Juliana Maia Rabelo Nucci

Adaptação de Ensaio Cometa às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de *Rhizophora mangle* para avaliar a genotoxicidade no ambiente marinho

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

2016

Nucci, Juliana Maia Rabelo
Adaptação de Ensaio Cometa às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de *Rhizophora mangle* para avaliar a genotoxicidade no ambiente marinho / Juliana Maia Rabelo Nucci.
São Paulo, 2016.
125 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
Orientador: Phan Van Ngan
1.Ensaio cometa. 2. Genotoxicidade.3. *Rhizophora mangle*. 4.Mangue.I. Ngan, Phan Van. II. Título.

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico

Adaptação de Ensaio Cometa às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de *Rhizophora mangle* para avaliar a genotoxicidade no ambiente marinho

Juliana Maia Rabelo Nucci

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/____/____

_____	_____
Prof. Dr. Phan Van Ngan	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Catálogo de cometas de diferentes graus de danificação classificados em quatro classes de dano. 32
Figura 2. Catálogo de cometas de diferentes graus de danificação classificados em cinco classes de dano. 33
Figura 3. Propágulos de Rhizophora mangle usados na germinação no claro e no escuro. 35
Figura 4. Raízes de propágulos de Rhizophora mangle: A - germinados no claro; B - germinadas no escuro. 36
Figura 5. Núcleo com borda nítida, com alta afinidade à coloração de prata, de raízes de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, mostrando no centro uma estrutura nuclear denominada como EAN, parecida com o nucléolo de outro vegetal encontrado na literatura (SHAW, 2010). 39
Figura 6. Núcleo com borda nítida, com media afinidade à coloração de prata, de raízes de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese mostrando no centro uma estrutura nuclear denominada como EAN, parecida com o nucléolo de uma alga encontrada na literatura (TRENDELENBURG et al., 1974). 40
Figura 7. Cometa obtido com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, a 4ºC. O cometa apresenta aparentemente duas EANs. Aumento 400x. 40
Figura 8. Núcleos e cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração. A: sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese; núcleo com borda e EAN com grânulos com coloração heterogênea. B: sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC; cometa com borda e EAN com grânulos com coloração heterogênea. C: com 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese; núcleo sem borda e EAN fortemente corada, sem grânulos e homogênea. D: com 60 minutos de lise alcalina iônica, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC; Cometa sem borda e EAN fortemente corada, sem grânulos e homogênea. Aumento 400x. 41
Figura 9. Cometas e EANs obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, a 4ºC. Seta preta: cometa de baixa nível de dano com EAN; Seta cinza: cometa com alto nível de dano, com EAN presente e pouco material nuclear associado; Setas brancas: EANs livres no gel, totalmente desassociadas de material nuclear. Aumento 400x. ... 42
Figura 10. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de Rhizhophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 44
Figura 11. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 44

Figura 12. Núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 45
Figura 13. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 46
Figura 14. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 46
Figura 15. Núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano de membrana, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 47
Figura 16. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 48
Figura 17. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 48
Figura 18. Núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com solução tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita).Aumento 400x. 49
Figura 19. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com solução tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 50
Figura 20. EAN livre no gel e núcleo sem borda nítida e com quase completa difusão de material nuclear pelo gel extraídos de raízes de Rhizophora mangle com tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 50
Figura 21. Núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano de membrana, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 51
Figura 22. Núcleo intacto (seta preta) com borda nítida e EANs (setas vazadas) extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 52
Figura 23. Cometas (setas pretas) e EANs livres (setas vazadas) extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. 52
Figura 24. Porcentagem de núcleos intactos, núcleos com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle usando quatro diferentes soluções de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. 53
Figura 25. Núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise e sem eletroforese. Os núcleos apresentam borda nítida,

material nuclear com coloração forte e homogênea, baixa granulosidade e com EANs centralizadas e fortemente coradas. Aumento 400x. 55
Figura 26. Núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise e sem eletroforese. Os núcleos apresentam borda nítida, material nuclear com coloração fraca e homogênea, baixa granulosidade e com EANs centralizadas e mais coradas que o anel de material nuclear. Aumento 400x. 55
Figura 27. Núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 56
Figura 28. Núcleo com borda nítida e granulação fina extraído de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 57
Figura 29. Núcleos sem borda nítida e granulação grossa extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 57
Figura 30. Núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, sem relaxamento e sem eletroforese, em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 58
Figura 31. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração e submetidos à lise salina aniônica por 60 minutos a 4°C, sem lise e sem eletroforese. Aumento 400x. 59
Figura 32. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração e submetidos à lise salina aniônica por 60 minutos, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 60
Figura 33. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração em diferentes tipos de lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x. 61
Figura 34. Núcleo extraído de raiz de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, submetido à lise alcalina aniônica por 60 minutos a 4°C, sem relaxamento e sem eletroforese. O núcleo apresenta borda nítida, grânulos finos, coloração heterogênea e EAN com coloração heterogênea. Aumento 400x. 62
Figura 35. Porcentagem de núcleos intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração e expostos às condições: sem lise, com lise alcalina iônica por 60 minutos e com lise salina aniônica por 60 minutos, todos sem relaxamento e sem eletroforese. 63
Figura 36. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. 64
Figura 37. Cometa obtido com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. ... 65
Figura 38. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e

20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 66
Figura 39. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 66
Figura 40. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração e expostos às condições: 60 minutos e 120 minutos de lise alcalina iônica e a 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese. 67
Figura 41. Cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC. Aumento 400x. 68
Figura 42. Cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA, 4ºC, em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 69
Figura 43. Cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA. Aumento 400x. 70
Figura 44. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 71
Figura 45. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com tampão PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. A, B e C são cometas sem borda e sem difusão e migração do material nuclear. D, E e F são cometas com borda. Aumento 400x. 71
Figura 46. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com tampão PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x. 72
Figura 47. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, e submetidos a três diferentes combinações de tempo de relaxamento e de eletroforese em tampão de eletroforese pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC: 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese; 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese; 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese. 73

Figura 48. Cometa sem cauda obtido com núcleo de raiz de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.... 74
Figura 49. Cometa com pequena cauda obtido com núcleo de raiz de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x..... 75
Figura 50. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x..... 75
Figura 51. Cometa com pequena cauda obtido com núcleo de raiz de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x..... 76
Figura 52. Cometa com longa cauda obtido com núcleo de raiz de Rhizophora mangle extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. 77
Figura 53. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x..... 77
Figura 54. Cometa com longa cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x..... 78
Figura 55. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x..... 79
Figura 56. Cometas com longos comprimentos caudais obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm 230mA. Aumento 400x. 80
Figura 57. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x..... 80
Figura 58. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, e submetidos às combinações de diferentes condições de lise e de tempo de

relaxamento. Eletroforese 20 minutos em tampão de eletroforese pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC. 81
Figura 59. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 83
Figura 60. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 84
Figura 61. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro) exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 85
Figura 62. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 86
Figura 63. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 87
Figura 64. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro)exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 88
Figura 65. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle, extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA. 89
Figura 66. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle, extraídos com PBS (barra cinza claro) ou com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração e com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 90
Figura 67. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração,

sem exposição à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 91
Figura 68. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 92
Figura 69. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle, extraídos com solução salina 12%o como solução de extração,sem(barra cinza claro) e com (barra cinza escuro)exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC. 93
Figura 70. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 94
Figura 71. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 95
Figura 72. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro) exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA. 96
Figura 73. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano, com contagem de EAN, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA. 97
Figura 74. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de Rhizophora mangle, extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA. 98
Figura 75. Raízes de propágulos germinados no escuro. Seta branca mostra raízes secundárias. 101
Figura 76. Catálogo de classes de danos de cometas de pampo (Trachinotus carolinus): expostos à diferentes concentrações de nano-TiO_2: Classe 0: Intacto; Classe 1: Pouco danificado; Classe 2: Danificado; Classe 3: Muito danificado; Classe 4: Severamente danificado. Fonte: Vignardi, 2012. Reproduzida com permissão. 102

Figura 77. A e B: Cometas de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. A1 e B1: copias de A e B, respectivamente, com marcação da área da cabeça (vermelho) e da cauda (azul). A constrição (seta) ao(s) lado(s) do cometa indica o encontro da área da cabeça com a área da cauda. 104
Figura 78. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. As setas indicam as irregularidades das caudas dos cometas formadas durante a eletroforese. 105
Figura 79. Cometas obtidos com núcleos de raízes de Rhizophora mangle extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. 109
Figura 80. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC, sem (barra cinza escuro) e com (barra cinza claro) contagem de EANs. 114
Figura 81. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC, sem (barra cinza escuro) e com (barra cinza claro) contagem de EANs. 114

AGRADECIMENTOS

Ao Phan, meu orientador, professor, amigo, que sempre foi como um pai para mim. Sem palavras para descrever tudo o que você fez por mim antes do meu ingresso, durante e, principalmente, na reta final. Você é um exemplo de profissional e de pessoa, em quem sempre irei me inspirar. Você será sempre parte da minha vida!

Ao professor Vicente, pela pessoa maravilhosa, pelo exemplo de professor que é e por sempre ter me ajudado em tudo o que precisei. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e pela confiança.

À CAPES, pela bolsa concedida!

À Universidade de São Paulo.

Ao IOUSP e todos os seus funcionários, especialmente: Arthur e Zezé, por todo apoio e conhecimento transmitido; ao pessoal da secretaria da pós; ao pessoal das bases, principalmente ao Clayton, por todo carinho e atenção; ao pessoal da biblioteca, em particular ao Wagner, por toda a ajuda; ao pessoal do transporte e ao Henrique do LIO, por todo apoio sempre.

Ao Alex, Cá, Dani, Dé, Fabio, Margot e Pri. Foi maravilhoso ser parte deste laboratório com vocês! Sem vocês eu jamais teria conseguido!

A toda minha família, pelo apoio e suporte durante todo esse tempo, especialmente: minha mãe, meu pai, minha avó, meus tios e minhas primas.

A todos os meus amigos do coração, que sempre me apoiaram desde antes de meu ingresso e por terem compreendido os diversos momentos em que precisei estar ausente.

À vida que, com seus altos e baixos, retas e meandros e todos os acasos, fez com que tudo acontecesse da forma como aconteceu. Sou grata!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o estabelecimento de um método citogenotoxico, o ensaio cometa, adaptado às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de mangue da espécie *Rhizophora mangle* para utilização em estudos sobre genotoxicidade em ambientes marinhos. Foram testados dois tipos de germinação de raízes, quatro diferentes soluções de extração de núcleos, duas soluções de lise e o não uso da lise, dois períodos de exposição à lise, dois períodos de relaxamento, dois períodos de eletroforese e a interação de duas condições de lise com dois diferentes tempos de relaxamento. A validação de método foi realizada através da exposição de núcleos a quatro diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Os resultados mostraram que é possível a obtenção de cometas com núcleos extraídos de propágulos de *Rhizophora mangle* e que a validação de método apresenta uma relação concentração dependente entre o índice de dano de núcleos e a concentração do agente genotoxico testado. Os melhores parâmetros utilizados para obtenção de cometas através do método por nós adaptado são: PBS ou solução salina 12‰ como solução de extração, exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos, 5 minutos de relaxamento e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Palavras-chave: Ensaio cometa. Genotoxicidade. *Rhizophora mangle*. Mangue.

ABSTRACT

This study aimed to establish a citogenotoxic method, the comet assay, adapted to the meristematic cells from propagule roots of red mangrove, *Rhizophora mangle,* for use in studies of genotoxicity in marine environments. Experiments were carried out to test two ways of root germination, four different nuclei extraction solutions, two lysis solutions and without lysis, two periods of exposure to lysis, two periods of unwinding, two periods of electrophoresis and the interaction of two lysis conditions with two different times of unwinding. Experiments on validation of the method were performed by exposing the nuclei to four different concentrations of hydrogen peroxide. The results showed that it is possible to obtain comets with nuclei extracted from the root of propagules of *Rhizophora mangle* and the validation data showed a dose-dependent relationship between the damage index and the concentration of the genotoxic agent tested. The best parameters to obtain comets using the method adapted by us are: PBS or saline 12 ‰ as extraction solution, exposure to alkaline lysis for 60 minutes, 5 minutes of unwinding and electrophoresis in buffer pH> 13, 0,8V/cm, 230mA for 20 min at 4ºC.

Keywords: Comet assay. Genotoxicity. *Rhizophora mangle*. Mangrove.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 18

II. HIPÓTESE 24

III. OBJETIVO 24

III.1. OBJETIVO PRINCIPAL: 24
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 24

IV. MATERIAL E MÉTODOS 25

IV.1. MATERIAL. 25
IV.2. MÉTODOS 25
IV.2.1. Germinação das raízes 25
IV.2.1.1. Germinação das raízes no claro 25
IV.2.1.2. Germinação das raízes no escuro 26
IV.2.2. Extração de núcleos das células meristemáticas 26
IV.2.3. Estimativa de número de núcleos extraídos. 27
IV.2.4. Testes para escolha do tipo e do tempo de lise 27
IV.2.5. Determinação do tempo de relaxamento e de eletroforese 28
IV.2.6. Voltagem e amperagem 28
IV.2.7. Ensaio Cometa 28
IV.2.8. Validação de Método 30
IV.2.8.1. Exposição à H_20_2 30
IV.2.9. Análise de Dados: 31
IV.2.9.1. Sem contagem de EANs 31
IV.2.9.2. Com contagem de EANs 32
IV.2.10. Testes estatísticos 34

V. RESULTADOS 35

V.1. GERMINAÇÃO DE RAÍZES 35
V.1.1. Germinação no claro 36
V.1.2. Germinação no escuro 36
V.2. EAN – ESTRUTURA ASSUMIDA COMO NUCLÉOLO 37
V.2.1. Nucléolos 37
V.2.2. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* e EAN, Estrutura Assumida como Núcleolo. 38
V.3. EXTRAÇÃO DE NÚCLEOS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE EXTRAÇÃO 43
V.3.1. PBS 43
V.3.2. Solução Salina 12‰ 45
V.3.3. Tampão 0.4M Tris pH 7,4 47
V.3.4. Tampão Sorensen 49
V.3.5. Efeitos de soluções de extração sobre quantidade e qualidade de núcleos extraídos. 51
V.4. EFEITO DE TIPO DE LISE 54
V.4.1. Sem lise 54
V.4.2. Lise alcalina iônica 56

V.4.3. Lise salina aniônica 58
V.4.4. Comparação entre os tipos de lise 60
V.4.5. Efeitos do tempo de lise 64
V.5. INTERAÇÃO DE RELAXAMENTO E ELETROFORESE 68
V.5.1. Combinação de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese 68
V.5.2. Combinação de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese 69
V.5.3. Combinação de 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese 71
V.6. INTERAÇÃO DE LISE E RELAXAMENTO 74
V.6.1. Combinação de sem exposição à lise e 5 minutos de relaxamento 74
V.6.2. Combinação de sem lise e 10 minutos de relaxamento 76
V.6.3. Combinação de 60 minutos de lise e 5 minutos de relaxamento 78
V.6.4. Combinação de 60 minutos de lise e 10 minutos de relaxamento .. 79
V.7.1. INTERAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À H_2O_2, SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO E LISE SOBRE O ÍNDICE DE DANO 83
V.7.1.1. Interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise 83
V.7.1.2. Interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Com lise 84
V.7.1.3. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise/Com lise 85
V.7.1.4. Interação H_2O_2 - PBS - Sem lise 86
V.7.1.5. Interação H_2O_2 - PBS - Com lise 87
V.7.1.6. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS - Sem lise/Com lise 88
V.7.1.7. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Sem lise 89
V.7.1.8. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Com lise 90
V.7.2. Contagem com EANs inclusas 91
V.7.2.1. Interação H_2O_2 - Solução salina 12‰ - Sem lise 91
V.7.2.2. Interação H_2O_2 - Solução salina 12‰ - Com lise 92
V.7.2.3. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise/Com lise 93
V.7.2.4. Interação H_2O_2 - PBS - Sem lise 93
V.7.2.5. Interação H_2O_2 - PBS - Com lise 94
V.7.2.6. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS - Sem lise/Com lise 95
V.7.2.7. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Sem lise 96
V.7.2.8. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Com lise 98
VI. DISCUSSÃO 99
VI.1. GERMINAÇÃO DE RAÍZES 99

VI.2. Os efeitos das EANs 102
VI.3. Extração de núcleos com diferentes soluções de extração 105
VI.4. Lise no ensaio cometa de núcleos de células meristemáticas de propágulos 108
VI.5. Relaxamento e eletroforese 109
VI.6. Efeitos combinados da lise e relaxamento 110
VI.7. Validação de Método 111

VII. CONCLUSÃO 117

VIII. REFERÊNCIAS 119

I. INTRODUÇÃO

Os mangues se desenvolvem nas margens de baías, enseadas, estuários, e desembocaduras de rios onde há água salobra ou em locais semi abrigados da ação das marés nas regiões tropicais ou subtropicais, formando as florestas litorâneas na interface entre os ambientes terrestre e marinho.

O Brasil apresenta cerca de 25.000km^2 de florestas de mangue (SAENGER; HEGERL; DAVIE, 1983) ao longo de sua costa, do norte até o limite sul do estado de Santa Catarina (PESSENDA *et al.,* 2012). Apesar de sua ampla distribuição, o Brasil apresenta somente 7 espécies de mangues distribuídas em 4 gêneros (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.,* 1990), das quais três espécies pertencem ao gênero *Rhizophora* (família Rhizophoraceae), duas espécies ao gênero *Avicennia* (família Avicenniaceae), e uma espécie cada aos gêneros *Laguncularia* e *Conocarpus* (família Combretaceae) (KJERFVE; LACERDA, 1993). Como estas espécies possuem ampla tolerância ambiental, é natural encontrar florestas de mangue com diferentes características estruturais em diferentes zonas geográficas (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.,* 1990).

O solo das florestas de mangue caracteriza-se por ser úmido, salgado, lodoso, pobre em oxigênio e muito rico em nutrientes, uma vez que possui grande quantidade de matéria orgânica em decomposição. Essa matéria orgânica serve de alimento à base de uma extensa cadeia alimentar que sustenta muitas espécies de plantas e animais. Devido à alta abundância de alimentos, abrigos e baixa pressão predatória, o mangue torna-se um habitat ideal para muitas espécies de animais durante uma parte ou por todo seus ciclos de vida.

Acima do nível da água as plantas de mangue fornecem um habitat para insetos, aves, répteis e mamíferos. Abaixo do nível da água as raízes de mangues suportam grande variedade de tunicatas, esponjas e algas, enquanto que os espaços entre as raízes servem como abrigo para camarões, caranguejos e peixes. Seu solo lodoso forma um habitat para a epifauna e para a infauna. Plânctons, algas epífitas e microfitobentos também existem, tornando a floresta um criadouro para muitas espécies aquáticas.

Os mangues também apresentam outras importâncias ecológicas e socioeconômicas para a população adjacente, fornecendo recursos alimentares, empregos e geração de renda, alem de participarem da exportação de carbono e nutrientes entre as regiões costeira e oceânica (ADAME; LOVELOCK, 2011; KRISTENSEN *et al.*, 2008).

No entanto, a floresta de mangue é considerada um dos ambientes tropicais mais ameaçados. Algumas espécies de mangues sofrem alto risco de extinção e poderão desaparecer em menos de uma década (DUKE *et al.,* 2007; POLIDORO *et al.,* 2010; VALIELA; BOWEN; YORK, 2001). A perda mundial de mangues nas recentes décadas tem sido significativa, apesar de ainda ocuparem extensas áreas em alguns lugares do mundo (SPALDING, 1998; ALONGI, 2002). O ecossistema sofre impactos de devastações massivas por causa do desenvolvimento costeiro ou pelo uso de recursos (GIRI *et al.*, 2011), tais como sobre exploração de árvores para lenha e produção de madeira; desmatamento para a agricultura; mineração; criação de viveiros de aquicultura e represamento de rios (WORLD RESOURCES INSTITUTE, 1996). Além disso, alterações hidrológicas, mudanças climáticas, infestações de insetos e poluição química também contribuem para a degradação de mangues (FRIESS *et al.*, 2012a; FRIESS *et al.*, 2012b).

Contaminantes afetam a biodiversidade marinha de várias maneiras. Esgoto não tratado, óleo e metais pesados podem ser diretamente tóxicos para alguns organismos marinhos, e seus efeitos podem ser instantâneos ou acumulativos (WORLD RESOURCES INSTITUTE, 1996). Estudos sobre a ocorrência de poluição em mangues confirmam a contaminação por metais traços, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), poluentes orgânicos persistentes (POPs), produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e compostos de disrupção endócrina. Uma recente revisão sobre assunto está disponível (BAYEN, 2012). Muitos desses produtos são conhecidos por serem não somente tóxicos, mas também genotóxicos, ou seja, substâncias que podem danificar o DNA, o material genético da célula, causando tumores, cânceres e mutações durante a divisão celular. Quando não são reparadas, lesões no DNA podem dar início a uma cascata de consequências biológicas a nível celular, nos órgãos, nos organismos e, finalmente, nas populações e comunidades. Os danos ao DNA em uma variedade de organismos aquáticos estão associados à redução de crescimento, desenvolvimento anormal e

sobrevivência reduzida de embriões, larvas e adultos (LEE; STEINERT, 2003). Devido às implicações biológicas e ecológicas associadas ao dano ao DNA, estudos genotóxicos no ecossistema são de grande interesse para o monitoramento ambiental.

No Brasil, a contaminação por poluentes nos mangues é diversificada. Estudos revelaram contaminação por petróleo, metais pesados e metais traço no sedimento ou no tecido de árvores de mangue (SILVA; LACERDA; REZENDE; 1990; LACERDA *et al*., 1993; MACHADO *et al.,* 2002a; MACHADO *et al.,* 2002b; KEHRIG; *et al.,* 2003), estrogênios (FROEHNER *et al*., 2012), pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas no sedimento da floresta de mangues (SOUZA *et al.,* 2008).

Os efeitos da poluição sobre plantas de mangue têm sido estudados através de respostas biológicas, tais como sobrevivência, produção de biomassa, defoliação e fotossíntese, expressão de metalotioneínas, atividade enzimática (GSH, SOD, CAT, peroxidase), produtos de peroxidação e frequência de mutação (BAYEN, 2012, para revisão).

Estudos sobre efeitos de genotoxinas nos organismos marinhos são raros. A grande maioria destes estudos foram realizados com invertebrados (CANTY *et al*., 2009; HUTCHINSON *et al.,* 1998) ou com peixes (OLIVEIRA *et al*., 2010; NAHRGANG *et al*., 2009; VIGNARDI *et al*., 2015). Em relação às plantas, alguns trabalhos foram realizados com macro e microalgas (ATIENZAR *et al.,* 2000; USSAMI, 2007; DEASI *et al.,* 2010). Não encontramos na literatura nacional e internacional a tentativa de utilização de células extraídas de raízes de plantas marinhas superiores como sentinelas para estudar a genotoxicidade nos ecossistemas marinhos. Esta lacuna de informação, em parte, pode ser devida à falta de metodologias para estudar o assunto.

Dentre as diferentes técnicas citogenotóxicas para detectar os danos causados por substâncias genotóxicas, a eletroforese em gel de célula individual (em inglês, *single cell gel electrophoresis*, ou SCGE), também chamada de ensaio cometa (*comet assay*), vem sendo utilizada cada vez mais como um teste de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* em laboratório ou nos estudos ambientais em uma grande variedade de organismos (TICE, 1995). O ensaio apresenta as seguintes vantagens: é sensível; o dano no DNA é estudado no nível de célula individual; é necessário somente um pequeno número de células; pode ser aplicado praticamente

em qualquer população de células eucarióticas; é relativamente simples e de baixo custo. O ensaio também pode ser utilizado para estudar o reparo do DNA em nível de célula individual. Na versão mais utilizada do ensaio cometa, uma suspensão de células individuais é misturada a um gel de agarose de baixo ponto de fusão dissolvido em um tampão. Essa mistura é colocada em uma lâmina de microscópio, criando assim um filme de gel de agarose com células incluídas. As membranas das células e de seus núcleos são dissolvidas por imersão numa solução contendo detergente e uma alta concentração de sais, deixando somente um novelo de DNA altamente enrolado, chamado nucleóide. A imersão numa solução alcalina (pH > 13) permite então o desenrolamento do DNA no nucleóide. O DNA passa então por uma eletroforese (pH >13) na qual os fragmentos do DNA danificado migram a partir do núcleoide para fora, em direção ao ânodo. A distância da migração depende do tamanho dos fragmentos. Os fragmentos menores percorrem distâncias maiores, formando a cauda, enquanto que os fragmentos maiores migram menos ou não migram, permanecendo no mesmo lugar e formando a cabeça de uma figura que se assemelha a um cometa após a coloração. Neste ensaio, os danos causados ao DNA pela exposição ao agente genotóxico podem ser mensurados através de vários parâmetros característicos do cometa, como por exemplo o comprimento da calda, o diâmetro da cabeça e a intensidade da coloração caudal, entre outros, através da análise pelo programa de análise de imagens, ou pela morfologia do cometa através de análise visual. A partir da análise de cometas de DNA provenientes de organismos intactos usados como controles e de DNA de organismos expostos a substâncias genotóxicas é possível tirar conclusões precisas sobre a genotoxicidade de uma substância.

A versão alcalina do ensaio cometa permite detectar um amplo espectro de danos ao DNA, incluindo quebras de fita única (SSBs), fita dupla (DSB) e sítios lábeis à álcalis, que são expressos em quebras de fita simples e quebras de fita simples associadas a reparos por excisão incompleta (SINGH *et al.,* 1988). Sob determinadas condições, o ensaio pode também detectar a reticulação DNA-DNA e DNA-proteína (HARTMANN *et al.,* 2003), que são danos que podem alterar dramaticamente as informações codificadas nos genes.

O ensaio cometa é um dos métodos citogenéticos mais sensíveis e o mais utilizado para estudar a genotoxicidade de substâncias em laboratórios e no

ambiente. O ensaio estuda o dano ao DNA de células expostas à agentes físicos e/ou químicos genotóxicos à nível de célula individual. Nas plantas superiores, o ensaio cometa, originalmente desenvolvido para células animais, foi adaptado e aplicado para estudar danos ao DNA causado por mutagenos em dois modelos de planta, o tabaco e a cebola, através da utilização de células provenientes de folhas ou de raízes (BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011). O ensaio também foi aplicado para estudar a genotoxicidade do chumbo em tremoços (*Lupinus luteus*) usando células de raízes (RUCINSKA; SOBKOWIAK; GWOZDZ, 2004). Nos estudos ambientais, o ensaio cometa aplicado às células de folhas foram utilizados para estudar comparativamente os danos ao DNA de plantas na beira da estrada e de plantas distantes da estrada (SRIUSSADAPORN *et al.,* 2003). O ensaio também foi aplicado para estudar o dano e o reparo do DNA de plantas expostas a diferentes genotoxinas (MENKE *et al.,* 2001). Recentes revisões sobre o uso de ensaio cometa nas plantas são disponíveis em Lanier *et al*, (2015) e Santos, Pourrut; e Oliveira (2015).

Propágulos de mangues têm capacidade de germinar e crescer na zona da água salobra. A adaptação de ensaio cometa para poder utilizar as células meristemáticas extraídas de raízes de propágulos como sentinelas possibilita assim monitorar a genotoxicidade da água de diferentes ambientes costeiros, como portos e estuários ou para monitorar a variação da genotoxicidade ao longo da costa a partir de um centro poluidor, por exemplo.

O uso de células meristemáticas extraídas de raízes de propágulos de mangue como material para ensaio cometa apresenta varias vantagens, incluindo fácil coleta, a possibilidade de serem coletados durante grande parte do ano, fácil manuseio e o fato de vários propágulos poderem ser coletados de uma mesma planta. Como meio de reprodução e dispersão desta espécie vegetal, o propágulo é uma entidade independente, e o uso das células do propágulo não é invasivo em relação à planta mãe.

O ensaio cometa usando células meristemáticas extraídas de raízes de propágulos de mangue como sentinelas, quando estabelecido, constituirá uma ferramenta útil e poderosa, que ainda esta em falta, para detectar a genotoxicidade em ambientes marinhos costeiros, águas e/ou sedimentos, assim como em comunidades de mangues onde as plantas são possivelmente expostas à

genotoxicidade do petróleo, metais pesados e outras poluições urbanas. As células meristemáticas podem ainda ser aplicadas para outros métodos citogenotóxicos.

II. Hipótese

O ensaio cometa pode ser adaptado aos núcleos de células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de mangue para utilizar no estudo de genotoxidade ambiental.

III. Objetivo

III.1. Objetivo Principal:

O presente projeto tem como objetivo estabelecer um ensaio cometa adaptado às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de mangue da espécie *Rhizophora mangle* para utilização em estudos sobre a genotoxicidade em ambientes costeiros marinhos.

III.2. Objetivos Específicos:

- Estabelecimento de condições experimentais ótimas para o crescimento das raízes dos propágulos no laboratório.
- Estabelecimento de método para a obtenção de núcleos de células meristemáticas para o ensaio de cometa.
- Estabelecimento de condições experimentais ótimas para o ensaio cometa com estes núcleos.
- Validação do método estabelecido com a utilização das substâncias genotóxicas modelos.

IV. Material e Métodos

IV.1. Material.

Propágulos de mangue vermelho, *Rhizophora mangle*, situados à beira do mar dentro da dependência da base de pesquisa “João Paiva Carvalho” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em Cananeia, litoral sul do Estado de São Paulo, foram utilizados para a obtenção das células meristemáticas. Estas plantas foram escolhidas por pertencerem e serem conservadas por uma instituição de pesquisa. Mangue vermelho é o manguezal mais importante da região e do Brasil. Apesar de ser uma espécie nativa do Brasil, também é amplamente encontrada em outras partes do mundo, como a África. Somente os propágulos recém-caídos e aparentemente intactos, de tamanho entre 20-33cm foram recolhidos e transportados para o Laboratório de Ecofisiologia de Organismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, onde foram utilizados na germinação das raízes.

IV.2. Métodos

IV.2.1. Germinação das raízes

IV.2.1.1. Germinação das raízes no claro

Vasos de cristal transparentes com 24,2cm de altura, 8,8 cm de diâmetro da base e 8,0cm de diâmetro da boca foram utilizados como recipientes. De três a cinco propágulos foram germinados em 1040 ml de água com salinidade de 12‰ preparada com sal do mar para aquário (Marca Natural Ocean, de procedência japonesa) em água destilada. A salinidade foi escolhida dentro da faixa de variação da mesma na região de coleta, que varia entre 8,6‰ e 30,5‰ (SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRÓN-MOLERO, 1990). Os recipientes com propágulos foram mantidos próximos a uma janela, com incidência de radiação solar, em temperatura

ambiente. Para manter a salinidade constante, a quantidade evaporada de água foi reposta com água diariamente.

IV.2.1.2. Germinação das raízes no escuro

Os mesmos procedimentos descritos no ítem anterior (VI.2.1.1) foram feitos simultaneamente, mas no caso da germinação no escuro, os vasos de cristal foram envoltos externamente por fita adesiva preta, impedindo assim a incidência de radiação solar na região basal dos propágulos. Na boca dos vasos foi colocado um plástico preto composto de polietileno com furos para a inserção de cada propágulo. Desta forma, somente a região apical dos propágulos foram expostas à radiação solar.

IV.2.2. Extração de núcleos das células meristemáticas

Raízes do mesmo propágulo foram utilizadas para a coleta de núcleos para o ensaio cometa tendo como base o método descrito por Navarrete *et al*. (1997) para obtenção de célula meristemática de cebola (*Allium cepa*). As raízes cortadas dos propágulos foram colocadas sobre o gelo para que se manterem túrgidas. Uma raiz por vez foi seccionada transversalmente em secções finas com bisturi na zona meristemática, acima da coifa. A superfície de cada corte foi tocada várias vezes em um volume de 40µL de solução de extração colocada em cima de lâminas com gel de primeira camada. Assim, somente as células meristemáticas com o corte na região do citoplasma liberaram seus núcleos livres para a solução de extração, formando assim uma suspensão de núcleos pronta para ser usada no ensaio cometa.

Foram testadas 4 soluções com o objetivo de escolher a melhor solução para extração de núcleos de *Rhizophora mangle*, tendo sido levados em conta os seguintes parâmetros: quantidade de núcleos; presença de borda; ausência de dano

ao material nuclear e a proporção entre núcleos intactos e EANs (veja IV.2.9.2.). As soluções testadas foram:

- Tampão Sörensen, conforme descrito por Navarrete *et al*. (1997).
- Tampão PBS conforme descrito por Singh *et al*. (1988).
- Solução salina 12‰, a mesma solução utilizada para germinação de raízes.
- Tampão 0.4M Tris pH 7,4, conforme descrito por Singh *et al*. (1988).

IV.2.3. Estimativa de número de núcleos extraídos.

Foram contados todos os núcleos por toda extensão da lâmina. Posteriormente, a quantidade de núcleos foi dividida por 40 µl, sendo este o volume total de solução de extração utilizado na extração dos núcleos. Assim, foi calculada a quantidade de núcleos por microlitro em cada lâmina analisada.

IV.2.4. Testes para escolha do tipo e do tempo de lise

Foram testadas duas soluções de lise e também foi realizado um teste sem a lise. As soluções testadas foram lise alcalina iônica (0,1% DSS, 300mM Na2EDTA, pH>13) e lise salina aniônica (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 0,1 M Na2EDTA, 1% n-lauril-sarcosinato, 1% Triton X-100, pH 10) (USSAMI, 2007) previamente preparadas e refrigeradas. Com a lise alcalina iônica foram testadas exposições de 60 minutos e 120 minutos e com a lise salina aniônica foi testada somente a exposição por 60 minutos. Todas as exposições à lise foram realizadas 4ºC.

Para selecionar o melhor procedimento de lise foram levados em conta os seguintes parâmetros: a presença ou ausência de borda nítida, presença ou ausência de dano ao DNA, quantidade de núcleos, a migração de material, proporção entre núcleos intactos e EANs.

IV.2.5. Determinação do tempo de relaxamento e de eletroforese

Foram testados os tempos de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese e 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese. Quanto maior a exposição à solução de eletroforese, maior o grau de relaxamento e expressão de sítios álcali-lábeis de DNA (USSAMI, 2007). Desta forma, os parâmetros para escolha dos tempos de relaxamento e eletroforese levaram em conta a migração do material, a integridade do anel do material, a granulação do material no anel e a proporção de núcleos intactos de EANs.

IV.2.6. Voltagem e amperagem

Todas as corridas foram conduzidas a 0,8V/cm e 230 mA. O volume de solução de eletroforese no interior da cuba foi ajustado para se obter a corrente desejada de 230 mA.

IV.2.7. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado conforme descrito por Singh *et al.* (1988), com modificações feitas para otimizar a análise do material. Lâminas histológicas lisas de alta qualidade, foscas numa extremidade e devidamente limpas foram cobertas com uma fina camada de gel de agarose de ponto de fusão normal dissolvida em água destilada na concentração de 1.5%. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e guardadas para serem utilizadas quando necessário. Esta primeira camada atua como base para melhor adesão da segunda camada que contém o material celular aderido às lâminas.

Um volume de 40 µl de solução de extração foi colocado na forma de um segmento reto perto de uma extremidade da lâmina previamente coberta com a primeira camada de gel de agarose e os núcleos foram extraídos neste volume de

solução de extração, formando assim uma suspensão, conforme descrito no ítem IV.B.2.

Um volume 120µl de gel de agarose de baixo ponto de fusão dissolvido em PBS foi colocado na forma de um segmento reto cerca de 1mm atrás do segmento de suspensão. Em seguida, uma lamínula de vidro (24X60mm) encostada no gel de forma inclinada foi delicadamente abaixada para espalhar o gel junto com a suspensão por toda extensão da lâmina, formando a segunda camada com os núcleos incubados. As lâminas com a segunda camada foram dispostas horizontalmente em uma bandeja e colocadas na geladeira (4°C) por 20 minutos para o endurecimento do gel. As lamínulas foram então delicadamente retiradas. Foram confeccionadas três lâminas por propágulo.

As lâminas foram colocadas numa solução de lise contendo 0,1% DSS, 300mM NaOH, 30mM Na_2EDTA, pH>13 recém preparada, a 4°C por 60 minutos. Neste procedimento, as membranas do núcleo e organelas são rompidas e os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são dissolvidos, deixando o DNA exposto, como um novelo altamente enrolado. Ao término da lise, as lâminas foram lavadas com água destilada gelada para completa remoção da solução de lise. Em testes sem lise esta etapa foi emitida.

As lâminas foram então dispostas na própria cuba eletroforética e imersas por 5 minutos em solução refrigerada de tampão alcalino de eletroforese pH>13 (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM) a 4ºC, para o relaxamento do DNA.

Finalizada a etapa do relaxamento do DNA, as lâminas foram então submetidas à eletroforese durante 20 minutos na voltagem de 0,80V/cm e amperagem de 300 mA.

Ao término da eletroforese, as lâminas foram submetidas duas vezes à neutralização por 15 minutos em tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7,5), lavadas com água destilada, submersas em etanol 100% a 4°C e colocadas para secar em temperatura ambiente por cerca de duas horas.

A coloração por nitrato de prata foi feita conforme o protocolo de Garcia *et al.* (2004) e os cometas foram fotografados em aumento de 200X com o auxílio de um microscópio óptico de luz.

Núcleos e cometas obtidos nos experimentos que visavam selecionar a solução de extração, lise e tempo de lise, tempo de relaxamento e eletroforese foram fotografados e analisados visualmente levando em consideração a coloração, a integridade da borda, a granulação do anel de material nuclear, a migração do material e outros aspectos morfológicos do cometa. Os dados obtidos foram utilizados para comparar as diferentes condições experimentais.

Os cometas obtidos nos experimentos visando a avaliação de método foram analisados usando índice de dano descrito na secção IV.2.9.

IV.2.8. Validação de Método

IV.2.8.1. Exposição à H_20_2

Para validar e testar a aplicabilidade do ensaio cometa adaptado foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é uma substância com ação direta, cuja genotoxicidade não precisa ser ativada pelas enzimas de biotransformação.

Testes com substâncias de ação direta foram realizados conforme o método descrito por Wojewódzka, Buraczewska, e Kruszewski (2002), com pequena modificação.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mais conhecido como água oxigenada, foi utilizado como substância genotóxica nas concentrações de 5, 10, e 20 µM em PBS, e três lâminas foram expostas a cada concentração. Lâminas confeccionadas com células de três propágulos foram cobertas em toda a sua superfície com 200µl de cada solução, e foram então incubadas no escuro durante 30 minutos para serem utilizadas como controle positivo. Lâminas de controle negativo foram cobertas com mesma quantidade de PBS. Ao término do período de exposição, as lâminas foram lavadas 10 vezes com PBS em abundância e submetidas ao restante do procedimento do ensaio cometa, conforme descrito na seção V.2.4. O peróxido de hidrogênio é uma substância utilizada rotineiramente em nosso laboratório para essa finalidade.

IV.2.9. Análise de Dados:

IV.2.9.1. Sem contagem de EANs

A análise de dados de validação foi feita usando Índice de Dano. Para cada propágulo, cem cometas foram examinados e classificados em quatro classes, de 0 a 3, em função do grau de danos ao DNA sem levar em conta a existência de EANs, conforme o catálogo apresentado na figura 1. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição ao agente genotóxico, e a classe 3 corresponde aos cometas com danos máximos. O Índice de Danos (ID) foi calculado como a somatória dos produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2 e 3):

ID *= 0.(n Classe 0) + 1.(n Classe 1) + 2.(n Classe 2) + 3.(n Classe 3)*

O valor do ID, assim, varia de 0 quando todos os 100 cometas contados são intactos; e 300 quando todos os 100 cometas contados são danificadas ao máximo.

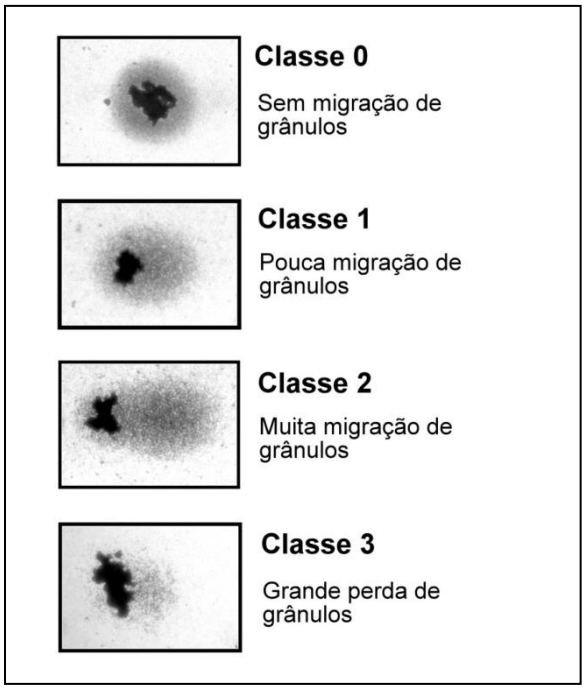

Figura 1. Catálogo de cometas de diferentes graus de danificação classificados em quatro classes de dano.

IV.2.9.2. Com contagem de EANs

Também foi calculado o valor do ID com a inclusão de EANs nos dados para verificar seu efeito sobre resultados obtidos e para determinar se é possível considerar EANs como cometas de uma classe com maior nível de dano. Para este cálculo, cem cometas foram examinados e classificados em cinco classes, de 0 a 4, em função do grau de dano ao DNA, conforme o catálogo apresentado na figura 2. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição, e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos, ou seja, às EANs (onde houve dispersão completa de todo o material celular, restando somente esta estrutura). O Índice de Danos (ID) foi calculado como a somatória dos produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4):

ID *= 0.(n Classe 0) + 1.(n Classe 1) + 2.(n Classe 2) + 3.(n Classe 3) + 4.(n Classe 4)*

O valor do ID, assim, varia de 0 quando todos os 100 cometas contados são intactos; e 400 quando todos os 100 cometas contados são EANs, elementos nucleares considerados como cometas com danos máximos.

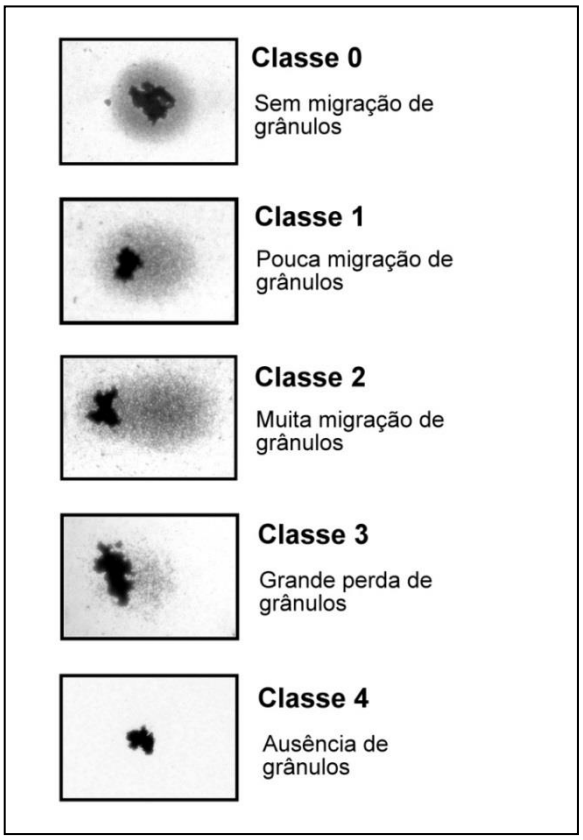

Figura 2. Catálogo de cometas de diferentes graus de danificação classificados em cinco classes de dano.

IV.2.10. Testes estatísticos

Os testes estatísticos foram executados com o programa Statistica 7. Foram utilizados testes ANOVA não paramétricos de Kruskal-Wallis para verificar se existe ou não diferença entre os grupos e testes de comparação múltipla de Duncan para identificar os grupos com diferenças. Para comparação de dois grupos foi utilizado o Teste-t de Student (ZAR, 1996). As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

V. RESULTADOS

V.1. Germinação de raízes

A figura abaixo (figura 3) mostra propágulos provenientes de uma mesma coleta germinados aleatoriamente em vasos opacos (germinação no escuro) e vasos translúcidos (germinação no claro). No total foram 20 propágulos germinados, sendo 10 no claro e 10 no escuro.

Figura 3. Propágulos de *Rhizophora mangle* usados na germinação no claro e no escuro.

A figura 4 mostra raízes geminadas no claro (A) e no escuro (B), dentro das mesmas condições.

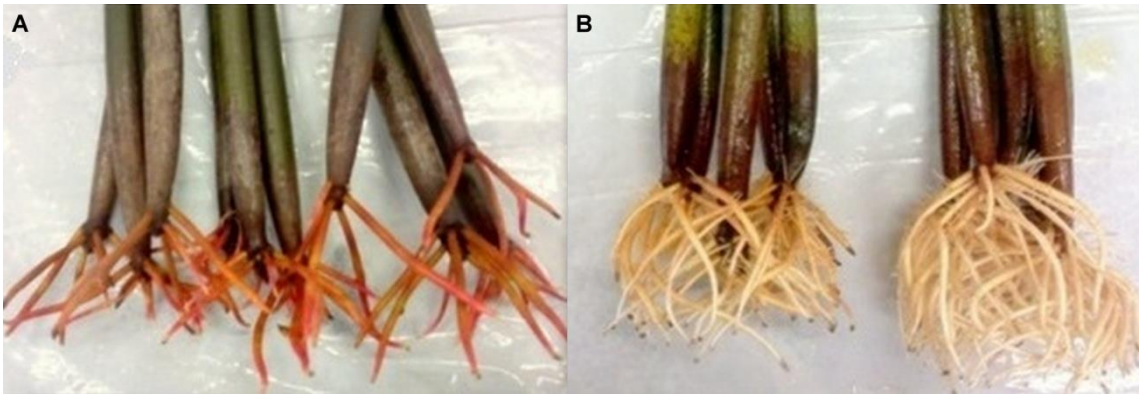

Figura 4. Raízes de propágulos de *Rhizophora mangle*: A - germinadas no claro; B - germinadas no escuro.

V.1.1. Germinação no claro

As raízes geminadas no claro (figura 4 A) se desenvolveram mais tardiamente e apresentaram maior rigidez, mantendo-se estendidas, retas. Essas raízes apresentaram tons mais escuros de bege e em grande parte uma coloração avermelhada. Os propágulos germinados no claro, considerando toda sua extensão, assumiram uma tonalidade marrom opaco próximo à base do propágulo e verde escuro ao longo do propágulo até seu ápice.

V.1.2. Germinação no escuro

As raízes germinadas no escuro (figura 4 B) se desenvolveram mais rapidamente e mantiveram uma coloração mais homogênea e clara, em tons de bege, e apresentaram uma consistência menos rígida, mais mole, assumindo um formato curvo. Foi possível também evidenciar que os propágulos germinados no escuro mantiveram uma coloração semelhante a dos propágulos recém coletados: em tonalidade marrom na região próxima à base do propágulo e verde claro ao longo do propágulo até seu ápice. Desta forma, todos os experimentos seguintes foram realizados com raízes germinadas no escuro.

V.2. EAN – Estrutura assumida como nucléolo

V.2.1. Nucléolos

Nucléolos são estruturas nucleares presentes em quase todas as células eucarióticas. Eles são especializados na produção de subunidades ribossomais e também desempenham um papel em muitas atividades celulares fundamentais, como resposta ao stress ou infecções virais, controle do envelhecimento, sequestro de moléculas regulatórias, modificação de diferentes tipos de RNA, montagem de RNP, bem como exportação nuclear. Embora os nucléolos eucarióticos conservem suas funções principais, diferenças morfológicas entre essas estruturas podem ser notadas entre diferentes reinos. Na maioria dos casos, nucléolos de plantas se apresentam como estruturas bem ordenadas, nas quais quatro principais componentes podem ser distinguidos no nível ultraestrutural: centros fibrilares (FC), componente fibrilar denso (DFC), componente grânular (GC) e vacúolos nucleolares (SHAW; BROWN, 2012). A morfologia e a proporção dos subcompartimentos de um nucléolo podem mudar de acordo com a atividade metabólica, que por sua vez está correlacionada com o estado fisiológico de uma célula, tipo de célula, fase do ciclo celular, bem como com a influência ambiental (STĘPIŃSKI, 2014).

Nucléolos são estruturas extremamente dinâmicas. Seu tamanho, sua forma, sua ordenação e atividade transcripcional dependem do estado funcional, atividade metabólica, fase do ciclo celular, estado fisiológico ou patológico da célula, como também fatores bióticos e abióticos do ambiente (STĘPIŃSKI, 2014).

Em mamíferos, FCs são estruturas esféricas de tamanhos diferentes e compostos de fibrilas frouxamente entrelaçadas. O seu número é altamente variável, variando de uma a várias dezenas por nucléolo. O DFC é composto de fibrilas hermeticamente embaladas. Geralmente, o DFC está localizado ao redor das FCs. A CG é composta de grânulos e cercam os componentes fibrilares (DERENZINI *et al*., 2006). O nucléolo não está envolto por uma membrana, sendo mantido unido por interações entre seus componentes protéicos e seus ácidos nucléicos, sendo um extenso complexo multimolecular (SHAW; BROWN, 2012).

Todos os componentes nucleolares apresentam afinidade à prata. Esta afinidade pode ser demonstrada para centros fibrilares (FC) e componente fibrilar denso (DFC), ou somente para centros fibrilares (FC), dependo dos métodos empregados (JORDAN, 1984).

V.2.2. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* e EAN, Estrutura Assumida como Núcleolo.

Figuras de núcleos, cometas e “Estruturas Assumidas como Nucléolo” (EANs) apresentadas nesta seção foram capturadas das lâminas preparadas para ensaio cometa conforme descritas no ítem IV.2.7 do Material e Métodos. Em resumo, os núcleos foram extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS ou solução salina 12‰ como solução de extração e incubados em uma camada de gel de agarose sobre uma lâmina histológica. Conforme necessidade, as lâminas foram submetidas à coloração de prata, e aos parciais ou completos subsequentes passos do ensaio cometa antes de serem examinadas e fotografadas. Nestas condições, os resultados obtidos podem ser diferentes dos obtidos através de métodos citológicos convencionais. Detalhes de tratamentos serão apresentados juntamente às figuras.

Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração podem ser classificados em dois tipos em função da intensidade da coloração. A figura 5 mostra um exemplo de tipo de núcleo fortemente e homogeneamente corado com coloração de prata. Em geral núcleos apresentam a forma redonda, borda nítida, e anel de material nuclear com granulação fina. A nitidez da borda, a granulação e a homogeneidade do anel sugerem a integridade da borda e do material nuclear.

No centro do núcleo há uma estrutura nuclear parecida com o nucléolo de uma célula de planta descrita na literatura (SHAW, 2010; TRENDELENBURG *et al*., 1974). Em nosso experimento, a estrutura é de forma irregular e tamanho variado, sendo fortemente corada pela prata. A estrutura foi provisoriamente chamada de Estrutura Assumida como Nucléolo, EAN, pois não foi feito um estudo de identificação e por necessidade de referência na descrição de núcleos e de cometas. Neste tipo de núcleo, entre o anel de material nuclear e a EAN, existe um anel fino com menor intensidade da coloração.

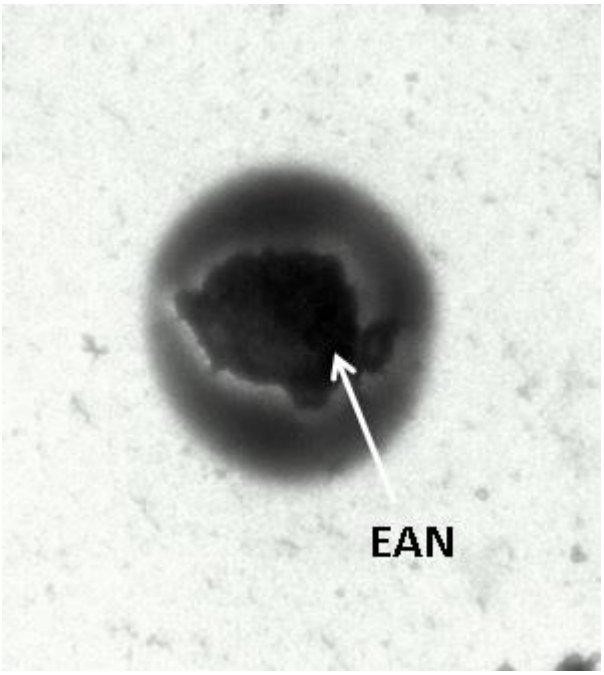

Figura 5. Núcleo com borda nítida, com alta afinidade à coloração de prata, de raízes de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, mostrando no centro uma estrutura nuclear denominada como EAN, parecida com o nucléolo de outro vegetal encontrado na literatura (SHAW, 2010).

A figura 6 mostra um exemplo de um núcleo com intensidade média de coloração e borda nítida. O anel de material nuclear neste tipo de núcleo se mostra como um anel de granulação fina, moderadamente corada na periferia do núcleo. A EAN é grande, revelando grossa granulação de diferentes intensidades de cores.

Núcleos com enorme nucléolo foram descritos na alga *Acetabularia mediterranea* (TRENDELENBURG *et al*., 1974).

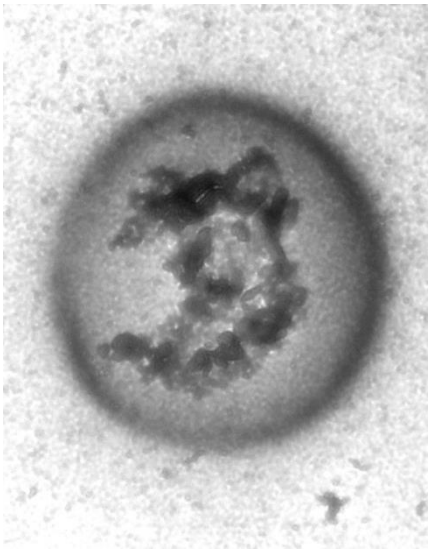

Figura 6. Núcleo com borda nítida, com media afinidade à coloração de prata, de raízes de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese mostrando no centro uma estrutura nuclear denominada como EAN, parecida com o nucléolo de uma alga encontrada na literatura (TRENDELENBURG et al., 1974).

Geralmente, a EAN apresenta-se como uma estrutura única dentro do núcleo. No entanto, raras vezes apareceu algo semelhante a duas EANs no interior de um só núcleo, como visto na figura 7.

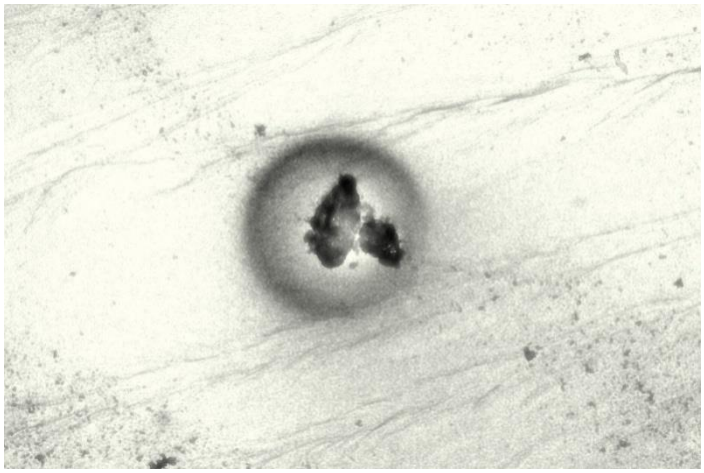

Figura 7. Cometa obtido com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, a 4ºC. O cometa apresenta aparentemente duas EANs. Aumento 400x.

A forma e a característica histoquímica da EAN mudam em função da integridade da borda dos núcleos ou dos cometas. Nos núcleos e cometas intactos, que não passaram pela etapa da lise e que apresentaram borda nítida, o que indica a integridade da membrana dos núcleos, a EAN demonstra granulosidade e coloração heterogênea. Nos núcleos ou cometas obtidos após submissão à lise, que tem a função de dissolver a membrana nuclear para facilitar a migração/difusão do material nuclear, as bordas ficam sem nitidez e a EAN apresenta-se como uma massa sem granulosidade, homogênea e fortemente corada pela coloração prata (figura 8).

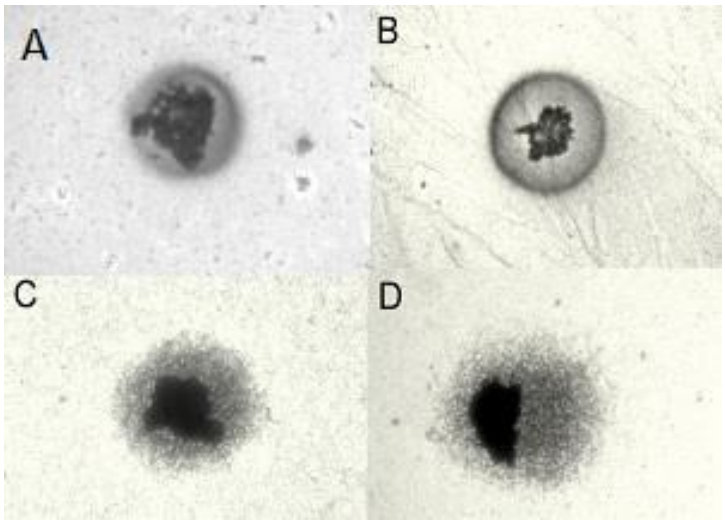

Figura 8. Núcleos e cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração. A: sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese; núcleo com borda e EAN com grânulos com coloração heterogênea. B: sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC; cometa com borda e EAN com grânulos com coloração heterogênea. C: com 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese; núcleo sem borda e EAN fortemente corada, sem grânulos e homogênea. D: com 60 minutos de lise alcalina iônica, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC; Cometa sem borda e EAN fortemente corada, sem grânulos e homogênea. Aumento 400x.

Esta mudança de forma e de características histoquímica pode ser explicada pelo fato de que, em um núcleo ou um cometa intacto com borda nítida, que indica a integridade da membrana nuclear, a EAN é um conjunto estável de FC, DFC, que são os componentes fibrilares, e CG, um componente granuloso que engloba FC e

DFC em uma estrutura sem membrana. A forma visível do conjunto representa a afinidade do mesmo à coloração de prata. Com a membrana, o ambiente interno do núcleo é suficientemente estável para manter a integridade do nucléolo.

Em um núcleo ou cometa que passou pela etapa de lise, a membrana foi dissolvida, o ambiente interno do núcleo não é mais estável para manter a integridade do nucléolo e os grânulos de CG se difundem deixando expostos no local os componentes FC e DFC que não difundem nem migram por serem os componentes fibrilares. FC e DFC são componentes de alta afinidade à prata, o que resulta em uma EAN fortemente corada.

Assim sendo, nos núcleos/cometas que não conseguiram manter o ambiente interno estável para a integridade da EAN, o que foi chamado de EAN de fato é apenas uma parte da EAN. Nos núcleos/cometas com danificação mais séria, o material granuloso e outros materiais, tais como fragmentos de DNA e outras proteínas, são parcialmente ou completamente difundidos e desaparecem, deixando, respectivamente, “EANs associadas com material nuclear” ou “EANs livres”, que são estruturas de formas irregulares fortemente coradas e imobilizadas no gel (figura 9).

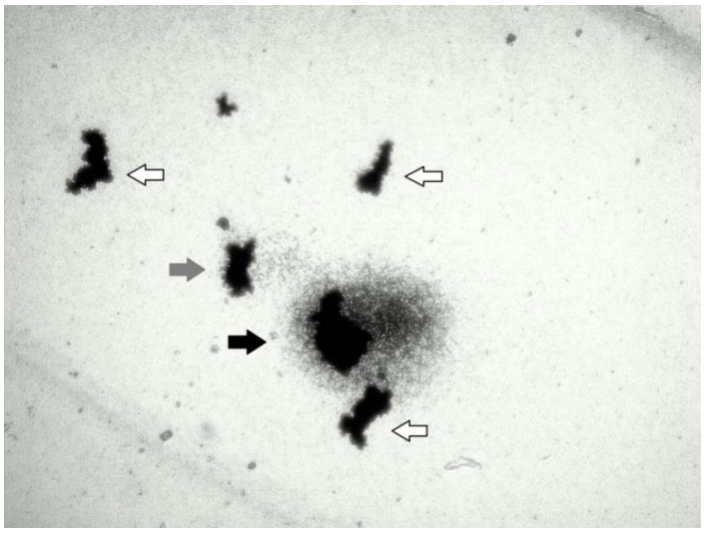

Figura 9. Cometas e EANs obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, a 4ºC. Seta preta: cometa de baixo nível de dano com EAN; Seta cinza: cometa com alto nível de dano, com EAN presente e pouco material nuclear associado; Setas brancas: EANs livres no gel, totalmente desassociadas de material nuclear. Aumento 400x.

Núcleos/cometas com mais de uma EAN são extremamente raros e aparentemente não há indícios de que uma EAN pode originar mais de uma EAN livre. Estas observações sugerem que provavelmente cada EAN livre pode ser considerada como um núcleo/cometa com máximo grau de danificação.

V.3. Extração de núcleos com diferentes soluções de extração

Experimentos foram realizados com núcleos extraídos com diferentes soluções de extração sem serem submetidos à etapa de lise, relaxamento e eletroforese para evidenciar o efeito exclusivo de cada solução de extração que foi testada.

V.3.1. PBS

Núcleos de raízes germinadas no escuro extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese estão na figura 10. Na maioria das lâminas preparadas com extrato de PBS foram extraídos cerca de 5 núcleos/µl, sendo suficiente para análise de cometas através de método visual.

Os núcleos extraídos apresentaram borda nítida, granulação fina e coloração forte indicando a integridade da membrana e do material nuclear.

Dentro dos núcleos foi observada uma mancha de forma irregular e fortemente corada com coloração de prata. A estrutura é provisoriamente nomeada Estrutura Assumida como Nucléolo (EAN) e foi descrita mais detalhadamente na seção VI.2.

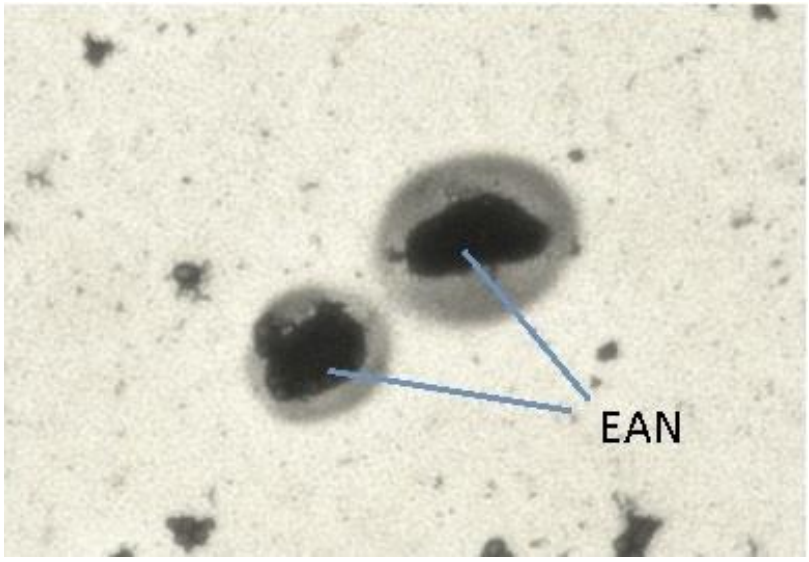

Figura 10. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

Em alguns casos foram obtidos núcleos cuja borda não estava nítida, a granulação era fina e a coloração fraca (figura 11), sugerindo certo nível de danificação de membrana e perda de material nuclear através da difusão.

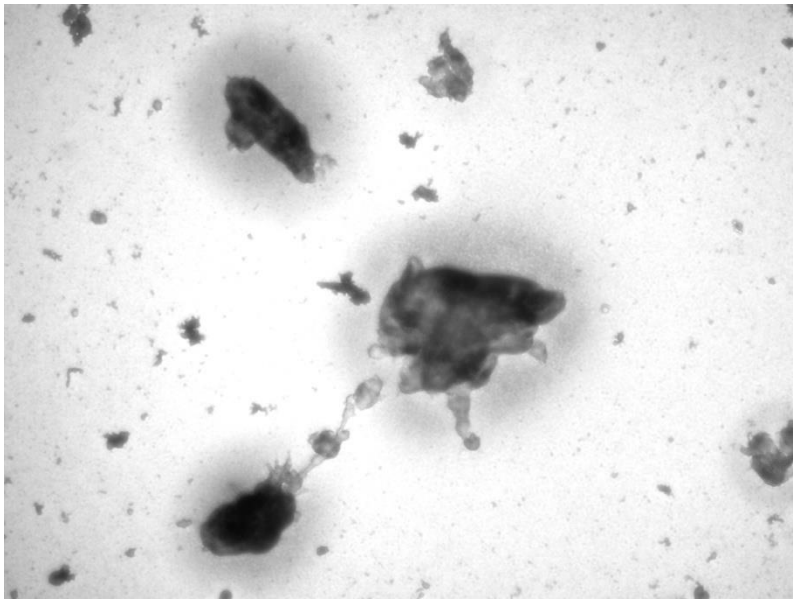

Figura 11. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura 12 mostra núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* com diferentes níveis de dano de membrana extraídos com PBS como solução de extração. Núcleo com menor nível de dano de membrana mostra a borda nítida e aparentemente sem difusão do material nuclear pelo gel. Núcleo com membrana completamente danificada, no entanto, mostra a EAN livre, sem material nuclear associado. EANs livres são restos dos núcleos cujas membranas foram completamente danificadas e outros materiais nucleares completamente difundidos.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 48%, EANs livres 27% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 25%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 52%.

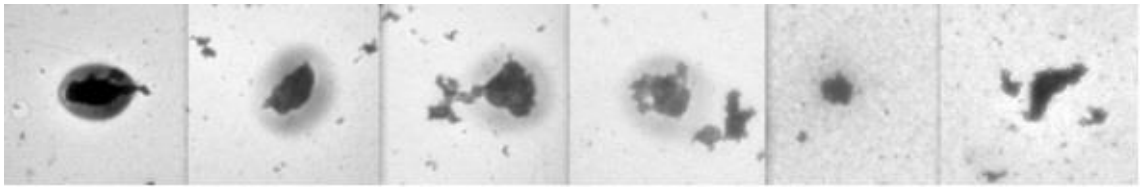

Figura 12. Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.3.2. Solução Salina 12‰

Na extração com solução salina 12‰ a quantidade de núcleos encontrada foi de cerca de 2,5 núcleos/µl.

Os núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* usando solução salina 12‰ como solução de extração encontrados nas lâminas sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, estão nas figuras 13 e 14.

Grande parte dos núcleos apresentou borda nítida e nestes casos a granulação era fina e a coloração forte (figura 13). No entanto, alguns núcleos não

apresentaram borda nítida (figura 14), coloração fraca e dispersão de material nuclear pelo gel.

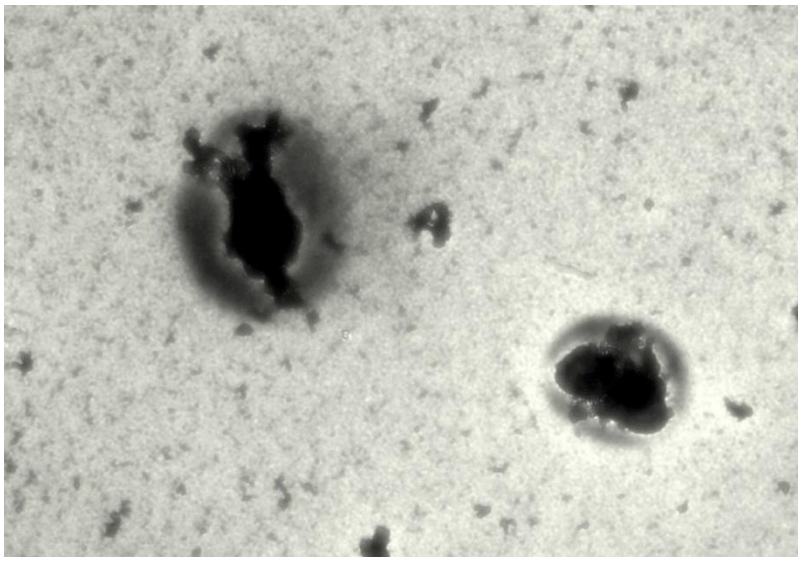

Figura 13. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

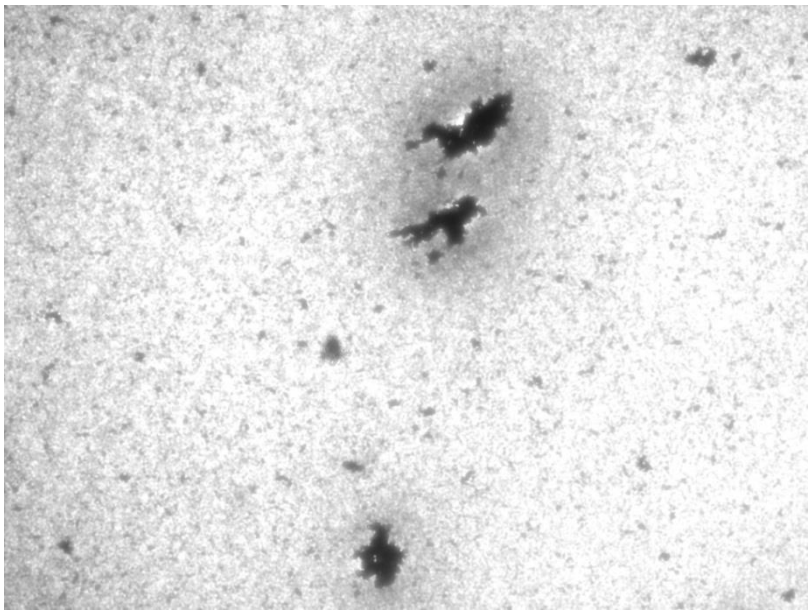

Figura 14. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura 15 mostra núcleos com diferentes níveis de dano de membrana extraídos a partir de raízes de *Rhizophora mangle* com solução salina 12‰ como solução de extração. Núcleo com menor nível de dano de membrana mostra a borda nítida e aparentemente sem difusão do material pelo gel. Núcleo com membrana completamente danificada, no entanto, mostra somente a EAN livre.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 32%, EANs livres 44% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 24%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 68%.

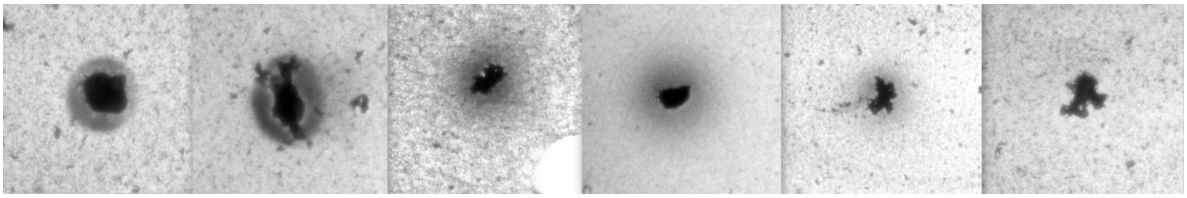

Figura 15. Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano de membrana, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.3.3. Tampão 0.4M Tris pH 7,4

Na extração com tampão 0.4M Tris pH 7,4 a quantidade de núcleos encontrada foi de cerca de 1,25 núcleos/µl.

Os núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* usando solução de tampão 0,4M Tris pH 7,4 como solução de extração encontrados nas lâminas sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, estão nas figuras 16 e 17. Poucos núcleos apresentaram borda nítida e nestes casos a granulação era bem fina e a coloração forte (figura 16). Grande parte dos núcleos não apresentou borda nítida (figura 17), granulação grossa e dispersa e coloração fraca.

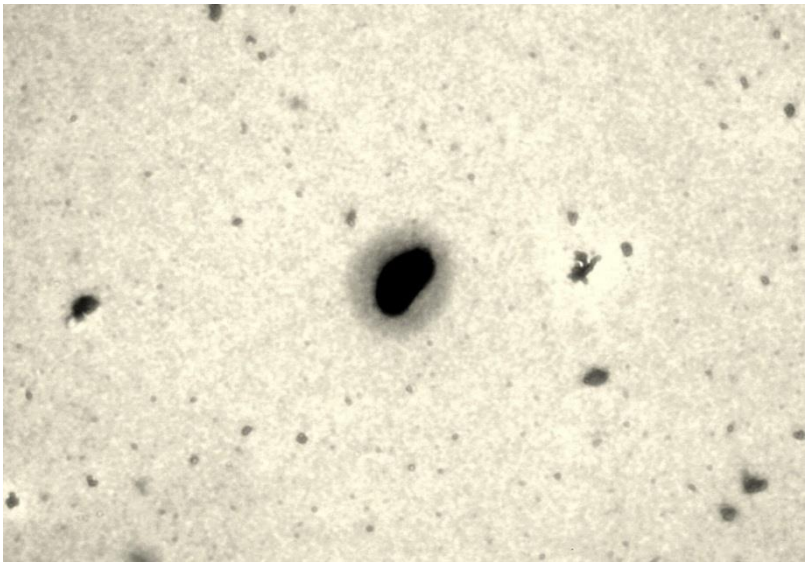

Figura 16. Núcleos com borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

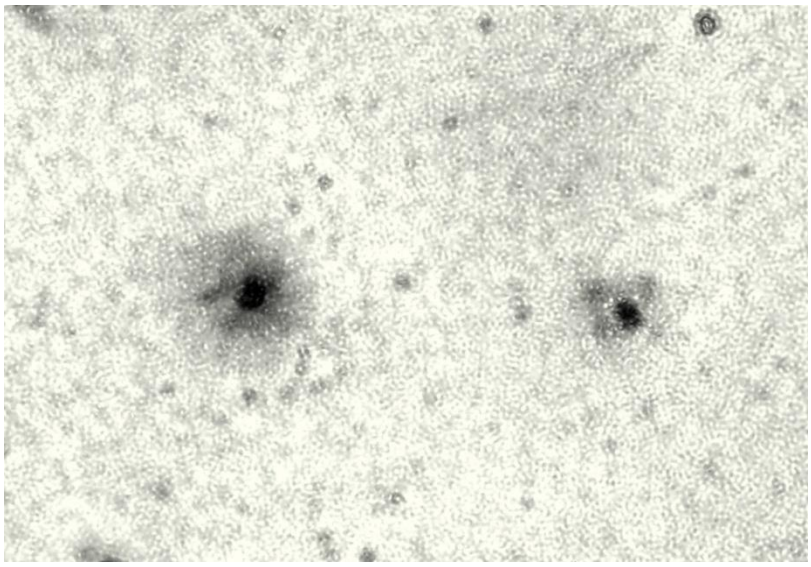

Figura 17. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura 18 mostra núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, que vão do menor (esquerda) ao maior nível de dano de membrana (direita). Núcleo com menor nível de dano de membrana mostra a borda nítida e aparentemente sem difusão do material pelo gel.

Núcleo com membrana completamente danificada, no entanto, mostra somente a EAN livre.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 19%, EANs livres 58% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 23%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 81%.

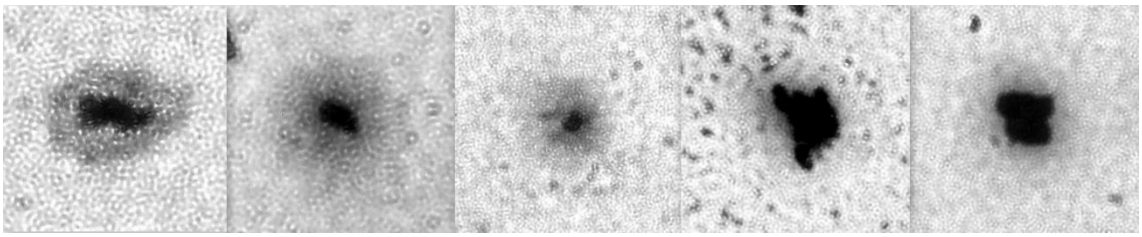

Figura 18. Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução tampão 0.4M Tris pH 7,4 como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita).Aumento 400x.

V.3.4. Tampão Sorensen

Na extração com tampão Sorensen como solução de extração a quantidade de núcleos encontrada foi de cerca de 0,57 núcleos/µl.

Os núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* usando tampão Sorensen como solução de extração encontrados nas lâminas sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, estão nas figuras 19 e 20. Os poucos núcleos encontrados apresentaram borda, porém não nítida (figura 19). Nestes casos a granulação era grossa e a coloração forte, com um pouco de difusão de material pelo gel. No entanto, a grande maioria dos núcleos encontrados não apresentava borda, sendo mais evidente a presença da EAN com algum vestígio de material nuclear disperso ao redor desta estrutura (figura 20).

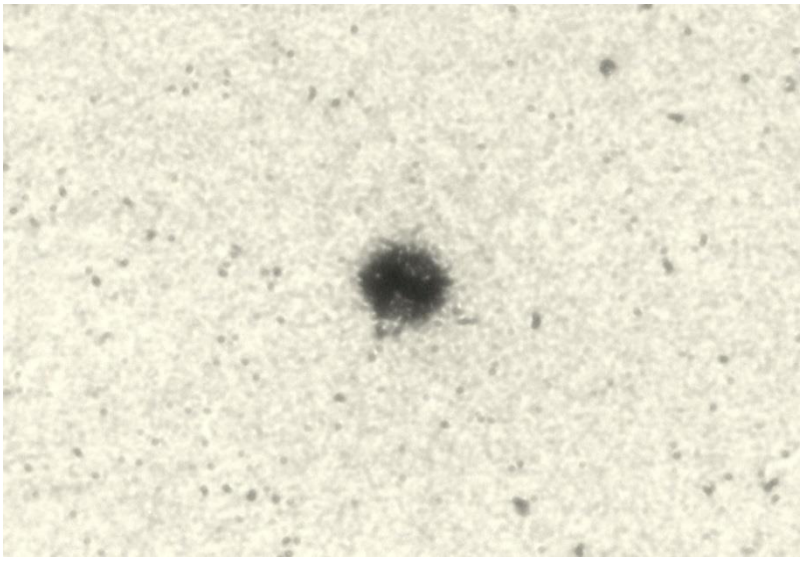

Figura 19. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com solução tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

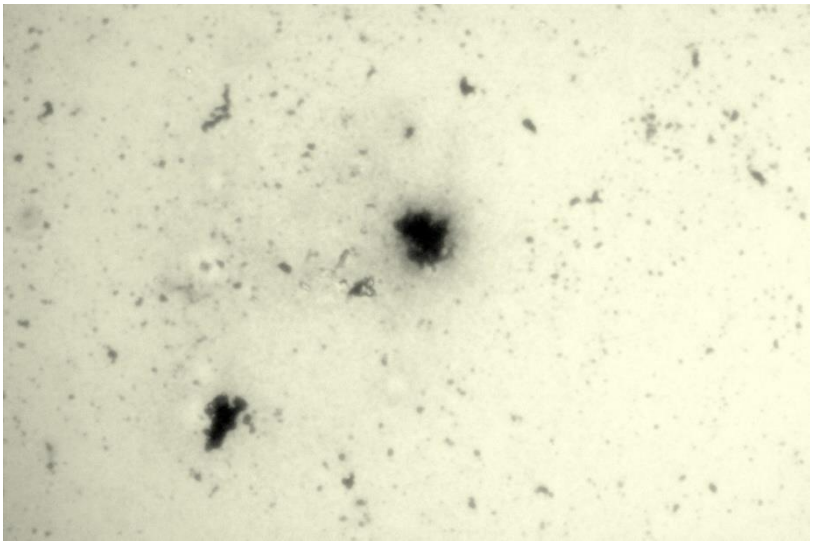

Figura 20. EAN livre no gel e núcleo sem borda nítida e com quase completa difusão de material nuclear pelo gel extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura 21 mostra núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle*, com tampão Sorensen como solução de extração, que vão do menor (esquerda) ao maior nível de dano de membrana (direita). Núcleo com menor nível de dano de

membrana mostra a borda nítida e pouca difusão do material pelo gel. Núcleo com membrana completamente danificado, no entanto, mostra somente a EAN livre.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 12‰, EANs livres 87% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 1%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 88%.

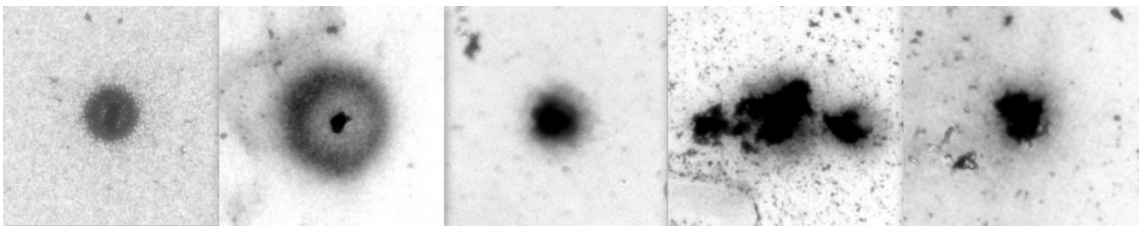

Figura 21. Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com tampão Sorensen como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano de membrana, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.3.5. Efeitos de soluções de extração sobre quantidade e qualidade de núcleos extraídos.

Resultados de experimentos acima descritos mostram que extratos de núcleos com diferentes soluções de extração apresentam diferentes números de núcleos e diferentes graus de danificação de membrana de núcleos extraídos, variando de núcleos intactos, danificados, até EANs livres. São considerados núcleos intactos os que possuem borda nítida indicando a integridade da membrana e que, aparentemente, não apresentam dispersão de material nuclear pelo gel (figura 22, seta preenchida). Os núcleos danificados são aqueles que não possuem borda nítida, indicando dano à membrana, e apresentam dispersão de material pelo gel (figura 23, seta preenchida). As EANs livres também são núcleos danificados, mas neste caso as membranas são consideradas completamente danificadas e os materiais nucleares são completamente dispersos pelo gel (figuras 22 e 23, setas vazadas).

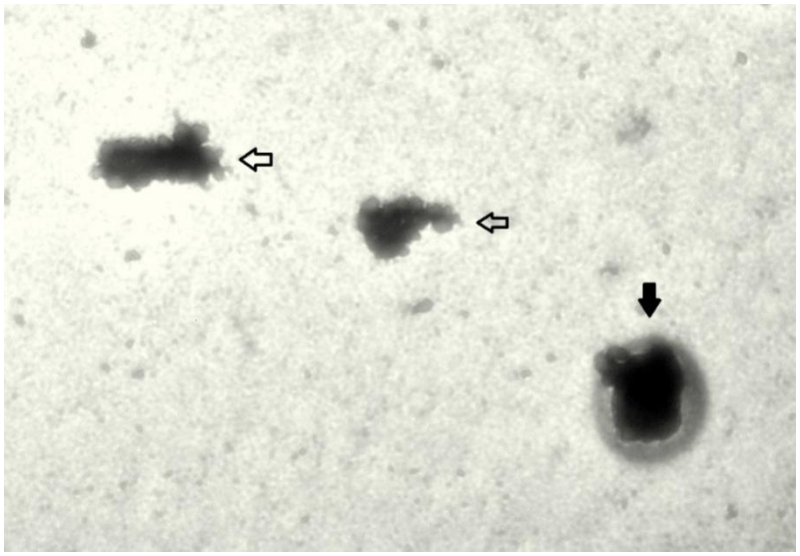

Figura 22. Núcleo intacto (seta preta) com borda nítida e EANs (setas vazadas) extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

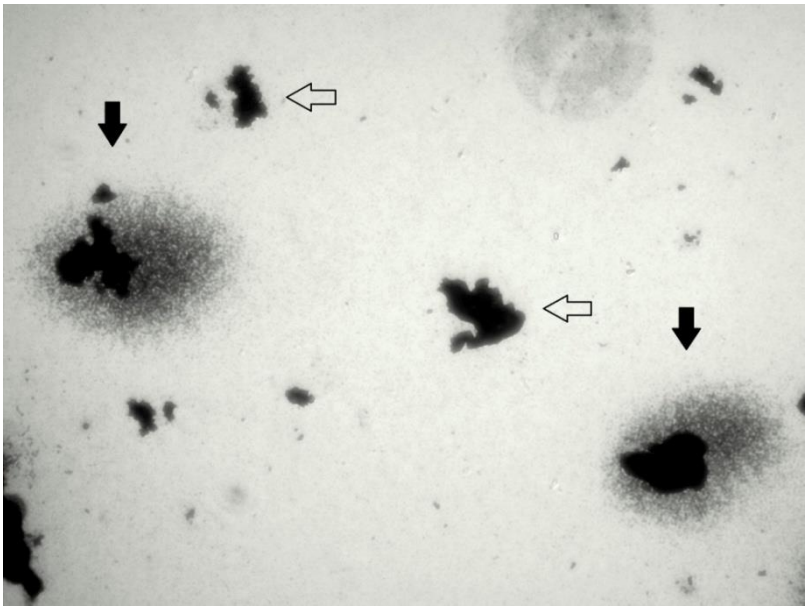

Figura 23. Cometas (setas pretas) e EANs livres (setas vazadas) extraídos de raízes *de Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

A porcentagem de núcleos intactos e núcleos danificados, o que inclui as EANs (figura 24), varia em função da solução de extração, sendo o PBS a solução

que apresentou maior proporção de núcleos intatos (48%) e menor proporção de núcleos danificados (52%, sendo 25% de núcleos com danos intermediários e 27% somente EANs livres). O tampão Sorensen, por outro lado, apresentou menor proporção de núcleos intatos (12‰) e maior proporção de núcleos danificados (88%), sendo quase todos eles EANs (87%).

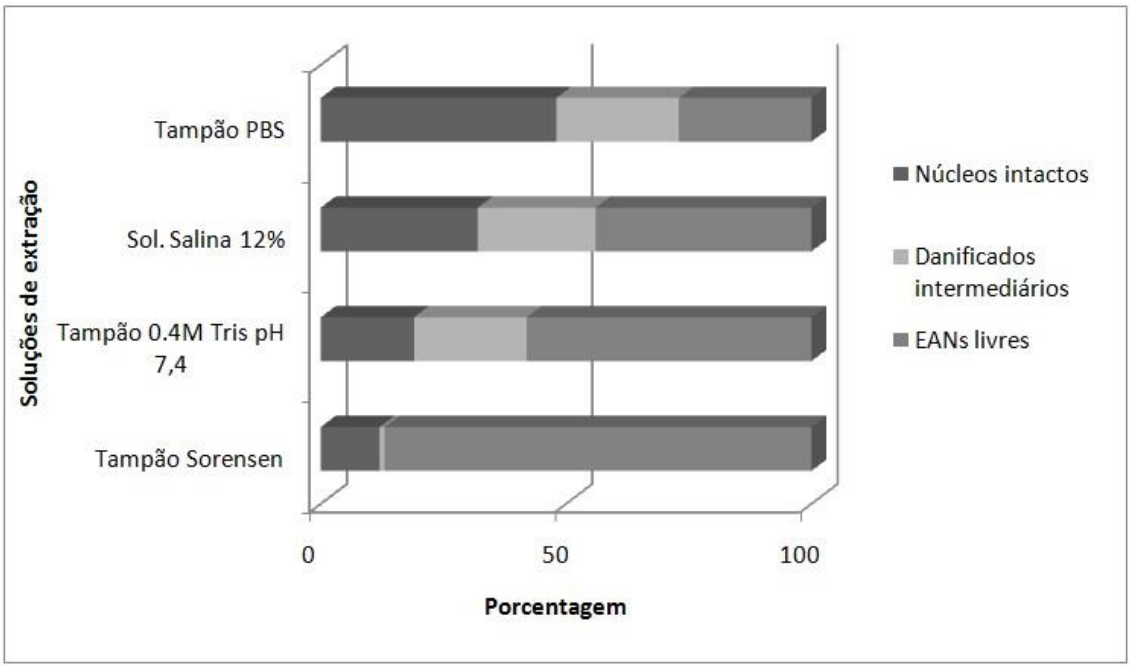

Figura 24. Porcentagem de núcleos intactos, núcleos com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* usando quatro diferentes soluções de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese.

As características tais como nitidez da borda, pouca difusão do material, maior número de núcleos extraídos por lâmina, e a baixa porcentagem de EANs livres apontam a qualidade do PBS como solução de extração, razão pela qual os núcleos extraídos com esta solução foram utilizados em todos os demais experimentos que visavam estabelecer o método para o ensaio cometa e também a validação do método.

A solução salina também apresentou qualidades comparáveis com as do PBS como uma solução de extração. Núcleos extraídos com esta solução foram também utilizados para a validação do método.

Núcleos extraídos com tampão 0.4M Tris pH 7,4 e com tampão Sorensen como soluções de extração não foram mais utilizados.

V.4. Efeito do tipo de lise

Experimentos foram realizados em diferentes condições de lise usando somente núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, que foi selecionada através de experimentos anteriores como a solução mais adequada para extração de núcleos. Os experimentos tiveram como objetivo determinar o tipo e a duração da lise apropriada para este ensaio cometa.

V.4.1. Sem lise

Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem serem submetidos à lise e à eletroforese, apresentaram um anel de material nuclear com borda nítida, coloração forte, homogênea e pouca granulação. A EAN, localizada na região central do núcleo, apresenta-se fortemente corada, em tonalidade mais escura que o anel de material nuclear (figura 25). Podem ser encontrados também núcleos com o anel de material nuclear e EANs em coloração mais fraca (figura 26). A EAN, no entanto, sempre apresenta tonalidade de cor mais escura que a do anel de material nuclear.

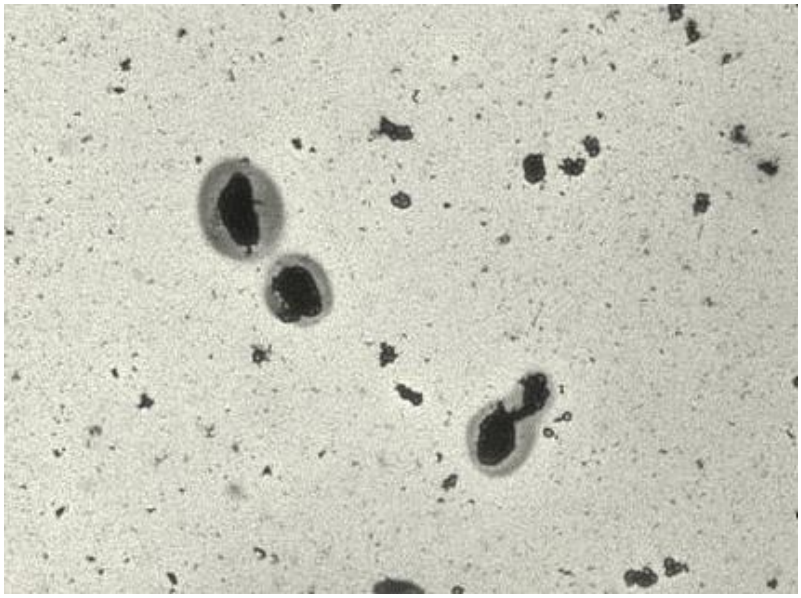

Figura 25. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise e sem eletroforese. Os núcleos apresentam borda nítida, material nuclear com coloração forte e homogênea, baixa granulosidade e com EANs centralizadas e fortemente coradas. Aumento 400x.

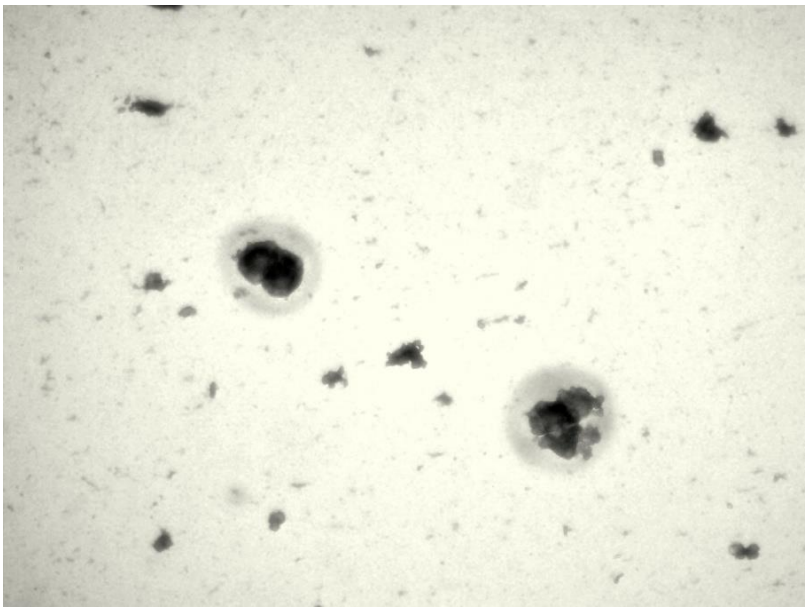

Figura 26. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise e sem eletroforese. Os núcleos apresentam borda nítida, material nuclear com coloração fraca e homogênea, baixa granulosidade e com EANs centralizadas e mais coradas do que o anel de material nuclear. Aumento 400x.

A figura 27 mostra núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle*, com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese, que vão do menor (esquerda) ao maior nível de dano de membrana (direita). Núcleo com menor nível de dano de membrana mostra a borda nítida e pouca difusão do material pelo gel. Núcleo com membrana completamente danificada, no entanto, mostra somente a EAN livre.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 48%, EANs livres 27% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 25%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 52%.

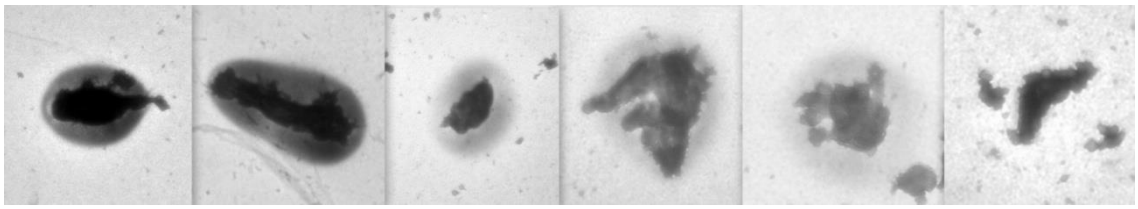

Figura 27. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, sem lise, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.4.2. Lise alcalina iônica

Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle*, com PBS como solução de extração em lâminas submetidas à lise alcalina iônica por 60 minutos, sem relaxamento e sem eletroforese estão nas figuras 28 e 29.

Parte dos núcleos apresenta anel de material nuclear denso, homogêneo, granulação fina com coloração fraca e borda nítida (figura 28), indicando menor efeito da lise. Alguns núcleos apresentaram granulação grossa, coloração intensa e a borda não está nítida (figura 29), indicando maior efeito da lise.

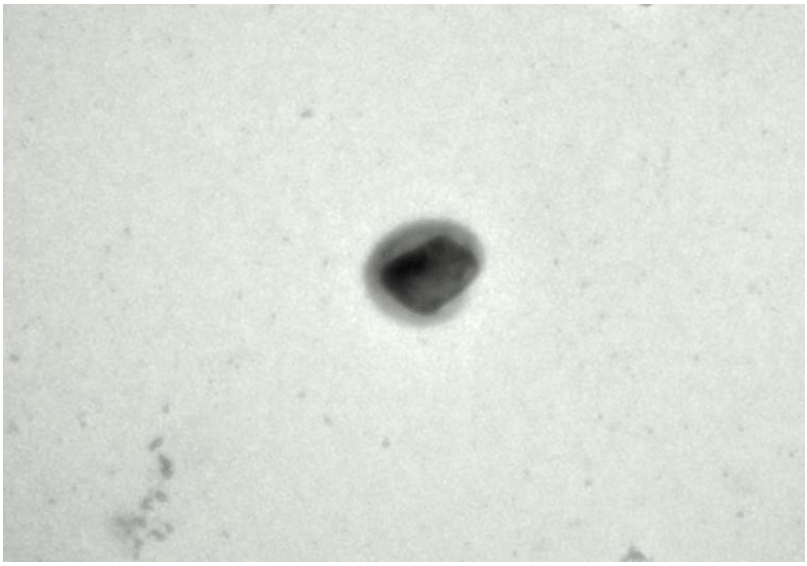

Figura 28. Núcleo com borda nítida e granulação fina extraído de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

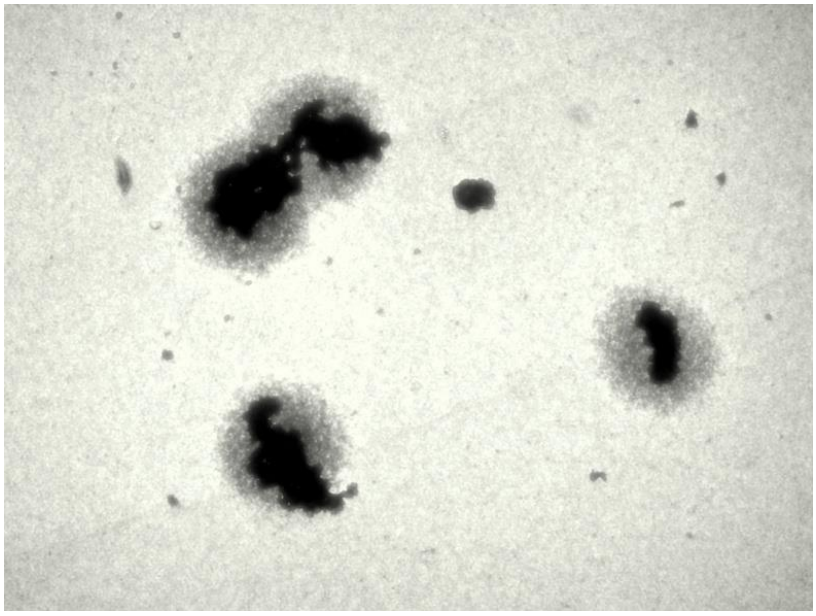

Figura 29. Núcleos sem borda nítida e granulação grossa extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise alcalina iônica, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura 30 mostra núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, expostos à lise alcalina iônica por 60 minutos a 4ºC, sem relaxamento e sem eletroforese, que vão do menor (esquerda) ao maior nível

de dano de membrana (direita). Núcleo com menor nível de dano de membrana mostra a borda nítida e pouca difusão do material pelo gel. Núcleo com membrana completamente danificado, no entanto, mostra somente a EAN livre. A porcentagem de núcleos intactos foi de 41%, EANs livres 22% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 37%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 59%.

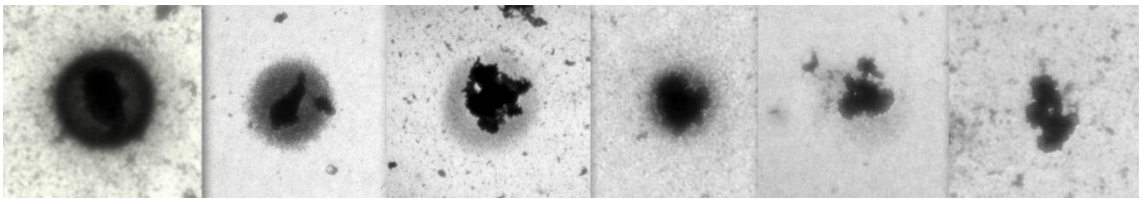

Figura 30. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, sem relaxamento e sem eletroforese, em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.4.3. Lise salina aniônica

Núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração em lâminas sem relaxamento, sem eletroforese e submetidas à lise salina aniônica por 60 minutos a 4ºC, estão na figura 31.

Os núcleos demonstraram efeito excessivo da solução de lise (figura 31) deixando o anel de material nuclear sem borda nítida e com granulação altamente difundida pelo gel.

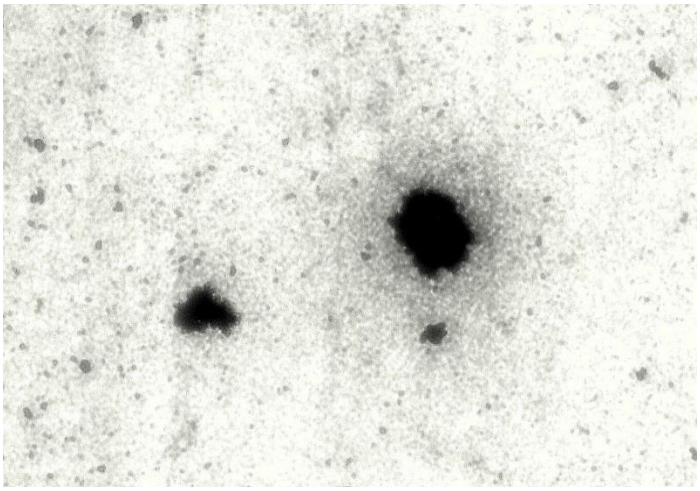

Figura 31. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e submetidos à lise salina aniônica por 60 minutos a 4°C, sem lise e sem eletroforese. Aumento 400x.

A figura abaixo (figura 32) mostra núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, expostos à lise salina aniônica por 60 minutos a 4ºC, sem relaxamento e sem eletroforese, que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita). O menor nível encontrado mostra núcleo sem borda e material nuclear altamente disperso pelo gel, enquanto o mais danificado mostra somente a EAN livre. Com esta solução de lise, não houve nenhuma ocorrência de núcleos com borda e sem difusão de material nuclear pelo gel.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 0%, EANs livres 73% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 27%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 100%.

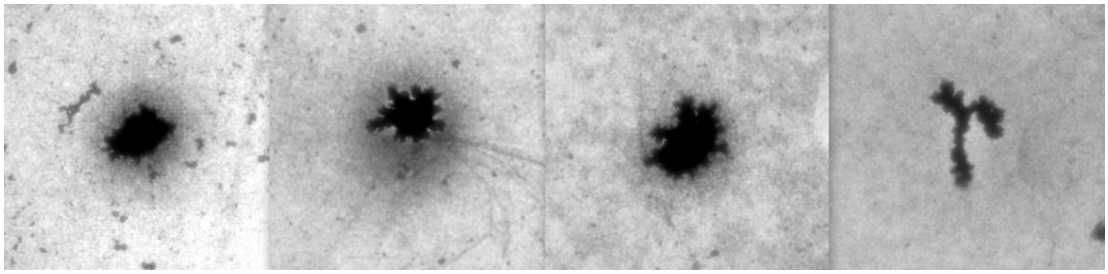

Figura 32. Núcleos sem borda nítida extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e submetidos à lise salina aniônica por 60 minutos, sem relaxamento e sem eletroforese em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.4.4. Comparação entre os tipos de lise

A figura abaixo (figura 33) mostra um esquema comparativo de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração e submetidos aos diferentes tipos de lise (sem lise, com lise alcalina iônica e com lise salina aniônica), sem relaxamento e sem eletroforese.

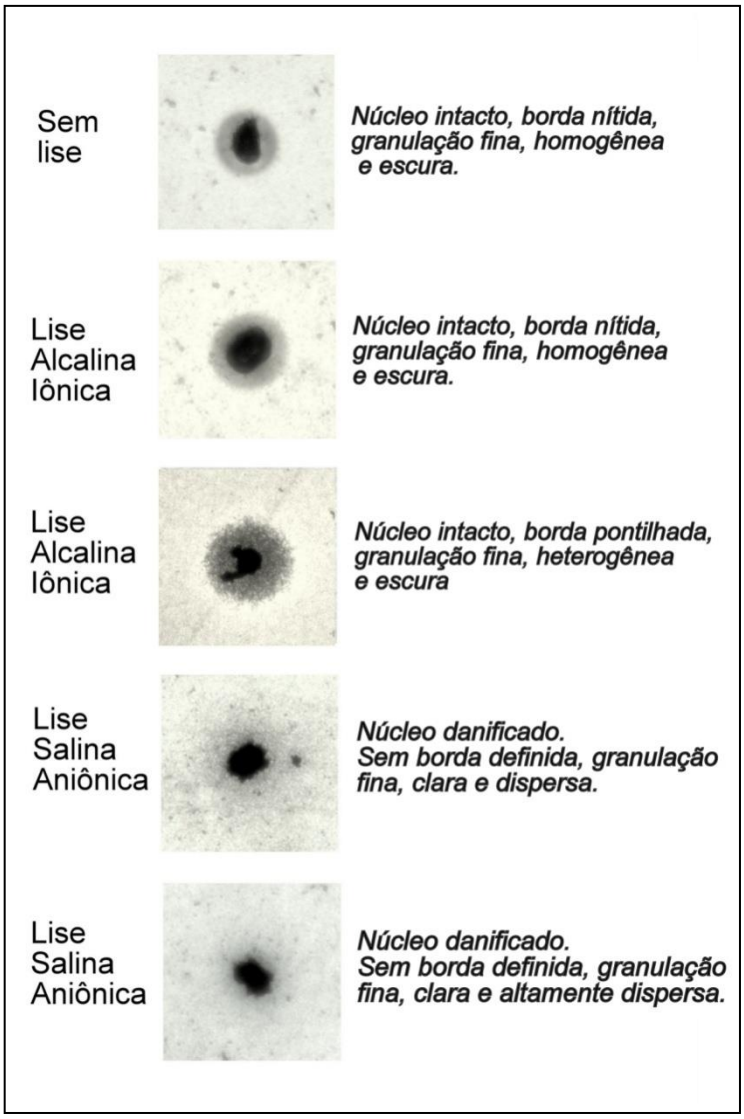

Figura 33. Núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração em diferentes tipos de lise, sem relaxamento e sem eletroforese. Aumento 400x.

Os núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e que não passaram pela etapa da lise, assim como os que foram submetidos à lise alcalina iônica por 60 minutos, apresentaram em sua maioria integridade na conformação nuclear, tendo a maioria dos núcleos borda definida.

Quando comparados os núcleos submetidos a 60 minutos de lise alcalina iônica com os submetidos a 60 minutos de lise salina aniônica, os núcleos que foram submetidos à lise salina aniônica apresentaram-se desintegrados, com ausência de

borda em todos os núcleos encontrados, estando presentes apenas alguns grânulos dispersos ao redor da EAN em alguns núcleos, enquanto a grande maioria apresentou somente a EAN livre. Já nos núcleos que foram expostos à lise alcalina iônica, como visto acima, houve uma pequena ocorrência de núcleos sem borda definida, mas a maioria apresentou borda.

Quando comparados os núcleos que não passaram pela etapa da lise com os que foram expostos por 60 minutos à lise alcalina iônica, nota-se que os que não passaram pela lise apresentaram borda, granulação fina, de tonalidade clara ou escura e homogênea. Os que foram submetidos à lise alcalina iônica apresentaram-se de três formas: (1) de forma semelhante aos que não foram expostos à lise, ou seja, borda, granulação fina, de tonalidade clara ou escura, e homogênea; (2) sem borda nítida, pouca dispersão do material genético pelo gel, grânulos grossos e fortemente corados, em tonalidade homogênea; e (3) em poucos casos, como mostrado na figura 34, borda nítida, ausência de dispersão do material genético pelo gel, grânulos finos em tonalidade heterogênea, estando concentrados e fortemente corados na região periférica do núcleo, no entorno da borda, e mais claros e quase ausentes na região central do núcleo, onde situa-se a EAN. A EAN, neste último caso, apresenta-se corada de forma heterogênea.

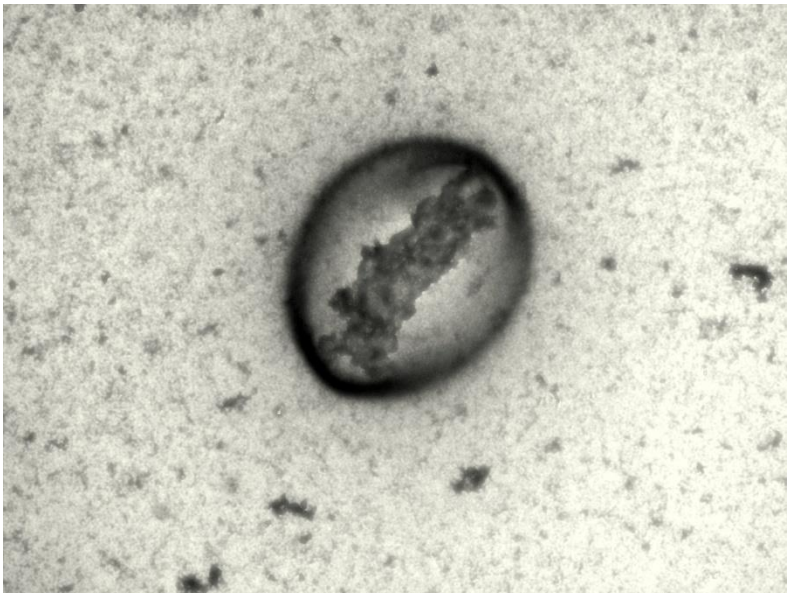

Figura 34. Núcleo extraído de raiz de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração, submetido à lise alcalina aniônica por 60 minutos a 4°C, sem relaxamento e sem eletroforese. O núcleo apresenta borda nítida, grânulos finos, coloração heterogênea e EAN com coloração heterogênea. Aumento 400x.

A figura 35 mostra a porcentagem de núcleos intactos, núcleos danificados intermediários e de EANs livres entre os diferentes tipos de lise, tendo sido todos eles obtidos a partir de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem relaxamento e sem eletroforese.

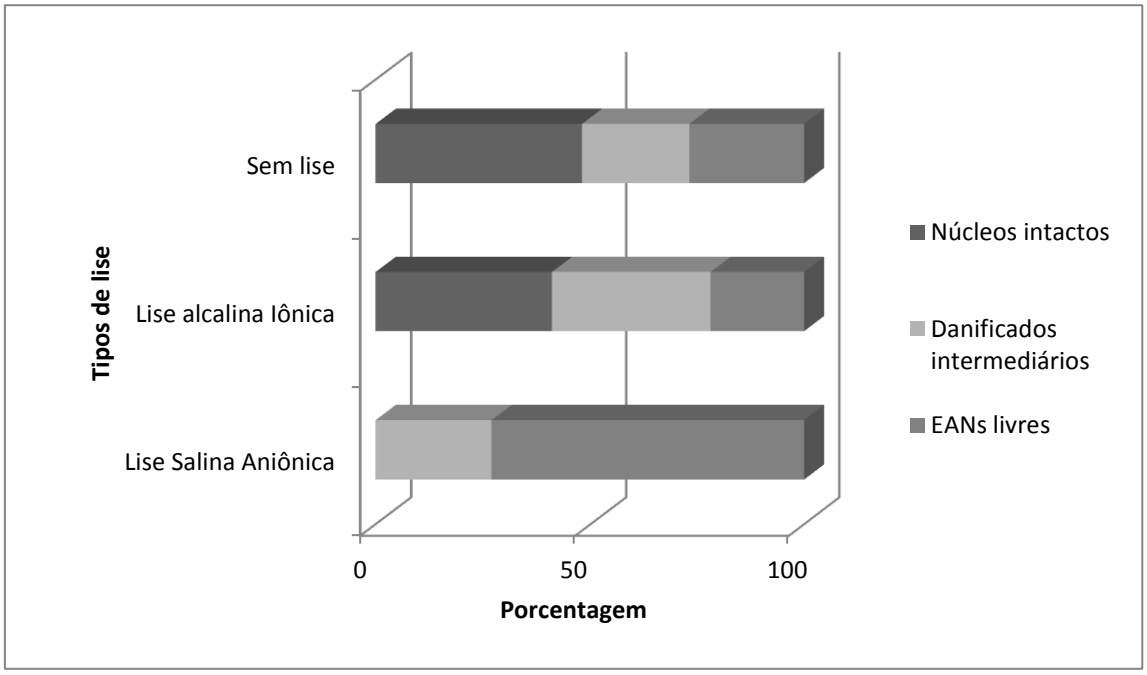

Figura 35. Porcentagem de núcleos intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e expostos às condições: sem lise, com lise alcalina iônica por 60 minutos e com lise salina aniônica por 60 minutos, todos sem relaxamento e sem eletroforese.

Como as condições sem lise e com lise alcalina iônica apresentaram melhores características qualitativas (como presença de borda, pouca difusão de material genético pelo gel), as duas condições foram mantidas. Ainda, em ambas as condições o número de núcleos intactos mostrou-se suficiente para que os dados possam ser analisados, e também demonstrou um número razoável de núcleos danificados e baixo número de EANs.

A exposição à lise salina aniônica não foi mais testada para o estabelecimento de padrões de métodos, nem nos testes de validação de método devido ao efeito excessivo da lise sobre os núcleos, deixando-os desintegrados e

sem material genético disponível para futura análise de cometa, não apresentando, inclusive, núcleos intactos.

V.4.5. Efeitos do tempo de lise

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* sob as mesmas condições experimentais (raízes germinadas no escuro, PBS como solução de extração, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese), diferindo somente o tempo de lise alcalina iônica, estão nas figuras abaixo. A figura 36 mostra cometas com diferentes níveis de dano que foram submetidos a 60 minutos de lise alcalina iônica, e a figura 37 mostra um cometa com alto nível de dano que foi submetido a 120 minutos de lise alcalina iônica.

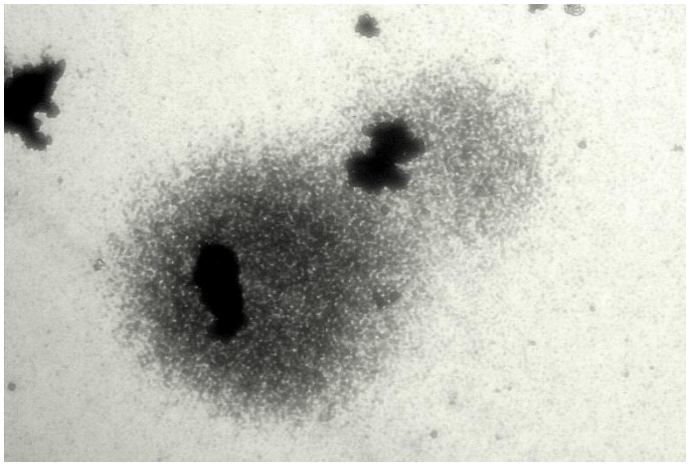

Figura 36. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

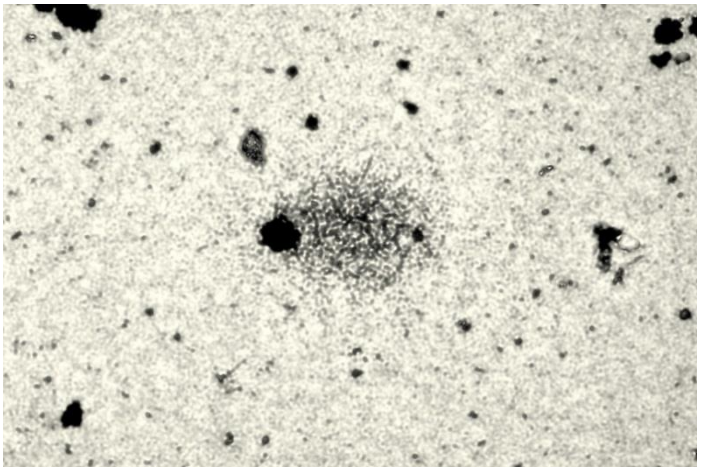

Figura 37. Cometa obtido com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

Os cometas obtidos de núcleos submetidos a 60 minutos de lise apresentaram grânulos grossos, um pouco de difusão do material pelo gel e pouca migração na eletroforese. Já nos cometas de núcleos expostos a 120 minutos de lise alcalina iônica os grânulos se dispersaram bastante pelo gel e estes eram grossos e fortemente corados, tendo sofrido forte migração na eletroforese.

Quanto à contagem dos cometas cujos núcleos foram submetidos a 60 minutos de lise, a porcentagem de cometas intactos foi de 26% e cometas danificados 74%, sendo 25% somente EANs livres e 49% cometas danificados com níveis intermediários (entre intactos e EANs). Já nos cometas cujos núcleos foram submetidos a 120 minutos de lise alcalina iônica, a porcentagem de cometas intactos foi de 7% e cometas danificados 93%, sendo 37% somente EANs livres, e 56% cometas danificados com níveis intermediários (entre intactos e EANs).

As duas figuras abaixo mostram cometas obtidos de núcleos expostos a 60 minutos (figura 38) e 120 minutos (figura 39) de lise alcalina iônica e vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

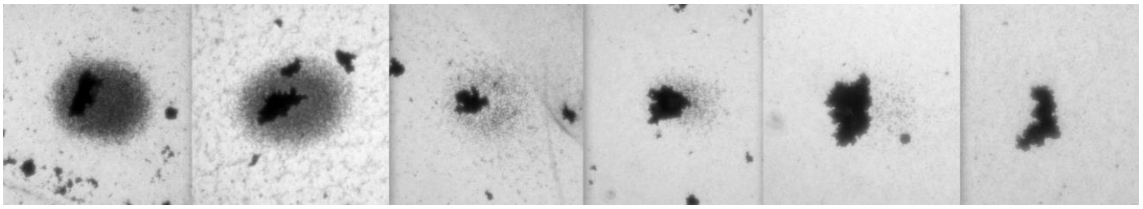

Figura 38. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

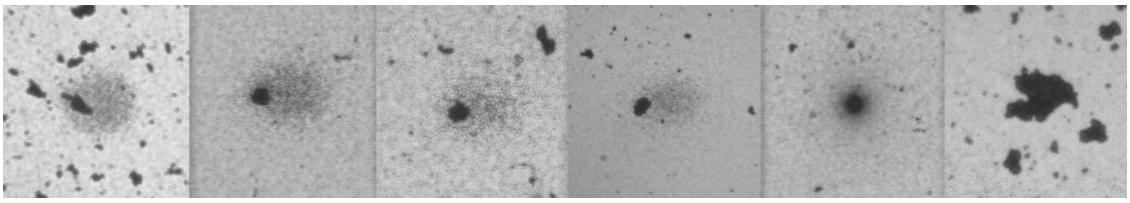

Figura 39. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

Tanto as características dos cometas, quanto a comparação entre a contagem de cometas e EANs entre os dois tempos de exposição, sugerem que uma hora de lise é mais adequada para o ensaio cometa.

A figura 40 mostra a porcentagem de cometas intactos, cometas danificados intermediários e EANs livres em dois tempos de exposição à lise alcalina iônica: 60 minutos e 120 minutos. O relaxamento, em ambos, foi de 10 minutos e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC.

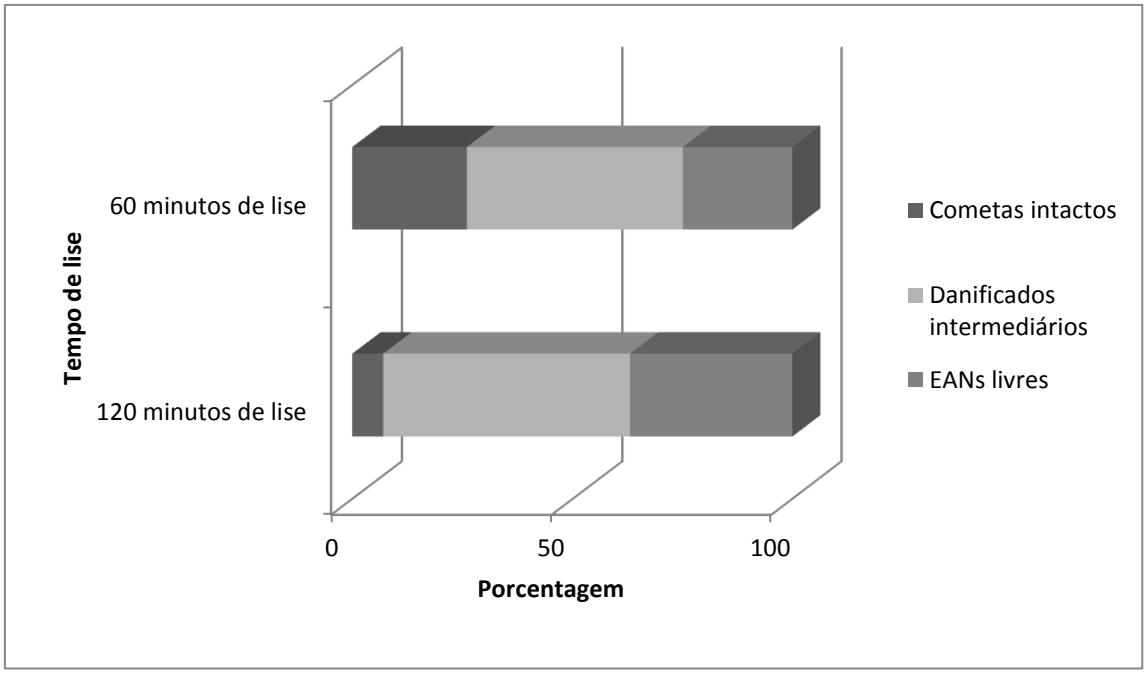

Figura 40. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e expostos às condições: 60 minutos e 120 minutos de lise alcalina iônica e a 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese.

Tanto os cometas obtidos de núcleos submetidos a 60 minutos de lise quanto os cometas obtidos de núcleos submetidos a 120 minutos de lise apresentaram grânulos grossos, difusão e migração de material pelo gel. No entanto, a difusão e a migração dos cometas obtidos de núcleos submetidos a 120 minutos de lise foram maiores.

Os cometas de núcleos obtidos de núcleos submetidos a 120 minutos de lise apresentaram poucos cometas intactos, sendo quase a totalidade de cometas com níveis de danos intermediários ou EAN livres. Já os cometas obtidos de núcleos submetidos a 60 minutos de lise apresentaram maior número de cometas intactos e também menor número de EANs quando comparados ao outro tempo de exposição. Por esta razão somente a submissão a 60 minutos de lise será testada nos experimentos para o estabelecimento de método.

V.5. Interação de relaxamento e eletroforese

Foram testadas 3 combinações de tempo de relaxamento e eletroforese, todas dentro das mesmas condições experimentais (núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, tampão de eletroforese com pH>13, voltagem de 0,8V/cm e amperagem 230mA), para que ficasse evidente somente o efeito do relaxamento e da eletroforese.

V.5.1. Combinação de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, submetidos a 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese (0,8V/cm; 230mA) em tampão pH>13 estão na figura 41.

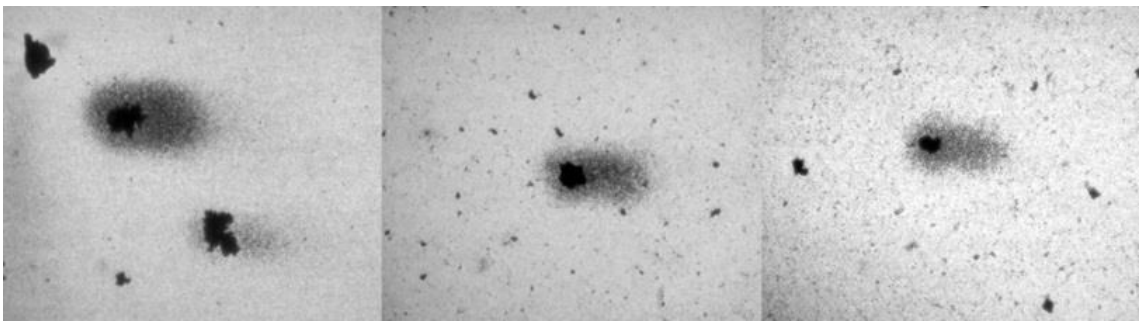

Figura 41. Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC. Aumento 400x.

Nesta condição experimental houve grande migração dos grânulos através do gel, formando uma cauda mais comprida em comparação ao comprimento da cabeça. A cauda é fortemente corada e granulosa.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 4% e núcleos danificados 96%, sendo 39% EANs e 57% núcleos danificados com níveis intermediários (entre intactos e EANs).

A porcentagem de núcleos intactos foi de 4%, EANs livres 39% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 57%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 88%.

A figura abaixo (figura 42) mostra cometas que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita) nesta condição experimental. Mesmo os cometas com menor nível de dano apresentam difusão e migração do material nuclear.

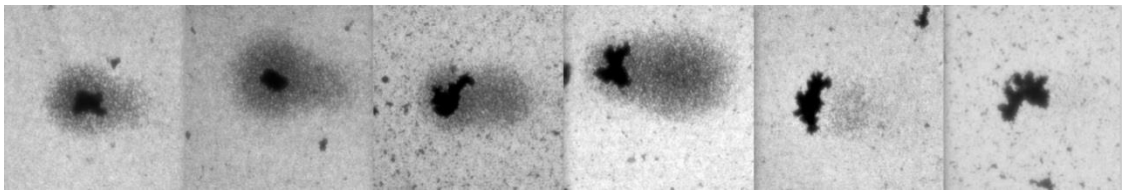

Figura 42. Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA, 4ºC, em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.5.2. Combinação de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, submetidos a 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA na temperatura de 4ºC estão na figura 43.

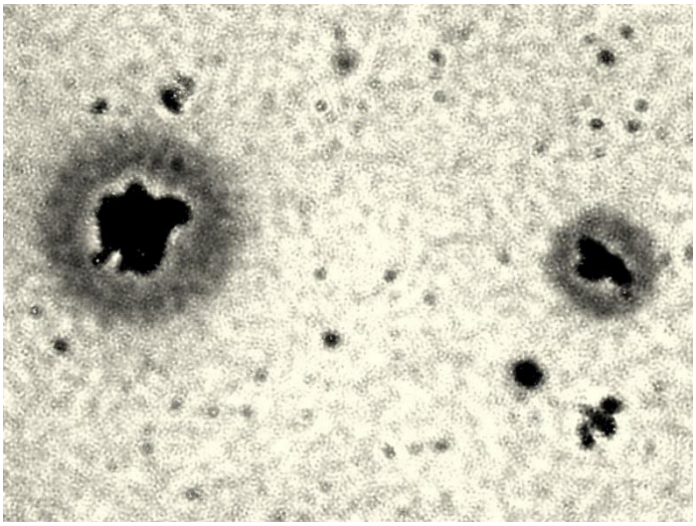

Figura 43. Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA. Aumento 400x.

Nesta condição experimental de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese os cometas, em sua maioria, demonstraram ausência de borda nítida. A granulação é fina, escura e homogênea. Não houve migração dos grânulos para fora dos núcleos.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 39% e núcleos danificados 61%, sendo 23% EANs livres, e 38% núcleos danificados com níveis intermediários (entre intactos e EANs).

A porcentagem de núcleos intactos foi de 39%, EANs livres 23% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 38%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 61%.

A figura abaixo (figura 44) mostra cometas obtidos nesta condição experimental que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

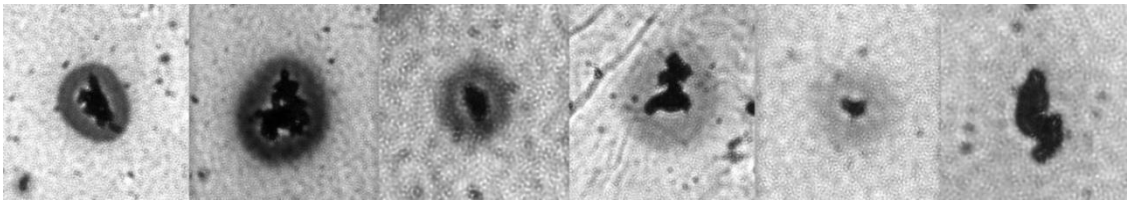

Figura 44. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.5.3. Combinação de 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, submetidos a 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC estão na figura 45.

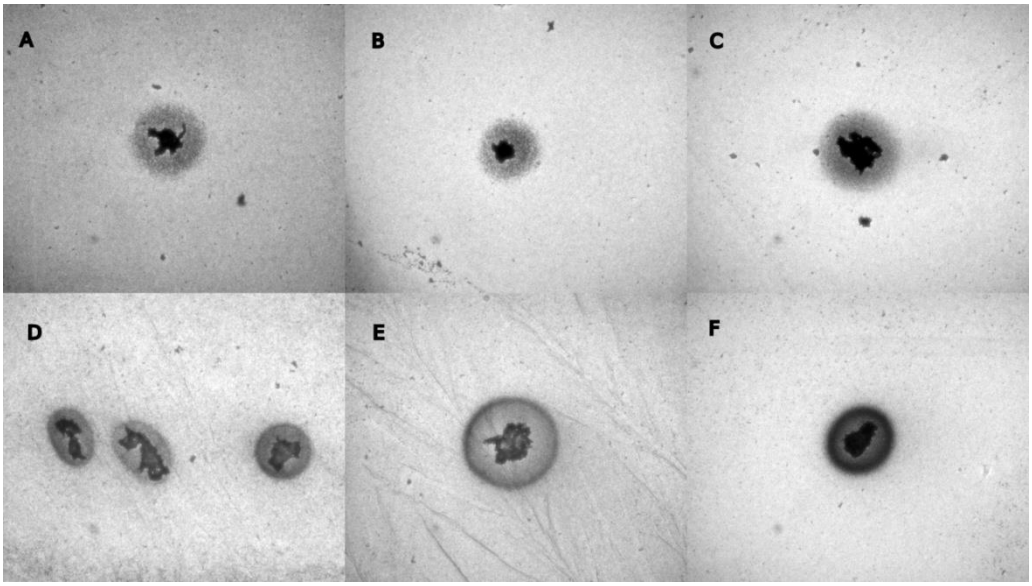

Figura 45. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com tampão PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. A, B e C são cometas sem borda e sem difusão e migração do material nuclear. D, E e F são cometas com borda. Aumento 400x.

Na condição sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese, os cometas obtidos na sua maioria foram cometas de baixo nível de dano e não apresentaram migração ou difusão dos grânulos para fora de núcleos. Em alguns cometas a borda não estava evidente (figura 45 - A, B e C), e os grânulos apresentaram-se mais grossos, com coloração e distribuição mais homogênea. Entretanto, a maioria dos cometas demonstrou borda evidente (figura 45 - D, E e F), com granulação fina, mais escuro na borda e mais claro ao redor da EAN, na região central.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 38%, EANs livres 29% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 33%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 62%.

A figura abaixo (figura 46) mostra cometas obtidos nesta condição experimental, que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

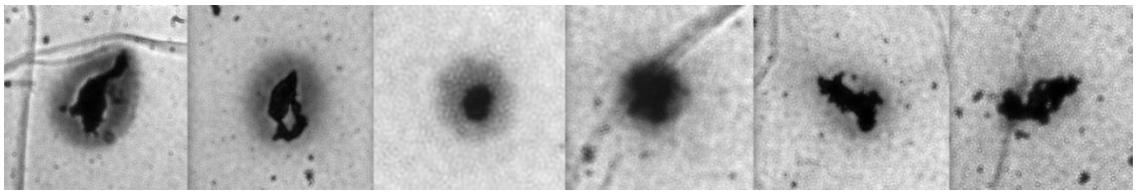

Figura 46. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com tampão PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

A figura 47 mostra a porcentagem de cometas intactos, cometas danificados e EANs livres obtidos em diferentes tempos de exposição ao relaxamento e à eletroforese.

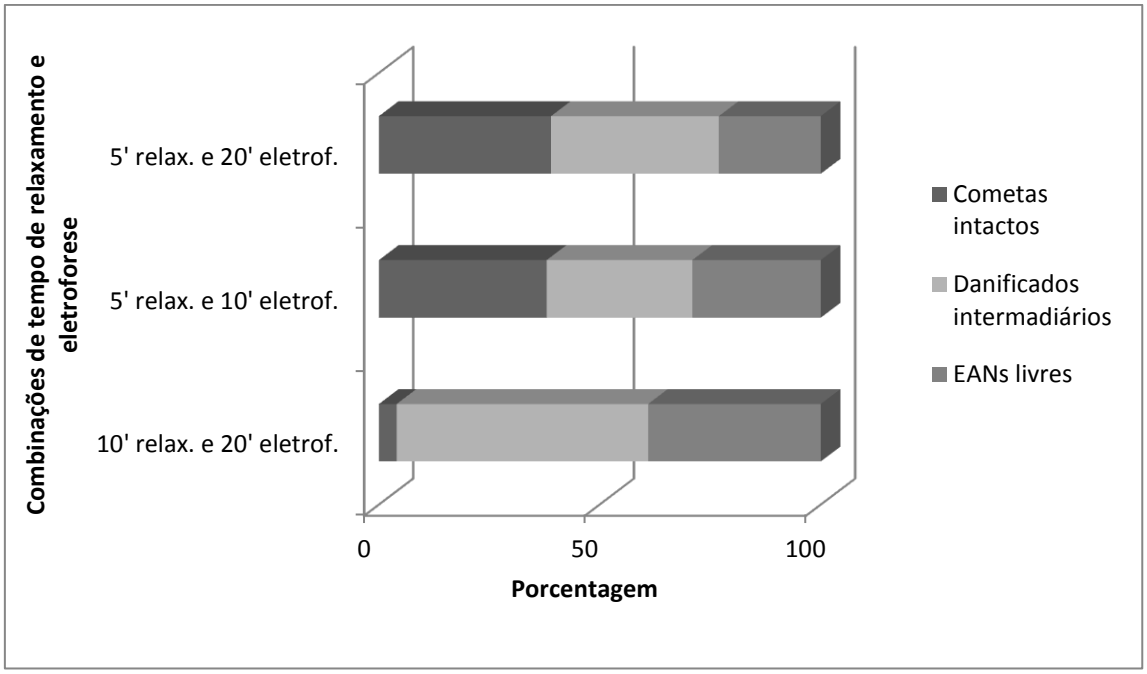

Figura 47. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de Rhizophora mangle com PBS como solução de extração, sem lise, e submetidos a três diferentes combinações de tempo de relaxamento e de eletroforese em tampão de eletroforese pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC: 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese; 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese; 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese.

Como visto na figura 47, a condição de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese houve baixa incidência de cometas intactos e alta incidência de cometas com níveis intermediários de danos e EANs livres.

Nas condições de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese e 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese, houve maior incidência de cometas intactos, e menor incidência de EANs livres quando comparados à outra condição (10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese).

Essas características quantitativas, somadas às características qualitativas descritas no ítem V.5 levaram à escolha das condições 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese e 5 minutos de relaxamento e 10 minutos de eletroforese para serem testadas nos testes de estabelecimento de método.

V.6. Interação de lise e relaxamento

Foram testadas combinações de duas condições lise (sem e com exposição a 60 minutos de lise alcalina iônica) e dois tempos de relaxamento (5 e 10 minutos) para analisar possíveis efeitos destas combinações na mesma condição de eletroforese.

V.6.1. Combinação de sem exposição à lise e 5 minutos de relaxamento

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA estão nas figuras 48 e 49.

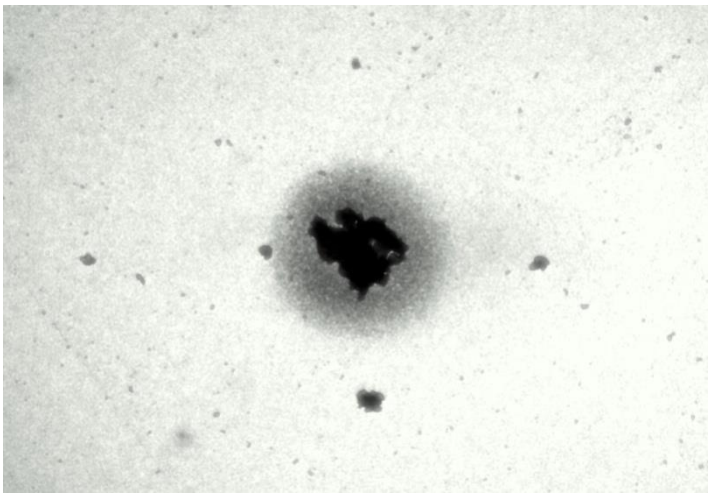

Figura 48. Cometa sem cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

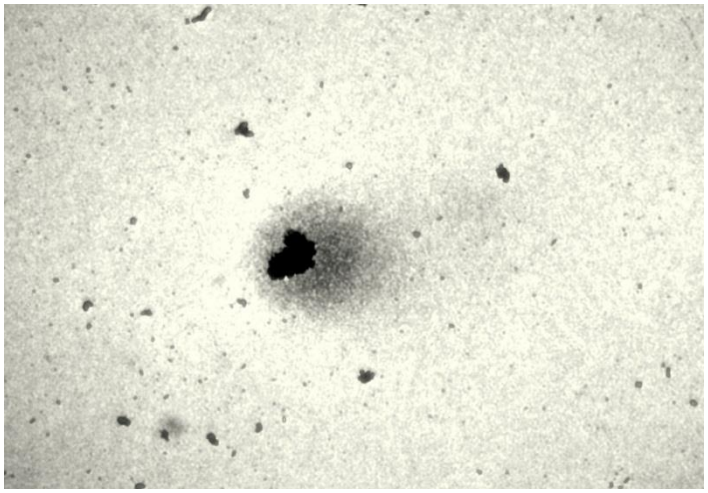

Figura 49. Cometa com pequena cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

Cometas obtidos nestas condições de modo geral não possuem borda nítida, seus grânulos são médios, heterogêneos, fortemente corados e apresentam pouca difusão. Foram obtidos cometas que aparentemente não apresentaram migração de grânulos para fora do núcleo (figura 48), e outros que apresentaram leve migração do material através do gel formando uma pequena cauda (figura 49).

A porcentagem de núcleos intactos foi de 45%, EANs livres 26% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 29%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 55%.

A figura abaixo (figura 50) mostra cometas obtidos nesta condição, que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

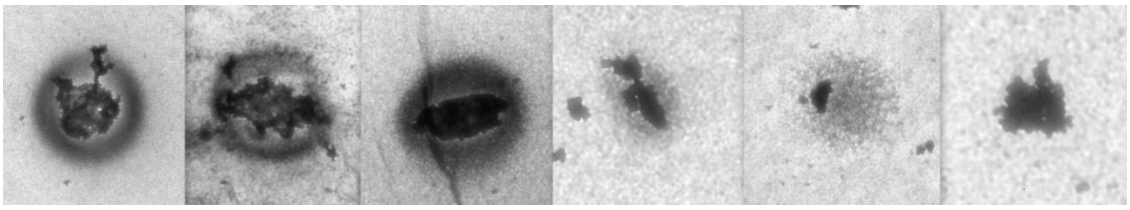

Figura 50. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.6.2. Combinação de sem lise e 10 minutos de relaxamento

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, submetidos a 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA estão nas figuras 51 e 52.

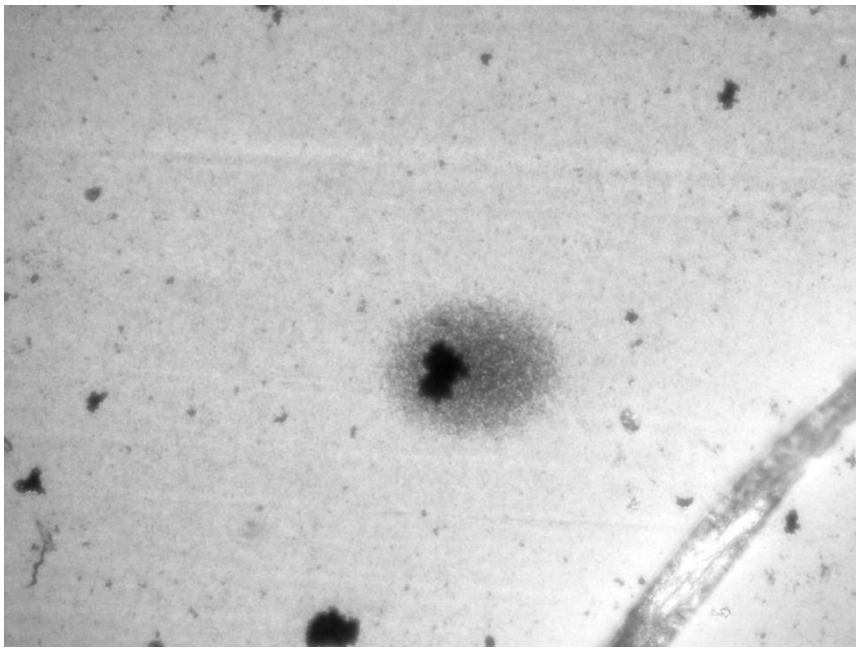

Figura 51. Cometa com pequena cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

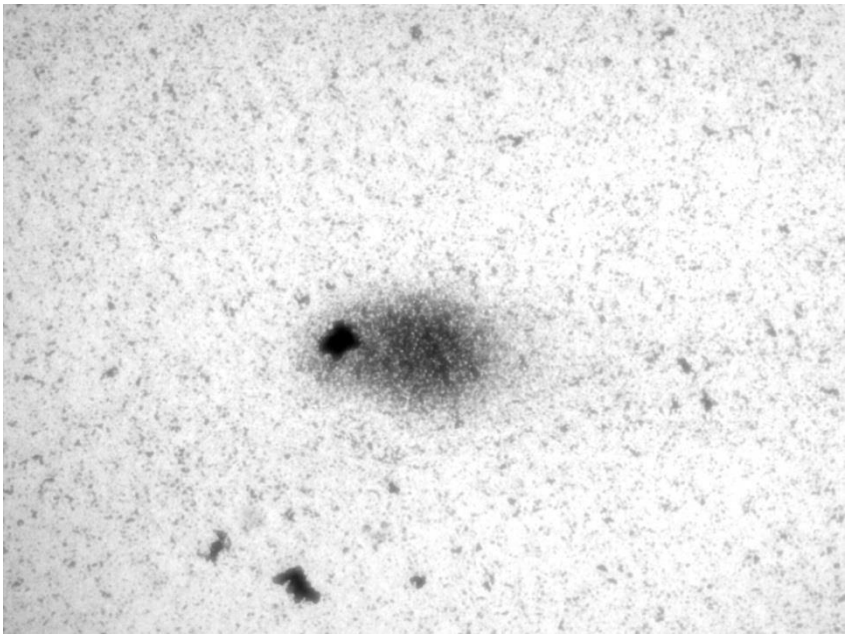

Figura 52. Cometa com longa cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

Nesta combinação de sem lise e 10 minutos de relaxamento, apesar de não terem sido encontrados cometas com longo comprimento caudal, como visto na figura 52, a quantidade de cometas obtidos é menor do que a quantidade obtida na combinação de com lise e com mesmo tempo de relaxamento. O número de cometas intactos dentro desta condição sem lise também é maior.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 20%, EANs livres 32% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 48%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 80%.

A figura abaixo (figura 53) mostra cometas obtidos nesta condição que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

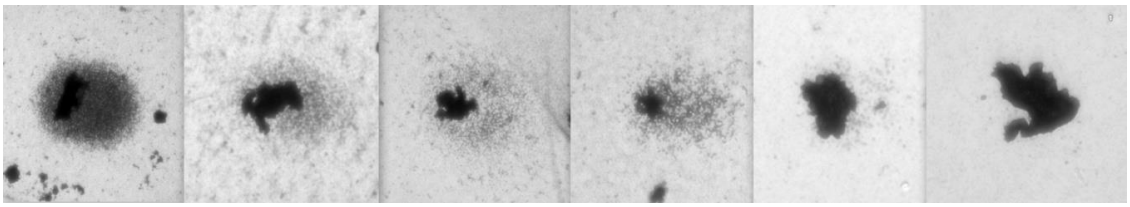

Figura 53. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, sem lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão

pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.6.3. Combinação de 60 minutos de lise e 5 minutos de relaxamento

Cometa obtido de núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, submetido a 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm e 230mA está na figura 54.

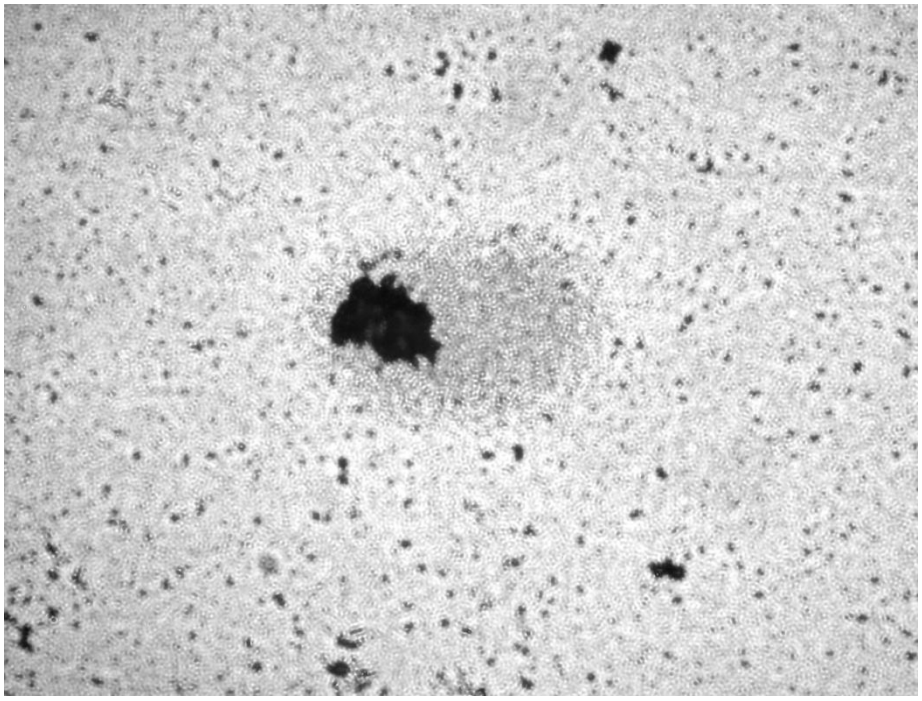

Figura 54. Cometa com longa cauda obtido com núcleo de raiz de *Rhizophora mangle* extraído com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

Estes cometas possuem grânulos médios, de tonalidade média e homogênea, com difusão intensa dos grânulos. Ocorreram muitos cometas intactos e também muitos cometas com dano. No entanto, apesar de ter havido migração dos grânulos,

os cometas formados nesta condição experimental não apresentaram longos comprimentos caudais.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 34%, EANs livres 35% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 31%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 66%.

A figura abaixo (figura 55) mostra cometas que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

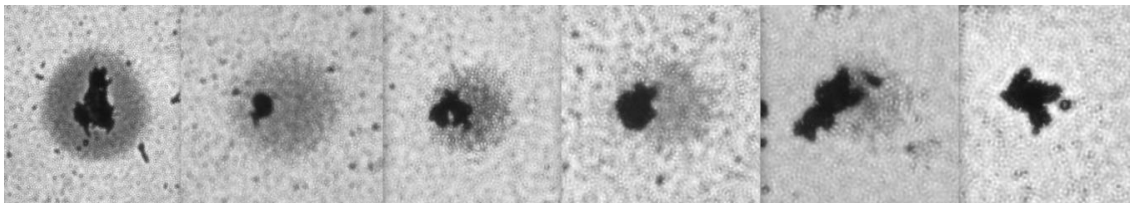

Figura 55. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

V.6.4. Combinação de 60 minutos de lise e 10 minutos de relaxamento

Cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise alcalina iônica, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tempão pH>13, 0,8V/cm e 230mA estão na figura 56.

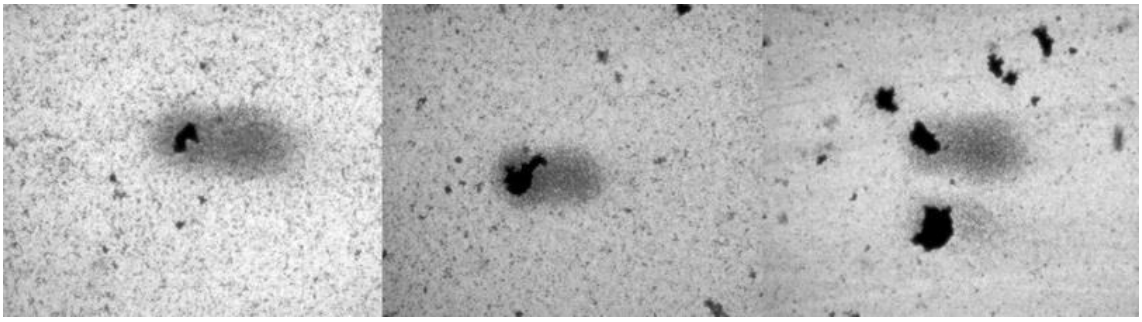

Figura 56. Cometas com longos comprimentos caudais obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm 230mA. Aumento 400x.

Na combinação com lise alcalina iônica por 60 minutos e 10 minutos de relaxamento, os cometas apresentaram diferentes comprimentos de cauda e diferentes níveis de danos. Houveram poucos cometas intactos e muitos cometas danificados, que apresentaram difusão de material genético e, principalmente, forte migração do material, formando cometas com longo comprimento caudal como visto na figura 56.

A porcentagem de núcleos intactos foi de 4%, EANs livres 33% e núcleos danificados de níveis intermediários (entre intactos e EANs) 63%. Núcleos danificados de todos os níveis totalizaram 96%.

A figura abaixo (figura 57) mostra cometas que vão do menor nível de dano (esquerda) ao maior nível de dano (direita).

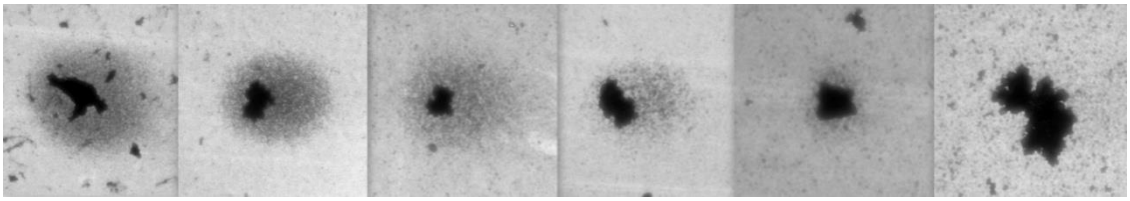

Figura 57. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC em seus diferentes níveis de dano, indo do menos danificado (esquerda) ao mais danificado (direita). Aumento 400x.

A figura abaixo (figura 58) mostra a porcentagem de cometas intactos, danificados intermediários e de EANs livre entre os diferentes tempos de exposição ao relaxamento, com lise e sem lise.

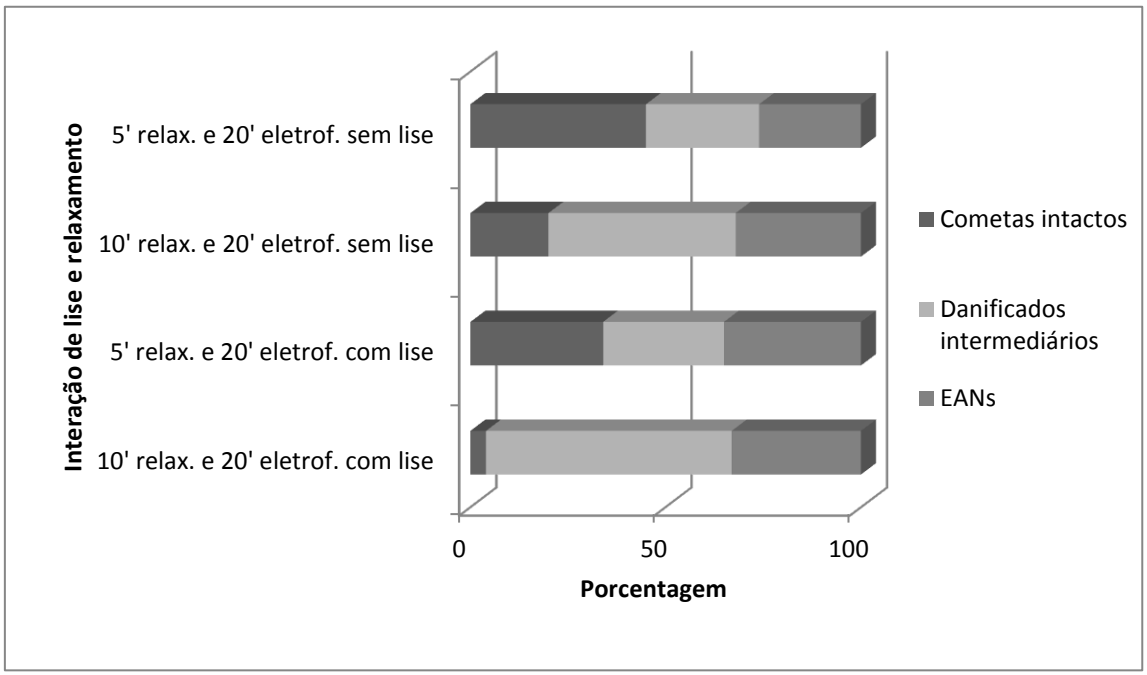

Figura 58. Porcentagem de cometas intactos, com danos intermediários e de EANs livres encontrados na contagem de 100 estruturas nas lâminas preparadas com núcleos extraídos de raízes de *Rhizophora mangle* com PBS como solução de extração e submetidos às combinações de diferentes condições de lise e de tempo de relaxamento. Eletroforese 20 minutos em tampão de eletroforese pH>13, 0,8V/cm e 230mA a 4ºC.

Em todas as condições experimentais as lâminas não submetidas à lise apresentaram maior número de cometas intactos e menor número de cometas danificados e EANs quando comparados às lâminas submetidas às mesmas condições experimentais, porém, expostas à lise alcalina iônica por 60 minutos.

As lâminas submetidas à etapa da lise, em ambos os tempos, apresentaram cometas com maior comprimento caudal, ou seja, maior migração dos grânulos, quando comparados às que não passaram pela etapa da lise.

A condição experimental de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese apresentou cometas com longo comprimento caudal mesmo nas

lâminas não expostas à lise. Nas lâminas com exposição à lise, os cometas apresentaram comprimentos caudais ainda maiores.

Já na condição experimental de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese, tanto as lâminas não submetidas à lise quanto as submetidas a 60 minutos de lise alcalina iônica, apresentaram cometas com caudas menores do que na outra condição (10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese). Nesta condição de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese, as que não passaram pela etapa da lise apresentaram cometas com comprimentos caudais ainda menores do que as expostas à lise nesta mesma condição de tempo.

Devido ao alto nível de dano na condição de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese, mesmo quando não houve a etapa de lise, esta condição não foi utilizada nos testes de estabelecimento de método.

V.7. Validação de Método

Conforme descrito no ítem IV.2.9.1, o Índice de dano foi calculado em quatro classes, de 0 a 3, em função do grau de danos ao DNA, no qual a classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição à genotoxina, ou H_2O_2, e a classe 3 corresponde aos cometas com danos máximos, representados pelos cometas com maiores comprimentos caudais, com base na figura 1, sem contagem de EAN.

Conforme descrito no ítem IV.2.9.2, quando houve contagem de EAN, o Índice de dano foi calculado em cinco classes, de 0 a 4, em função do grau de danos ao DNA, no qual a classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição à genotoxina, ou H_2O_2, e a classe 4 corresponde às EANs, com base na figura 2.

V.7.1. Interação da exposição à H_2O_2, solução de extração e lise sobre o índice de dano.

V.7.1.1. Interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise

A figura 59 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, sem exposição à lise alcalina iônica.

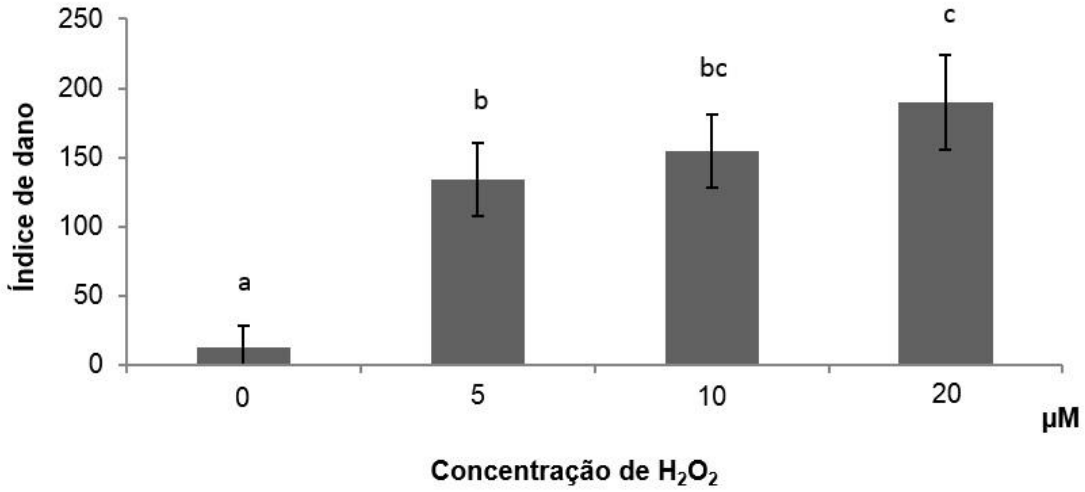

Figura 59. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Índices de dano de cometas obtidos com núcleos que não passaram pela exposição à lise (figura 59) aumentam gradativamente em função da concentração

de H_2O_2, porém não há diferença significativa entre os índices de dano nas concentrações de 5µM e 10µM e nas concentrações de 10µM e 20µM.

V.7.1.2. Interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Com lise

A figura 60 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

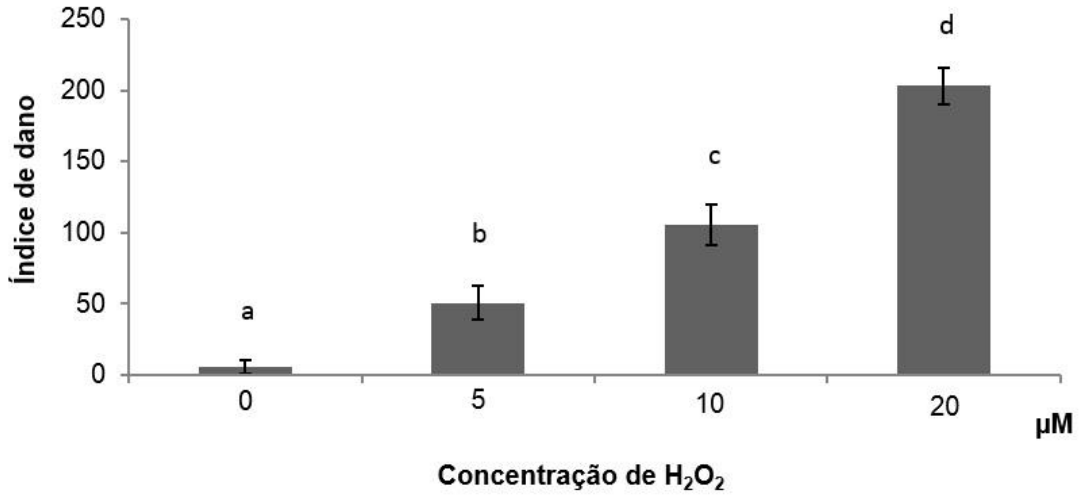

Figura 60. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Índices de dano de cometas obtidos com núcleos que foram submetidos à lise alcalina iônica por 60 minutos aumentam significativamente em função da concentração de H_2O_2 (figura 60).

V.7.1.3. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise/Com lise

A figura 61 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, entre a exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos e sem exposição à lise.

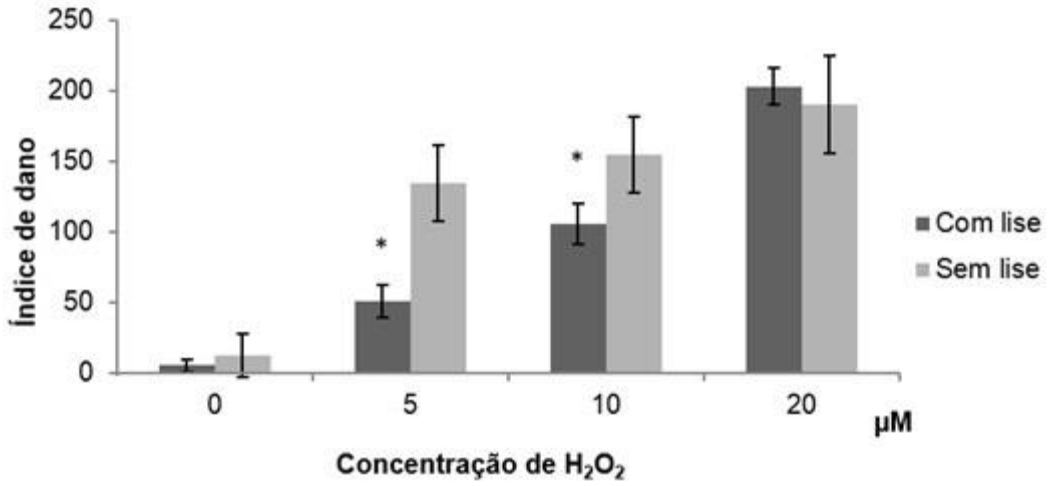

Figura 61. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro) exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com lise e sem lise na mesma concentração de H_2O_2).

Em geral, os índices de dano de cometas obtidos com núcleos que passaram pela lise foram menores do que os índices de dano de cometas obtidos com núcleos que não passaram pela lise, nas diferentes concentrações de H_2O_2,com exceção da concentração de 20 µM. No entanto, essa diferença só foi significativa nos grupos expostos às concentrações de 5µM e 10µM de H_2O_2. Nas outras concentrações as diferenças de índices de dano entre com lise e sem lise não foram significativas.

V.7.1.4. Interação H_2O_2 - PBS - Sem lise

A figura 62 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS, sem exposição à lise.

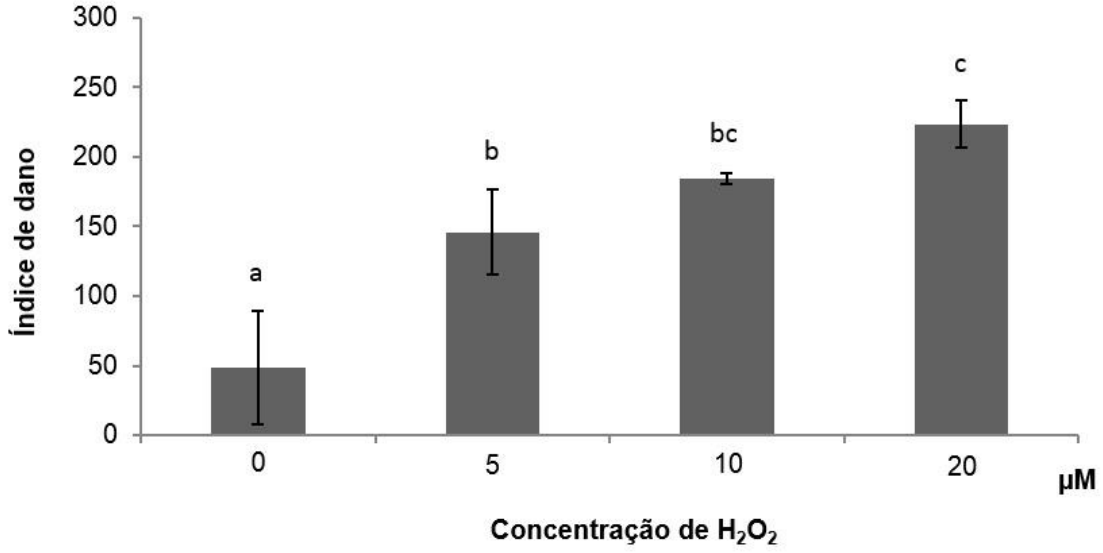

Figura 62. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Assim como com a extração com solução salina 12‰, cometas obtidos de núcleos que não passaram pela etapa da lise (figura 62) também apresentam crescimento gradativo do índice de dano conforme o aumento de concentração de H_2O_2, porém não há diferença significativa entre o índice de dano nas concentrações de 5µM e 10µM, e nas concentrações de 10µM e 20µM.

V.7.1.5. Interação H_2O_2 - PBS - Com lise

A figura 63 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS, com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

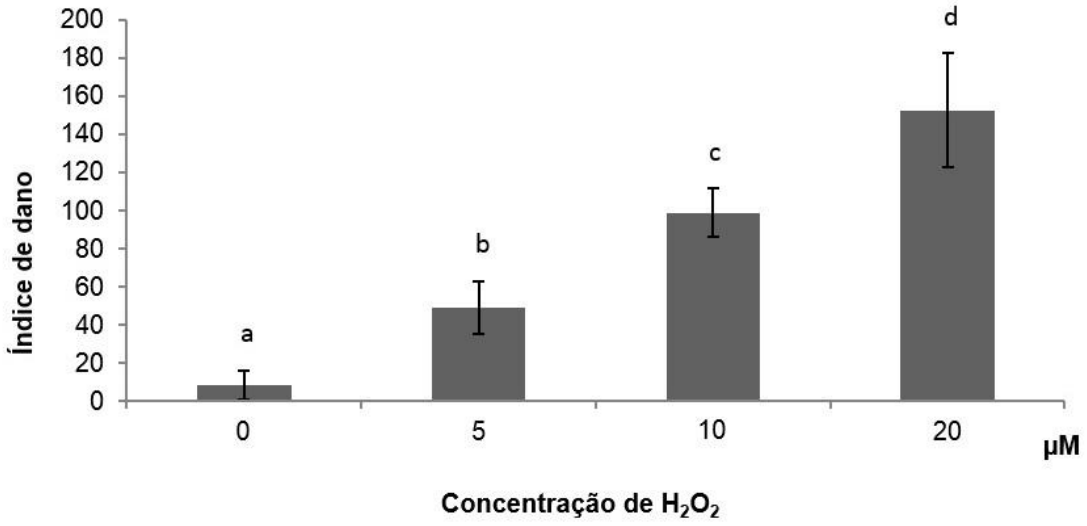

Figura 63. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Cometas obtidos de núcleos expostos à solução de lise alcalina iônica por 60 minutos apresentam aumento gradativo e significativo do nível de dano em função do aumento da concentração da H_2O_2 (figura 63).

V.7.1.6. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS - Sem lise/Com lise

A figura 64 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS, entre a exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos e sem exposição à lise.

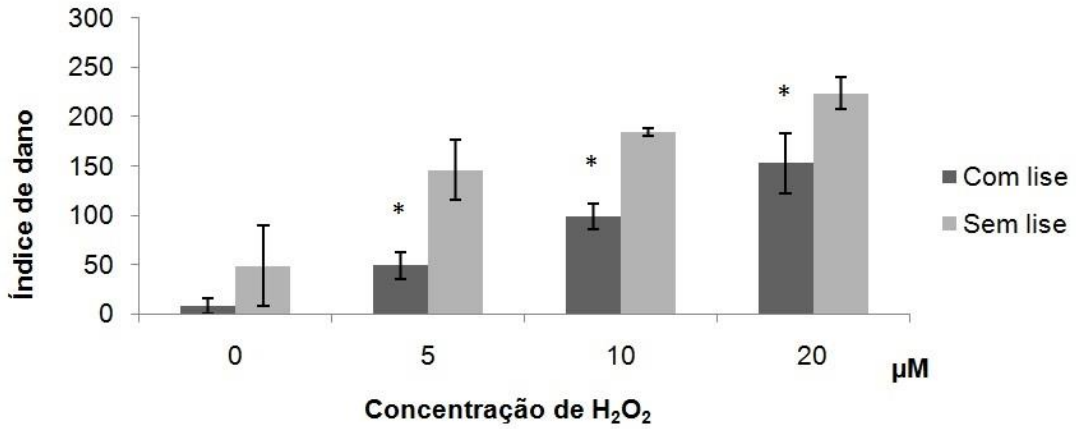

Figura 64. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro)exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com lise e sem lise na mesma concentração de H_2O_2).

Comparando os índices de dano de cometas obtidos com lise e sem lise, os cometas com lise apresentaram índices de danos menores do que os índices de dano de cometas sem lise. Na concentração de 0µM de H_2O_2, ou no grupo controle, a diferença entre o índice de dano de cometas com lise e de cometas sem lise não foi significativa. Já em todas as outras concentrações as diferenças foram significativas entre os grupos com lise e sem lise.

V.7.1.7. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Sem lise

A figura 65 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ como soluções de extração e sem submissão à lise.

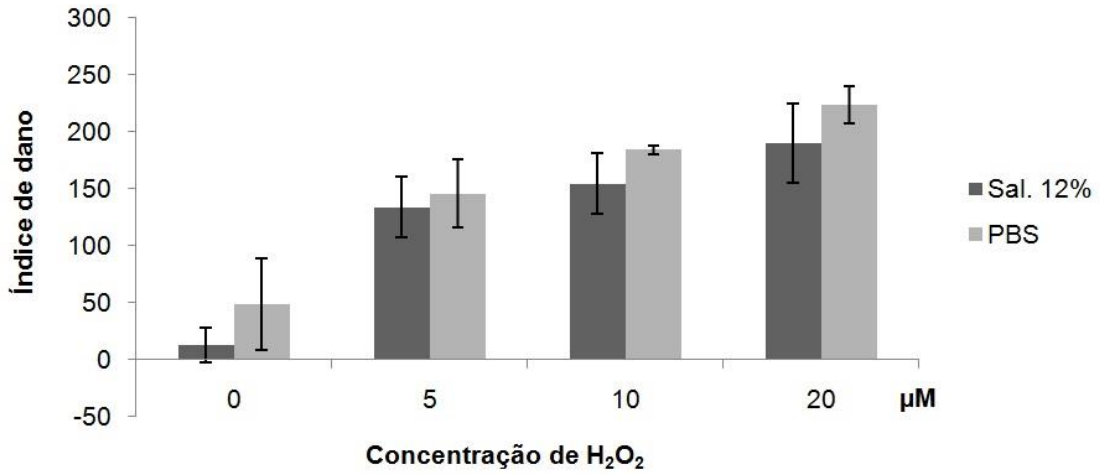

Figura 65. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle*, extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA.

Não houve diferença significativa entre o índice de dano de cometas obtidos de núcleos extraídos com salina 12‰ ou com PBS como solução de extração em

todas as concentrações de H_2O_2 testadas, apesar de os índices de danos de cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS apresentarem valores sempre maiores.

V.7.1.8. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Com lise

A figura 66 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ como soluções de extração, com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

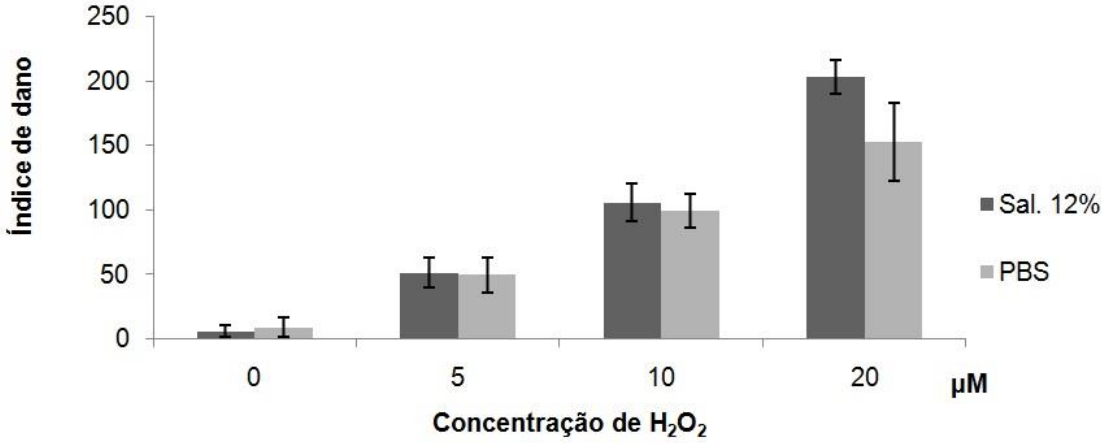

Figura 66. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle*, extraídos com PBS (barra cinza claro) ou com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração e com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

A média dos índices de dano dos cometas obtidos a partir de núcleos extraídos com solução salina 12‰ e as médias dos cometas obtidos a partir de núcleos extraídos com PBS não apresentam diferenças significativas.

V.7.2. Contagem com EANs inclusas

V.7.2.1. Interação H_2O_2 - Solução salina 12‰ - Sem lise

A figura 67 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, sem exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos e com contagem de EANs.

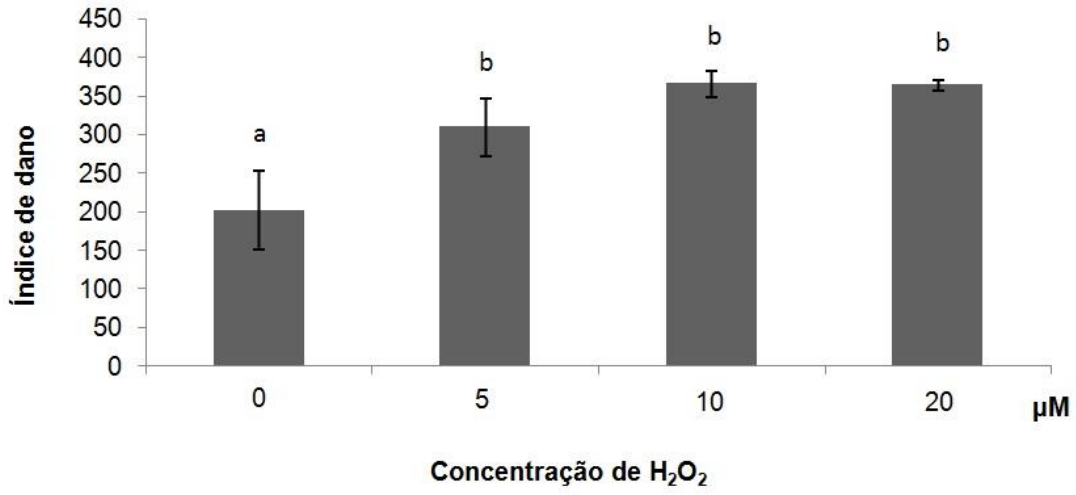

Figura 67. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Com a inclusão de EAN, os índices de dano de cometas obtidos de núcleos sem submissão à lise não são significativamente diferentes nas concentrações de 5, 10 e 20µM. Na concentração de 0µM, o índice de dano é significativamente menor do que os das outras concentrações.

V.7.2.2. Interação H_2O_2 - Solução salina 12‰ - Com lise

A figura 68 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos e com contagem de EANs.

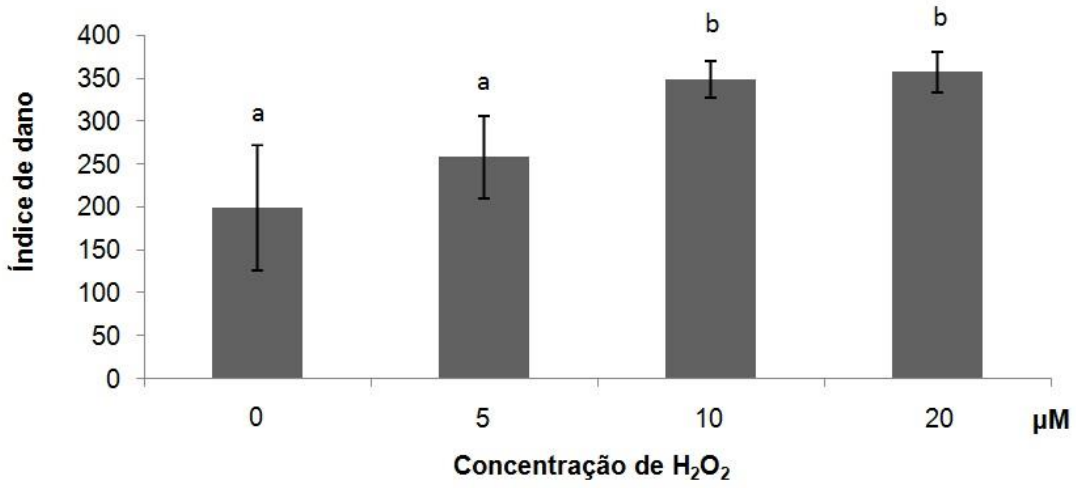

Figura 68. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Índices de dano de cometas obtidos de núcleos extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica não são significativamente diferentes nas concentrações de 0 e 5µM, assim como nas concentrações de 10 e 20µM. Nas concentrações de 0µM e 5µM os índices de dano são significativamente menores do que os das outras concentrações

V.7.2.3. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - Salina 12‰ - Sem lise/Com lise

A figura 69 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰, com ou sem exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

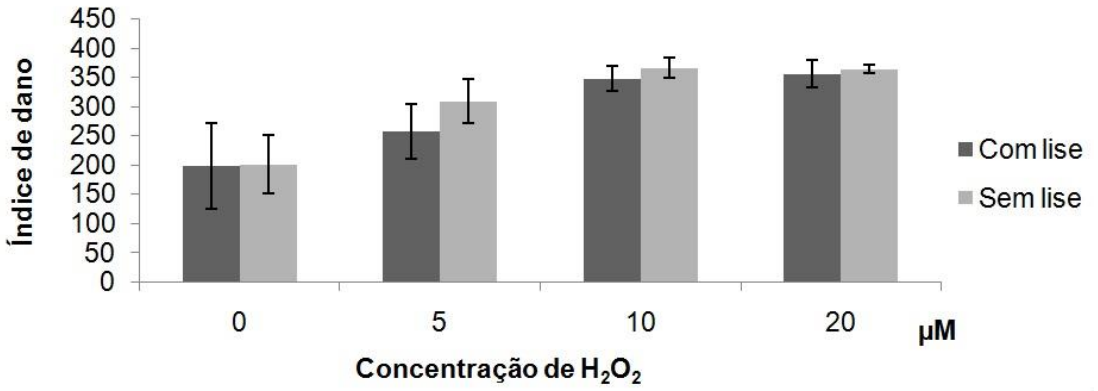

Figura 69. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle*, extraídos com solução salina 12%o como solução de extração,sem(barra cinza claro) e com (barra cinza escuro)exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

Não houveram diferenças significativas entre as médias dos índices de dano dos cometas obtidos de núcleos extraídos com solução salina 12‰ sem e com submissão à lise.

V.7.2.4. Interação H_2O_2 - PBS - Sem lise

A figura 70 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano, com contagem

de EANs de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS e sem exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

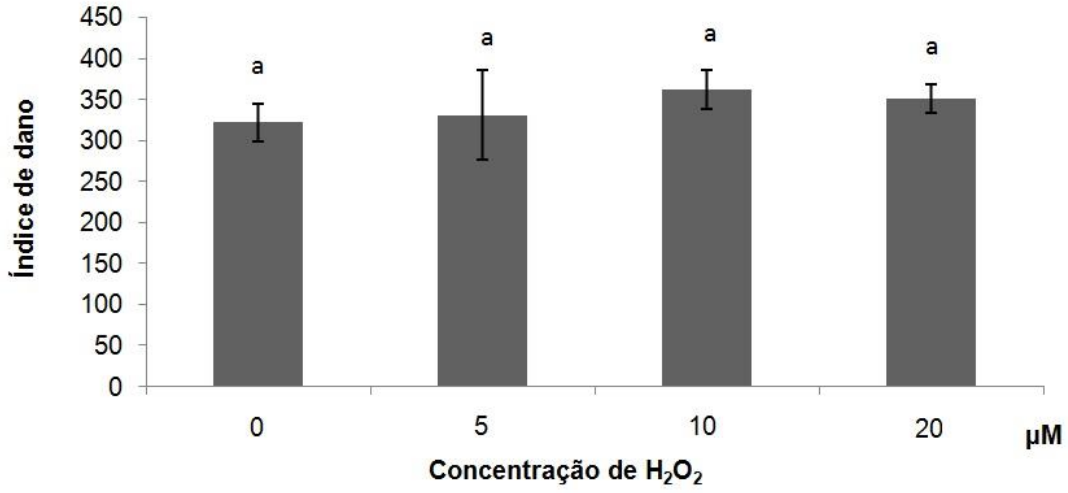

Figura 70. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem exposição à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Com a inclusão de EAN, os índices de dano de cometas obtidos de núcleos sem submissão à lise não são significativamente diferentes em todas as concentrações de H_2O_2 testadas.

V.7.2.5. Interação H_2O_2 - PBS - Com lise

A figura 71 mostra efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS e com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

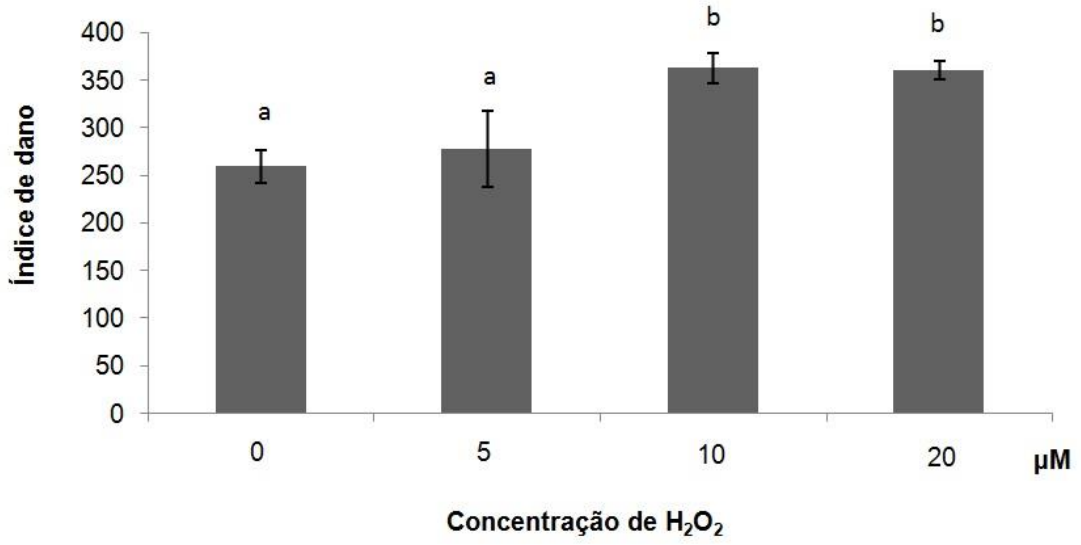

Figura 71. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (Duncan).

Os índices de dano de cometas obtidos de núcleos com submissão à lise não são significativamente diferentes nas concentrações de 10 e 20µM. Os índices de dano nas concentrações de 0µM e 5µM também não são significativamente diferentes e são significativamente menores do que os de outras concentrações.

V.7.2.6. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS - Sem lise/Com lise

A figura 72 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS, com e sem exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

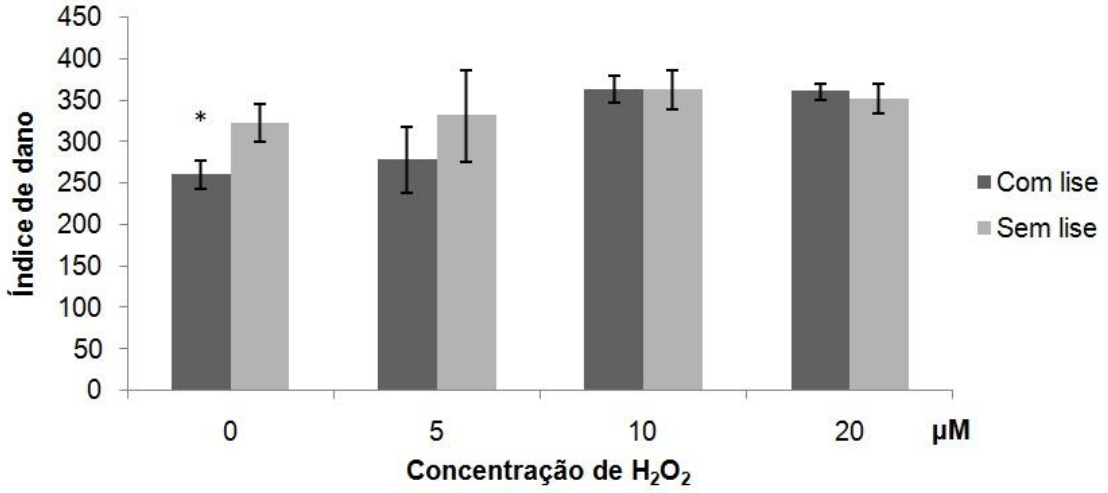

Figura 72. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS como solução de extração, sem (barra cinza claro) e com (barra cinza escuro) exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica e com contagem de EANs. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese de 20 minutos em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com lise e sem lise na mesma concentração de H_2O_2).

Não houveram diferenças significativas entre as médias dos índices de dano dos cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS sem e com submissão à lise em todas as concentrações de H_2O_2, exceto na concentração de 0µM (controle PBS). Nesta concentração o índice de dano de cometas obtidos de núcleos expostos à lise foi significativamente menor do que o índice de dano de cometas obtidos de núcleos sem submissão à lise.

V.7.2.7. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Sem lise

A figura 73 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de

Rhizophora mangle extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ como soluções de extração, sem exposição à lise alcalina iônica.

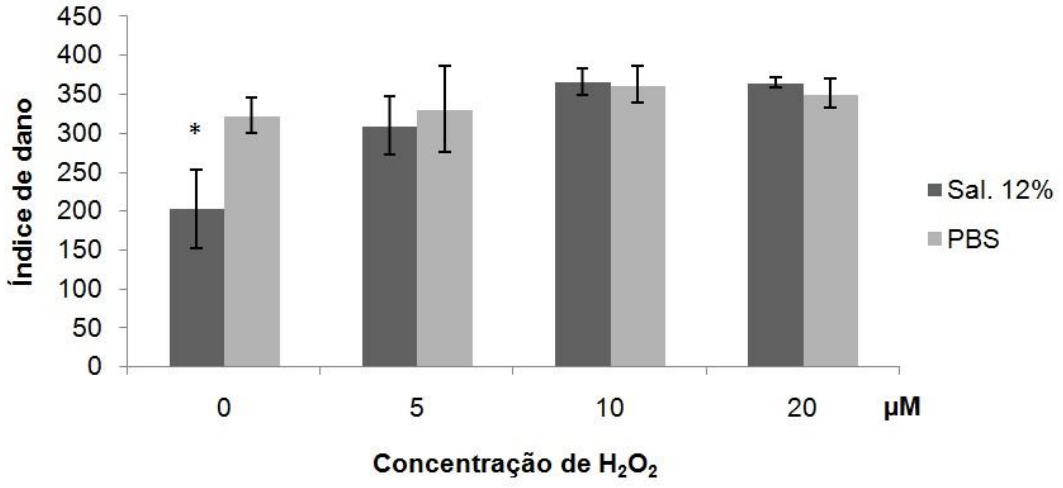

Figura 73. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano, com contagem de EAN, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle,* extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, sem lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com lise e sem lise na mesma concentração de H_2O_2).

Não houveram diferenças significativas entre as médias dos índices de dano dos cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ sem submissão à lise em todas as concentrações de H_2O_2, exceto na concentração de 0µM (controle PBS). Nesta concentração o índice de dano de cometas obtidos de núcleos extraídos com solução salina 12‰ foi significativamente menor do que o índice de dano de cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS.

V.7.2.8. Comparação dos efeitos da interação H_2O_2 - PBS/Salina 12‰ - Com lise

A figura 74 mostra a comparação dos efeitos da exposição às diferentes concentrações de 0µM (controle PBS), 5µM, 10µM e 20µM de H_2O_2 sobre índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ como soluções de extração e com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos.

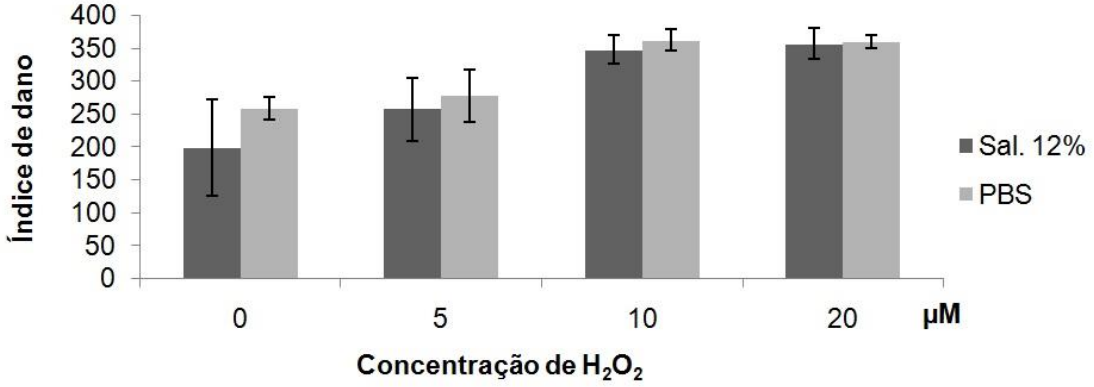

Figura 74. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano, com contagem de EANs, de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle*, extraídos com PBS (barra cinza claro) e com solução salina 12‰ (barra cinza escuro) como soluções de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8 V/cm, 230mA.

Não houveram diferenças significativas entre as médias dos índices de dano dos cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS ou com solução salina 12‰ com submissão à lise em todas as concentrações de H_2O_2.

VI. DISCUSSÃO

VI.1. Germinação de raízes

Em seu habitat natural os propágulos de *Rhizophora mangle* germinam no sedimento do mangue, sendo este sedimento notadamente rico em nutrientes. De acordo com Duarte *et al*. (1998), num experimento realizado com *Rhizophora apiculata*, a variação na taxa de crescimento de mangue poderia ser explicada pela diferença na concentração de nutrientes das folhas que foi, por sua vez, relacionada com a concentração de nutrientes intersticial e com o teor de silte e argila dos sedimentos. O crescimento das mudas aumentou significativamente quando as plantas cresceram em locais ricos em nutrientes.

Em nosso estudo, a germinação ocorreu em vasos de vidro, sem o contato com um substrato mole e num ambiente apertado. A germinação ocorreu em água, sendo um meio pobre em nutrientes comparado com os sedimentos de mangue. As bases dos propágulos também estavam em contato direto com o fundo do vidro, recipiente no qual foram germinados.

Nesta forma de germinação realizada em nosso estudo, fatores como ambiente apertado, sem contato com um substrato mole, com a base dos propágulos em contato com o vidro, e em um meio pobre em nutrientes, podem constituir um estresse para os propágulos devido às diferenças de condições ambientais entre germinação na natureza e geminação no laboratório.

As células normalmente respondem rapidamente ao estresse, alterando seu metabolismo para compensar o estresse, podendo levar ao interrompimento do ciclo celular ou à apoptose. Muitas vezes também ocorre reorganização da arquitetura nuclear. O nucléolo sente o estresse e é um eixo central para coordenar a resposta ao estresse (BOULON *et. al*, 2010). De acordo com Shaw e Doonan (2005), pelo fato do nucléolo ser responsável pela síntese ribossomal exigida pelas células, e por isso demandar uma enorme atividade metabólica, a função nucleolar pode facilmente tornar-se um fator limitante ao crescimento celular. Um fenômeno bem conhecido em situações de estresse é a segregação nucleolar causada por DNAs

danificados (BOULON *et. al*, 2010; FERNÁNDEZ-GÓMEZ; ESPINA; RISUEÑO, 1984).

A relação entre o estresse ambiental e a atividade dos nucléolos foi relatada por vários autores (STĘPIŃSKI, 2014; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015). As alterações em parâmetros de nucléolos foram utilizadas por vários autores como marcadores nos estudos sobre estresse ambiental nas plantas e nos animais (ARKHIPCHUK; MALINOVSKAYA; GARANKO, 2000; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005).

O possível estresse abiótico da condição de germinação no laboratório, em raízes germinadas no escuro e no claro, pode estar ligado ao aparecimento das EANs em todos os núcleos/cometas obtidos em nossos experimentos.

Em nosso estudo, a presença de luz na germinação das raízes levou à diferenças significativas entre as raízes que germinaram no escuro comparadas às raízes que germinaram no claro, notadamente, em relação à coloração (figura 4). As raízes germinadas no claro apresentaram um tom bege claro, enquanto que as germinadas no escuro apresentaram uma tonalidade vermelha.

Carotenóides são pigmentos que podem variar sua coloração do incolor até o vermelho, e sua mudança de cor ocorre à medida que há uma mudança no seu espectro de absorção (FRANCIS, 1986), ou seja, sua capacidade de absorver luz.

Um estudo realizado por Ruiz-Sola *et al*. (2014) demonstrou que a biossíntese de ácido abscísico (ABA) em raízes de *Arabidopsis thaliana* tratadas com sal envolveu a indução da via de biossíntese de carotenóides. O ácido abscísico ABA é um hormônio que desempenha um papel vital na mediação de respostas de estresses abióticos em plantas. A exposição ao sal induz à síntese de ABA por meio da clivagem de precursores de carotenóides (xantofilas), que são comumente encontrados em níveis muito baixos em raízes.

Desta forma, o vermelho produzido pelas raízes germinadas no escuro pode estar associado à biossíntese de carotenóides devido ao estresse abiótico, uma vez que a presença de luz não é um fator comum na germinação de raízes de *Rhizophora mangle,* que ocorre na natureza abaixo do sedimento, ou seja, no escuro.

Além da diferença de coloração, as raízes dos propágulos germinados no escuro se desenvolveram em formato curvo e rígido, enquanto que as raízes dos propágulos germinados no claro cresceram em formato reto e mais mole. Os propágulos germinados no claro também apresentaram uma quantidade reduzida de raízes germinadas em comparação com a quantidade de raízes dos propágulos que foram germinados no escuro, como visto na figura 4. Os propágulos germinados no escuro também desenvolveram raízes secundárias, como visto na figura 75, o que não ocorreu nas raízes dos propágulos germinados no claro.

Figura 75. Raízes de propágulos germinados no escuro. Seta branca mostra raízes secundárias.

O número reduzido e a rigidez das raízes germinadas no claro fazem com que as raízes obtidas nesta condição não sejam adequadas para serem utilizadas na obtenção de núcleos para o estabelecimento de um ensaio cometa e para validação do mesmo. O número reduzido de raízes reduz o número de lâminas que podem ser confeccionadas e a rigidez das raízes dificulta a obtenção de fatias finas para extrair os núcleos.

VI.2. Os efeitos das EANs

Figura 76. Catálogo de classes de danos de cometas de pampo (*Trachinotus carolinus*): expostos à diferentes concentrações de nano-TiO_2: Classe 0: Intacto; Classe 1: Pouco danificado; Classe 2: Danificado; Classe 3: Muito danificado; Classe 4: Severamente danificado. Fonte: Vignardi, 2012. Reproduzida com permissão.

Para análise de dados no ensaio cometa, um cometa é tradicionalmente divido em duas partes principais: a cabeça e a cauda. A cabeça é uma área redonda, densa, fortemente corada com corante de prata e consiste de DNAs que não migram na eletroforese. A cauda é uma área oval de granulação menos densa e consiste de fragmentos de DNA danificado que migram para fora de cabeça em direção ao anodo durante a eletroforese. A figura 76 mostra um catálogo de cometas de pampo (*Trachinotus carolinus)* classificados em cinco classes de dano em função do nível de danificação do DNA nuclear, causado pela exposição à diferentes concentrações de nano-TiO_2. São cometas obtidos através de um protocolo de ensaio que foi basicamente o mesmo utilizado para obter os cometas de mangue, incluindo a coloração. A Classe 0 representa os cometas cujo DNA não sofreu danificação, consequentemente, sem cauda; e a Classe 4 representa os cometas cujo DNA sofreu máximo nível de danificação e, consequentemente, a cabeça é reduzida em um ponto pequeno e a cauda é grande, sendo uma relação inversa entre o DNA contido na cabeça e o DNA contido na cauda. Em todos os casos a delimitação da cabeça é nítida. Em nenhum caso foi possível verificar se existe ou não EAN dentro da área da cabeça.

Cometas obtidos com núcleos de *Rhizophora mangle* (Figura 77 A e B), no entanto, apresentam características diferentes. A cabeça é uma mancha basicamente redonda com coloração fraca de material granulado. A cauda é outra mancha granulada com mesma tonalidade de coloração e de forma mais variada. Não está clara a delimitação entre cabeça e cauda, como visto nos cometas de

pampo. Em todos os cometas obtidos durante nosso experimento, uma EAN fortemente corada foi consistentemente encontrada na área da cabeça do cometa. A coloração fraca na área da cabeça do cometa de mangue pode ser devida à técnica de coloração, tipo de coloração ou à intervenção da EAN sobre a revelação do DNA com coloração de prata. A coloração em prata foi aplicada com sucesso no ensaio cometa de material vegetal (SANTOS, POURRUT; OLIVEIRA, 2015). O protocolo da coloração em prata utilizado neste trabalho é um protocolo que foi desenvolvido usando material animal (GARCIA *et al.,* 2004). Uma modificação/ajuste do protocolo ao nosso material talvez seja necessário. A coloração de fluorescência não foi testada. A intervenção como inibição e/ou competição da EAN podem também ter influenciado a coloração. Com afinidade mais alta à prata do que o DNA, por exemplo, a EAN pode ter absorvido mais corante disponível, ficando com a coloração mais forte do que o DNA na cabeça e na cauda do cometa. A explicação completa e plausível deste problema pode envolver um estudo citológico de células meristemáticas de *Rhizophora mangle* e a identificação dos componentes desta célula, o que não estava no contexto deste estudo neste momento.

A falta de delimitação entre a cabeça e a cauda e a presença da EAN inviabilizaram a análise de cometas através de programas de análise de imagem como, por exemplo, o Comet Score (Tri-Tek Corporation), que usa como parâmetros o diâmetro de cabeça, o comprimento da cauda, a diferença entre a densidade da cabeça e da cauda, entre outros, para comparar o nível de danos dos cometas.

A figura 77 mostra dois cometas de diferentes níveis de dano obtidos de núcleos extraídos de raízes de propágulo de mangue. O cometa na Figura 77-A é um cometa de Classe 3 com moderado grau de danificação de DNA. O cometa na Figura 77-B é um cometa de Classe 1 com baixo grau de danificação de DNA. Apesar da coloração fraca, há indícios de que as sombras da cabeça dos cometas existem. As delimitações da cabeça e da calda destes cometas foram marcadas com um circulo de linha ponteada vermelha e de linha ponteada azul, respectivamente, na Figura 77-A1 e 77-B1 para facilitar a visualização.

Outro indício da existência da cabeça nos cometas de mangue é uma discreta constrição frequentemente observada na junção da área da cabeça com a área da

cauda, em um ou em ambos os lados da periferia dos cometas de mangue (figura 77-A1).

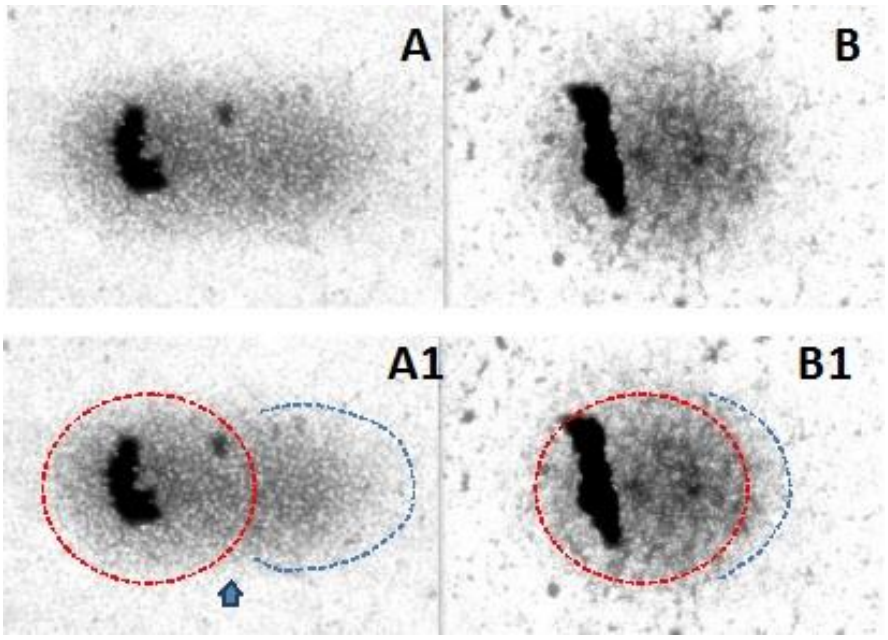

Figura 77. A e B: Cometas de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. A1 e B1: copias de A e B, respectivamente, com marcação da área da cabeça (vermelho) e da cauda (azul). A constrição (seta) ao(s) lado(s) do cometa indica o encontro da área da cabeça com a área da cauda.

Os cometas de pampo são basicamente de duas formas, redondo ou oval, dependendo do grau de danificação de seu DNA. Os cometas de mangue, por outro lado, são de formas altamente variadas. Esta variação na forma é devido à EAN que permanece no lugar da cabeça dos cometas e resulta em uma distorção local do paralelismo da corrente no campo elétrico que, por sua vez, afeta profundamente a configuração dos cometas (figura 78). Assim, quando a corrente que passa paralelamente encontra a EAN, ela desvia para os lados antes de retornar novamente à forma de uma corrente paralela. O desvio desta corrente causa a deformação da cauda. A distorção do campo elétrico não só muda a conformação do cometa, mas também a direção da cauda.

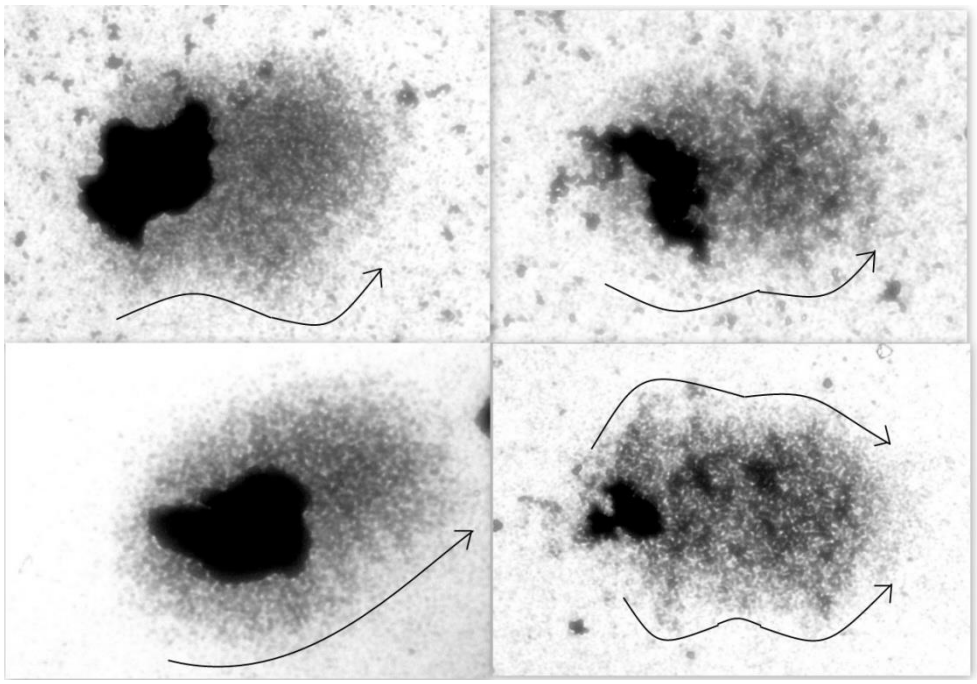

Figura 78. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 60 minutos de lise, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x. As setas indicam as irregularidades das caudas dos cometas formadas durante a eletroforese.

VI.3. Extração de núcleos com diferentes soluções de extração

Santos, Pourrut e Oliveira (2015) analisaram 156 trabalhos nos quais os ensaios cometa foram realizados com plantas, tendo sido usados diversos tecidos (raízes, folhas, suspensão de células, entre outros). Destes 156 trabalhos, 43 usaram o PBS como solução de extração, 14 usaram o Tampão Sorensen e 73 usaram o Tampão 0.4M Tris pH 7,4. Nos outros 30 foram usadas outras soluções.

Em nosso estudo quatro soluções de extração foram testadas, dentre elas o PBS, o Tampão 0.4M Tris pH 7,4, o Tampão Sorensen e a Solução salina 12‰, que é o próprio meio no qual os propágulos foram germinados. Foram levados em conta os seguintes parâmetros para a escolha da solução de extração: quantidade de núcleos; proporção entre núcleos intactos e EANs; presença de borda e ausência de dano ao DNA.

O PBS foi a solução de extração que em nosso estudo demonstrou maior capacidade na manutenção da integridade dos núcleos, sendo, portanto, a solução que possibilitou a extração da maior quantidade de núcleos por microlitros de solução de extração.

Características nucleares como borda nítida e granulação fina na maioria dos núcleos (figuras 10 e 11) são indicadores de integridade. Mesmo nos núcleos com ausência de borda, houve pequena difusão de material, sendo este um indicativo de pouco dano ao material nuclear.

As EANs encontradas livres no gel, como visto em todas as condições, representaram somente 27% dos núcleos danificados extraídos com PBS, sendo esta a menor porcentagem de aparição de EANs livres entre as quatro diferentes soluções de extração.

A solução salina 12‰ foi testada por ser uma solução tampão (água do mar) e iso-osmótica em relação à solução de germinação, no intuito de procurar uma solução de extração que pode diminuir o efeito da diferença osmótica entre o citoplasma e a solução de extração na deformação e/ou lise de núcleos.

Grande parte dos núcleos obtidos com solução salina 12‰ também apresentaram borda nítida e granulação fina (figura 13), demonstrando integridade dos núcleos extraídos, como ocorreu com os núcleos extraídos com PBS. No entanto, diferentemente do que ocorreu na extração de núcleos com PBS, quando não houve borda nítida nos núcleos extraídos com solução salina 12‰, ocorreu grande dispersão de material nuclear pelo gel (figura 14), o que indica que, comparada ao PBS, a solução salina 12‰ apresenta maior propensão a causar danos aos núcleos. A quantidade de núcleos obtidos equivaleu à metade da quantidade obtida com PBS.

Quando comparadas as porcentagens de núcleos obtidos com as duas soluções de extração, a porcentagem de núcleos intactos foi menor, assim como a porcentagem de núcleos danificados com nível intermediário e EANs livres foi maior nos núcleos extraídos com solução salina 12‰, o que apresenta uma indicação a mais para a melhor qualidade do PBS como solução de extração.

Quando a extração foi realizada com tampão 0.4M Tris pH 7,4, a quantidade de núcleos obtidos equivaleu à metade da quantidade de núcleos obtidos com solução salina 12‰ e um quarto da quantidade de núcleos obtidos com PBS, ou seja, uma quantidade muito baixa de núcleos.

Na extração com tampão 0.4M Tris pH 7,4 poucos núcleos apresentaram borda nítida (figura 16), o que também indica que a solução comprometeu a integridade dos núcleos coletados. A maioria dos núcleos apresentou ausência de borda e grande dispersão do material nuclear pelo gel (figura 17), indicando alto nível de dano. Consequentemente, a porcentagem de núcleos intactos foi muito baixa e a de núcleos danificados muito alta. Ou seja, quando comparada às soluções salina 12‰ e PBS, o tampão 0.4M Tris pH 7,4 se mostrou ineficiente quanto ao número de núcleos obtidos. Os núcleos extraídos com tampão 0.4M Tris pH 7,4 também possuíam maiores danos do que aqueles coletados com as outras soluções.

Quando a extração foi realizada com tampão Sorensen, a quantidade de núcleos obtidos equivaleu a menos da metade da quantidade obtida com tampão 0.4M Tris pH 7,4, ou seja, uma quantidade muito pequena. A baixa incidência de núcleos obtidos indica que o tampão Sorensen é nocivo aos núcleos.

Os poucos núcleos intactos extraídos com tampão Sorensen não apresentavam borda nítida (figura 19) e a maioria dos núcleos apresentava quase completa difusão de material nuclear pelo gel (figura 20). A porcentagem de núcleos intactos foi a menor e a de núcleos danificados, sendo praticamente todos eles EANs livres, foi a maior comparada às porcentagens de núcleos obtidos com as soluções salina 12‰, PBS e com o tampão 0.4M Tris pH 7,4.

Desta forma, o PBS mostrou-se como a solução de extração mais adequada, pois foi com esta solução que a maior quantidade de núcleos foi extraída, e também por que os núcleos extraídos com PBS apresentaram características que indicam maior integridade, como presença de borda e pouca difusão de material nuclear.

VI.4. Lise no ensaio cometa de núcleos de células meristemáticas de propágulos

Diversos testes foram realizados para se testar a necessidade e a eficácia da etapa de lise em nosso estudo. Embora alguns autores que realizaram ensaios cometa em plantas tenham executado a etapa da lise (KOPPEN; VERSCHAEVE, 1996), muitos autores omitiram esta etapa do ensaio (GICHNER; PATKOVÁ; KIM, 2003; VENTURA *et al*., 2013; BHAT *et al*., 2011).

Núcleos extraídos com PBS expostos a 60 minutos de lise salina aniônica demonstraram ausência de borda e quase completa difusão de material nuclear em todos os núcleos, indicando efeito excessivo da lise sobre os núcleos (figuras 31 e 32), motivo pelo qual ela não foi mais usada posteriormente.

Núcleos extraídos com PBS que não passaram pela lise apresentaram borda nítida (figuras 25 e 26). Núcleos extraídos com PBS submetidos à lise alcalina iônica por 60 minutos apresentaram tanto núcleos com borda nítida (figura 28), quanto núcleos sem borda nítida (figura 29). A porcentagem de núcleos intactos entre as condições sem lise e com exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos não diferiu muito, enquanto que a condição sem lise apresentou maior incidência de EANs livres.

Quando comparado o tempo de exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos e por 120 minutos, nos cometas obtidos a partir de núcleos expostos a 60 minutos de lise alcalina iônica houve efeito da lise com migração de material nuclear pelo gel (figura 36), ou seja, houve dissolução da membrana e outras proteínas nucleares para que os fragmentos pudessem migrar. Este efeito de migração não foi excessivo. O número de cometas intactos mostrou-se suficiente para análises, havendo também muitos cometas danificados, como era esperado.

Já nos núcleos que foram expostos a 120 minutos de lise alcalina iônica, o efeito da lise foi excessivo (figuras 37 e 79), havendo poucos cometas intactos e muitos cometas danificados que sofreram forte migração de material nuclear e também muitas ENIs livres. Por esta razão, a exposição por 120 minutos não foi mais utilizada em nossos experimento.

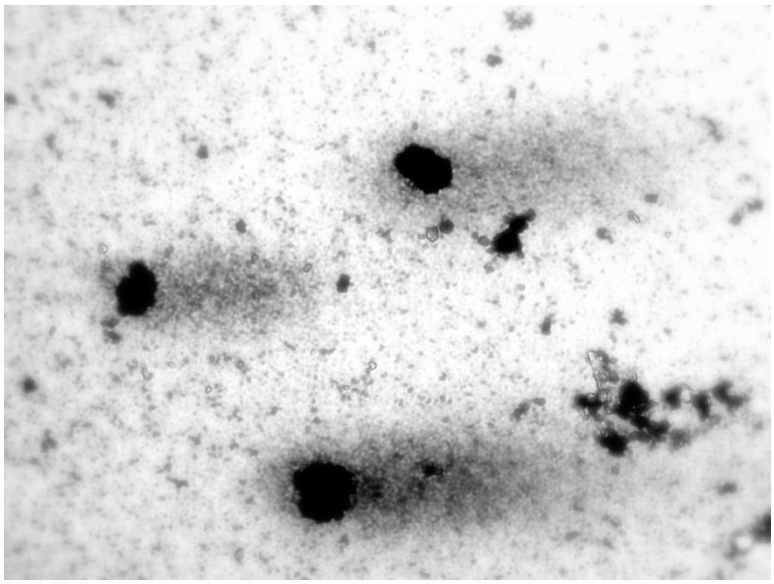

Figura 79. Cometas obtidos com núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, 120 minutos de lise, 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC. Aumento 400x.

VI.5. Relaxamento e eletroforese

Gichner, Patková e Kim (2003) testaram diferentes tempos de relaxamento e eletroforese (5 minutos de relaxamento e 15 minutos de eletroforese e 15 minutos de relaxamento e 30 minutos de eletroforese) em 8 diferentes plantas para testar suas respostas e aplicabilidade do ensaio cometa em áreas poluídas ou tratadas com químicos agrícolas. Na maioria dos testes, o menor tempo muitas vezes mostrou-se insuficiente para que houvesse formação de cometas. Por outro lado, a exposição ao maior período levou a aumentos significativos do momento de cauda em 3 casos e, em um dos casos, resultou em núcleos completamente danificados.

Em nosso experimento, a condição de 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese (figuras 43 e 44) mostrou-se adequada por apresentar cometas com características esperadas após a exposição ao relaxamento e à eletroforese, como visto no ítem V.5.2. Grande parte dos cometas eram intactos e não apresentavam borda. Nos cometas que apresentaram danificação, o material nuclear sofreu

dispersão pelo gel e ocorreu pouca migração de grânulos. Uma pequena dispersão de grânulos é normal devido ao efeito do relaxamento, e a não formação de cauda através da migração pelo efeito da eletroforese também era esperada já que são cometas provenientes de núcleos que não foram expostos a agentes genotóxicos. A contagem de EANs livres nessas lâminas não foi alta.

Já a condição de 5 minutos relaxamento e 10 minutos de eletroforese, também apresentou uma grande quantidade de cometas intactos e com pouco dano (figuras 45 e 46), sendo também baixa a quantidade de ENIs. Entretanto, houve pouca resposta à exposição e ao tempo de relaxamento e eletroforese.

Já na condição de 10 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese houve baixa incidência de cometas intactos, mas forte resposta às condições de relaxamento e eletroforese. A grande maioria dos cometas apresentou dispersão de material nuclear e forte migração para o ânodo, formando cometas com longos comprimentos caudais (figuras 41 e 42).

VI.6. Efeitos combinados da lise e relaxamento

Os dados obtidos nas condições de 5 minutos de relaxamento com exposição à lise e sem exposição à lise (figuras 48, 49 e 54) eram esperados. Os cometas de núcleos expostos às condições com lise e sem lise apresentaram ausência de borda, pouca difusão de grânulos e pouca migração dos grânulos na eletroforese, com formação de cometas com médios comprimentos caudais. A pouca migração dos grânulos na eletroforese indica que os núcleos não sofreram muitos danos, apresentando pequenos comprimentos caudais.

Já na condição de 10 minutos de relaxamento, os cometas de núcleos que não passaram pela lise apresentaram ausência de borda, média difusão do material nuclear pelo gel e média migração dos grânulos (figuras 51 e 52). Os cometas de núcleos expostos a 60 minutos de lise e 10 minutos de relaxamento apresentaram ausência de borda, média difusão do material pelo gel e alta migração dos grânulos

na eletroforese (figura 56). Isso pode indicar que em nosso estudo este tempo de relaxamento foi excessivo.

Nos cometas de núcleos expostos a 60 minutos de lise e 10 minutos de relaxamento, os níveis de danos foram ainda maiores comparados aos não expostos à lise. A evidência disso consiste na comparação entre os dados obtidos na exposição ao relaxamento por 5 minutos com os dados obtidos na exposição ao relaxamento por 10 minutos. Como esta diferença de tempo foi a única variável entre os dois experimentos, a formação de cometas com altos níveis de dano nos núcleos expostos a 10 minutos de relaxamento, tanto nos cometas de núcleos expostos à lise como nos cometas de núcleos não expostos à lise, pode estar relacionada a este período maior de exposição ao relaxamento. Por estas razões, a condição de 10 minutos de relaxamento, com e sem exposição à lise, não foi mais usada em nossos experimentos.

VI.7. Validação de Método

Nos experimentos para Validação de Método os melhores resultados, tanto na extração de núcleos com PBS quanto na extração de núcleos com solução salina 12‰, foram obtidos nos testes realizados com exposição à lise. Na extração com as duas soluções com exposição à lise houve uma relação dose-dependente entre o índice de dano e a concentração do agente genotóxico. Nos testes realizados com o PBS e com a solução salina 12‰ como soluções de extração sem exposição à lise não houve relação dose-dependente.

Quando comparados os resultados relacionados à submissão ou não submissão à lise, todos os grupos expostos à lise apresentaram menores índices de dano quando comparados aos grupos submetidos às mesmas condições, mas que não passaram pela etapa da lise.

Estes resultados, de índices de danos inferiores nos grupos expostos à lise comparados aos índices de danos de grupos não expostos à lise, foram diferentes dos obtidos no estabelecimento de método. No estabelecimento de método os grupos expostos à lise apresentaram sempre maiores índices de dano do que os

não expostos à lise. Isso pode estar relacionado à exposição dos núcleos a outros fatores que não foram testados em conjunto no estabelecimento de método, enquanto que na validação de método os núcleos foram expostos a uma combinação de condições que incluía, além da lise: solução de extração, exposição à H_2O_2, relaxamento e eletroforese.

Quando expostos à lise, cometas obtidos de núcleos extraídos com PBS apresentaram menores índices de dano do que os cometas de núcleos extraídos com solução salina 12‰ nas mesmas condições, porém não houve diferença significativa entre estes índices de dano nestas duas condições. Em cometas de núcleos extraídos com PBS e com solução salina 12‰ ocorre uma relação dose-dependente entre o índice de dano e a concentração do agente genotóxico. Assim, as duas soluções se mostraram adequadas para o nosso estudo.

Como mencionado no ítem V.2, a EAN frequentemente apresentou-se livre no gel mantendo aparentemente sua conformação inicial, sugerindo que EAN livre era parte de um cometa altamente danificado no qual todo outro material nuclear havia se dispersado, restando somente esta estrutura no gel. Assim sendo, na análise de cometa, poderia ser considerada a EAN como um cometa de última classe de dano. Para testar esta possibilidade na análise de dados de validação, o índice de dano foi computado sem contagem de EAN e comparado com o índice de dano computado com contagem de EAN como o cometa de ultima classe de dano (ítem IV.2.9.2).

A figura 80 mostra a comparação da variação de índices de danos de núcleos obtidos com PBS como solução de extração, em função da concentração de H_2O_2, com e sem contagem de EANs, usando os dados obtidos nos experimentos de validação de método.

Sem contagem de EANs o índice de dano aumentou gradualmente em função da concentração do agente genotóxico H_2O_2, mostrando uma relação dose-dependente entre as duas variáveis.

Com contagem de EANs o índice de dano aumentou rapidamente com o aumento da concentração do agente genotóxico e a relação entre as duas variáveis deixa de ser uma relação dose-dependente linear.

A falta de relação dose-dependente entre o índice de dano e a concentração do agente genotóxico quando houve contagem de EANs está ligada ao fato de que o índice de dano em diferentes concentrações de agente genotóxico não aumenta na mesma taxa, e que o índice de dano em uma ou mais concentrações intermediárias de agente genotóxico (5µM ou 10 µM de H_2O_2) chegou a nivelar com o índice de dano da última concentração da série (20 µM de H_2O_2). A falta de uma relação dose-dependente entre o índice de dano e a concentração do agente genotóxico faz com que a inclusão de EANs como uma classe de dano nos dados do ensaio não seja recomendável.

Na análise de dados do ensaio cometa, a exclusão de uma classe de dano para evitar a distorção de resultados não é incomum. As células animais mortas são associadas com um nível elevado de quebras de fita de DNA. Cometas de células necróticas e apoptóticas são cometas com cabeça pequena, ou sem cabeça, e com cauda grande e difusa. Estas células são comumente chamadas de "ouriços (Hedgehogs)", "células fantasmas (ghost cells)", “nuvens (clouds)" ou "células com núcleos não-detectáveis (non-detectable cell nuclei - NDCN). A exclusão destas células dos dados do ensaio é recomendada para evitar o “falso positivo” (false positives) (HARTMANN *et al*., 2003).

Além de interferir na relação dose-dependente entre o índice de dano e a concentração do agente genotóxico, os índices de dano com contagem de EANs foram significativamente maiores do que os índices de dano sem contagem da EAN nas mesmas concentrações do agente genotóxico. O alto índice de dano com contagem de EANs pode ser devido ao aumento de mais uma classe de dano, o número de EANs e o peso (4) da classe no formulário de cálculo de índice de dano (ítem IV.2.9.2), o que significa que, em termos de índice de dano, cada EAN equivale a quatro cometas de peso (1) de classe 1.

As mesmas tendências foram encontradas na comparação da variação dos índices de núcleos obtidos com salina 12‰ como solução de extração em função de concentração de H_2O_2, com e sem contagem de EANs, usando os dados obtidos nos experimentos de validação de método (figura 81).

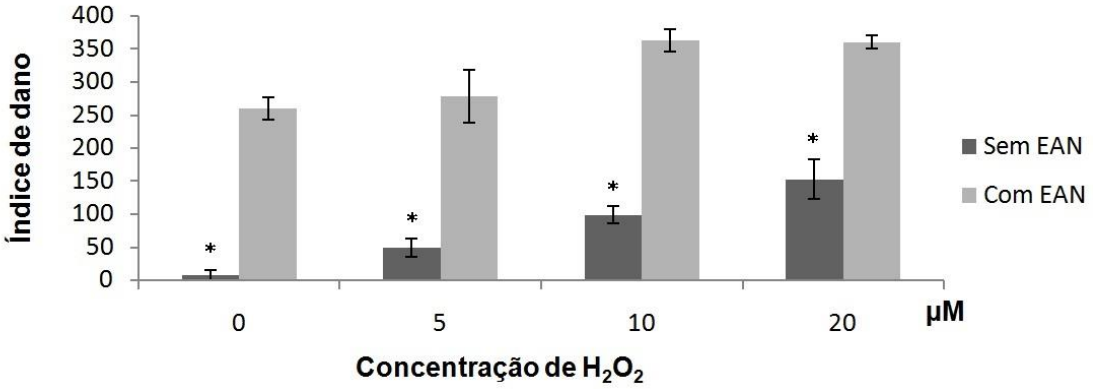

Figura 80. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com PBS como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC, sem (barra cinza escuro) e com (barra cinza claro) contagem de EANs.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com contagem de EAN e sem contagem de EAN na mesma concentração de H_2O_2).

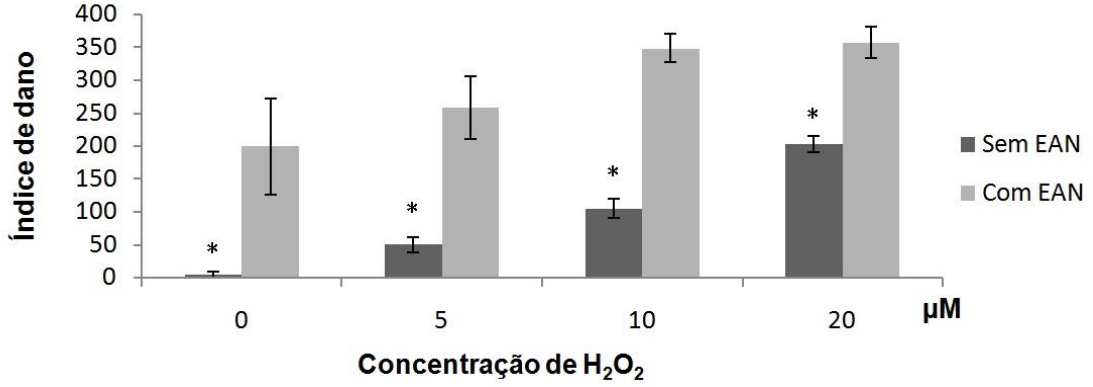

Figura 81. Efeitos da exposição às diferentes concentrações (0µM, 5µM, 10µM e 20µM) de H_2O_2 sobre os índices de dano de cometas obtidos de núcleos de raízes de *Rhizophora mangle* extraídos com solução salina 12‰ como solução de extração, com exposição por 60 minutos à lise alcalina iônica. Relaxamento foi de 5 minutos e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC, sem (barra cinza escuro) e com (barra cinza claro) contagem de EANs.

Asterisco indica diferença significativa (Tese-t de Student entre com contagem de EAN e sem contagem de EAN na mesma concentração de H_2O_2).

Desta forma, estabeleceu-se um método em que tanto o PBS quanto a solução salina 12‰ podem ser usados como solução de extração, o uso da lise alcalina iônica por 60 minutos é recomendado, 5 minutos de relaxamento e 20 minutos de eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA, 4ºC e sem contagem de EANs.

EAN é uma estrutura que aparece consistentemente em todos os núcleos/cometas encontrados em nosso estudo e altera os resultados obtidos de diversas maneiras. Para poder aplicar efetivamente o método estabelecido neste estudo nos estudos ambientais, é necessário de um entendimento mais profundo sobre esta estrutura, sua identidade, seu aparecimento, seus efeitos e seu controle.

Nosso estudo objetivou o estabelecimento de um ensaio cometa adaptado às células meristemáticas provenientes de raízes de propágulos de mangue da espécie *Rhizophora mangle* para utilização em estudos sobre a genotoxicidade em ambientes costeiros marinhos.

Entretanto, de acordo com alguns autores (LIN; STERNBERG, 1992; SMITH; SNEDAKER, 1995), a germinação da *Rhizophora mangle* em baixas salinidades leva à melhora e aumento da sua taxa de crescimento. Smith e Snedaker (1995) testaram a taxa de crescimento de propágulos de *Rhizophora mangle* entre as salinidades 5% e 36%, que representava a variação de salinidade da área coletada, e mostraram que as taxas de crescimento aumentam conforme ocorre diminuição da salinidade. Ainda, demonstraram que propágulos que germinavam em salinidades de 35% e posteriormente eram colocados em uma salinidade de 5%, mostravam uma taxa de crescimento ainda mais elevada comparados aos que germinavam na baixa salinidade desde o início. Uma vez que a *Rhizophora mangle* tolera esta faixa de variação salina, isso mostra que esta tolerância é mais um mecanismo de evolução para que ela ocupe áreas com um estresse salínico não suportado por outras espécies do que uma preferência por ambientes salubres.

Em seu habitat natural as *Rhizophora mangle* germinam em sedimentos de mangue, no entanto, em nosso estudo, ela germinou em água. Desta forma, este ensaio cometa pode ser aplicado em ambientes costeiros marinhos, assim como sua germinação pode tanto ocorrer em sedimentos quanto em água, o que torna o espectro de aplicabilidade do método bem amplo. Também, o ensaio pode ser realizado para se estudar o efeito de um determinado agente em laboratório, como feito em nosso estudo, ou os propágulos podem ser germinados em determinada região em que se queira determinar o nível de contaminação do local, ou ainda podem ser extraídos propágulos diretamente de seus habitats para se avaliar as condições do mangue em si.

Mais estudos necessitam ser realizados com o intuito de identificar as EANs, visto que estas podem servir como importantes biomarcadores para o estudo sobre genotoxicidade ambiental. Ainda, a literatura sobre morfologia e fisiologia de células de *Rhizophora mangle* é muito escassa, o que dificultou a interpretação acerca do comportamento das estruturas extraídas das raízes de *Rhizophora mangle* diante das diferentes condições às quais foram expostas (soluções de extração, lise, relaxamento e eletroforese), principalmente pelo fato de a *Rhizophora mangle* ser uma planta que já se distingue das demais, pois ela é uma planta que evoluiu para se adaptar à condições de estresse, e isso provavelmente influencia sua morfologia e fisiologia. Desta forma, antes de aprimorar o estudo do ensaio cometa adaptado às *Rhizophora mangle*, sugere-se um prioritário aprofundamento no estudo morfofisiológico desta espécie para que conclusões mais precisas possam ser encontradas.

VII. CONCLUSÃO

- É possível a obtenção de cometas com núcleos extraídos de propágulos de *Rhizophora mangle*. A validação de método realizada com agente genotoxico, H_2O_2, apresenta uma relação concentração dependente com o índice de dano.

- A germinação no claro e no escuro resultou em dois tipos de raízes diferentes. Raízes germinadas no escuro são mais adequadas para extração de núcleos.

- O PBS demonstrou-se como a melhor solução de extração em termos de qualidade e quantidade de núcleos extraídos, como também sua interação com outros parâmetros do ensaio.

- A solução salina de 12‰ demonstrou-se também uma boa solução de extração.

- A etapa da lise mostrou-se desnecessária quando o efeito da lise foi analisado isoladamente. Quando houve sequente exposição ao relaxamento e à eletroforese, as lâminas submetidas à lise apresentaram melhores resultados.

- O tempo ideal de relaxamento foi de 5 minutos, tendo 10 minutos sido excessivo.

- Os melhores parâmetros estabelecidos neste trabalho para ensaio cometa com células meristemáticas de *Rhizophora mangle* são: PBS ou solução salina 12‰ como solução de extração, exposição à lise alcalina iônica por 60 minutos, 5 minutos de relaxamento e eletroforese em tampão pH>13, 0,8V/cm, 230mA por 20 minutos a 4ºC.

- O aparecimento de EANs em todos os núcleos, assim como a elevada incidência de EANs livres, podem indicar que os propágulos usados para obtenção de núcleos estão sob estresses causados provavelmente pelas condições experimentais.

- Não é aconselhável a contagem de EANs livres como núcleo com máximo nível de danificação de DNA na análise de cometa utilizando o índice de dano.

- A aplicação de métodos estabelecidos neste trabalho para um estudo ambiental, no entanto, necessita de um entendimento mais profundo sobre a EAN, seu controle, e seu efeito sobre os resultados.

VIII. REFERÊNCIAS

ADAME, M.F.; LOVELOCK, C. E. Carbon and nutrient exchange of mangrove forests with the coastal ocean. **Hydrobiologia**, v. 663, p. 23-50, 2011.

ALONGI, D.M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, p. 331–349, 2002.

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

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

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

ATIENZAR, F.A.; CORDI, B.; DONKIN, M.E.; EVENDEN, A.J.; JHA, A.N.;DEPLEDGE, M.H. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 1-12, 2000.

BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of Allium and Nicotiana in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 860-865, 2011.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review. **Environment International**, v. 48, p. 84–101, 2012.

BHAT, T.M.; ANSARI, M.Y.K.; CHOUDHARY, S.; ASLAM, R.; ALKA. 2011. Synergistic Cytotoxic Stress and DNA Damage in Clover (Trifolium repens) Exposed to Heavy Metal Soil from Automobile Refining Shops in Kashmir-Himalaya. **ISRN Toxicology, v.** 2011, p. 1-7, 2011.

BOULON, S.; WESTMAN, B.J.; HUTTEN, S.; BOISVERT, F.M.; LAMOND, A. The nucleolus under stress. **Molecular Cell**, v. 40, p. 216–227, 2010.

CANTY, M. N.; HUTCHINSON, T. H.; BROWN, R. J.; JONES, M. B.; JHA, A. N. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). **Aquatic toxicology**, v. 94, n. 1, p. 68-76, 2009.

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

DEASI, S.R.; VERLECAR, X.N.; ANSARI, Z.A.; JAGTAP, T.G.; SARKAR, A.; VASHISTHA, D.; DALAL, S.G. Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. **Water Research**, v. 44, n. 7, p. 2235-2244, 2010.

DERENZINI, M.; PASQUINELLI, G.; O'DONOHUE, M.F.; PLOTON, D.; THIRY, M.. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 131–145, 2006.

DUARTE, M.C.; GEERTZ-HANSEN, O.; THAMPANYA, U.; TERRADOS, J.; FORTES, M.D.; KAMP-NIELSEN, L.; BORUM, J.; BOROMTHANARATH, S. Relationship between sediment conditions and mangrove Rhizophora apiculata seedling growth and nutrient status. **Marine Ecology Progress Series**, v. 175, p. 277-283, 1998.

DUKE, N.C.; MEYNECKE, J.O.; DITTMANN, S.; ELLISON, A.M.; ANGER, K.; BERGER, U. 2007. A world without mangroves? **Science**, v. 317, n. 5834, p. 41-42, 2007.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; ESPINA, S.M.D.; RISUEÑO, M.C. Nucleolar activity in anoxic root meristem cells of *Allium cepa.* **Environmental and Experimental Botany**, v. 25, n. 3, p. 219-228, 1984.

FRANCIS.; F.J. **Handbook of food colorant patents**. Westport: Food and Nutrition Press, 1986.

FRIESS, D.A.; KRAUSS, K.W.; HORSTMAN, E.M.; BALKE ,T.; BOUMA, T.J.; GALLI, D. Are all intertidal wetlands naturally created equal? Bottlenecks, thresholds and knowledge gaps to mangrove and saltmarsh ecosystems. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 87, n. 2, p. 346–66, 2012a.

FRIESS, D.A.; PHELPS, J.; LEONG, C.R.; LEE, W.K.; WEE, A.K.S.; SIVASOTHI, N.; OH, R.R.Y.; WEBB, E.L. Mandai mangrove, Singapore: Lessons for the conservation of Southeast Asia's mangroves. **The Raffles Bulletin of Zoology,** n. 25, p. 55–65, 2012b. Supplement.

FROEHNER, S.; MACHADO, K.S.; STEFAN, E.; BLENINGER, T.; ROSA, E.C.D.; MARTINS, C.D.C. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 75-79, 2012.

GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. 2004. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation research**, v. 556, n. 1/2, p. 25-34, 2004.

GICHNER, T.; PATKOVÁ, Z.; KIM, J.K. DNA Damage Measured by the Comet Assay in Eight Agronomic Plants. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 2, p. 185-188, 2003.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAU, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M.; DIXON, D.R. Assessment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (Platynereis dumerilii) exposed to disinfected municipal sewage effluent. **Mutation Research**, v. 399, n. 1, p. 97-108, 1998.

JORDAN, E.G. Nucleolar nomenclature. **Journal of Cell Science**, v. 67, p. 217–220, 1984.

KEHRIG, H.A.; PINTO, F.N.; MOREIRA, I.; MALM, O. Heavy metals and methyl-mercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 5, p. 661-669, 2003.

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D.. Mangroves of Brazil. In: LACERDA, L. D. **Conservation and sustainable utilization of mangrove forests in Latin America and Africa regions**. Okinawa: International Society for Mangrove Ecosystems, 1993. p. 245-272.

KOOPEN, 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**, v. 360, n. 3, p. 193-200, 1996.

KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; MARCHAND, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: a review. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 2, p. 201-219, 2008.

LACERDA, L.D.; CARVALHO, C.E.V.; TANIZAKI, K.F.; OVALLE, A.R.C.; REZENDE, C.E. The biogeochemistry and trace metals distribution of mangrove rhizospheres. **Biotropica**, v. 25, n. 3, p. 252-257, 1993.

LANIER, C.; MANIER, N.; CUNY, D.; DERAM, A. The comet assay in higher terrestrial plant model: Review and evolutionary trends. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 6-20, 2015.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LIN, G.; STERNBERG, L.S.L. Effect of Growth Form, Salinity, Nutrient and Sulfide on Photosynthesis, Carbon Isotope Discrimination and Growth of Red Mangrove *(Rhizophora mangle* L.). **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 5, p. 509-517, 1992.

MACHADO, W.; MOSCATELLI, M.; REZENDE, L.G.; LACERDA, L.D. Mercury, zinc and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 2, p. 455-461, 2002a.

MACHADO, W.; SILVA-FILHO, E. V.; OLIVERIRA, R. R.; LACERDA, L.D. Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara Bay, SE Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 11, p.1277-1280, 2002b.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9796-9806, 2015.

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**, v. 493, n. 1/2, p. 87-93, 2001.

NAHRGANG, J.; CAMUS, L.; GONZALEZ, P.; GOKSØYR, A.; CHRISTIANSEN, J. S.; HOP, H. PAH biomarker responses in polar cod (Boreogadus saida) exposed to benzo(a)pyrene. **Aquatic toxicology**, v. 94, n. 4, p. 309-319, 2009.

NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; DE MIGUEL, M.; DE LA TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation research**, v. 389, n. 2/3, p. 271-277, 1997.

OLIVEIRA, M.; MARIA, V. L.; AHMAD, I.; TELES, M.; SERAFIM, A, BEBIANNO, M. J.; PACHECO, M. Golden grey mullet and sea bass oxidative DNA damage and clastogenic/aneugenic responses in a contaminated coastal lagoon. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 8, p. 1907–1913, 2010.

PESSENDA, L.C.R.; VIDOTTO, E.; OLIVEIRA, P.E.; BUSO, A.A.; COHEN, L.; CANCELA, M.; ROSSETTI, D.F.; RICARDI-BRANCO, F.; BENDASSOLLI, J.A. Late Quaternary vegetation and coastal environmental changes at Ilha do Cardoso mangrove, southeastern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaecology**, v. 363/364, p. 57-68, 2012.

POLIDORO, B.A.; CARPENTER, K.E.; COLLINS, L.; DUKE, N.C.; ELLISON, A.M.; ELLISON, J.C. The loss of species: mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10095, 2010.

RUCINSKA, R.; SOBKOWIAK, R.; GWOZDZ, E.A. Genotoxicity of lead in loupin root cells as evaluated by the comet assay. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, n. 3, p. 519-528, 2004.

RUIZ-SOLA, M.A.; ARBONA, V.; CADENAS-GÓMEZ, A.; RODRÍGUZ-CONCEPCIÓN, M.; RODRÍGUEZ-VILLALÓN, A. A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in arabidopsis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e90765, 2014.

SAENGER, P.; HEGERL, E.J.; DAVIE, J.D.S. Global status of mangrove ecosystems. **The Environmentalist**, v. 3, p. 7-80, 1983. Supplement, n. 3.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J.M.P.F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-18, 2015.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; DE CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian Coast. **Estuaries**, v. 13, n. 2, p. 204-218, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G. The Cananéia Lagoon Estuarine System, São Paulo, Brazil. **Estuaries**, v. 13, n. 2, p. 193-203, 1990.

SHAW, P. Nucleolus. In: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. Chichester : John Wiley & Sons, 2010.

SHAW, P.; BROWN, J. Nucleoli: composition, function, and dynamics. **Plant Physiology**, v. 158, n. 1, p. 44-51, 2012.

SHAW, P.; DONAN, J. The Nucleolus. Playing by different rules? **Cell Cycle**, v. 4, n. 1, p. 102-105, 2005.

SILVA, C.A.R.; LACERDA, L.D.; REZENDE, C.E. Metals reservoir in a red mangrove forest. **Biotropica**, v. 22, n. 4, p. 339-345, 1990.

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

SMITH, S.M.; SNEDAKER, S.C. Salinity responses in two populations of Viviparous Rhizophora mangle L. Seedlings. **Biotropica**, v. 27, n. 4, p. 435-440, 1995.

SOUZA, A.S.D.; TORRES, J. P. M.; MEIRE, R. O.; NEVES, R. C.; COURI, M. S.; SEREJO, C.S. Organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and crabs (*Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851) from mangroves of Guanabara Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. **Chemosphere**, v. 73, p. 186-192, 2008. Supplement .

SPALDING, M.D. **Patterns of biodiversity in coral reefs and mangroves: global and local scales**. 1998. Dissertation (Ph.D.). University of Cambridge.

SRIUSSADAPORN, C.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K.; SIMAZAKI, D. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. **Mutation Research**, v. 541, n. 1/2, p. 31-44, 2003.

STĘPIŃSKI, D. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1285-1306, 2014.

TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPOS, D. H., VENITT, S. (Ed.). **Environmental mutagenesis**. Oxford: BIOS Scientific, 1995. p. 315-339.

TRENDELENBURG, F.M.; SPRING, H.; SCHEER, U.;FRANKE, W.W. Morphology of Nucleolar Cistrons in a Plant Cell, Acetabularia mediterranea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 9, p. 3625-3630, 1974.

USSAMI, K.A. **Ensaio Cometa em microalgas marinhas: danos no DNA de *Dunaliella tertiolecta* (Butcher 1959) causados pela 4-nitroquinolina-1-óxida e benzo (a) pireno**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanografico, Universidade de São Paulo.

VALIELA, I.; BOWEN, J. L.; YORK, J. K. Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments. **Bioscience**, v. 51, n. 10, p. 807-15, 2001.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; BUTTAFAVA, A.; CARBONERA, D.; BALESTRAZZI, A. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2013.

VIGNARDI, C.P. **Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio em juvenis de pampos, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos citogenotóxicos**. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.

VIRGARDI, C.P.; HASUE, F.M.; SARTÓRIO, P.V.; CARDOSO, C.M.; MACHADO, A.S.D.; PASSOS, M.J.A.C.R.; SANTOS, T.C.A.; NUCCI, J.M.R.; HEWER, T.L.R.; WATANABE, L.; GOMES, V.; PHAN, N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell

uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish Trachinotus carolinus (Linnaeus, 1766). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 218–229, 2015.

WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutation Research**, v. 518, n. 1, p. 9–20, 2002.

WORLD RESOURCES INSTITUTE. **World resources**: 1996–97. Oxford: Oxford University Press, 1996.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 3 th ed. New Jersey: Prentice Hall.