



**ALINE SILVA FREITAS**

**EFEITO DO SPL (SPENT POT LINER) E DE  
SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES NO  
CRESCIMENTO RADICULAR, CICLO  
CELULAR E FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3  
NA SERINA 10, NO MODELO VEGETAL *Lactuca  
sativa* L.**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**ALINE SILVA FREITAS**

**EFEITO DO SPL (SPENT POT LINER) E DE SEUS PRINCIPAIS  
COMPONENTES NO CRESCIMENTO RADICULAR, CICLO  
CELULAR E FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3 NA SERINA 10,  
NO MODELO VEGETAL *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Vânia Helena Techio

Coorientadora

Dr<sup>a</sup>. Larissa Fonseca Andrade Vieira

**LAVRAS - MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Freitas, Aline Silva.

Efeito do SPL (*Spent Pot Liner*) e de seus principais componentes no crescimento radicular, ciclo celular e fosforilação da histona H3 na serina 10, no modelo vegetal *Lactuca sativa* L. / Aline Silva Freitas. – Lavras : UFLA, 2015.  
53 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. H3S10f. 2. Alteração celular. 3. Micronúcleos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ALINE SILVA FREITAS**

**EFEITO DO SPL (SPENT POT LINER) E DE SEUS PRINCIPAIS  
COMPONENTES NO CRESCIMENTO RADICULAR, CICLO  
CELULAR E FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3 NA SERINA 10,  
NO MODELO VEGETAL *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin Morales UNESP – Rio Claro

Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Mendes Costa UNILAVRAS

Dr<sup>a</sup>. Larissa Fonseca Andrade Vieira UFLA

Dr<sup>a</sup>. Vânia Helena Techio  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2015**

A Deus,

**OFEREÇO**

Aos meus pais, Nilson e Patrícia, ao meu irmão, Lucas, e a minha avó querida,  
pelo exemplo, apoio, carinho e amor incondicional.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo apoio e carinho, que tornaram mais fácil a conclusão dessa etapa.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos transmitidos e por elevarem cada vez mais o nível da pesquisa em nossa Universidade. Dentre esses quero destacar as professoras doutoras Lisete Chamma Davide e Giovana Augusta Torres pela participação ativa na minha formação profissional.

À professora doutora Larissa Fonseca Andrade Vieira, pelos conselhos, disponibilidade e atenção. Sua coorientação foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao doutorando Marcel Palmieri pela disponibilidade e ajuda com as análises estatísticas, o que foi essencial para realização do trabalho.

À professora doutora Vânia Helena Techio, agradeço pela confiança creditada a mim, pela orientação e, mais do que isso, pelos conselhos, dedicação e ensinamentos. Tudo que sou hoje profissionalmente, e também como pessoa, devo muito a essa profissional, da qual me orgulho muito de ser orientada por quase seis anos.

Agradeço a todos os amigos e amigas do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal de Lavras, pela convivência e auxílio. Certamente cada um contribuiu para que este trabalho fosse possível, o que comprova a importância do trabalho em equipe. Gostaria de destacar a amizade e o auxílio da doutoranda Cristina de Paula, que foi fundamental para a execução do trabalho. Obrigada à estudante de graduação Isabella que participou diretamente no desenvolvimento do trabalho.

À República Saia Justa por ser minha segunda família em Lavras.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia pela estrutura concedida para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, obrigado pela concessão da bolsa.

## RESUMO

O Spent Pot Liner (SPL) é um resíduo sólido proveniente da indústria de mineração e processamento de alumínio que é frequentemente descartado em aterros industriais e pode sofrer lixiviação e contaminar o solo, fontes de água potável e plantações, passando a representar riscos para a saúde humana e para os diversos ecossistemas. Sua composição é variável, destacando-se a presença de sais de cianeto, fluoreto e alumínio, considerados altamente tóxicos e poluidores ambientais. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do SPL e seus principais componentes sobre o crescimento radicular e ciclo celular de *Lactuca sativa* investigando os mecanismos das alterações cromossômicas e celulares por meio da imunolocalização. Para tanto, raízes recém-emergidas de *L. sativa* foram expostas por 48h ao SPL e diferentes constituintes do SPL (soluções de cianeto, fluoreto e alumínio) e ao CaCl<sub>2</sub> (controle) e submetidas à análise de ciclo celular por meio de técnicas de citogenética convencional e de imunolocalização. Os resultados mostraram que houve inibição de crescimento radicular para os tratamentos com SPL e alumínio e a ocorrência de anormalidades cromossômicas e nucleares para todos os tratamentos. Pela imunolocalização foram observadas células em divisão normal com distribuição espaço temporal regular da fosforilação da histona H3 na serina10 (H3S10f). Entretanto, foi verificado que o SPL e seus principais componentes inibiram a fosforilação da histona H3 na serina 10, inativando regiões pericentroméricas e afetando a coesão das cromátides irmãs. Além disso, induziram a formação de SF na região pericentromérica dos cromossomos.

Palavras-chave: H3S10f. Alteração celular. Anormalidades cromossômicas. Micronúcleos.



## ABSTRACT

The Spent Pot Liner (SPL) is a solid residue originated from the mining industry and aluminum processing and that is frequently discarded into industrial dumps. This residue may undergo leaching and contaminate the soil, springs and plantations, becoming hazardous to human health and many ecosystems. Its composition varies, highlighting the presence of cyanide, fluoride and aluminum salts, considered highly toxic and environmentally polluting. The objective of this study was to evaluate the effects of the SPL and its main over root growth and cell cycle *Lactuca sativa* investigating the mechanisms of chromosomal and cellular changes by means of immunolocalization. For this purpose, newly emerged seeds of *L. sativa* were exposed to SPL and its different components (cyanide, fluoride and aluminum solutions), as well as to CaCl<sub>2</sub> (control), for 48h, and subjected to cell cycle analysis by means of conventional cytogenetic and immunolocalization techniques. The results showed the inhibition of root growth in the treatments with SPL and aluminum, in addition to the occurrence of chromosomal and nuclear abnormalities in all treatments. With immunolocalization, we observed cells in normal division with regular space-temporal distribution of histone H3 in serine 10 phosphorylation (H3S10p). However, we verified that the SPL and its main components inhibited the phosphorylation of histone H3 in serine 10, inactivating the pericentromeric regions and affecting the cohesion of sister chromatids. Furthermore, they induced the formation of fragile sites in the pericentromeric region of the chromosomes.

Keywords: H3S10p. Cellular change. Chromosomal abnormalities. Micronuclei.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Toxicidade do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes</b>	13
<b>2.2</b>	<b>Bioensaios em vegetais</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Uso da citogenética para detecção de agentes tóxicos e mutagênicos.</b>	18
<b>2.4</b>	<b>O emprego da imunolocalização em estudos de genotoxicidade</b> .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b>Material vegetal e tratamentos com SPL</b> .....	24
<b>3.2</b>	<b>Análises do crescimento radicular</b> .....	24
<b>3.3</b>	<b>Análises do ciclo celular</b> .....	25
<b>3.4</b>	<b>Análises Estatísticas</b> .....	26
<b>3.5</b>	<b>Imunolocalização da Histona H3 fosforilada na serina 10</b> .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
<b>4.1</b>	<b>Análises do crescimento radicular e ciclo celular</b> .....	28
<b>4.2</b>	<b>Análise dos efeitos do SPL e seus principais componentes por meio da imunolocalização da fosforilação da serina 10 da Histona H3</b> .....	32
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de mineração e processamento de alumínio no Brasil é responsável pela produção de um milhão e meio de toneladas de alumínio por ano. A cada 1.000 toneladas produzidas são geradas mais de 29.000 toneladas de Spent Pot Liner (SPL), um resíduo sólido que frequentemente é descartado em aterros industriais (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA, 2012).

O SPL é formado por uma mistura de substâncias tóxicas dentre elas, sais de cianeto, fluoreto e alumínio, que são considerados altamente nocivos e poluidores ambientais. Além disso, por ser descartado em aterros industriais sem tratamento adequado, o SPL pode sofrer lixiviação e contaminar o solo, fontes de água potável e plantações, passando a representar grandes riscos para a saúde humana e para os diversos ecossistemas (CHANDRA et al., 2005; ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008).

Neste sentido, a fim de determinar os efeitos tóxicos do SPL nos seres vivos, bioensaios vegetais com os modelos *Lactuca sativa* L.(alface), *Allium cepa* L.(cebola) e *Zeamays* L. (milho) vêm sendo conduzidos (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE et al., 2011; ANDRADE-VIEIRA; CAMPO; DAVIDE, 2012; PALMIERI et al., 2014). Esses bioensaios realizados com sistema teste de vegetais superiores são amplamente utilizados em estudos de prospecção de efeitos de poluentes ambientais visto que, além de serem rápidos, baratos e sensíveis, apresentam correlação com modelos animais (GRANT et al., 1994).

Essas espécies vegetais mostraram-se altamente sensíveis quando expostas a diferentes tratamentos de SPL. Nos trabalhos realizados, foram observadas redução nas taxas de germinação e crescimento radicular, redução dos índices mitóticos e indução de anormalidades cromossômicas como pontes cromossômicas, c-metáfases, cromossomos perdidos e cromossomos pegajosos,

além de anormalidades nucleares, como a formação de micronúcleos, núcleos condensados e células polinucleadas (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE et al., 2011; PALMIERI et al., 2014).

Dentre as espécies submetidas ao SPL, *L. sativa* mostrou-se altamente eficiente para determinação do efeito tóxico do resíduo, além de apresentar cromossomos grandes e em número pequeno ( $2n=18$ ). Campos et al. (2008) observaram características que facilitam as análises citogenéticas e Andrade-Vieira, Campo e Davide (2012) observaram que este organismo teste apresenta também rápida germinação e alta prolificidade.

Porém nesses trabalhos não foram avaliados os efeitos do SPL em nível da molécula de DNA e organização molecular dos cromossomos. Logo é de grande valia, a utilização de novos parâmetros de análise que forneçam mais subsídios para elucidar os mecanismos de ação desse resíduo e seus principais constituintes em células vegetais. Sendo assim, a imunolocalização apresenta-se como uma ferramenta nova e promissora a ser utilizada em testes de citotoxicidade, fornecendo respostas sobre os mecanismos moleculares da formação das alterações observadas.

Diante do exposto, a imunolocalização é vista como uma metodologia adicional a ser aplicada em conjunto com os testes de aberrações cromossômicas para o melhor entendimento dos mecanismos de ação do SPL sobre as alterações relacionadas ao ciclo celular e à progressão da mitose. Dentre essas alterações, observam-se problemas relacionados à orientação dos cromossomos para placa metafásica e à segregação durante a anáfase, os quais também podem ser explicados via imunolocalização da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f).

A fosforilação da serina 10 da histona H3 está envolvida com a coesão das cromátides irmãs (KASZÁS; CANDE, 2000; SHIBATA; MURATA, 2004; PAULA et al., 2013) e, segundo Houben et al. (1999), essa modificação pós-

traducional é uma característica essencial na estrutura do centrômero/cinetócoro, necessária para garantir uma estabilidade mecânica ao centrômero durante o movimento cromossômico. Análises de cromossomos dicêntricos revelaram que H3S10 hiperfosforilada ocorre apenas no centrômero funcional (HOUBEN et al., 1999; HAN; LAMB; BIRCHLER, 2006; FU et al., 2012), indicando que se trata de uma marca epigenética para regiões (peri)centroméricas ativas (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013).

Destarte, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do SPL e de seus principais componentes sobre o crescimento radicular e ciclo celular de *L. sativa* investigando os mecanismos de formação das alterações cromossômicas e nucleares por meio da imunolocalização.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Toxicidade do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes**

O Spent Pot Liner (SPL) é um resíduo proveniente da indústria de mineração e do processamento de alumínio, gerado pelo desgaste do revestimento catódico das cubas de redução eletrolítica da alumina durante a obtenção do metal alumínio a partir de purificação e refino da bauxita (SILVEIRA et al., 2002). Esse resíduo é classificado como tóxico pela USEPA (United States Environmental Protection Agency) e como perigoso de classe I pela norma ABNT NBR10.004/04(SILVEIRA et al., 2003).

Palmieri et al. (2014), estudando o potencial tóxico e a composição química do SPL, observaram a presença de metais pesados como óxido de ferro, presente na forma de goethita e óxido de alumínio, compostos halogenados, como o fluoreto, traços de manganês, cromo, zinco e altas concentrações de sais de flúor e ferro no lixiviado. Além disso, evidenciou o caráter inorgânico do resíduo que também mostrou em condições ácidas, um alto potencial de lixiviar em solos degradados (como os industriais).

A composição do SPL é bastante variável com presença de cianetos, fluoretos, metais e materiais orgânicos, sendo os sais de cianeto, fluoreto e alumínio apontados como os principais componentes responsáveis por sua toxicidade (SILVEIRA et al., 2003). No ambiente, essas substâncias, quando em contato com a água, podem sofrer lixiviação e contaminar fontes de água potável, afetando plantações, diversos ecossistemas e até mesmo a saúde humana (CHANDRA et al., 2005).

O íon fluoreto ocorre em abundância no ambiente em combinação com outros elementos, normalmente constituindo rochas e solos (BARBIER; MENDOZA; RASO, 2010). Esse elemento pode ser encontrado em alimentos,

água fluorada, pastas de dente, mas principalmente, em lençóis subterrâneos contaminados por rejeitos de extração de material geológico. Em humanos, altas taxas de fluoreto podem causar a fluorose, uma doença em que os íons de fluoreto atacam as células ósseas e geram sintomas, como manchas nos dentes e deformidades esqueléticas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

A ação do fluoreto não é bem conhecida em plantas. No entanto, seu acúmulo pode causar alterações metabólicas, redução no crescimento e desenvolvimento da planta e lesões foliares que podem causar sua necrose (ABDALLAH et al., 2006; FRANZARING; KLUMPP; FANGMEIER, 2007). Além disso, o fluoreto impede a germinação de sementes, provoca inibição do crescimento radicular e altas taxas de anormalidades cromossômicas (presença de pontes e micronúcleos), indicando assim sua ação clastogênica, aneugênica e potencial indutor de morte celular (PALMIERI et al., 2014).

O cianeto é conhecido por ser tóxico para todos os organismos por inibir a respiração celular. É um contaminante ambiental de alguns sistemas aquáticos e terrestres em decorrência da sua presença em efluentes das indústrias de poliacrilonitrilas, de processamento de fármacos e de corantes e da extração de ouro e prata (FURTADO et al., 2007). Em sua forma livre ( $CN^-$ ), ele é mais tóxico do que quando associado, e pode formar sais e compostos simples ou complexos, quando associado com compostos orgânicos e metais. Suas formas mais comuns são o cianeto de potássio, cianeto de hidrogênio e cianeto de sódio. Todas as suas formas podem ser tóxicas quando em altas quantidades, sendo o cianeto de hidrogênio a mais perigosa, por ser altamente inflamável (ZIMMERMAN et al., 2007; DASH; GHOUR; BALOMAJUMDER, 2009). O cianeto faz parte de diversas vias metabólicas nas plantas. Estudos sugerem que em plantas vasculares existam enzimas que degradam substâncias tóxicas, agindo assim para reduzir contaminações por cianetos (EBBS et al., 2003).

Avaliações feitas em *L. sativa*, em que sementes foram expostas em soluções de cianeto dissolvidas em  $\text{CaCl}_2$  (0,001503g/L, 0,0031g/L e 0,004592g/L) por um período de 48 horas à temperatura de 24°C, detectaram a presença de C-metáfase no ciclo celular, mostrando o efeito aneugênico do cianeto que pode levar à formação de células aneuploides (PALMIERI et al., 2014).

O alumínio afeta diversos processos fisiológicos e celulares nas plantas, visto que pode se acumular nas suas células e formar aglomerados que impedem as suas funções básicas. Ele interfere no crescimento radicular, podendo estar relacionado com a interrupção da divisão celular, afetar o desenvolvimento de pelos nas raízes, diminuindo a aquisição de nutrientes pela planta. A exposição prolongada de células vegetais e animais ao alumínio pode provocar danos ao núcleo, atingindo a composição do DNA, a estrutura da cromatina e suas funções (SILVA et al., 2000; FRANTZIOS; GALATIS; APOSTOLAKOS, 2001; CIAMPORAVA, 2002).

Os efeitos do alumínio já foram avaliados em espécies vegetais cultivadas como feijão, arroz, trigo e milho, sendo observada redução do crescimento e da frutificação (TASSIST et al., 2010). Campos et al. (2008) verificaram forte inibição do crescimento e índice mitótico, além da presença de anormalidades cromossômicas, em espécies de *Z. mays* e *A. cepa* tratadas com alumínio. Em *L. sativa*, observou-se sua forte ação clastogênica devido à presença de alterações cromossômicas como pontes e micronúcleos e sua interferência no índice mitótico provocado pela redução do crescimento radicular (PALMIERI et al., 2014). Em humanos, a toxicidade com alumínio pode estar associada a doenças neurodegenerativas graves, como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (GARRUNTO; YANAGIHARA; GAJDUSEK, 1990; CHAPUIS; FAVIER, 1999).



A relação que essas substâncias possuem com o solo e sua atuação nos organismos é de grande interesse no estudo da toxicidade do SPL, principalmente do seu lixiviado, que possui alto potencial tóxico. Desta forma, é de extrema importância o cuidado com seu descarte, já que depósitos de SPL a céu aberto, por exemplo, representam riscos tanto para a saúde humana quanto para os ecossistemas (PALMIERI et al., 2014).

A toxicidade do SPL já foi comprovada em modelos vegetais, que tiveram redução em seu enraizamento, crescimento radicular e índice mitótico quando expostas a diferentes concentrações de SPL. Também foram observadas anormalidades cromossômicas em todas as fases do ciclo celular e a presença de núcleos condensados, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e distúrbios enzimáticos, indicando morte celular programada (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE et al., 2011; ANDRADE-VIEIRA; CAMPO; DAVIDE, 2012; PALMIERI et al., 2014).

## **2.2 Bioensaios em vegetais**

A necessidade de detectar os danos genéticos (seja em nível de DNA, cromossômico ou genômico) causados por compostos tóxicos, tem gerado o desenvolvimento de vários testes biológicos. Nesse contexto, os vegetais são importantes bioindicadores de poluição, por apresentarem uma série de alterações que podem ser avaliadas (alterações na estrutura dos cromossomos, na ploidia e na estrutura do DNA) e alta sensibilidade a agentes mutagênicos permitindo a análise de vários mecanismos de ação, englobando mutações pontuais e aberrações cromossômicas em diferentes células (LEME; MARIN-MORALES, 2009; KUMARI et al., 2011).

Testes de germinação seguidos da avaliação do crescimento radicular são comumente empregados para avaliar os efeitos fitotóxicos de contaminantes ambientais nos organismos vegetais. Os efeitos desses compostos tóxicos são avaliados durante os primeiros dias de crescimento e os testes considerados simples, rápidos, confiáveis e de baixo custo. A aplicação desses testes é de grande valor, principalmente quando associada a testes citogenéticos, que permitem respostas em nível celular e de DNA (GOPALAN, 1999; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

Várias espécies vegetais têm sido utilizadas em análises de contaminação ambiental: *L. sativa*, *Vicia faba*, *Z. mays*, *Tradescantia* sp., *Nicotiana tabacum* e *A. cepa*, sendo esta última a mais utilizada (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008). O modelo vegetal *A. cepa* apresenta boas condições para avaliação, por possuírem cromossomos grandes e em pequeno número ( $2n=2x=16$ ), facilitando as análises do ciclo celular e visualização das alterações cromossômicas. Além disso, já foi observado que as plantas mostram-se altamente sensíveis para a detecção de substâncias químicas, sendo comparada aos testes feitos com linfócitos humanos (FISKESJÖ, 1993; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Em estudos com SPL, a *L. sativa* mostrou ser um ótimo bioindicador, apresentando alta sensibilidade, devido à inibição da germinação e do crescimento de sementes, altas taxas de anormalidades cromossômicas e baixos valores de índice mitóticos das células. Além disso, assim como *A. cepa*, essa espécie é uma das mais utilizadas em bioensaios, pela facilidade das análises de dados macro e microscópicos, por apresentar rápida germinação e por ser um ótimo indicador de toxicidade em solos (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; PALMIERI et al., 2014).

Um parâmetro importante a ser estudado quando se trabalha com bioindicadores, é a determinação do IC<sub>50</sub> (Inibição de Crescimento 50%), que

corresponde à avaliação da concentração de um dado agente que reduz em 50% o tamanho das raízes do modelo testado em relação ao tratamento controle. Esse valor é altamente representativo por refletir o efeito tóxico do agente testado sem inibição severa do crescimento radicular, sendo um teste importante para se obter raízes a serem utilizadas nas avaliações citogenéticas (LING; XING, 2007). Palmieri et al. (2014) determinaram a concentração de 26,5 g/L de SPL (diluído em CaCl<sub>2</sub>) como sendo o IC<sub>50</sub> em seus estudos de toxicidade do SPL em *L. sativa* (alface).

### **2.3 Uso da citogenética para detecção de agentes tóxicos e mutagênicos**

A citogenética é uma área da ciência que estuda a hereditariedade com bases citológicas, tendo como objetivo estudar a estrutura (número e forma) e comportamento (organização e movimentação) dos cromossomos/ cromatina no contexto da célula. Além disso, preocupa-se com a função dos cromossomos e suas implicações na transmissão, recombinação e expressão gênica (SUMNER, 2003). Ela tem aplicações em estudos evolutivos, citotaxonômicos, medicina clínica, melhoramento genético e em estudos de toxicidade ambiental. Neste último, a citogenética vem sendo bastante aplicada em avaliações de toxicidade de diversos compostos através de análises de ciclo celular e índice mitótico de organismos modelos (DHO et al., 2010; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE, 2011; KLANCNIK et al., 2011; KUMARI et al., 2011).

A análise do ciclo celular fornece informações sobre a organização e o comportamento dos cromossomos durante a divisão, e em análises de toxicidade, permite a detecção de anormalidades, como as aberrações cromossômicas e nucleares (GRANT, 1994; ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

O estudo de aberrações cromossômicas é um dos métodos mais antigos utilizados em avaliações de efeitos mutagênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Aberrações cromossômicas são consideradas quaisquer alterações na estrutura ou no número dos cromossomos e podem ser derivadas de quebras, inibição da síntese ou replicação alterada do DNA de modo espontâneo ou induzidas por exposição a agentes químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As alterações provocadas por agentes químicos e físicos podem surgir por efeitos clastogênicos, como as quebras e pontes cromossômicas ou por efeitos aneugênicos, que inativam ou alteram algumas estruturas celulares, como os microtúbulos e os centrômeros. Desta forma, elas provocam mudanças no ciclo celular que são responsáveis pela formação de células poliploides e anomalias celulares. (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Quebras no DNA podem causar alterações estruturais nos cromossomos, como as deficiências, duplicações, inversões e translocações. Já os efeitos no fuso mitótico e nos centrômeros afetam a segregação dos cromossomos durante a divisão celular, que causam alterações numéricas, como as euploidias e aneuploidias (SUMNER, 2003). Várias dessas alterações são altamente prejudiciais às células, muitas vezes irreversíveis fazendo com que a célula entre em processo de morte celular (PALMIERI et al., 2014).

Análises de anormalidades nucleares têm sido incluídas nos estudos da toxicidade de agentes químicos, sendo caracterizadas como alterações morfológicas no núcleo interfásico, como núcleos lobulados, polinúcleos e minicélulas (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A presença de C-metáfases indica ação aneugênica porque é resultante de alterações no funcionamento do fuso mitótico e divisão celular anormal que podem culminar com a formação de células aneuploides (FENECH, 2000). Os

cromossomos pegajosos ocorrem devido a mudanças na estrutura cromossômica que promove a perda de características normais de condensação e formação de aglomerados. Eles podem ocasionar perdas cromossômicas, visto que o processo de divisão fica alterado e alguns cromossomos não se aderem ao aglomerado de cromossomos sendo então perdidos durante o ciclo celular (SILVA; FONSECA, 2003). A presença de pontes é uma evidência de clastogenicidade, visto que ela é o resultado de eliminação ou perda de telômeros e podem produzir quebras nos cromossomos e gerar fragmentos (PANDA; PANDA, 2002).

Os micronúcleos (MN) são considerados excelentes indicadores de toxicidade, e, por esse motivo, são as alterações mais estudadas. Os MNs são estruturas presentes no citoplasma que contém cromatina, revestido por um envoltório nuclear e sem ligação com o núcleo principal. Essas estruturas podem ser originadas pela eliminação de cromossomos inteiros (atividade aneugênica) ou por fragmentos cromossômicos (atividade clastogênica) durante o processo de divisão celular (FENECH, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Trabalhos relacionados com ação citogenotóxica de SPL, como os de Andrade, Davide e Gedraite (2010) e Palmieri et al. (2014), mostraram alta taxa de MNs nas células de *L. sativa* expostas em soluções contendo o SPL e seus principais componentes.

Outro indicador de toxicidade é a morte celular programada (PCD). A morte celular programada é a capacidade que a planta possui de eliminar células danificadas, sendo um processo geneticamente definido e associado com as alterações morfológicas e bioquímicas das células (DANON et al., 2000; XIONG; LI; LI, 2006). Os principais indícios de morte celular programada em plantas são a condensação cromatídica, que pode ser evidenciada pela presença de cromossomos pegajosos e a fragmentação celular (DANON et al., 2000).

## 2.4 O emprego da imunolocalização em estudos de genotoxicidade

A imunodeteção ou imunolocalização é uma ferramenta importante nos estudos de citogenética, visto que permite analisar modificações nas proteínas ligadas à cromatina durante a divisão celular, fazendo uso de anticorpos específicos para determinadas proteínas, tais como para fosforilação na serina 10 e 28 da H3, na serina 1 da H4, na serina 1 da H2A; acetilação na lisina 9 da H3, na lisina 4 e 5 da H4 e metilação da lisina 5 da H3 (PAWLAK; DECKERT, 2007). Além disso, a imunolocalização pode fornecer elementos que possibilitam o entendimento dos mecanismos de ação celular de diversos contaminantes sobre as células, constituindo mais um parâmetro a ser inserido nos testes usados para monitoramento de toxicidade.

As proteínas histônicas podem sofrer inúmeras alterações pós-traducionais, que refletem significativamente sobre a estrutura e função da cromatina e estão correlacionadas com funções biológicas particulares que regulam a expressão gênica, ativação ou silenciamento de genes (JIN et al., 2008). Essas modificações são conhecidas como um dos mecanismos epigenéticos, que podem alterar a função do genoma sobre influência exógena. Investigações em humanos e animais identificaram que essas alterações podem ser provocadas por vários estresses ambientais, como a presença de metais pesados, irradiação UV, proliferadores de peroxissomas, poluentes do ar e salinidade (PAWLAK; DECKERT, 2007; BACARELLI; BOLLATI, 2009).

As modificações nas histonas ocorrem, predominantemente, nas caudas N-terminais, as quais estão sujeitas a mudanças dinâmicas e covalentes, tais como: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deaminação e isomerização de prolina, que geralmente estão associadas com funções distintas e que podem influenciar a estrutura da

cromatina e a expressão de genes (PAWLAK; DECKERT, 2007; BACARELLI; BOLLATI, 2009).

Nas histonas, a metilação ocorre principalmente nas cadeias laterais da lisina e arginina, e tem sido elucidada para as histonas H3 e H4. Segundo Chen et al. (2006) e Pawlak e Deckert (2007), o níquel influencia sobre o padrão da histona em leveduras e células animais, mostrando que ele levou ao aumento de dimetilação da lisina 9 da H3, a qual está associada ao silenciamento do gene.

A acetilação das histonas desempenha um importante papel no processo de transcrição, visto que as acetilases conduzem a descondensação da cromatina ativando o processo de iniciação e alongação da transcrição. Nesse contexto, metais pesados como o níquel e o cobre atuam inibindo a acetilação e provocando silenciamento da expressão gênica em leveduras e em células animais (PAWLAK; DECKERT, 2007). Foram observadas em células pulmonares de humanos expostas ao níquel perda de acetilação das histonas H2A, H2B, H3 e H4, bem como aumento da ubiquitinação da H2A e H2B e aumento de dimetilação da H3K9 (BACARELLI; BOLLATI, 2009).

A fosforilação é observada em resíduos de serina e treonina para todas as histonas e pode estar associada com a condensação e/ou segregação cromossômica, transcrição e reparo de danos ao DNA e ativação da apoptose. Embora não tenha registros de inibição da fosforilação da H3 em plantas, causada por metais, a presença de respectivo resíduo de aminoácido na histona de plantas (histidina 18 na histona H3) torna esse processo possível (PAWLAK; DECKERT, 2007).

A maioria dos estudos que relata a toxicidade de substâncias químicas como mediadoras de alterações epigenéticas tem-se concentrado sobre a metilação do DNA, enquanto algumas investigações têm sido feitas em relação às modificações de histona e microRNA (BACARELLI; BOLLATI, 2009).

Trabalhos têm demonstrado que os metais podem alterar tanto a transcrição do DNA quanto a expressão gênica devido à alteração na conformação das histonas, porém as informações sobre o papel das histonas em relação aos estresses ambientais são ainda insuficientes.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal e tratamentos com SPL

Sementes de *L. sativa* var. Lechuga Grandes Lagos da empresa ISLA foram utilizadas como sistema teste modelo. O SPL utilizado para preparar as soluções teste foi proveniente de uma indústria de mineração e processamento de alumínio situado no Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. As concentrações de SPL e de seus principais componentes referente aos tratamentos apresentados na Tabela 1 foram baseadas no IC<sub>50</sub> (50% inibição de crescimento) determinado por Palmieri et al. (2014). As soluções preparadas seguiram os métodos de absorção descritos também pelo mesmo autor.

Tabela 1 Tratamentos com SPL e seus principais componentes, aplicados em sementes de *Lactuca sativa*

Controle negativo	CaCl <sub>2</sub>
Tratamento 1	SPL na concentração do IC <sub>50</sub> (26,5g/L)
Tratamento 2*	Solução de alumínio (0,004588g/L)
Tratamento 3*	Solução de cianeto (0,0031g/L)
Tratamento 4*	Solução de fluoreto (0,3938g/L)

\* Concentrações dos tratamentos baseadas na quantidade do elemento encontrada na concentração do IC<sub>50</sub> (50% inibição de crescimento) de SPL segundo Palmieri et al. (2014).

#### 3.2 Análises do crescimento radicular

O experimento foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) contendo dez placas de Petri de cada tratamento. Cada placa continha trinta sementes de *L. sativa* colocadas primeiramente sobre papel de germinação com 5mL de água, totalizando 50 placas. Após a germinação e

emissão de raiz de 1 a 2mm, foi feita a mensuração do comprimento das raízes, utilizando um paquímetro digital, e as mesmas foram colocadas em outras placas de Petri, contendo 5mL das soluções testes (Tabela 1). As placas de Petri com os tratamentos foram mantidas por 48 horas em uma BOD a 24°C.

Nos períodos de 24 e 48 horas após exposição aos tratamentos, as raízes de cada semente foram medidas para ser calculado o crescimento radicular médio de cada placa pela diferença do comprimento médio das raízes antes e após a exposição (de 24 ou 48h).

### **3.3 Análises do ciclo celular**

Sementes de *L. sativa* germinadas em placas de Petri com papel filtro umedecido em água destilada contendo raízes de 1 a 2mm foram submetidas aos tratamentos (Tabela 1) por 48h em BOD, no escuro a uma temperatura de 24°C.

Após as 48h de exposição, às raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy (etanol/ácido acético, 3:1) por um período mínimo de 24 horas. Para preparo da lâmina, as raízes fixadas foram lavadas, hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10min, e esmagadas emorceína acética 2%.

Foram avaliadas 10 lâminas por tratamento e 500 células por lâmina, totalizando 5.000 células por tratamento. Foram observadas e anotadas as diferentes fases da divisão mitótica bem como possíveis alterações cromossômicas e nucleares e anotadas. Foram obtidos, conforme Andrade, Campos e Davide (2008), os seguintes parâmetros: índice mitótico (IM), calculado pela razão do número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento e a frequência de alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), calculadas pela razão do número de alteração (cromossômica e nuclear, respectivamente) pelo número total de células avaliadas.

### 3.4 Análises Estatísticas

As médias de crescimento obtidas por placa, assim como os parâmetros obtidos na análise de ciclo celular (IM, AC e AN), foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de média de *Kruskal Wallis* no *software* livre “R” (R *Development Core Team*, 2014).

### 3.5 Imunolocalização da Histona H3 fosforilada na serina 10

Após os tratamentos realizados conforme descrito no item 4.3, as raízes foram coletadas e submetidas à técnica de imunolocalização, seguindo o protocolo descrito por Manzanero et al. (2000), com algumas modificações (PAULA et al., 2013).

A fixação foi realizada por 40 minutos em temperatura ambiente em solução de para formaldeído 4% contendo PBS (Posphate Buffer Saline)1x. Após essa etapa, as raízes passaram por tratamento enzimático (celulase: pectinase (100U:200U) + pectoliase) durante uma hora e meia, a 37°C. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento, sendo utilizado PBS 1x como meio de montagem e para a realização das lavagens.

Para evitar a marcação não específica do anticorpo, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em 50µL de PBS contendo solução bloqueadora BSA (Albumina de soro bovino) 3% e Triton x-100 0,1% em temperatura ambiente. Posteriormente foi aplicado sobre as lâminas 25µL/lâmina de solução contendo anticorpo primário da H3S10f (Rabbit polyclonal IgG, Sta Cruz Biotechnology, USA) e solução bloqueadora (1:100). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por, no mínimo, 16 horas a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em PBS 1x e aplicado sobre a preparação 25 µL/lâmina da mistura de anticorpo secundário (Goatanti-rabbit IgG-FITC, Sta Cruz

Biotechnology, USA) e solução bloqueadora (1:100). As lâminas foram mantidas em câmara úmida, por 3 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem das lâminas em tampão PBS 1x, as mesmas foram contra coradas e montadas em uma solução de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield H-1000 (1:100) e armazenadas em caixa escura.

A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para o DAPI e 495/515 para a FITC (Fluorescência isocianetada). O padrão de distribuição da H3S10f foi determinado a partir das observações dos eventos de ocorrência e não ocorrência da imunolocalização, e contagem das anormalidades cromossômicas. Nesta etapa, foram avaliadas cinco lâminas por tratamento. A imunolocalização foi realizada para ratificar as observações feitas pela coloração convencional e visando observar efeitos do SPL sobre a fosforilação da serina 10 na histona H3.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises do crescimento radicular e ciclo celular

Os dados de crescimento radicular médio (CR), índice mitótico (IM), média de alterações cromossômica (AC) e média de núcleos condensados (NC) estão apresentados na Tabela 2. Para o CR, foi verificado que os tratamentos com alumínio e SPL diferiram significativamente em comparação com o controle, com redução do crescimento da raiz expresso em 32,92% e 39,64%, respectivamente. Os tratamentos com cianeto e fluoreto não afetaram significativamente o crescimento radicular. Entretanto, para o IM, o cianeto foi o único dos tratamentos com diferença significativa.

Em comparação com o controle, os testes demonstraram que o SPL e seus componentes isolados provocaram efeitos significativos. Entretanto, a frequência de alterações cromossômicas total foi significativamente igual para todos os tratamentos (Tabela 2).

Em relação à presença de NC, com exceção do alumínio, os demais tratamentos diferiram do grupo controle, sendo mais expressivo para o SPL (Tabela 2).

A análise detalhada das ACs mostrou que a metáfase foi a fase do ciclo celular mais afetada pela exposição ao SPL e seus principais componentes. Foram observadas, em diferentes frequências, efeitos diversos tais como: cromossomos pegajosos, c-metáfases, fragmentos e cromossomos não orientados (Tabela 3). Nos tratamentos com alumínio e fluoreto, observou-se frequência de cromossomos não orientados superior à observada para SPL e cianeto (Tabela 3, Figura 1A). A ocorrência de fragmentos cromossômicos foi significativamente igual para todos os tratamentos (Tabela 3, Figura 1B). A frequência de cromossomos pegajosos foi significativamente diferente em

ralação ao controle para os tratamentos com SPL, cianeto e fluoreto, sendo maior para células tratadas com o fluoreto (Tabela 3, Figura 1C), sendo maior para o fluoreto e o cianeto. Entre todos os tratamentos, o SPL mostrou maior efeito como indutor de C-metáfases e o fluoreto para a formação de pontes (Tabela 3, Figuras 1D; 1E). Todos os tratamentos induziram, de forma semelhante, a formação de micronúcleos, não diferindo significativamente ao controle (Tabela 3, Figura 1F).

Tabela 2 Crescimento Radicular médio em mm (CR), Índice Mitótico (IM), média de Alterações Cromossômicas (AC) e Núcleos Condensados (NC) para cada tratamento

Tratamentos	CR	IM	AC	NC
Controle	12,18 ± (0,45) <sup>a</sup>	21,32 ± 4,70 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,63 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>
Alumínio	8,17 ± (0,52) <sup>b</sup>	20,71 ± 4,41 <sup>b</sup>	2,17 ± 1,47 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,17 <sup>d</sup>
Cianeto	11,22 ± (1,27) <sup>a</sup>	31,04 ± 4,39	2,64 ± 1,81 <sup>b</sup>	0,58 ± 1,00 <sup>c</sup>
Fluoreto	12,21 ± (0,30) <sup>a</sup>	22,19 ± 6,10 <sup>b</sup>	2,91 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,85 ± 1,10 <sup>b</sup>
SPL	7,35 ± (0,81) <sup>b</sup>	19,44 ± 4,87 <sup>b</sup>	2,89 ± 1,31 <sup>b</sup>	3,77 ± 1,19 <sup>a</sup>

Médias seguidas de desvio padrão. Valores com letras diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Kruskal Wallis para significância de  $p < 0,05$ .

Tabela 3 Médias das alterações cromossômicas observadas em relação ao total de alterações encontradas para cada elemento, a cada mil células

<b>Anormalidades Cromossômicas</b>	<b>Cianeto</b>	<b>Alumínio</b>	<b>Fluoreto</b>	<b>SPL</b>	<b>Controle</b>
Cromossomos não orientados	2,77 A	3,7 B	4,51 B	2,2 A	0,73 A
Fragmentos	1,14 A	2,0 A	0,38 A	1,2 A	0,18 A
Cromossomos pegajosos	12,8 BC	4,9 AB	13,01 C	9,83 BC	1,44 A
C-metáfases	4,36 AB	4,8 BC	3,82 AB	12,69 C	0,94 A
Pontes	5,3 BC	4,78 B	6,56 C	3,82 B	1,84 A
Micronúcleos	0,55 B	0,43 B	0,60 B	0,61 B	0,13 A

\*Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem entre si para cada anormalidade pelo teste de Kruskal Wallis para significância de  $p < 0,05$ .

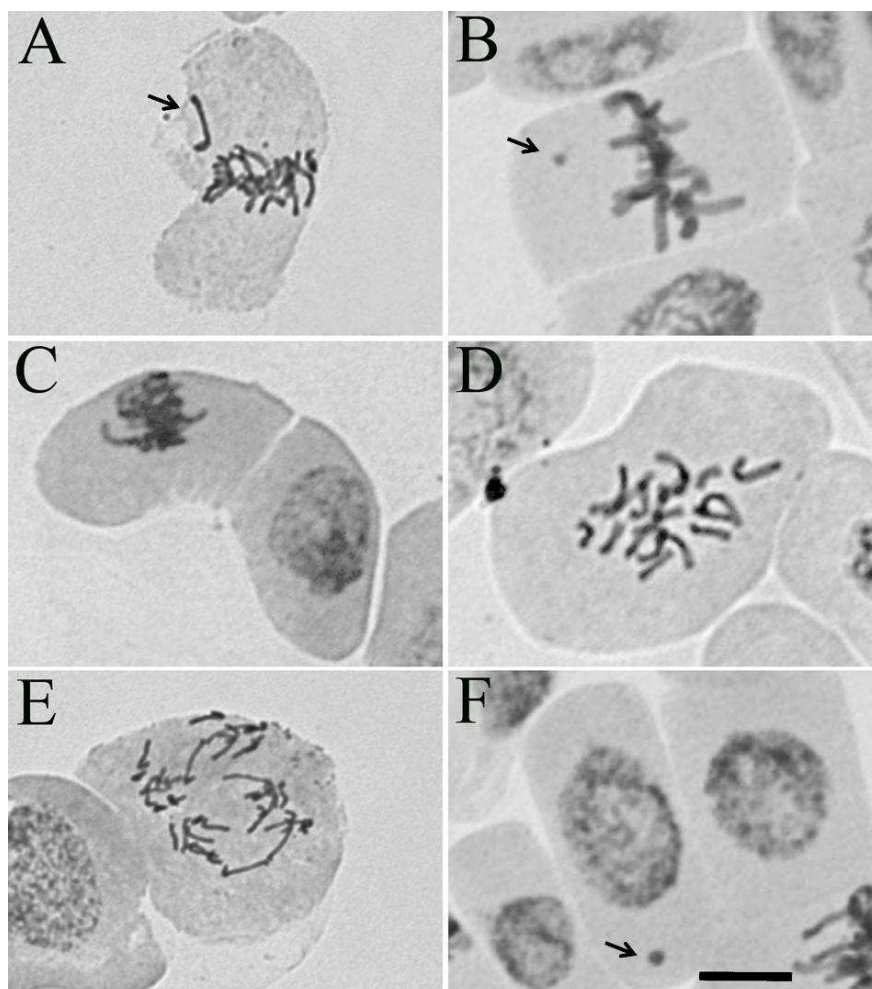


Figura 1 Exemplo das anormalidades cromossômicas observadas após exposição ao SPL e seus principais componentes por coloração convencional. a) Cromossomo não orientado (seta); b) Metáfase com fragmento, seta indicando o fragmento; c) Cromossomos pegajosos; d) C-Metáfase; e) Anáfase com pontes f) Célula interfásica com micronúcleo (seta)

Nota: A barra representa 30  $\mu\text{m}$ .



#### **4.2 Análise dos efeitos do SPL e seus principais componentes por meio da imunolocalização da fosforilação da serina 10 da Histona H3**

As análises com imunolocalização mostraram que, em todos os tratamentos, existem células em divisões normais, com padrão de distribuição espaço-temporal regular da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) (Tabela 4, Figura 2) com a localização pericentromérica típica. A marcação é ausente em intérfase (Figura 2A), aparecendo inicialmente em prófase (Figura 2B), prosseguindo na prometáfase (Figura 2C) e permanecendo na metáfase (Figura 2D). Na anáfase, o sinal da H3S10f apresenta menor intensidade (Figura 2E) e começa a desaparecer, de forma gradual, na telófase (Figura 2F).

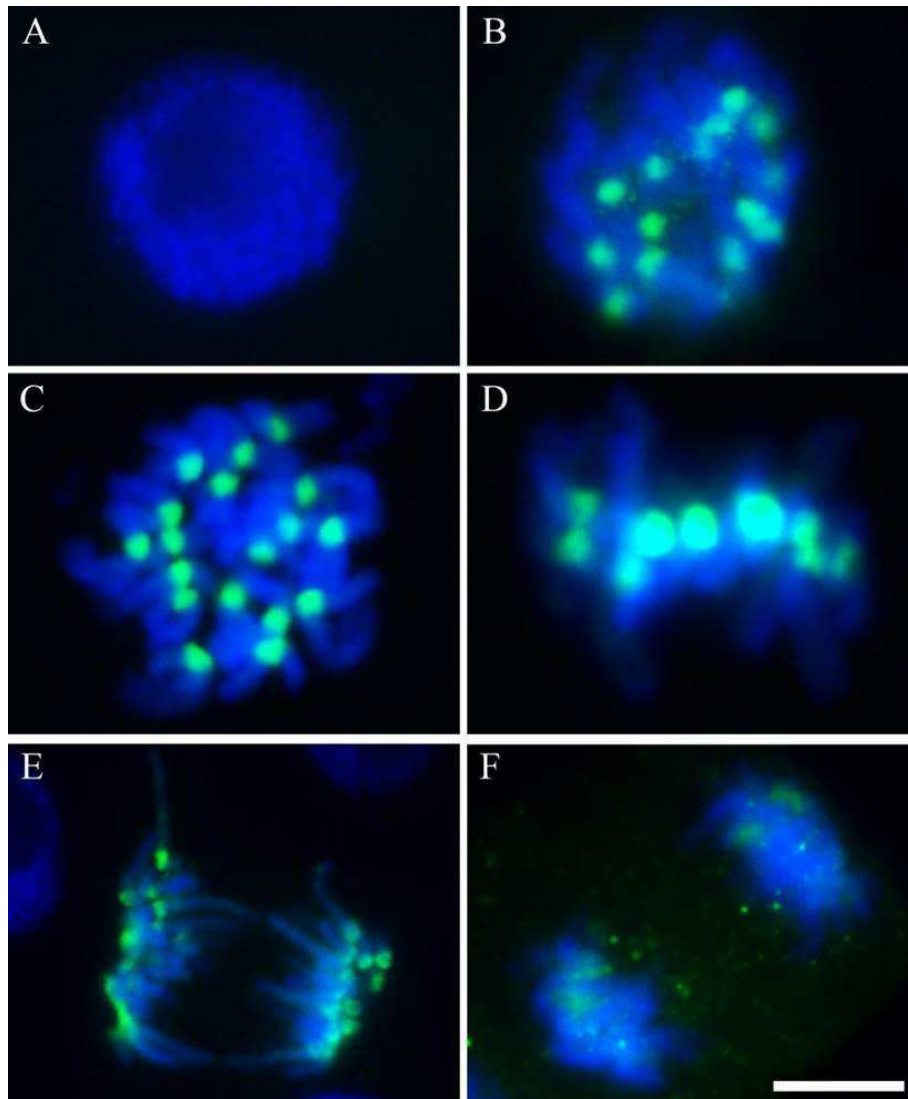


Figura 2 Ciclo mitótico normal com padrão de distribuição da H3S10f típica. a) célula em intérfase com ausência de fosforilação da H3S10; b) Prófase mostrando o início do aparecimento dos sinais; c) Prometáfase com sinais da H3S10f pericentroméricos característicos; d) Metáfase mostrando os sinais na placa equatorial; e) Anáfase com sinal da H3S10f apresentando menor intensidade e f) Telófase com menor intensidade do sinal de fosforilação da H3S10

Nota: A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Para as células com AC, foi verificado que, em todos os tratamentos, havia distribuição regular H3S10f, mas também ocorriam células com ausência ou número reduzido de fosforilação da histona H3 na serina 10, em diferentes frequências (Tabela 4). Nos tratamentos com cianeto e SPL, foram observadas as maiores frequências de células com problemas sobre a fosforilação da H3 na serina 10, as quais apresentavam ausência ou número reduzido de sinais fosforilação (77,27% e 58,62%, respectivamente). O menor impacto foi observado nas células tratadas com fluoreto.

Tabela 4 Porcentagem de células com alterações cromossômicas (AC) em função da fosforilação da serina 10 da histona H3

Tratamentos	Total de células	H3S10f	H3S10f*
Cianeto	19	22,73%	77,27%
Alumínio	34	55,88%	44,12%
Fluoreto	12	83,33%	16,67%
SPL	29	41,38%	58,62%

\*Ausência ou número reduzido de sinais da H3S10f.

Dentre as células com AC, observou-se que aquelas em que foram encontrados cromossomos pegajosos (Figura 3A), os sinais de fosforilação da H3S10 apareceram em menor número e intensidade de fluorescência. Além disso, estes sinais apareciam de forma difusa por toda a célula, diferindo do comportamento típico das marcações pericentroméricas dos cromossomos orientados na placa equatorial como observado na metáfase normal (Figura 2D).

As C-metáfases, de modo geral, apresentavam 18 marcações pericentroméricas de H3S10f, sendo essas consideradas normais, por apresentarem o número de marcações esperado para a espécie que possui 18 cromossomos (Figura 3C).

As metáfases poliploides observadas em células tratadas com fluoreto, cianeto e alumínio (Figura 3B) foram caracterizadas por apresentarem número de marcações pericentroméricas da H3S10f acima de 18. Algumas metáfases e pró-metáfases apresentavam cromossomos ou fragmentos com e sem sinais de fosforilação (Figuras 3D; 4A e B e 4C). Além disso, foram observadas quebras na região pericentromérica em pró-metáfases analisadas (Figura 4Ae 4B). Cromossomos não orientados, apresentando sinal de fosforilação, foram também observados (Figura 4D).

Outra evidência dos efeitos dos tratamentos sobre essa modificação pós-traducional foi observada nas anáfases com cromossomos ou fragmentos perdidos, sem os sinais pericentroméricos característicos da fosforilação (Figura 3E). Além disso, foi observada anáfase com fuso tripolar que apresentava, em todos os polos, cromossomos com sinais da fosforilação (Figura 3F). Células com micronúcleos também foram observadas, e estes não apresentaram marcação de H3S10f (Figura 4E e 4F).

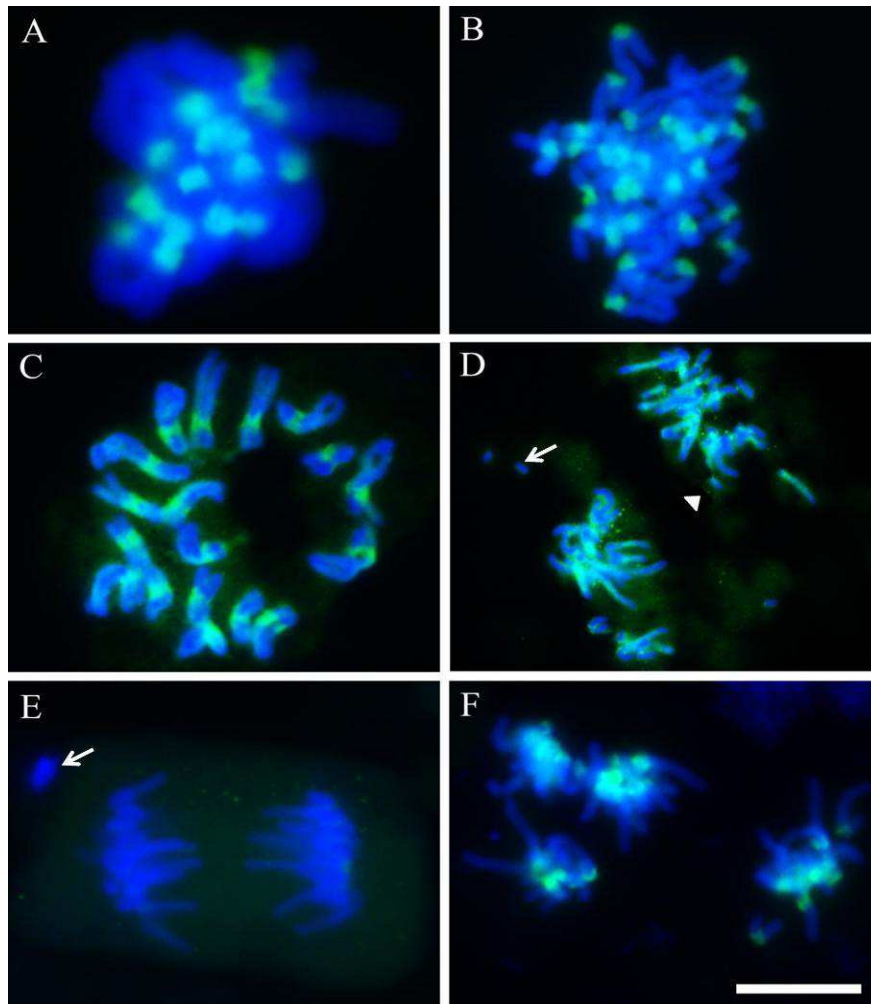


Figura 3 Anormalidades do ciclo celular evidenciadas pela imunolocalização da H3S10f. a) Cromossomos pegajosos com sinais de fosforilação difusos e em menor número b) Célula poliploide com número de sinais de fosforilação superior a 18; c) C-metáfase com 18 sinais pericentroméricos; d) Metáfases com fragmentos com e sem sinal de fosforilação; e) Anáfase com cromossomo ou fragmento perdido sem sinal de fosforilação; f) Anáfase multipolar com sinais de fosforilação em todos os polos. Setas indicam fragmentos ou cromossomos sem sinal e pontas de seta, fragmentos ou cromossomos com sinal de fosforilação

Nota: A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

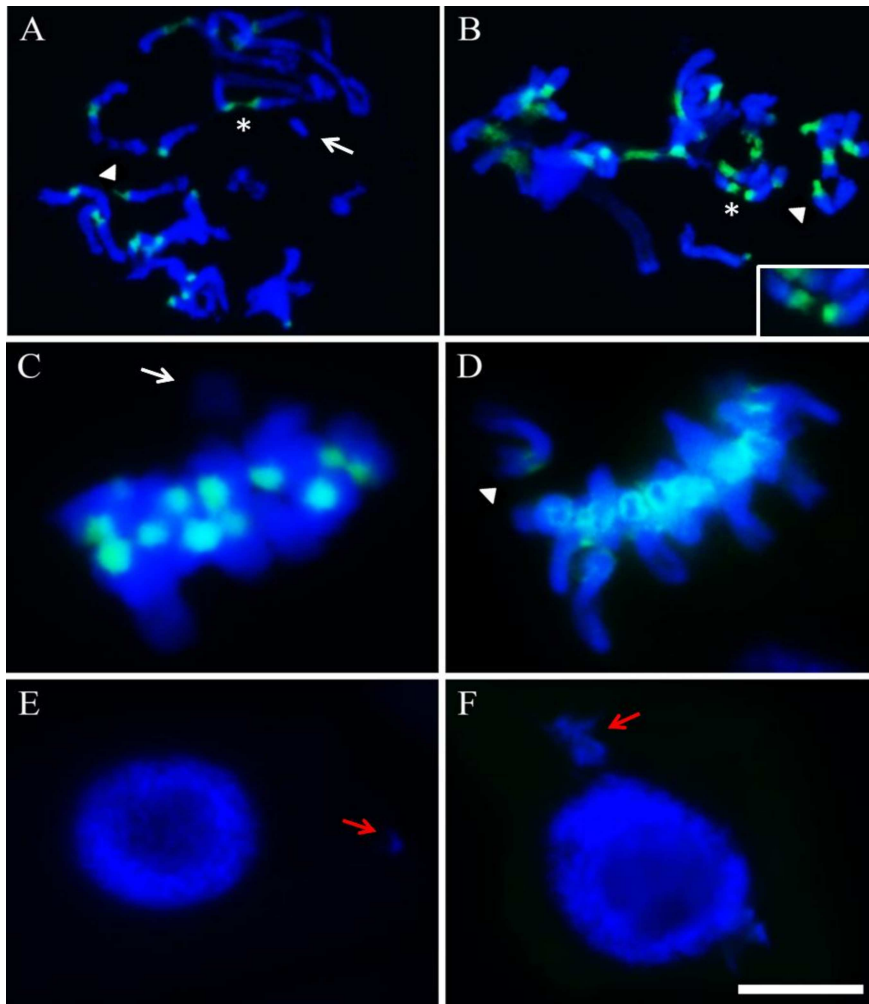


Figura 4 Anormalidades do ciclo celular evidenciadas pela imunolocalização da H3S10f. a e b) Pro-metáfase com cromossomo ou fragmento com e sem sinal de fosforilação; c) Metáfase com cromossomo não orientado e sem sinal de fosforilação d) Metáfase com cromossomo não orientado com sinal da fosforilação; e-f) Micronúcleos com ausência de fosforilação. Setas indicam cromossomo/fragmento sem sinal, pontas de seta indicam cromossomo/fragmento com sinal; setas vermelhas indicam micronúcleo. Asteriscos indicam locais de quebras pericentroméricas. O zoom está evidenciando a região de quebra pericentromérica

Nota: A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

## 5 DISCUSSÃO

As análises de CR mostraram que está havendo inibição de crescimento para os tratamentos com SPL e alumínio, mesmo que, para ambos, o IM não tenha diferido do controle. Essa observação se opõe ao observado para o cianeto, cujo IM foi altamente afetado e o CR manteve-se nos níveis observados para as plantas do grupo controle. A redução do crescimento radicular pode resultar de mecanismos diferentes como morte celular, inibição da divisão celular, inibição do alongamento das células e inibição de absorção de nutrientes (DELHAIZE; RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995; RENGEL et al., 1996; IKEGAWA; YAMANO; MATSUMOTO, 1998). Os resultados observados neste estudo mostram, portanto, que os efeitos sobre a redução do crescimento não devem estar associado à inibição da divisão celular, mas podem estar relacionados com alguns fatores listados pelos autores supracitados, como a morte celular e o alongamento das células.

O elevado IM observado em células tratadas com cianeto pode estar relacionado com o aumento de C-metáfases. Estas, por sua vez, estão intimamente ligadas aos problemas na formação do fuso mitótico devido à insuficiência energética. O cianeto pode estar envolvido com alterações na função mitocondrial, roubando ou levando a uma produção insuficiente de energia e afetando a polimerização dos microtúbulos. Devido a essa influência do cianeto na atividade mitocondrial, ocorre morte celular que é evidenciada pela presença de núcleos condensados.

Também em células de *L. sativa* tratadas com SPL e seus principais componentes, Palmieri et al. (2014) verificaram a redução do CR e do IM em todos os tratamentos. No entanto, esses autores observaram os efeitos das substâncias sobre a germinação (tratamento contínuo) e revelaram o forte impacto das mesmas sobre esse processo. Os resultados apresentados no

presente trabalho foram obtidos a partir da análise de sementes germinadas em água e que foram colocadas nos tratamentos quando suas raízes atingiram cerca de 2 mm (tratamento descontínuo), logo, os efeitos observados são relacionados exclusivamente com o processo de crescimento da raiz, refletindo as respostas das células pós-germinação e justificando, portanto, as diferenças observadas entre os dois estudos.

A presença de anormalidades cromossômicas e núcleos condensados em todos os tratamentos ratifica o que já foi descrito para os efeitos do SPL e seus componentes em espécies vegetais por Palmieri et al. (2014) e Andrade, Campos e Davide (2008) e Andrade, Davide e Gedraite (2010). As maiores médias de núcleos condensados observadas nos tratamentos com SPL também foram relatadas para células meristemáticas de *L. sativa* por Palmieri et al. (2014). O fato de o SPL apresentar um equilíbrio entre a ocorrência de AC clastogênica e aneugênica e o grande número de NC explicam seu efeito sinérgico em que seus principais compostos contribuem de forma conjunta, sendo o dano genético maior em células tratadas com SPL do que nos demais compostos testados (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; PALMIERI et al., 2014).

Em menor grau, o fluoreto e o cianeto também induziram a formação de NC nas condições testadas no presente trabalho. Os estudos sobre os efeitos do fluoreto em células vegetais ainda são escassos. Altas concentrações desse composto inibem totalmente o crescimento radicular, impedindo a germinação das sementes. A sua principal contribuição no SPL é a indução de MC (PALMIERI et al., 2014). Segundo Palmieri et al. (2014), o cianeto induz a formação de NC em sementes de *L. sativa*. A presença de NC é a marca citológica da ocorrência de MC (morte celular), que visa eliminar células que apresentam danos genéticos, sendo um eficiente mecanismo de autodefesa que procura evitar a proliferação e herança desses danos (DANONS et al., 2000). Andrade et al. (2011) e Andrade-Vieira, Campo e Davide (2012) mostram que



altas doses de SPL pode causar mais de 50% de morte nas células meristemática de *Allium cepa*.

A maior frequência de danos provocados em células em metáfases pode indicar uma ação preferencial do SPL e seus principais componentes sobre os constituintes da placa metafásica, evidenciadas pela observação de cromossomos não orientados, fragmentos, cromossomos pegajosos e C-metáfases. Com base nesses resultados foram confirmadas, em graus diferenciados, as ações clastogênicas e aneugênicas do SPL e de seus componentes. Anteriormente, Palmieri et al. (2014) já haviam relatado para *L. Sativa* o efeito aneugênico do cianeto, que resultou em um processo de divisão celular anormal, o que pode levar à formação de células com ploidias diferentes. Também foi relatada a ação clastogênica do alumínio e fluoreto devido à presença de grande quantidade de pontes e micronúcleos. Além disso, determinou-se que o SPL tem ação aneugênica e clastogênica sobre as células e que seus principais componentes agem sinergisticamente. Apesar dos trabalhos que avaliaram o efeito tóxico do SPL e seus componentes principais verificarem a presença de AC, nenhum deles apresentou resultados sobre os efeitos em nível da molécula de DNA (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; PALMIERI et al., 2014), sendo o presente trabalho, o primeiro a apresentar essa abordagem molecular e de organização dos cromossomos.

O padrão regular de distribuição da fosforilação da histona H3 na serina 10, observado nas células que não apresentavam AC de *L. sativa*, submetidas aos tratamentos com SPL, alumínio, fluoreto e cianeto, está de acordo com o que tem sido relatado para espécie de plantas com cromossomos monocêntricos (KASZAS; CANDE, 2000; MANZANERO et al., 2000; MANZANERO et al., 2002; PAULA et al., 2013). Estudos mostraram que os eventos de H3S10f estão mais relacionados com a manutenção da coesão entre as cromátides irmãs e essa modificação pós-traducional ocorre de maneira consistente enquanto as

cromátides irmãs mantêm-se coesas, começando em prófase até o início da anáfase (MANZANERO et al., 2000; GERNAND; DEMIDOV; HOUBEN, 2003; TOPP; DAWE, 2006).

Dentre as células portadoras de AC, também foi verificado que algumas delas apresentavam padrão regular de H3S10f, porém outras células apresentaram ausência ou número reduzido de H3S10f, sobretudo nos tratamentos com o cianeto e o SPL. Essa observação indica que ambos exercem um maior efeito sobre essa modificação pós-traducional, comparado ao fluoreto e alumínio.

O menor número de marcações pericentroméricas observadas em algumas metáfases anormais de todos os tratamentos evidencia que a serina 10 da histona H3 não apresentou fosforilação, indicando uma provável inativação do centrômero, causada pela exposição a esses compostos, visto que esta é uma marca epigenética relacionada com a atividade pericentromérica (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013). A ativação é necessária para o perfeito movimento dos cromossomos durante a divisão (SUMNER, 2003). Esses resultados mostram que está havendo um impacto desses compostos sobre a funcionalidade do centrômero e a coesão entre as cromátides irmãs, que se refletem na orientação dos cromossomos na placa equatorial e na segregação. Tais comportamentos podem explicar o efeito aneugênico observado.

A ocorrência de C-metáfases com atividade comprometida dos centrômeros observada para os tratamentos com SPL e cianeto pode resultar na formação de células com número variáveis de cromossomos, reforçando a ideia de efeito aneugênico destes compostos.

Para cromossomos pegajosos, de acordo com Silva e Fonseca (2003), El-Ghamery, El-Kholy e El-Yousser (2003) e Andrade, Davide e Gedraite (2010), a ocorrência se deve a alterações na estrutura dos cromossomos que gera a perda das características normais da condensação, causando a formação de

aglomerado que é irreversível e pode levar à morte celular. A presença de cromossomos pegajosos e pontes na anáfase podem ser decorrentes de ação clastogênica. Elas podem se expressar devido às quebras que resultam no ciclo de quebra-fusão-ponte descrito por McClintock (1941) em estudos clássicos com citogenética do milho.

A comprovação de ação clastogênica é feita também pela presença de quebras nas regiões pericentroméricas, predominantemente nos tratamentos com alumínio, cianeto e fluoreto, que foram claramente marcadas pela imunolocalização da H3S10f. Esses resultados indicam que se trata de uma região possivelmente com menor densidade de DNA e que pode ser caracterizada como um sítio frágil, o qual está associado com instabilidades cromossômicas. Sítios frágeis (SFs) são amplamente descritos em humanos, associados ao câncer (RICHARDS, 2001; HUEBNER; CROCE, 2001; GLOVER, 2006), e, recentemente, foram relatados em espécies vegetais, tais como *Lolium perenne* e *L. multiflorum* (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015) e *Phleum echinatum* (GRABOWSKA-JOACHIMIAK et al., 2014).

Em *Lolium*, os SFs ocorrem, de forma espontânea, na região do rDNA 45S, e estão parcialmente colocalizados com regiões pericentroméricas. Entretanto, já foram descritas formas de indução de SF empregando actinomicina (ActD) e ampicolina em milho, arroz, cevada e sorgo (Huang et al., 2012). Análises específicas em milho tratado com ActD mostraram que nos SFs houve diminuição de histonas H3, consistente com a descondensação, hipometilação de sequências C-G e presença de histonas  $\gamma$ H2AX, uma variante da histona H2A fosforilada, que serve como uma marca para detectar quebras dupla fita do DNA.

Os SFs observados nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de *L. sativa* tratados com SPL e com seus principais componentes podem também ser responsáveis pela formação de metáfases com cromossomos pegajosos.

Uma das causas para a formação de metáfases poliploides, observada no tratamento com fluoreto, pode estar relacionada com o bloqueio da polimerização dos microtúbulos que geram alterações no funcionamento do fuso mitótico (CARPETA et al., 2006; CAMPOS et al., 2008). O efeito das substâncias estudadas sobre o fuso mitótico é confirmado pela presença das C-metáfases que são resultantes de distúrbios na polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Tais distúrbios levam à interrupção do ciclo celular em metáfase e os cromossomos são observados bem condensados e com os centrômeros definidos (SHARMA; SEN, 2002).

Geralmente, como consequência da inativação dos centrômeros, já relatada anteriormente, ocorre a eliminação do cromossomo ao término da divisão celular, levando à formação de micronúcleos. Os cromossomos não orientados que apresentam sinais da H3S10f e, portanto, (peri)centrômeros ativos, poderão ainda ser incorporados nos núcleos filhos durante a divisão, dependendo da sua posição territorial na célula. Os fragmentos acêntricos ou cromossomos com (peri)centrômeros inativos tendem geralmente a serem eliminados na forma de MN.

A presença de anáfases multipolares pode ser indicativa de problemas no arranjo e organização dos microtúbulos causados pelo alumínio. Essa hipótese é reforçada pela presença de C-metáfases, cromossomos não orientados e células poliploides, uma vez que as mesmas, em geral são causadas por alterações na dinâmica dos microtúbulos (HARON; SHEHI, 2001). Provavelmente, o SPL e seus constituintes, além de afetar a fosforilação da serina 10 da histona H3 que interfere na orientação e na segregação cromossômica, podem estar interferindo nos processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos.

Os distúrbios no fuso foram descritos por Dho et al. (2010), que verificaram, por meio de imunolocalização da  $\beta$ -tubulina em células de *Pisum sativum*, que o arsênio provoca alterações em cadeia no arranjo dos microtúbulos, observados nas bandas pré-prófase e fusos metafásicos alterados, e que altas concentrações deste composto podem conduzir à perda completa dessa estrutura. Fusconi, Gallo e Camusso (2007), avaliando o comportamento de *P. sativum* também por imunolocalização da  $\beta$ -tubulina, verificaram alterações nos microtúbulos, mas provocadas pelo cádmio e observaram que o citoesqueleto microtubular é fortemente sensível ao cádmio, já que em pequenas dosagens ele provoca alterações microtubulares que estão, possivelmente, envolvidas no atraso do progresso de células de G2 para a mitose.

Os resultados da avaliação da H3S10 indicam que o SPL e seus principais componentes estão promovendo a inibição da fosforilação, cuja ação tem efeitos sobre a atividade dos (peri)centrômeros e a coesão das cromátides irmãs, fatores estes relacionados com o surgimento das alterações cromossômicas observadas.

A avaliação do padrão de distribuição da fosforilação da histona H3 na serina 10 realizada no presente estudo trouxe uma nova abordagem em relação às análises anteriores de citotoxicidade, que permite o entendimento das respostas em nível funcional/molecular das células. Essa abordagem vai ao encontro das afirmações de Vandegheuchte e Jansen (2014), sobre o uso de análises das características epigenéticas de espécies vegetais e animais submetidos a fatores de estresses ambientais. Esses estudos podem trazer informações relevantes no campo da ecotoxicologia, derivadas de avaliações das características epigenéticas, sobretudo da metilação do DNA.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados em células de *L. sativa*, conclui-se que o SPL e seus principais componentes:

- a) afetaram o crescimento radicular por mecanismos não associados ao aumento do número de células, mas por mecanismos relacionados com a morte celular e alongamento das células;
- b) induziram alterações aneugênicas e clastogênicas;
- c) apresentaram efeito sinérgico sobre o ciclo celular;
- d) inibiram a fosforilação da histona H3 na serina 10, inativando regiões pericentroméricas e afetando a coesão das cromátides irmãs com reflexos sobre a orientação dos cromossomos na placa metafásica e segregação das cromátides na anáfase;
- e) induziram quebras nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, caracterizadas como sítios frágeis.

## REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. B. et al. Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 329, n. 3, p. 200-207, Mar. 2006.

ANDRADE, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 4, p. 882-888, May 2011.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 71, n. 3, 706-710, 2008.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 4, p. 626-631, May 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPO, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, London, v. 107, n. 30, p. 140-146, Sept. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos – classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

BACARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 243-251, Apr. 2009.

BARBIER, O.; MENDOZA, L. A.; RASO, L. M. D. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 188, n. 2, p. 319-333, Nov. 2010.

BUSTAMANTE, F. O. et al. Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. reveals fragile sites in 45S rDNA region. **Crop Science**, Madison, v. 54, p. 1-9, Mar./Apr. 2014.

CAMPOS, J. M. S. et al. **Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions**. Houston: Studium Press, 2008.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopath Journal**, Oxford, v.22, p. 143-152, 2008.

CARPETA, A. D. et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, Leipzig, v. 227, n. 2-4, p. 147-153, May 2006.

CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 347, n. 1-3, p. 46-52, July 2005.

CHAPUIS, P.; FAVIER, A. Trace elements in nutrition and therapeutic. **Medicine International**, Baltimore, v. 112, n. 1, p. 131-137, 1999.

CHEN, H. et al. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 3728-3737, May 2006.

CIAMPOROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 2, p. 161-171, 2002.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **A sustentabilidade da indústria brasileira do alumínio**. Brasília: CNI, 2012.

DANON, A. et al. Review plant programmed cell death: a common way to die. **Journal Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 647-655, June 2000.

DASH, R. R.; GHOUR, A.; BALOMAJUMDER, C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 1-11, Apr. 2009.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 107, p. 315-321, Mar. 1995.



DHO, S. et al. Arsetate toxicity on the ápices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules.

**Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 69, n. 1, p. 17-23, Sept. 2010.

EBBS, S. et al. Transport and metabolism of free cyanide and iron cyanide complexes by willow. **Plant, Cell & Environment**, Washington, v. 26, n. 9, p. 1467-1478, Sept. 2003.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. evaluation of cytological effects of  $Zn^{2+}$  in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 29-41, May 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, v. 1-2, p. 81-95, Nov. 2000.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to triXuralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 252-259, July 2007.

FISKESJÖ, G. The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 8, n. 3, p. 291-298, Aug. 1993.

FRANTZIOS, G.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*: II. cytokinetic cells. **Journal of Plant Research**, Toyo, v. 114, n. 2, p. 157-170, June 2001.

FRANZARING, J.; KLUMPP, A.; FANGMEIER, A. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 41, n. 23, p. 4828-4840, July 2007.

FU, S. et al. Dicentric chromosome formation and epigenetics of centromere formation in plants. **Journal of Genetics Genomics**, Beijing, v. 39, n. 3, p. 125-130, Mar. 2012.

FURTADO, J. F. et al. Cianeto em tiquiras: riscos e metodologia analítica. **Ciência Tecnologia Alimentação**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 694-700, out./dez. 2007.

FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable marks for assessment of stress pollution. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 632, n. 1-2, p. 9-19, Aug. 2007.

GARRUNTO, R. M.; YANAGIHARA, R.; GAJDUSEK, D. C. Models of environmentally induced neurological disease: epidemiology and etiology amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the Western Pacific. **Environmental Geochemistry and Health**, Key, v. 12, n. 1-2, p. 137-151, Mar. 1990.

GERMAND, D.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between monoandpolycentric chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 101, n. 2, p. 172-176, 2003.

GLOVER, T. W. Common fragile sites. **Cancer Letters**, Limerick, v. 232, n. 1, p. 4-12, Jan. 2006.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 6, p. 99-102, May 1999.

GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A. et al. Karyotype structure and chromosome fragility in the grass. **Protoplasma**, Amsterdam, v. 252, n. 1, p. 301-306, Jan. 2014.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, Oct. 1994.

HAN, F.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 9, p. 3238-3243, Feb. 2006.

HARON, S. A.; SHEHRI, M. A. Cytogenetic effects of *Calotropis procera* extract on *Vicia faba* L. **Cytologia**, Tokyo, v. 66, p. 373-378, 2001.

HOUBEN, A. et al. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **The Plant Journal**, London, v. 18, n. 6, p. 675-679, 1999.

Houben, A.; Demidov, D.; Karimi-Ashtiyani, R. Epigenetic control of cell division. In: Grafi, G.; Ohad, N. (Ed.). **Epigenetic memory and control in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 155-175.

Huang, J. et al. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. 1–7, May 2008.

Huang, J. et al. Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 59–65, July 2009.

Huang, M. et al. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35139, 2012.

Huebner, K.; Croce, C. M. FRA3B and other common fragile sites the weakest links. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 1, n. 3, p. 214-221, Dec. 2001.

Ikegawa, H.; Yamamoto, Y.; Matsumoto, H. Cell death caused by a combination of aluminum and iron in cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 3, p. 474-478, Nov. 1998.

Jin, W. et al. Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1203-1214, 2008.

Kászás, E.; Candé, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 18, p. 693-705, Sept. 2000.

Klancnik, K. et al. Use of modified *Allium* test with nanoTiO<sub>2</sub>. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 1, p. 85-92, Jan. 2011.

Kochian, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, June 1995.

- KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 190, n. 1-3, p. 613-621, June 2011.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, Aug. 2009.
- LING, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 150, n. 2, p. 243-250, Nov. 2007.
- MANZANERO, S. et al. Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. **Chromosome Research**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 467-476, 2002.
- MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, Wien, v. 109, n. 5, p. 308-317, 2000.
- MCCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea Mays*. **Genetics**, New York, v. 26, n. 2, p. 234-282, Mar. 1941.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Fluoride in drinking-water: a scientific review of EPA's standards**. New York: National Academic, 2006.
- PALMIERI, M. J. et al. Citotoxy and phytotoxy effects on the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 763, p. 30-55, Mar. 2014.
- PANDA, B. B.; PANDA, K. K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. In: PRASAD, M. N. V.; STRZAŁKA, K. (Ed.). **Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 395-414.
- PAULA, C. M. P de et al. Distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis and meiosis in *Brachiaria* species. **Journal of Genetics**, London, v. 92, n. 2, p. 259-266, 2013.
- PAWLAK, S.; DECKERT, J. Histone modifications under environmental stress. **Biological Letters**, Ames, v. 44, n. 2, p. 65-73, 2007.

RENGEL, Z. et al. Uptake of aluminium by plant cells. **New Phytologist**, Cambridge, v. 134, n. 3, p. 389-406, Nov. 1996.

RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 339-345, June 2001.

ROCHA, L. C. et al. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 451-460, May 2015.

SHARMA, A.; SEN, S. **Chromossomebotay**. Oxford: Enfield Science Publishers, 2002.

SHIBATA, F.; MURATA, M. Differential localization of the centromere specific proteins in the major centromeric satellite *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, p. 2963- 2970, June 2004.

SILVA, I. et al. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 2, p. 543-552, June 2000.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. M. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. **Genética Toxicológica**, Rio de Janeiro, p. 70-84, 2003.

SILVEIRA, B. I. et al. Characterization of inorganic fraction of spent pot Liners: evaluation of the cyanides and fluorides content. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 177-183, Jan. 2002.

SILVEIRA, B. I. et al. Effectiveness of cement-based for stabilization and solidification of spent pot Liner inorganic fraction. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 98, n. 1-3, p. 183-190, Mar. 2003.

SUMNER, A. T. **Chromossomes organization and function**. North Berwick: Blackwell, 2003.

TASSIST, A. et al. Equilibrium, kinect and themodynamic studies on aluminum biosorption by a micelialbyomass (*Streptomyces rimosus*). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 183, n. 1-3, p. 35-43, Nov. 2010.

TOPP, C. N.; DAWE, R. K. Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 647-653, Dec. 2006.

VANDEGEHUCHTE, M. B.; JASSEN, C. R. Epigenetics in an ecotoxicological context. **Mutation Research**, Amsterdam, v.764-765, p. 36-45, Apr. 2014.

XIONG, H.; LI, Y.; LI, L. A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. **Plant Science**, Limerick, v. 171, n. 5, p. 624-631, Nov. 2006.

ZIMMERMAN, A. et al. Influence of a soil enzyme on iron-cyanide complex speciation and mineral adsorption. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 1044-1051, Jan. 2007.