá através de sua ligação a grupos sulfidril (radicais -SH) de enzimas que atuam no combate às EROs, inibindo sua atividade (GUO et al., 2004).

2.3.3 Micronúcleos e anormalidades nucleares

Segundo Fenech e Crott (2002), micronúcleos podem ser resultados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular, e acabam sendo envoltos isoladamente por outras membranas. Isso acontece porque se perderam do restante devido às ACs e a alterações de conformação das fibras do fuso mitótico. Segundo Ribeiro (2003), os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Desta maneira, uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos pode ser considerada uma substância clastogênica ou aneugênica (MENG; YI, 2003).

No entanto, apesar da alta frequência de perdas cromossômicas, não foram encontrados micronúcleos durante as análises. Isso se deve ao tempo de exposição ao Cd, pois para formar micronúcleos é necessário que as células passem por vários ciclos de divisão, para que haja tempo do cromossomo perdido ser envolto pela membrana nuclear. Entretanto, com apenas 24 horas de exposição aos tratamentos

já foi suficiente para que os tecidos meristemáticos apresentassem muitas outras aberrações, discutidas acima.

Já as anormalidades nucleares, que se caracterizam pelas anormalidades e/ou alterações morfológicas dos núcleos em interfase, foram visualizadas em baixa frequência, sendo 9 núcleos anormais entre 5247 células do tratamento a $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd e outros 2 núcleos anormais entre 5256 da concentração de $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

A Prancha 2.4 mostra duas fases iniciais das células em que observa-se anomalias. Estas fases são a interfase com alteração morfológica em seu núcleo (Prancha 2.4, Figura B) e a prófase com cromossomos espalhados (Prancha 2.4, Figura D) devido a ausência da membrana nuclear.

Prancha 2.4 - Aberrações cromossômicas na interfase e na prófase. (A) Interfase normal. (B) Interfase anormal, com núcleo apresentando alterações morfológicas. (C) Prófase normal. (D) Prófase anormal, com ausência de membrana nuclear. Barra = $5 \mu\text{m}$

2.4 Conclusão

Em função das variáveis mensuradas, a partir da dose mínima de cádmio empregada neste estudo ($0,018 \text{ mg.L}^{-1}$) é possível constatar aberrações cromossômicas, tais como quebras, perdas, adesões e pontes, em tomateiro.

Referências

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WALTERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, p. 111-72, 2000.

BEHBOODI, B.S.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 411-416, 2004.

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**, Oxford, v. 72, p. 722-725, 2008.

CHRISTIE, N.T.; COSTA, M. *In vitro* assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cell: interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 6, p. 139-158, 1984.

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: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, 14., 2008. São Paulo. **Anais...**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008. p. 203-204.

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.

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The chemical behavior of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. **Free Radical Research**, London, v. 31, p. S39-S43, 1999.

D'AMATO, F. Chromosome endoreduplication in plant tissue: development and function. In: BRYANT, J.A.; CHIATANTE, D. (Ed.). **Plant Cell Proliferation and its Regulation in Growth and Development**. Chichester: Wiley, 1998. chap. 15, p. 153-166.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potencial of 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. (Ed.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. cap. 4, 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.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, 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**, Amsterdam, v. 504, p. 131-136, 2002.

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**, San Diego, v. 88, p. 252-259, 2007.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer. Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonuclein- säure und auf die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, Berlin, v. 135, p. 203–248, 1924.

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

FISKESJÖ, 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. *Allium* test. **Methodology and Molecular Biology**, New York, v. 43, p. 119-127, 1995.

FISKESJÖ, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: WUNCHENG, W.; GORSUCH, J.W.; HUGHES, J.S. (Ed.). **Plants for Environmental Studies**. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1997. chap. 29, p. 307–333.

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, p. 508-511, 2006.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, Paris, v. 21, p. 139-149, 1993.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMASGAUDOT, 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**, Elmsford, v. 58, p. 253-260, 2006.

GIACOMELLI, FRB. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 163p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.

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

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of waste water samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 469, p. 183-218, 1999.

GUO, W.X.; PYE, Q.N.; WILLIAMS, K.S.; STEWART, C.A.; HENSLEY, K.L.; KOTAKE, Y.; FLOYD, R.A.; BROYLES, R.H. Reactive oxygen species in choline deficiency-induced apoptosis in rat hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, p. 1081-1089, 2004.

JUNDE, T.A.R.E.; FREITAS, T.R.O. Toxicologia Evolutiva. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcan, 2003. cap. 48, p. 101-113.

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.

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.

LIN, A.J.; ZHANG, X.H.; CHEN, M.M.; CAO, Q. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. **Journal of Environmental Science-China**, Hong Kong, v. 19, p. 596-602, 2007.

LIU, D.; JIANG, W.; GAO, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tips of garlic. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, p. 79-83, 2003/2004.

MARCANO, L.; DEL-CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas con inhibidores metabólicos. **Ciencia**, Lisboa, v. 3, p. 73-82, 1995.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efecto mitótico y genotóxico del cadmio en poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebolla). **Ciencia**, Lisboa, v. 6, p. 93-99, 1998.

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**, San Diego, v. 88, p. 30-35, 2002.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL-CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, San Diego, v. 94, p. 221- 226, 2004.

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**, Mendoza, v. 30, p. 259-267, 2006.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

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, p. 399-408, 2004.

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

MENG, Z.; YI, H. Genotoxicity of hydrated súlfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 537, p. 109-114, 2003.

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.

PANDA, B.B.; PANDA, K.K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. In: PRASAD, M.N.V.; STRZAKA, K. (Ed.). **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. chap. 39, p. 395-414.

PAVLICA, M.; BESENDORFER, V.; ROSA, J.; PAES, D. The citotoxic 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.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 35, p. 525–545, 1995.

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

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.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. cap. 19, p. 201-223.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutations. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. San Francisco: Pearson Education, 2002. cap. 35, p. 595–621.

SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 71, p. 76-85, 2007.

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**, New York, v. 71, p. 711–716, 2008.

SHARMA, C.B.S.R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 9, p. 409-442, 1990.

SOBKOWIAK, R.; DECKERT, J. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, p. 767-772, 2003.

SWIERENGA, S.H.H.; HEDDLE, J.A.; SIGAL, E.A.; GILMAN, J.P.W.; BRILLINGER, R.L.; DOUGLAS, G.R.; NESTMANN, E.R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 246, p. 301–322, 1991.

TUTEJA, N.; SINGH, M.B.; MISRA, M.K.; BHALLA, P.L.; TUTEJA, R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 36, p. 337–397, 2001.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. cap. 18, p. 327-344.

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

WATANABLE, M.; SUZUKI, T. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology . Part C . Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 4, p. 491–500, 2002.

WEBER, M.; TRAMPCZYNSKA, A.; CLEMENS, S. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 950-963, 2006.

ZHANG, Y.; YANG, X. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, p. 121–126, 1994.

ZHANG, Y.; XIAO, M. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against Cd induced chromosomal aberration and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 420, p. 1–6, 1998.

ZHAO, F.J.; JIANG, R.F.; DUNHAM, S.J.; MCGRATH, S.P. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 172, p. 646-654, 2006.

3 DANOS AO DNA DO TOMATEIRO INDUZIDOS PELO CÁDMIO

Resumo

Os seres vivos estão sujeitos a vários contaminantes ambientais com potencial tóxico, como o cádmio (Cd). Tais substâncias são capazes de provocar uma série de alterações às estruturas e ao metabolismo das células. Uma dessas alterações diz respeito aos danos causados ao DNA de células contaminadas por compostos genotóxicos. Para se detectar a genotoxicidade dessas substâncias, algumas metodologias científicas são empregadas, dentre elas, o ensaio de cometa (EC), que combina técnicas bioquímicas com citogenéticas a fim de detectar injúrias no DNA. Neste trabalho, o tomateiro, cultivar Micro-Tom, foi empregado para conduzir o EC a fim de avaliar a genotoxicidade do Cd. Raízes recém-germinadas, com cerca de 1 cm, foram tratadas com solução de CdCl_2 contendo 0, 0,018, 1,8, 3,7, 5,5, 7,3 e 13 mg.L^{-1} por 24 horas. As etapas do EC foram baseadas em: extração de núcleos, preparação de lâminas contendo os núcleos em agarose, eletroforese, coloração dos cometas pela prata e identificação dos cometas. Empregaram-se triplicatas em todas as etapas e as comparações entre controle e as doses de Cd foram conduzidas através do teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Assim, foram observados cometas sem danos (controle) e cometas com danos em diferentes níveis (mínimos, médios, intensos e máximos) já a partir da dose mínima (0,018 mg.L^{-1}). Uma possível explicação destes danos é que o Cd, ao se ligar de forma direta no DNA, conduza a sua quebra e fragmentação ou, ainda, atue de maneira indireta através do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Toxicologia ambiental; Metal pesado; Ensaio de cometa; Mutação; Estresse oxidativo

Abstract

Any living organism is naturally exposed to environmental contaminants with toxic potential, such as cadmium (Cd). These compounds are able to cause several alterations on structures and cell metabolism. One of these alterations is related to damages caused on DNA from contaminated cells by genotoxic compounds. To detect the genotoxicity of these compounds, some scientific methods are used, including the comet assay (CA), which combines biochemical and cytogenetic techniques to detected DNA damage. In this work, the tomato cultivar Micro-Tom was used to carry out the CA in order to verify Cd genotoxicity. Roots (~1 cm) from seedlings were treated with CdCl_2 solution (0, 0.018, 1.8, 3.7, 5.5, 7.3 and 13 mg.L^{-1}) for 24 hours. CA stages were based on: nucleus extraction, slides with nuclei fixed in agarose, electrophoresis, comet silver staining and comet identification. Triplicates were used in all stages and comparisons among control and Cd concentrations were carried out using Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). Undamaged comets (control) and damaged comets in different levels (minimum, medium, intense and maximum) were observed even at the lowest concentration of Cd used (0.018 mg.L^{-1}). One possible

explanation for these damages is related to direct Cd binding to DNA, leading to its break and fragmentation, or indirectly through increased oxidative stress.

Keywords: Environmental toxicology; Heavy metal; Comet assay; Mutation; Oxidative stress

3.1 Introdução

Os seres vivos estão expostos às ações de vários agentes com potencial tóxico. Estes agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos, que promovam efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, também genéticos (ARNAIZ, 1995). Na área de genética toxicológica, tais agentes são denominados agentes mutagênicos. Portanto, estes agentes são substâncias que também 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; PANDA; PANDA, 2002; UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

A genética toxicológica investiga os mecanismos de ação de compostos tóxicos que são capazes de induzir interações altamente específicas com os ácidos nucleicos, podendo resultar em danos genéticos, tais como mutação de ponto e erros durante o mecanismo de replicação do DNA, irregularidade mitótica, dentre outros (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

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 contaminação ambiental. Os compostos 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).

Dessa maneira, o uso de ensaios para detectar a toxicidade desses compostos se torna importante para realizar o monitoramento de regiões possivelmente contaminadas ou para se proceder à avaliação do potencial tóxico de tais agentes. Segundo White, Rasmussen e Blaise (1996), fontes poluidoras são capazes de reduzir a sobrevivência de um organismo. Assim, essa redução se deve aos

danos causados ao genoma das células somáticas e/ou germinativas das espécies que entraram em contato com estes compostos tóxicos. Consequentemente, esses danos têm sido relacionados a desordens genéticas e ao câncer.

Para se estudar os danos causados ao DNA por compostos tóxicos, tais como o cádmio (Cd), tem sido empregado o ensaio de cometa (EC). Este ensaio é um método de estudo da área de genética toxicológica muito sensível, baseado em danos causados ao DNA pelos compostos tóxicos, em células individualizadas (HARTMANN; SPEIT, 1997).

O EC foi desenvolvido por Singh et al. (1988), que empregaram outras metodologias que já vinham sendo utilizadas na área da genética para desenvolver uma técnica de eletroforese de célula única, chamada em inglês de “*SCGE - single cell gel electrophoresis*”, sob condições alcalinas. Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas para detecção de quebras em fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis, com as abordagens dos ensaios citogenéticos em células individualizadas (KLAUDE et al., 1996; HARTMANN; SPEIT, 1997), sendo capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (TICE et al., 2000). A visualização subsequente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio conveniente para se detectar danos no DNA de células únicas.

É considerado um teste sensível, rápido e eficiente e, quando comparado com outros testes de genotoxicidade, como, por exemplo, o teste de aberrações cromossômicas, ainda apresenta vantagens como flexibilidade e precisão, pois detecta pequenos danos no DNA, necessita de um pequeno número de células, é de fácil aplicação, é reprodutível e pode ser executado em curtos períodos de tempo (KOSZ-VNENCHAK; ROKOSK, 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998; TICE et al., 2000; BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006).

Estudos vêm sendo realizados utilizando-se desta técnica (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006; VENTURA; ANGELIS; MARIN-MORALES 2008; SETH et al., 2008b) e em todos eles, o teste mostrou-se eficaz na detecção dos efeitos danosos dos compostos testados, ou seja, as quebras no DNA.

Durante a última década, o EC foi utilizado em várias áreas de pesquisa, sendo aplicadas como ensaio para monitoramento ambiental, avaliação dos efeitos da radiação sobre os organismos, investigação de processos de reparo do DNA e

ecotoxicologia genética. Frenzilli, Bosco e Barale (2000) empregaram este ensaio na validação dos efeitos genotóxicos de 18 compostos químicos, revelando sua eficiência na identificação de agentes mutagênicos. Além de demonstrarem a produção de quebras nas fitas do DNA, estes autores as correlacionaram positivamente com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos poluentes ambientais, como metais pesados, defensivos agrícolas, entre outros.

Devido ao EC possuir sensibilidade para aplicação em monitoramentos ambientais e testes de agentes potencialmente tóxicos, a descrição de novas espécies modelo é importante para auxiliar as metodologias já estabelecidas através de outras espécies. Além disso, para o tomateiro não são encontrados resultados de genotoxicidade na literatura. E devido ao tomate ter se mostrado eficiente na detecção de anormalidades cromossômicas, como descrito no capítulo 1, também é de interesse testar sua sensibilidade ao Cd na experimentação através do EC.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas raízes com cerca de 1 cm de comprimento obtidas a partir da germinação de sementes de tomateiro em Gerbox, do cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. MT), em BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

3.2.2 Tratamento das raízes

As sementes recém-germinadas e com raízes com cerca de 1 cm de comprimento foram distribuídas em Gerbox contendo papel de alta absorção embebidos em soluções de CdCl₂ (J.T. Baker[®]), nas concentrações de 0,018, 1,8, 3,7, 5,5, 7,3 e 13 mg.L⁻¹, pH 5,6 (ou, 0,1, 10, 20, 30, 40 e 70 µM, respectivamente), além do controle, e mantidas em BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

Após 24 horas de exposição às diversas concentrações de CdCl₂, as raízes foram coletadas diretamente em fixador Carnoy (álcool etílico absoluto em ácido

acético PA, na proporção de 3:1, respectivamente) permanecendo em processo de fixação por 24 horas a temperatura ambiente.

3.2.3 Ensaio de Cometa (EC)

A abordagem do EC foi empregada para verificar o grau de danos ao DNA do tomateiro devido à ação tóxica do Cd. Estes danos foram visualizados, em microscópio, como rastros de fragmentos de DNA que deixam os núcleos, assemelhando-se a cometas.

Como a proposta final foi visualizar 100 cometas de cada concentração de Cd, foram confeccionadas lâminas em números variados a fim de se atingir este número de cometas. Para esta proposta, cada etapa do EC foi realizada seguindo protocolos descritos por três trabalhos científicos, como visto a seguir.

3.2.3.1 Suspensão Nuclear

Para obtenção de uma suspensão semi-pura de núcleos o protocolo seguido foi o de Abdalla, Thomson e Rafudeen (2009).

As regiões meristemáticas de cerca de 20 raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e o pó formado foi colocado em um microtubo. Em seguida, foram adicionados 4 mL.g⁻¹ de tampão de isolamento nuclear (NIB) a temperatura ambiente e misturados cuidadosamente e, então, esta suspensão foi filtrada em membrana de nylon com poros de 80 µm.

O filtrado foi centrifugado a 1260 x *g* por 10 minutos e depois o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 0,9 mL de tampão NIB a temperatura ambiente e adicionaram-se 100 µL de Triton X-100 a 10% (preparado em tampão NIB) para que sua concentração final fosse de 1%, misturando cuidadosamente (o Triton X-100 promove a lise celular e também remove a membrana mais externa do núcleo, pois este contém membrana nuclear dupla). Essa mistura ficou reservada e aguardando a preparação de um microtubo novo contendo 0,8 mL de sacarose a 2,3 M, e só então, aplicou-se 0,6 mL do lisado do passo anterior sobre a agarose, mas

sem homogeneizar. Procedeu-se à centrifugação deste microtubo a 12000 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante mais a agarose foram descartados.

Nesse último passo, o *pellet* era composto por uma mistura de núcleos e restos celulares lisados. Então, a centrifugação em agarose permitiu que apenas as estruturas maiores se depositassem no fundo do microtubo, devido a sua densidade, isolando-se, assim, os núcleos e outros grandes fragmentos celulares (indesejáveis). Por isso o nome suspensão semi-pura é usado.

O *pellet* foi lavado cuidadosamente em tampão NIB, sendo ressuspensionado em 1 mL de tampão NIB e centrifugado a 12000 x *g* por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Essa lavagem foi realizada por mais 2 vezes. Então, após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de tampão NIB para confecção das lâminas.

3.2.3.2 Preparação das Lâminas

A preparação das lâminas seguiu o protocolo descrito por Gichner et al. (2004).

As lâminas foram lavadas em solução de detergente Extran[®] a 10% durante 4 horas, seguidas de lavagem em água corrente de torneira e depois em água destilada.

A seguir, foram aplicados 40 µL de agarose de ponto de fusão normal (NMP – *normal melting point*) a 1%, preparada em tampão fosfato salino (PBS), deixando a agarose polimerizar de um dia para o outro. Em seguida, uma mistura de 50 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – *low melting point*) a 1%, preparada em PBS a 40°C, mais 50 µL de suspensão nuclear foram aplicados sobre a agarose já polimerizada, cobrindo-se com lamínula de vidro.

Essas lâminas contendo as preparações foram resfriadas em geladeira, por 10 minutos e depois tiveram suas lamínulas removidas, pois foi necessário aplicar mais uma fina camada de agarose (100 µL de agarose LMP a 0,5% preparada em PBS), cobrindo com lamínula e novamente resfriando. Ao concluir a preparação das lâminas, foi realizada uma corrida eletroforética das mesmas.

3.2.3.3 Eletroforese

As lâminas contendo as preparações nucleares foram colocadas em cuba de eletroforese, na posição horizontal, mantida em geladeira a 4°C e preenchida com tampão de corrida gelado (a 1 mM de Na₂EDTA e 300 mM de NaOH, pH > 13), preparado no momento do uso. Após 15 minutos de incubação das lâminas dentro da cuba de eletroforese com o tampão, a corrida eletroforética foi iniciada (a 0,72 cm⁻¹; sob 26 V e 300 mA), por cerca de 30 minutos.

Ao término da eletroforese, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas em tampão Tris a 400 mM, pH 7,5, por 3 vezes de 8 minutos.

3.2.3.4 Visualização dos Cometas

Esta etapa se subdivide em três: Fixação, Coloração e Bloqueio da Coloração. Cada uma destas etapas está descrita a seguir.

3.2.3.4.1 Fixação

As lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro de Hellendahl, para proceder à fixação dos materiais cobrindo-as com solução de fixação, composta por ácido tricloroacético a 15%, sulfato de zinco heptahidratado a 5% e glicerol a 5%, por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em água destilada, com duração de 5 minutos cada lavagem, e secas a temperatura ambiente, de um dia para o outro.

3.2.3.4.2 Coloração

Esta etapa foi realizada de acordo com Cerda et al. (1997), consistindo em coloração pela prata. Assim, com auxílio de uma cuba de vidro, as lâminas foram hidratadas em água destilada durante 5 minutos antes da coloração propriamente dita.

A solução de coloração foi preparada no momento do uso, misturando-se 32 mL de solução estoque de carbonato de sódio a 5% em 68 mL de solução estoque A, composta por nitrato de prata a 0,02%, nitrato de amônio a 0,02%, ácido tungstosilícico a 0,1% e formaldeído a 0,05%, pré-aquecidas a 60°C.

Em outra cuba de vidro, envolta por papel alumínio, foi adicionada a solução de coloração, mantendo a cuba em estufa a 37°C e ao abrigo da luz, por cerca de 30 minutos, agitando a solução a cada 3 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas em água destilada durante 5 minutos, repetindo a lavagem por mais 2 vezes.

3.2.3.4.3 Bloqueio da Coloração

Esta etapa teve por objetivo interromper o processo de coloração para evitar o acúmulo de resíduos de prata nas lâminas. Para isso, as lâminas foram mergulhadas em ácido acético a 1% durante 5 minutos. Em seguida, elas foram lavadas em água destilada por 3 vezes de 5 minutos e secas a temperatura ambiente até o dia seguinte.

3.2.3.5 Contagem e Classificação dos Cometas

Com auxílio de microscópio óptico (Axio Scope. A1, Carl Zeiss) em aumento de 200 x, os núcleos foram classificados primeiramente de acordo com presença ou ausência de cometas e, em uma segunda análise, os cometas foram qualificados de acordo com a seguinte classificação subjetiva: a) Classe 0: cometas intactos (sem danos causados pela exposição ao cádmio); b) Classe 1: cometas com danos mínimos; c) Classe 2: cometas com danos médios; d) Classe 3: cometas com danos intensos; e) Classe 4: cometas com danos máximos.

3.2.4 Análise estatística

As comparações entre o tratamento controle e os demais tratamentos com seis concentrações de Cd foram feitas usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

3.3 Resultados e Discussão

O EC realizado com diferentes concentrações de Cd mostrou ser uma análise sensível para a detecção de problemas relacionados aos danos causados ao DNA por este metal.

A sensibilidade do EC aos estresses ambientais ou toxicológicos deve-se ao fato de que nesta técnica os núcleos de plantas tratadas com agentes tóxicos estão isolados, ou seja, apresentam-se sem citosol e desprotegidos da parede celular (GICHNER et al., 2004).

Todas as concentrações de Cd promoveram danos ao DNA do tomateiro depois de 24 horas de exposição (Tabela 3.1). O tratamento controle apresentou menor porcentagem de células com danos ao DNA, que é normalmente encontrado nas espécies vegetais. A partir de $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd já foi possível observar 59% de núcleos com danos. Esta porcentagem aumentou constantemente com a elevação das concentrações de Cd, chegando a proporcionar 100% de danos ao DNA na concentração de 13 mg.L^{-1} . Nota-se, que com o aumento nas doses de Cd, houve também a diminuição de núcleos íntegros, pois foi possível observar, numericamente, que a viabilidade de tais núcleos ficou cada vez mais comprometida pelos danos causados ao DNA, como pode ser visto no decréscimo de núcleos normais em relação ao aumento das doses de Cd na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Frequências de núcleos normais e anormais (porcentagem de núcleos anormais)

Núcleos	Controle	Concentrações de Cd (mg.L ⁻¹)					
		0,018	1,8	3,7	5,5	7,3	13
Normais	91	41	32	24	21	8	0
Anormais	9 (9)a	59 (59)b	68 (68)b	66 (73)b	71 (77)b	77 (90)b	76 (100)b

Médias seguidas de letras diferentes são significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Quando os núcleos são analisados isoladamente, eles podem ser classificados de forma subjetiva. Assim, os cometas podem ser classificados em: Classe 0 para cometas intactos, sem danos causados pela exposição ao Cd; Classe 1 para os cometas com danos mínimos; Classe 2 para cometas com danos médios; Classe 3 para cometas com danos intensos e Classe 4 para cometas com danos máximos (Prancha 3.1).

Prancha 3.1 - Classes de Cometas. (A) Classe 0. (B) Classe 1. (C) Classe 2. (D) Classe 3. (E) Classe 4

Observa-se pela Tabela 3.2 que, numericamente, com o aumento da concentração de Cd, os cometas apresentam-se cada vez mais aberrantes, ou seja, as caudas são maiores, o que representa um rastro de DNA mais extenso devido aos danos causados a ele.

Tabela 3.2 – Frequência de núcleos normais e anormais em cada classe de cometa em função das concentrações de Cd

Concentrações (mg.L ⁻¹)	Classes				
	0	1	2	3	4
Controle	91	9	0	0	0
0,018	41	30	29	0	0
1,8	32	15	31	22	0
3,7	24	0	27	39	0
5,5	21	0	31	40	0
7,3	8	0	0	47	30
13	0	0	0	11	65

Médias dos dados da análise de três repetições por tratamento.

Os mecanismos moleculares responsáveis pela ação mutagênica do Cd sobre o DNA ainda não foram completamente elucidados, mas pode-se sugerir que exista uma interação direta e/ou indireta do Cd com o DNA (VALVERDE; TREJO; ROJAS, 2001). Se esta interação for de forma direta, possivelmente ocorra uma ligação do Cd ao DNA, mais especificamente com as bases nitrogenadas adenina e guanina, o que enfraquece as ligações entre as bases adenina e timina e entre guanina e citosina, causando a abertura da dupla hélice de DNA. Além disso, é possível que o Cd rompa as ligações entre os grupos fosfato e as pentoses do DNA, gerando quebras e fragmentos de DNA (HOSSAIN; HUQ, 2002). Pode, ainda, provocar ligações cruzadas do DNA a proteínas diversas (ZHANG; XIAO, 1998; TUTEJA et al., 2001). Essa interação direta pode gerar quebras no DNA e, se ocorrerem na dupla fita, serão mais relevantes, pois são mais difíceis de serem reparadas, podendo constituir, posteriormente, lesões letais ou mutagênicas nos organismos expostos (COLLINS et al., 1997).

Já na interação indireta, a toxicidade do Cd pode provocar o estresse oxidativo através de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radicais hidroxila e superóxidos, além de peróxido de hidrogênio (GRATÃO et al., 2008a), e são essas EROs que causam danos ao DNA e à célula. Células sob estresse oxidativo apresentam várias disfunções devido a lesões causadas pelas EROs aos lipídeos, proteínas e DNA (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

As plantas têm seus mecanismos moleculares a fim de minimizarem os danos causados pelas EROs. Estes mecanismos, baseados nos antioxidantes, sequestram e neutralizam os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo, particularmente aqueles do tipo tiol e algumas enzimas. Estes mecanismos de defesa em plantas incluem enzimas como superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase e glutathione peroxidase, entre outras, que metabolizam as EROs (HIGASHI-OKAI et al., 2004; GRATÃO et al., 2005; MISHRA et al., 2006; SETH; CHATURVEDI; MISRA, 2007a). Estas enzimas interagem com as EROs, formando um sistema de resposta antioxidativa que pode minimizar as consequências do estresse e manter o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (EMBERSON, 2003).

Ao estudar os efeitos do Cd em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Gincher et al. (2004) observaram baixo nível de danos no DNA nos resultados do EC e concluíram que o Cd induzia danos de forma indireta sobre o DNA. No presente trabalho, os danos ao DNA apresentaram-se em níveis elevados. Dessa forma, a ação genotóxica do Cd em tomateiro possivelmente incida diretamente ao DNA, contrariamente ao sugerido por Gincher et al. (2004).

Apesar de as injúrias causadas ao DNA da cebola (*Allium cepa*) devido à exposição por Cd, Seth, Chaturvedi e Misra (2008a) mostraram que essa planta pode se recuperar do estresse oxidativo. Estes autores constataram que essa espécie teve capacidade de se recuperar depois que o Cd foi eliminado do experimento, após 24 horas de tratamento sem Cd. Isso pode ter sido resultado do processo de desintoxicação através da síntese de fitoquelatinas e de outras moléculas orgânicas de baixo peso molecular, como aquelas do tipo tiol, como cisteína e glutathione, que quelam o metal pesado e o sequestram para o vacúolo para posterior desintoxicação (MISHRA et al., 2006; SETH; CHATURVEDI; MISRA, 2008a).

A literatura disponível sobre a genotoxicidade/mutagenicidade do Cd apresenta muitos resultados para testes feitos com mamíferos por causa de sua relevância direta para os seres humanos (HARTWIG, 1995; DHAWAN; MATHUR; SETH, 2001; ROZGAJ; KASUBA; FUCIC, 2002). Já estudos feitos com plantas, relatando danos ao DNA através do EC são poucos. Dentre esses estudos, poucas espécies são utilizadas, como por exemplo, fava (*Vicia faba*) (KOPPEN; VERSCHAEVE, 1996), *Arabidopsis thaliana* (MENKE et al., 2001), cevada (*Hordeum*

vulgare) (JOVTCHEV; MENKE; SCHUBERT, 2001), *Calamagrostis epigejos* (PTÁCEK et al., 2002), algumas culturas agronômicas, como milho e ervilha (GICHNER; PATKOVÁ; JIN, 2003), tabaco (STAVREVA et al., 1998) e a cebola, a mais utilizada, pois apresenta boa correlação com os dados gerados pelos modelos usados para mamíferos (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994). Dessa forma, novas espécies podem contribuir para tais estudos, como o tomateiro, pois os primeiros organismos com maiores chances de terem contato com os compostos poluentes/tóxicos são as plantas (GICHNER; PATKOVÁ; JIN, 2003; GICHNER et al., 2004).

3.4 Conclusão

A partir da dose mínima de cádmio empregada neste experimento ($0,018 \text{ mg.L}^{-1}$) é possível constatar danos causados ao genoma do tomateiro, expressos na forma de quebras de fita dupla do seu DNA, vistos em forma de cometas.

Referências

- ABDALLA, K.O.; THOMSON, J.A.; RAFUDEEN, M.S. Protocols for nuclei isolation and nuclear protein extraction from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* for proteomic studies. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 384, p. 365–367, 2009.
- ARNAIZ, R.R. Las Toxinas Ambientais y sus Efectos Genéticos. México: La Ciencia, 1995. 95p.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, Amsterdam, v.415, p.167-184, 1998.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 357-364, 2006.
- CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. The DNA ‘comet assay’ as a rapid screenins technique to control irradiated food. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p. 167-181, 1997.
- COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it tell us? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p. 183-193, 1997.
- CONNOR, J.A.; FERGUNSON, M.A. **Essential Medical Genetics**. London: Smith Blackwell Scientific Publications, 1993. 260p.
- DHAWAN, A.; MATHUR, N.; SETH, P.K. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 474, p. 121–128, 2001.
- EMBERSON, L. Air pollution on crops and forests: an introduction. In: EMBERSON, L.; ASHMORE, M.; MURRAY, F. (Ed.). **Air pollutions on crops and forests, a global assessment**. Singapore: Imperial College Press, 2003. p. 334.
- ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 1, p. 529–539, 2001.
- 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.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, p. 99–112, 1985.
- GICHNER, T.; PATKOVÁ, Z.; JIN, K.K. DNA damage measured by the Comet assay in eight agronomic plants. **Biologia Plantarum**, Praha, 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 recombination in tobacco leaves. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 559, p. 49–57, 2004.

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

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 481–494, 2005.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.153, p.321–333, 2008a.

HARTWIG, A. Current aspects in metal genotoxicity. **Biometals**, London, v. 8, p. 3–11, 1995.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.90, n.2-3, p.183–188, 1997.

HIGASHI-OKAI, K.; KANBARA, K.; AMANO, K.; HAGIWARA, A.; SUGITA, C.; MATSUMOTO, N.; OKAI, Y. Potent antioxidative and antigenotoxic activity in aqueous extract of Japanese rice bran-association with peroxidase activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 628–633, 2004.

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

JOVTCHEV, G.; MENKE, M.; SCHUBERT, I. The Comet assay detects adaptation toMNU-induced DNA damage in barley. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, p. 95–100, 2001.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The Comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 363, p. 89–96, 1996.

KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. The alkaline Comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 360, p. 193–200, 1996.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, Praha, v. 45, p. 153–156, 1997.

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**, Tokyo, v. 69, p. 399-408, 2004.

MENKE, M.; CHEN, I.P.; ANGELIS, K.J.; SCHUBERT, I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the Comet assay after treatment with different classes of genotoxins. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, p. 87–93, 2001.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S.V.; PRASAD, M.N.V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 25–37, 2006.

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

PANDA, B.B.; PANDA, K.K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. In: PRASAD, K.N.V.; STRZALKA, K. (Ed.). **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002. cap. 15, p. 395–414.

PTÁČEK, O.; MÜHLFELDOVÁ, Z.; DOSTÁLEK, J.; CECHÁK, T.; GICHNER, T. DNA damage in wood small-reed (*Calamagrostis epigejos*) plants growing in a sediment reservoir with substrates from uranium mining. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 4, p. 592–595, 2002.

ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; FUCIC, A. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the Comet assay and cytogenetic tests. **Journal of Trace Elements**, Berne, v. 16, p. 187–192, 2002.

SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental toxicology**, New York, v. 22, p. 539–549, 2007a.

SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. The role of phytochelatin and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica uncea* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 71, p. 76-85, 2008a.

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**, New York, v. 71, p. 711–716, 2008b.

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

STAVREVA, D.A.; PTÁČEK, O.; PLEWA, M.J.; GICHNER, T. Single cell gel electrophoresis analysis of genomic damage induced by ethyl methanesulfonate in cultured tobacco cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 422, p. 323–330, 1998.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIAYMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 3, p. 206-221, 2000.

TUTEJA, N.; SINGH, M.B.; MISRA, M.K.; BHALLA, P.L.; TUTEJA, R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. A review. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 36, p. 337–397, 2001.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. Cap. 18, p. 327-344.

VALVERDE, M.; TREJO, C.; ROJAS, E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? **Mutagenesis**, New York, v. 16, p. 265–270, 2001.

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

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. 116-139, 1996.

ZHANG, Y.; XIAO, H. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 420, p. 1–6, 1998.

4 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE A ORGANIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS EM TOMATEIRO

Resumo

Os microtúbulos (MTs) se organizam em estruturas essenciais para a condução de várias atividades celulares, tais como as fibras do fuso mitótico e do fragmoplasto. Os MTs são formados por subunidades de tubulinas, que são suscetíveis às alterações do meio ambiente. Tem sido evidenciado que o cádmio (Cd) causa danos aos MTs de espécies de plantas. Dessa forma, os efeitos do Cd sobre os MTs de células meristemáticas de raiz do tomateiro, cultivar Micro-Tom, foram investigados através de imunodeteção de α -tubulinas. Plântulas expostas a 0 e 3,7 mg.L⁻¹ de CdCl₂ foram analisadas através de microscopia de imunofluorescência indireta para α -tubulina e quatro tipos principais de estruturas de MTs foram encontradas. Estas estruturas apresentaram-se bem caracterizadas em função da fase do ciclo celular, no controle: arranjos na interfase, bandas na prófase inicial, fuso mitótico e fragmoplasto. Por outro lado, na dose de Cd testada, observou-se que a organização dos MTs do citoesqueleto teve seu mecanismo de controle alterado. Nesta situação, evidenciou-se a formação de arranjos atípicos de MTs no citoesqueleto durante a interfase, que consistiu de fragmentos e feixes ondulados de MTs. Em alguns casos, os MTs se desintegraram em fragmentos curtos, chegando a desaparecer, indicando a despolimerização dos MTs. O Cd também promoveu a desordem das fibras do fuso mitótico, com consequente visualização de perdas, quebras e pontes cromossômicas, C-metáfases e poliploidização. Estas alterações podem ser devidas à competição do Cd em sítios de cálcio no apoplasto, acarretando um desbalanço de cálcio citosólico que ativa a calmodulina, a qual está associada à despolimerização dos MTs. Adicionalmente, o Cd liga-se aos radicais -SH das tubulinas e impede a interação entre estas proteínas. Dessa forma, sugere-se que a ação mais provável do Cd no tomateiro deva ocorrer primeiramente sobre os MTs do citoesqueleto. Finalmente, através dos resultados dos três capítulos deste trabalho, pode-se destacar a importância do tomateiro como planta modelo e sua aplicabilidade em estudos de genotoxicidade e de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Metal pesado; Planta; Microtúbulo; Tubulina; Calmodulina; Radical sulfidril

Abstract

Microtubules (MTs) are essential structures that drive important cell activities, such as mitotic spindle fibers and phragmoplast. MTs are composed by tubulin subunits that are susceptible to environmental changes. Cadmium (Cd) was shown to cause damage on MTs of plant species. Therefore, Cd effects on MTs of dividing root-tip cells of the tomato cultivar Micro-Tom were investigated by α -tubulin immunodetection. Seedlings were cultivated under 0 and 3.7 mg.L⁻¹ CdCl₂ concentrations and analyzed using anti- α -tubulin by indirect immunofluorescence

microscopy. Four MTs structures were found. These structures appeared to be dependent upon the stage of the cell cycle: the interphase array, preprophase band, mitotic spindle and phragmoplast were typical for the control cells. On the other hand, the mechanisms of cytoskeleton MTs organization were modified using 3.7 mg.L^{-1} of Cd. Cd induced the formation of atypical MT arrays in the cortical cytoplasm of the interphase cells, consisting of MT fragments and wavy MT bundles. In some cases, MTs disintegrated into shorter fragments or completely disappeared, indicating MT depolymerization. Cd also induced a disorder of the mitotic spindle fibers allowing visualization of chromosome aberrations, such as losses, breaks, bridges, c-metaphases and polyploidizations. These alterations may be due to Cd competition in calcium sites in the apoplast, leading to a cytosolic calcium disbalance that activates calmodulin, which is associate with depolymerization of MTs. Additionally, Cd binds to -SH radicals of tubulins and prevents the interaction between these proteins. Therefore, it is possible to suggest that the most probable Cd action on tomato should happen firstly on cytoskeleton MTs. Finally, according to the results from the three chapters of this work it is possible to highlight the importance of tomato as a model plant and its applicability in genotoxicity studies and environmental monitoring.

Keywords: Heavy metal; Plant; Microtubule; Tubulin; Chromosome aberration

4.1 Introdução

Os microtúbulos (MTs) representam um dos componentes do citoesqueleto das células e são compostos primariamente por polipeptídeos monoméricos e globulares, chamados de α -, β - e γ -tubulinas. Os MTs são responsáveis pela morfologia, expansão e divisão celulares, movimentos de organelas e outras estruturas, e pela transdução de alguns sinais (HEPLER; HUSH, 1996; BARLOW; BALUŠKA, 2000; LINDA, 2000; ALBERTS et al., 2002; WASTENEYS; GALWAY, 2003). Os MTs além de manterem a ultraestrutura das células, são responsáveis por separarem os cromossomos durante a mitose e a meiose e promoverem a citocinese.

Os MTs formam-se quando as subunidades de α - e β -tubulina se associam através de ligações não-covalentes para formar heterodímeros que se agregam direcionalmente formando filamentos lineares, com um diâmetro exterior de 24 a 25 ηm e interior de 13 a 15 ηm (MAYER; JÜRGENS, 2002). Durante a divisão celular, organizam-se em estruturas dinâmicas que configuram e conduzem as diferentes fases da mitose. Esta dinâmica requer a cooperação funcional de diferentes proteínas que se associam aos MTs. As γ -tubulinas existem em baixa quantidade

nas células e estão relacionadas com as estruturas responsáveis pela nucleação e organização dos MTs nas extremidades basais (VANSTRAELEN; INZÉ; GEELLEN, 2006).

Os MTs das células vegetais formam quatro tipos básicos de arranjos durante o ciclo celular, a saber: MTs corticais em interfase, banda na prófase inicial, que correspondem ao futuro plano de divisão celular, fuso mitótico e fragmoplasto. Este último consiste em dois conjuntos de MTs paralelos, que guiam a deposição de celulose para a formação da parede celular e, conseqüente, citocinese (CYR; PALEVITZ, 1995).

Durante a mitose, a rede de MTs é constituída por fibras corticais justapostas e orientadas perpendicularmente ao eixo primário do alongamento celular, estando alguns MTs ligados à membrana celular. No fim da fase G_2 da divisão celular, a densidade de MTs aumenta dando início à formação da banda na prófase inicial, que assume o aspecto de uma banda estreita e circunscrita à região onde mais tarde ocorrerá a citocinese (SCHMIT; NICK, 2008). No início da prometáfase começa a formação do fuso acromático, responsável pela correta segregação das cromátides irmãs em cada ciclo celular, adquirindo uma forma de gaiola microtubular que envolve o envelope nuclear até este se desagregar no final da prófase. Na anáfase ocorre a separação individualizada e simultânea de todas as cromátides irmãs devido ao encurtamento dos MTs. E, finalmente, na telófase, inicia-se a formação de um denso cilindro de MTs formando-se a típica estrutura anelar, o fragmoplasto, cuja principal função parece ser a sinalização do local onde as vesículas provenientes do aparelho de Golgi migrarão, para o plano equatorial da célula, originando as novas membranas plasmáticas e parede celular (SCHMIT; NICK, 2008).

A interação de metais pesados com o citoesqueleto das células pode interferir na estrutura e função dos MTs (WASTENEYS; GALWAY, 2003; WASTENEYS, 2004). O cádmio (Cd) causa inibição do crescimento das raízes, distúrbios no sistema antioxidante, redução do conteúdo de clorofila e ineficiência do fotosistema II (KASTORI et al., 1998; DIETZ; BAIER; KRAMER, 1999; VERMA; DUBEY, 2003; LOMBARDI; SEBASTIANI, 2005). Dessa forma, evidências têm demonstrado que metais pesados interferem em certos elementos do citoesqueleto das células, que podem modificar a arquitetura e a função celulares.

Eun, Youn e Lee (2000) demonstraram que o chumbo (Pb) interferiu no alinhamento dos MTs em milho (*Zea mays*) quando estes eram expostos a partir de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ de Pb e concluíram que a análise de MTs era mais sensível do que a análise de formação de micronúcleos, que foi detectada a partir células tratadas com 41 g.L^{-1} de Pb. Aberrações nos MTs foram evidenciadas durante a mitose e a citocinese em raízes de *Triticum turgidum* tratadas com alumínio (Al) (FRANTZIOS; GALATIS; APOSTOLAKOS, 2000, 2001). Os metais pesados Cd, Pb e Ni apresentaram ações diferentes daquelas do Al em relação às alterações dos MTs em células meristemáticas de cebola (*Allium cepa*) (DOVGALYUK; KALYNYAK; BLUMEA, 2003). Em investigações das interações entre o Cd e o citoesqueleto de células interfásicas de alga verde (*Spirogyra decimina*) foram constatadas alterações na organização dos MTs (PŘIBYL; CEPÁK; ZACHLEDER, 2005). Fusconi, Gallo e Camusso (2007) afirmaram que uma análise de MTs do citoesqueleto de espécies tratadas com Cd é altamente sensível e rápida para o monitoramento ambiental, em comparação com outros testes, tais como a análise de aberrações cromossômicas e índice mitótico. E, Liu, Jiang e Gao (2003/2004) demonstraram que metais pesados perturbam a divisão mitótica em alho (*Allium sativum*).

Aberrações nos MTs podem ser evidenciadas logo após o contato com o Cd, por menor que seja a concentração desse metal, como foi demonstrado em alho por Liu, Jiang e Gao (2003/2004) a uma concentração de $0,052 \text{ mg.L}^{-1}$. Este relato sugere que o citoesqueleto de MTs pode ter um importante papel no mecanismo de toxicidade ao metal e a tolerância em plantas. Vários metais têm se mostrado muito tóxicos às plantas e uma das respostas desses organismos é a morte celular programada, como evidenciado para o Cd (IAKIMOVA et al., 2008; KUTHANOVA et al., 2008).

A organização dos MTs é muito sensível a vários fatores ambientais como a luz, altas e baixas temperaturas, metais pesados, agrotóxicos, entre outros (HEPLER; HUSH, 1996; SMERTENKO et al., 1997; SCHROER, 2001; MÜLLER; MENZEL; ŠAMAJ, 2007). Portanto, os estudos que utilizam a investigação dos MTs para detectar anomalias causadas por compostos tóxicos são bastante sensíveis e geram dados relevantes sobre a toxicidade de certas substâncias. Por isso, a técnica de imunodeteção foi empregada para a análise dos efeitos do Cd sobre a organização dos microtúbulos de α -tubulina em células meristemáticas de raiz de tomateiro.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas raízes com cerca de 1 cm de comprimento obtidas a partir da germinação de sementes de tomateiro em Gerbox, do cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. MT), em BOD a 25°C, sem fotoperíodo.

4.2.2 Tratamento com Cádmio (Cd)

Ainda em BOD, estas raízes foram tratadas com 3,7 mg.L⁻¹ (20 µM) de CdCl₂ (J.T. Baker®), pH 5,6, por 24 horas.

A escolha dessa concentração ocorreu devido ao elevado número de aberrações cromossômicas provocadas pelo Cd (apresentando células aberrantes nas seguintes proporções: 92% das metáfases, 93% das anáfases e 63% das telófases), e também por apresentar o índice mitótico de 1,6%, sendo o mais elevado entre os tratamentos afetados pelo metal pesado, como exposto no capítulo 2 desta tese.

4.2.3 Imunodeteção de α-tubulina

Para investigar a integridade das fibras do fuso mitótico e do citoesqueleto, esta etapa foi desenvolvida de acordo com o protocolo modificado a partir daquele descrito por Liu et al. (2009).

Logo após 24 horas de tratamento com Cd, as raízes foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato salino (PBS) sob pH 7,0 por 1 h e a temperatura ambiente.

Depois da fixação, as raízes foram lavadas por 3 vezes em PBS (pH 7,0) por 8 minutos cada lavagem e procedeu-se à digestão enzimática em solução de celulase a 15% e pectinase a 22% por cerca de 30 minutos. Em seguida as raízes foram lavadas em PBS (pH 7,0) por 3 vezes de 8 minutos (sob leve agitação).

Sobre uma lâmina, isolou-se a região meristemática de uma raiz e adicionou-se uma gota de PBS (pH 7,0). Uma lamínula de vidro foi posicionada sobre esta preparação e, então, foi feita uma leve pressão com a ponta dos dedos sobre essa lamínula, para que fosse possível esmagar suavemente as células. Este procedimento foi realizado para 10 raízes tratadas com Cd e para outras 10 raízes que receberam apenas água destilada durante a germinação. Em seguida, todas as lamínulas foram removidas com auxílio de nitrogênio líquido e deixadas secar naturalmente.

Depois de aplicar 50 μL de Triton-X 100 a 0,5% em PBS (pH 7,0), preparado no momento do uso, sobre as preparações (para promover a permeabilidade da membrana plasmática), cobriu-se com lamínula de parafilme (Packaging Company) e depois de 15 minutos a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS (pH 7,0), por 8 minutos cada lavagem.

Em seguida, foram aplicados 20 μL de anticorpos monoclonais de rato anti- α -tubulina (Sigma T-9026) sobre as preparações (diluídos a 1/100 em PBS, sob pH 7,0) e cobertas com lamínula de parafilme (Packaging Company). Estas preparações foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos e, em seguida, foram lavadas 3 vezes em PBS (pH 7,0) durante 10 minutos cada lavagem.

Logo após, em ambiente com pouca luz, foram aplicados sobre as preparações 20 μL de anticorpos de ovelha anti- α -tubulina de rato (Sigma F-0257) que possuem moléculas fluorescentes acopladas de fluoresceína isotiocianato (FITC), preparados na diluição de 1/50 em PBS (pH 7,0) e cobertas com lamínula de parafilme (Packaging Company). Estas preparações foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos (protegidas da luz) e, em seguida, lavadas cuidadosamente por 3 vezes em PBS (pH 7,0) por 10 minutos cada lavagem.

Adicionou-se cerca de 10 μL do agente antifade Fluoroshield (Sigma) contendo DAPI (dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol). A preparação do agente antifade com DAPI (na proporção de 1:100) se deu na diluição de 5 μL de DAPI (a 0,2 mg.mL^{-1} em PBS, sob pH 7,0) em 495 μL de Fluoroshield (Sigma). As preparações foram cobertas por lamínula de vidro e seladas com cola de borracha.

Antes de analisar as preparações, estas foram guardadas em frasco escuro em geladeira a 4°C, por 3 dias, para que os corantes fluorescentes se estabilizassem.

4.2.4 Documentação de Imagens

As preparações foram analisadas em microscópio de fluorescência Axioskop (Carl Zeiss), com auxílio dos filtros: Zeiss *filter set* 02 (para emissão de luz azul fluorescente – DAPI, com excitação em 359 nm e emissão em 461 nm) e Zeiss *filter set* 09 (para emissão de luz verde fluorescente – FITC, com excitação em 495 nm e emissão em 519 nm). As imagens foram capturadas através da câmera Axio Cam MRc (Carl Zeiss). Estes equipamentos pertencem ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA), do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka.

4.2.5 Softwares empregados

O *software* Axio Vision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss) foi empregado para a captura de imagens oriundas da metodologia de imunodetecção de α -tubulinas.

A montagem de pranchas e outros tratamentos de imagens foram realizados com o auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated).

4.3 Resultados e Discussão

O Cd afetou a arquitetura dos MTs nas células meristemáticas de raiz do tomateiro em muitos casos por despolimerizar os MTs, que puderam ser visualizados exibindo baixa intensidade de fluorescência. Além disso, o Cd induziu muitas aberrações cromossômicas.

Foram evidenciados quatro arranjos de MTs típicos nas análises das células do tratamento controle. Esses arranjos foram: MTs corticais em interfase (Prancha 4.1, Figura A2), banda na prófase inicial (Prancha 4.2, Figura A2), fuso mitótico (Prancha 4.3, Figura A2) e fragmoplasto (Prancha 4.5, Figura A2). Já na análise das

células tratadas com Cd, foram constatadas aberrações na organização dos MTs para todas as fases do ciclo da divisão mitótica.

Os arranjos de MTs corticais de células meristemáticas normais foram abundantes durante a interfase. Estes arranjos podem ser observados de forma organizada e paralelos uns aos outros, orientados transversalmente em relação ao longo eixo da célula (Prancha 4.1, Figura A2). Através da Prancha 4.1, Figuras A1-A3, os MTs foram localizados no citoplasma, como citoesqueleto, transversalmente ao longo eixo da célula em interfase e isso é comumente observado em muitas espécies de plantas (ZHANG; WADSWORTH; HEPLER, 1990; HEPLER; HUSH, 1996; INOUÉ; OLDENBOURG, 1998; VANTARD; COWLING; DELICHÈRE, 2000; SHAMINA, 2005).

Na prófase inicial normal, os MTs corticais reuniram-se para formar a banda vista em torno do núcleo (Prancha 4.2, Figura A2), que persistiu até o final da prófase. Em seguida, essa banda começou a desaparecer e as fibras do fuso mitótico começaram a se organizar, chegando à metáfase e organizando os cromossomos na placa equatorial da célula (Prancha 4.3, Figuras A1-A3). Então, as cromátides irmãs começaram a ser separadas com a movimentação para polos opostos durante a anáfase, através do encurtamento e contração dos MTs (Prancha 4.4, Figuras A1-A3). Assim que as células entraram em telófase, os MTs se organizaram para formar o fragmoplasto (Prancha 4.5, Figuras A1-A3), que consiste em dois conjuntos de MTs paralelos, que guiam a formação das membranas plasmáticas e a deposição de celulose para a formação da parede celular, tendo como consequência a citocinese (CYR; PALEVITZ, 1995).

O Cd causou mudanças na estrutura do citoesqueleto das células em interfase, as quais apresentaram aberrações nos MTs corticais (Prancha 4.1, Figuras B1-E3). Nestas células, os MTs passaram de retas transversais para ligeiramente ondulados e aleatoriamente organizados. Muitas vezes se mostraram descontínuos, formando fragmentos curtos e de tamanhos diferentes, devido às falhas de continuidade destes MTs. Além disso, em algumas células estes MTs se agregaram formando feixes fragmentados que fluoresceram intensamente na análise microscópica. Em consequência desses fatos, o número de MTs diminuiu (Prancha 4.1, Figuras B2, C2, D2 e E2).

Durante a prófase inicial o Cd alterou a conformação das bandas de MTs que encontram-se ao redor do núcleo (Prancha 4.2, Figuras B1-E3). Mais uma vez o Cd

provocou a ondulação dos MTs e a falha na formação dos mesmos, além de apresentarem a mesma tendência de se agregarem em feixes, mas menos espessos, como ocorreu na interfase (Prancha 4.2, Figuras B2, C2, D2 e E2). Outro fato observado foi a mudança no sentido dos MTs, que passaram a ter orientação contrária em algumas células da prófase inicial, ocupando uma posição em sentido longitudinal em relação ao longo eixo da célula (Prancha 4.2, Figuras D2 e E2).

Os MTs foram bastante afetados pelo Cd durante a metáfase (Prancha 4.3, Figuras B1-E3). Nem todos os cromossomos tiveram seus cinetócoros alinhados junto ao plano equatorial das células, devido a má formação e organização dos MTs. Em alguns casos, os MTs não foram sintetizados (Prancha 4.3, Figura B2) ou foram polimerizados parcialmente, e, estando ausentes, alguns cromossomos se perderam e em outras situações os cromossomos permaneceram desordenados e misturados entre si, configurando as chamadas C-metáfases (Prancha 4.3, Figura B1).

Através do corante fluorescente DAPI foi possível identificar outras aberrações cromossômicas além da C-metáfase, tais como adesões (Prancha 4.3, Figuras C1 e D1) e perdas cromossômicas. Falhas de continuidade dos MTs causaram o encurtamento dos mesmos e o fenômeno de aglomeração das fibras em feixes também ocorreu, sendo evidenciado através da fluorescência intensa vista ao microscópio, além da desorganização dos mesmos (Prancha 4.3, Figuras C2, D2 e E2).

Na anáfase, poucos tipos de alterações dos MTs foram observados (Prancha 4.4, Figuras B1-E3). Já em relação às aberrações cromossômicas muitos tipos foram encontrados, como visto com auxílio do corante fluorescente DAPI, tais como perdas (Prancha 4.4, Figura B1), divisão desigual dos cromossomos (Prancha 4.4, Figura C1) e pontes cromossômicas (Prancha 4.4, Figuras D1 e E1). Em relação às alterações dos MTs, estes se encontravam fragmentados e em feixes desordenados (Prancha 4.4, Figuras B2, C2 e D2). Também foi possível constatar a formação de múltiplos polos durante a anáfase, fenômeno este conhecido como multipolaridade (Prancha 4.4, Figura E2).

A telófase apresentou basicamente alterações relacionadas com a má formação do fragmoplasto (Prancha 4.5, Figuras B2, C2, D2 e E2), além de alguns feixes de MTs.

Prancha 4.1 – Organização dos microtúbulos de α -tubulina na interfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle apresentando vários MTs corticais orientados transversalmente ao longo eixo da célula. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd: os MTs apresentam-se levemente ondulados, alguns curtos devido às falhas de continuidade, distribuídos aleatoriamente, pouco organizados e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m

Prancha 4.2 – Organização dos microtúbulos de α -tubulina na prófase inicial. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle mostrando a formação de uma banda de MTs ao redor do núcleo. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd: os MTs apresentam-se ondulados, alguns mais curtos devido às falhas de continuidade, desorganizados e vários feixes com fluorescência intensa. (D2, E2) MTs com orientações contrárias, acompanhando o sentido longitudinal dos eixos das células. Barra = 5 μ m

Prancha 4.3 – Organização dos MTs de α -tubulina na metáfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle. (A2) Fibras do fuso mitótico. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B1) C-metáfase. (B2) Ausência de fibras do fuso mitótico. (C1, D1) Adesão cromossômica. (C2, D2, E2) MTs curtos devido às falhas de continuidade e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m

Prancha 4.4 – Organização dos MTs de α -tubulina na anáfase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle, cromossomos e MTs. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B1) Seta indica a perda cromossômica. (C1) Divisão desigual dos cromossomos. (D1, E1) Pontes cromossômicas. (B2, C2, D2) MTs curtos devido às falhas de continuidade, desorganizados e muitos feixes fragmentados exibindo fluorescência intensa. (E2) Setas indicam multipolaridade. Barra = 5 μ m

Prancha 4.5 – Organização dos MTs de α -tubulina na telófase. (A1, B1, C1, D1, E1) DNA corado pelo corante fluorescente DAPI, em azul. (A2, B2, C2, D2, E2) Imunodeteção de α -tubulina, em verde. (A3, B3, C3, D3, E3) Sobreposição das imagens 1 e 2 das respectivas letras. (A) Célula do tratamento controle. (A2) MTs do fragmoplasto. (B, C, D, E) Células tratadas com Cd. (B2, C2, D2, E2) Falhas na formação dos MTs do fragmoplasto e alguns feixes de MTs exibindo fluorescência intensa. Barra = 5 μ m

O Cd induziu várias desordens na organização dos MTs, assim como aberrações cromossômicas, como pontes na anáfase, quebras, perdas e adesões. As aberrações cromossômicas mais abundantes foram as perdas (Prancha 4.4, Figura B1), as adesões (Prancha 4.3, Figuras C1 e D1) e as C-metáfases (Prancha 4.3, Figura B1). Além disso, a maioria dos cromossomos na fase de metáfase apresentaram orientações do cinetócoro desalinhadas em relação ao plano equatorial das células.

Alguns trabalhos mostraram que o Cd interfere nos elementos de MTs que podem modificar a arquitetura e a função das células (DOVGALYUK; KALYNYAK; BLUMEA, 2003; PŘIBYL; CEPÁK; ZACHLEDER, 2005; FUSCONI; GALLO; CAMUSSO, 2007; XU; LIU; JIANG, 2009).

Células meristemáticas de cebola expostas a 9 mg.L^{-1} de Cd por 24 horas produziram profundos distúrbios na organização dos MTs, apresentando severa despolimerização dos MTs, evidenciado pelos curtos fragmentos de MTs na periferia das células (DOVGALYUK; KALYNYAK; BLUMEA, 2003).

Os efeitos tóxicos do Cd sobre o citoesqueleto em interfase de algas verdes mostraram que os MTs se apresentavam como fragmentos curtos e também formando feixes, chegando ainda a se desintegrarem até desaparecerem, dependendo da concentração (de $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ a 18 mg.L^{-1}) e do tempo (de 24 a 96 horas) de exposição ao Cd (PŘIBYL; CEPÁK; ZACHLEDER, 2005).

Em ervilha, os MTs do citoesqueleto foram altamente sensíveis ao Cd, em comparação com outras plantas modelo para monitoramento ambiental. Ainda, as alterações dos MTs ocorreram com dose de $0,046 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd, sendo os MTs ou as proteínas associadas aos MTs o principal alvo desse metal pesado (FUSCONI; GALLO; CAMUSSO, 2007).

As alterações dos MTs em alho foram diretamente relacionadas com a concentração e a duração do tratamento com Cd. Foi observado também que a $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd durante 30 minutos de tratamento já foi suficiente para causar mudanças visíveis nos MTs, e a partir de 4 horas de tratamento todos os tipos de anormalidades dos MTs puderam ser vistas em diferentes fases do ciclo de divisão celular (XU; LIU; JIANG, 2009).

A dose de $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ utilizada neste experimento, foi maior que àquelas empregadas por Fusconi, Gallo e Camusso (2007) e por Xu, Liu e Jiang (2009) e menor que a dose usada por Dovgalyuk, Kalynyak e Blumea (2003). No entanto, as

alterações causadas aos MTs foram comparáveis àquelas encontradas por estes pesquisadores. O Cd induziu C-metáfases, perdas, quebras e adesões cromossômicas nas células meristemáticas do tomateiro, e isso indica que todas essas aberrações estão intimamente relacionadas à deficiência da integridade estrutural e funcional dos MTs corticais, como uma ação primária dos efeitos do Cd sobre as células. Esses MTs corticais podem ser um alvo celular de tolerância ou toxicidade ao Cd nesta espécie.

Provavelmente, a polimerização dos MTs observada neste estudo tenha sofrido interferência do Cd nas primeiras horas de exposição, chegando até a sua inibição. No entanto, com o passar das 24 horas de tratamento, a célula possivelmente tenha conseguido se recuperar e iniciado a polimerização de forma precária e deficiente de um pouco de MTs, e assim, estes formaram as fibras falhadas e os feixes.

Em milho, foi mostrado que metais pesados podem interagir com as tubulinas e impedir seu processo de polimerização, resultando em fusos mitóticos defeituosos, entre outros problemas (OLSZEWSKA; MARCINIAK; KURAN, 1990; RIEDER; PALAZZO, 1992). Por isso, as funções dos MTs corticais estão associadas com respostas adaptativas ao ambiente, incluindo a exposição aos metais pesados (EUN; YOUN; LEE, 2000; DHONUKSHE et al., 2003; DOVGALYUK; KALYNYAK; BLUMEA, 2003; PŘIBYL; CEPÁK; ZACHLEDER, 2005; FUSCONI; GALLO; CAMUSSO, 2007).

O Cd possui alguns mecanismos de ação conhecidos e alguns deles estão associados ao cálcio, trifosfato inositol, proteínas C kinase e a elevação de cAMP (BULJAN et al., 2001). Em particular, a perturbação da homeostase do cálcio citosólico e/ou da atividade da calmodulina (proteína reguladora de cálcio citosólico) provavelmente desempenham papel principal na alteração da organização e das funções dos MTs.

O Cd e o cálcio possuem raios iônicos semelhantes (0,099 nm e 0,097 nm, respectivamente), que é a distância entre o centro do núcleo do átomo até o elétron estável mais afastado do mesmo. Porém, não referindo-se a um átomo, mas sim ao seu íon, esse fato que faz com que o Cd, ao ser absorvido pela planta, chegue ao citoplasma das células, e rapidamente entre em competição com o cálcio por certos sítios do apoplasto dessas células. Isto faz com que ocorra uma modificação na concentração de cálcio citosólico livre, afetando a função das bombas de transporte

de cálcio da membrana plasmática. Consequentemente, ocorre a ativação da calmodulina, que por sua vez tem atividade associada com a indução da despolimerização dos MTs, além de interferir em muitas vias de transdução de sinais (BULJAN et al., 2001).

Adicionalmente, o Cd tem muita facilidade de ligação a radicais sulfidril (radicais -SH), que faz parte de alguns aminoácidos e consequentemente de algumas proteínas. Esse fenômeno faz com que haja uma redução da disponibilidade de grupos de radicais sulfidril das tubulinas e, assim, a polimerização dos MTs é prejudicada, pois esses radicais são essenciais para a interação entre as moléculas de tubulinas (BANDYOPADHYAY; CHATTERJEE; DATTA, 1997).

É conhecido que os MTs desempenham papéis essenciais durante as divisões celulares. É possível que o Cd tenha atuado primariamente sobre os MTs e isso gerou todas as aberrações cromossômicas observadas. Assim, é razoável prospectar que o Cd interaja com tubulina e impeça o seu processo de polimerização, resultando a má formação das fibras do fuso mitótico e, consequentemente, gerando perdas, quebras, pontes e adesões cromossômicas.

Nesta investigação, possivelmente o Cd tenha afetado diretamente a polimerização das tubulinas e a organização dos MTs. Assim, estes resultados contribuem para a compreensão da toxicidade do Cd em tomateiro, mostrando que as tubulinas são um alvo preferencial da ação do Cd nas células desta espécie vegetal.

4.4 Conclusão

De acordo com a dose estabelecida de Cd ($3,7 \text{ mg.L}^{-1}$), os microtúbulos de α -tubulinas sofreram modificações em sua estrutura que alteram a organização do citoesqueleto celular, do fuso mitótico e a citocinese, que podem interromper as diversas fases da divisão celular ou gerar células anormais e até apoptose.

4.5 Considerações Finais

O tomateiro apresentou elevada sensibilidade em baixas concentrações de cádmio. Tal sensibilidade foi detectada através das seguintes alterações celulares: modificações dos microtúbulos, aberrações cromossômicas (apresentadas no capítulo 2) e danos causados ao DNA (apresentados no capítulo 3). Dessa forma, o tomateiro destaca-se como uma importante planta modelo com potencial para estudos de genotoxicidade aplicados ao monitoramento ambiental e testes de compostos potencialmente tóxicos.

Considerando todos os capítulos, algumas perspectivas podem ser exploradas em futuros estudos, tais como a utilização comparativa de raízes e suspensões celulares *in vitro*, que são sistemas distintos com células diferenciadas e não diferenciadas. Outra possibilidade seria a comparação entre o tomateiro e uma planta hiperacumuladora de Cd, a fim de verificar se as raízes de uma planta que tolera Cd nas células apresentam padrões diferentes. Além disso, explorar a variabilidade genética entre cultivares de tomateiro e a possível seleção de mutantes mais tolerantes ao Cd. Finalmente, conduzir estudos que avaliem o efeito do Cd e outros metais pesados.

Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002. 1463p.

BANDYOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, A.K.; DATTA, A.G. Effect of cadmium on purified hepatic flavokinase: involvement of reactive -SH group(s) in the inactivation of flavokinase by cadmium. **Life Sciences**, Elmsford, v. 60, p. 1891-1903, 1997.

BARLOW, P.W.; BALUŠKA, F. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 51, p. 289–322, 2000.

BULJAN, V.; YEUNG, S.; RUSHDI, S.; DELIKATNY, E.J.; HAMBLY, B. Mercury and cadmium effects on microtubule polymerization and depolymerisation. **Biophysical Journal**, New York, v. 80, p. 99, 2001.

CYR, R.J.; PALEVITZ, B. Organization of cortical microtubules in plant cells. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 7, p. 65-71, 1995.

DHONUKSHE, P.; LAXALT, A.M.; GOEDHART, J.; GADELLA, T.W.; MUNNIK, T. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. **Plant Cell**, Berlin, v. 15, p. 2666–2679, 2003.

DIETZ, K.J.; BAIER, M.; KRAMER, U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: PRASAD, M.N.V.; HAGENYER, J. (Ed.). **Heavy metal stress in plant from molecular to ecosystems**. Berlin: Springer, 1999. chap. 6, p. 73–98.

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

EUN, S.O.; YOUN, H.S.; LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, p. 357–365, 2000.

FRANTZIOS, G.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS P. Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum* I. Mitotic cells. **New Phytologist**, Cambridge, v. 145, p. 211–224, 2000.

FRANTZIOS, G.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum* II. Cytokinetic cells. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 157–170, 2001.

FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 632, p. 9–19, 2007.

HEPLER, P.K.; HUSH, J.M. Behavior of microtubules in living plant cell. **Plant Physiology**, Washington, v. 112, p. 455–461, 1996.

IAKIMOVA, E.T.; WOLTERING, E.J.; KAPCHINA-TOTEVA, V.M.; HARREN, F.J.M.; CRISTESCU, S.M. Cadmium toxicity in cultured tomato cells—role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. **Cell Biology International**, London, v. 32, p. 1521–1529, 2008.

INOUE, S.; OLDENBOURG, R. Microtubule dynamics in mitotic spindle displayed by polarized light microscopy. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 9, p. 1603–1607, 1998.

KASTORI, R.; PLESNICAR, M.; SAKAC, Z.; PANKOVIC, D.; ARSENIJEVIC-MAKSIMOVIC, I. Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, p. 75–85, 1998.

KUTHANOVA, A.; FISCHER, L.; NICK, P.; OPATRNY, Z. Cell cycle phasespecific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 1634–1643, 2008.

LINDA, A.A. Focusing-in on microtubules. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 10, p. 241–266, 2000.

LIU, D.; JIANG, W.; GAO, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tips of garlic. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, p. 79–83, 2003/2004.

LIU, D.; XUE, P.; MENG, Q.; ZOU, J.; GU, J.; JIANG, W. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 695–702, 2009.

LOMBARDI, L.; SEBASTIANI, L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 797–802, 2005.

MAYER, U.; JÜRGENS, G. Microtubule cytoskeleton: a track record. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 5, p. 494–501, 2002.

MÜLLER, J.; MENZEL, D.; ŠAMAJ, J. Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. **Protoplasma**, New York, v. 230, p. 231–242, 2007.

OLSZEWSKA, M.J.; MARCINIAK, K.; KURAN, H. The timing of synthesis of proteins required for mitotic spindle and phragmoplast in partially synchronized root meristems of *Vicia faba* L. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 53, p. 89–92, 1990.

PŘIBYL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium. **Protoplasma**, New York, v. 226, p. 231–240, 2005.

RIEDER, C.L.; PALAZZO, R.E. Colcemid and the mitotic cycle. **Journal of Cell Science**, London, v. 102, p. 387–392, 1992.

SCHMIT, A.C.; NICK, P. Microtubules and the evolution of mitosis. In: NICK, P. (Ed.). **Plant Microtubules - Development and Flexibility Plant Cell Monographs**. Heidelberg: Springer Verlag, 2008. chap. 11, p. 233-254.

SCHROER, T.A. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 13, p. 92–96, 2001.

SHAMINA, N.V. Formation of division spindles in higher plant meiosis. **Cell Biology International**, London, v. 29, p. 307–318, 2005.

SMERTENKO, A.; DRÁBER, P.; VIKLICKÝ, V.; OPATRŇ, Z. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, p. 1534-1542, 1997.

VANSTRAELEN, M.; INZÉ, D.; GEELLEN, D. Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, p. 167-175, 2006.

VANTARD, M.; COWLING, R.; DELICHÈRE, C. Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 691–703, 2000.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 645–655, 2003.

WASTENEYS, G.O.; GALWAY, M.E. Remodelling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 54, p. 691–722, 2003.

WASTENEYS, G.O. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 7, p. 651–660, 2004.

XU, P.; LIU, D.; JIANG, W. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, p. 387-390, 2009.

ZHANG, D.H.; WADSWORTH, P.; HEPLER, P.K. Microtubule dynamics in living dividing plant cells: confocal imaging of fluorescent brain tubulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 87, p. 8820–8824, 1990.