



ANGÉLICA RESENDE ARRIEL

**EFEITOS DOS FUNGICIDAS À BASE DE TEBUCONAZOL E
DIFENOCONAZOL NA MITOSE DE *Lactuca sativa* L. E *Allium*
cepa L.**

LAVRAS – MG

2018

ANGÉLICA RESENDE ARRIEL

**EFEITOS DOS FUNGICIDAS À BASE DE TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL NA
MITOSE DE *Lactuca sativa* L. E *Allium cepa* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para obtenção de título de Mestre.

Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

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

Arriel, Angélica Resende.

Efeito dos fungicidas à base de tebuconazol e difenoconazol na mitose de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. / Angélica Resende Arriel. - 2018.

89 p. : il.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Coorientador(a): Vânia Helena Techio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Modelos vegetais. 2. Alterações cromossômicas. 3. Imunodeteção. I. Andrade Vieira, Larissa Fonseca. II. Techio, Vânia Helena. III. Título.

ANGÉLICA RESENDE ARRIEL

**EFEITOS DOS FUNGICIDAS À BASE DE TEBUCONAZOL E DIFENOCONAZOL NA
MITOSE DE *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L.**

**EFFECT OF FUNGICIDES CONTAINING TEBUCONAZOLE AND DIFECONAZOLE ON
MITOSES OF *Lactuca sativa* L. AND *Allium cepa* L.**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Phd. Kátia Ferreira Marques de Resende (UFLA)

Phd. Mateus Mondin (USP-Piracicaba)

Phd. Márcia Flores da Silva Ferreira (UFES-Alegre)

Orientadora:

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

Coorientadora:

Dra. Vânia Helena Techio

LAVRAS-MG

2018

*A minha mãe Cleris por ser meu maior exemplo de fé e perseverança.
Ao meu pai Javerte por ser meu maior exemplo de dinamismo e
inventividade.
Por todo apoio e incentivo.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a luz que me guia e me faz entender todos os dias que o segredo da vida é o amor.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, seu corpo docente, direção, administração e a todos os funcionários que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, por todos os ensinamentos e contribuições.

À minha orientadora Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira, que com sua maneira de viver me ensinou que não existem limites para quem tem sonhos e coragem de vivê-los! À sua paciência e compreensão com meu processo de desenvolvimento durante essa etapa. Sou grata por todo crescimento profissional e pessoal que estar sob sua orientação me ofereceu.

À Dra. Vânia por todas contribuições realizadas na elaboração de pensamentos durante a construção deste trabalho partilhando do seu tempo, conhecimentos e experiências. Foi muito gratificante tê-la como coorientadora nessa empreitada.

À toda equipe do Laboratório de Citogenética Vegetal, pelo agradável convívio e amizade.

Aos técnicos do laboratório, Iara e Felipe, pela amizade e por toda a ajuda. E em especial aos integrantes do grupo de pesquisa, Prospecção de Efeitos Biológicos, pelos momentos de descontração, de partilha de conhecimentos e de trabalho em grupo. Estar com vocês foi realmente muito significativo para mim e para meu crescimento como pessoa.

À Gra, com certeza a mais eficiente! Nunca vou esquecer tudo o que você já fez por mim, de maneira sempre tão gratuita, você foi minha irmãzinha mais velha durante o mestrado, espero não ter dado muito trabalho! À Ingrid, pelas muitas contribuições neste trabalho, muito obrigada pela sua dedicação e paciência! A Thaisa pelas muitas conversas, lágrimas e sorrisos partilhados! Obrigada pela amizade sincera, meninas! Todas as manhãs antes de ir para UFLA meu coração se enchia de alegria ao pensar que veria vocês três! Vocês são muito especiais!

Aos amigos Elias, Sofia, Lau, Dany e Naty pelo carinho, pelas conversas descontraídas e pelas horas de estudo compartilhadas durante o mestrado. É bom ter com quem contar e com vocês tive a sorte de experimentar isso! Vocês são 10!

Às Friends: Adriele, Andréia, Damiane, Emília, Jéssica e Talita, que sempre torceram por mim, se fizeram presentes e me mostrando o verdadeiro valor da amizade!

À minha cunhada Joyce companheira de bate-volta de Perdões para Lavras pela ajuda nos momentos difíceis e amizade sincera desde sempre para sempre.

Aos meus pais, Cleris e Javerte e meu irmão, Alyson, por sempre acreditarem em mim e pelo amor incondicional.

À todos meus familiares que sempre se empolgaram com o fato de ter um futura mestra na família, me dando força e “enchendo minha bola”! Sinto-me especial em tê-los na minha vida!

Ao longo dessa jornada recebi mais bênçãos do que poderiam ser registradas aqui. Conheci inúmeras pessoas que me permitiram o privilégio de amá-las! Agradeço profundamente a todas essas pessoas que durante esses dois anos entraram na minha vida e me inspiraram, comoveram e iluminaram com a sua presença.

RESUMO

Os princípios ativos de fungicidas comerciais da classe de triazol - Tebuconazol (TBZ) e Difenconazol (DFZ) foram detectados em quantidades irregulares em amostras de alimentos analisadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Essas substâncias são tóxicas para os seres vivos, mostrando propriedades genotóxicas, mutagênicas e cancerígenas, mesmo em baixas concentrações. Neste contexto, é importante elucidar os efeitos desses compostos, bem como seus mecanismos de toxicidade. No presente trabalho o efeito de dois fungicidas à base de TBZ e DFZ foram estudados nas espécies vegetais modelo *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L., sendo os resultados encontrados divididos em dois artigos. O primeiro trabalho teve como objetivo compreender se as mudanças no ciclo mitótico provocadas por fungicidas comerciais contendo os princípios ativos TBZ e DFZ estão relacionadas ao padrão de distribuição de fosforilação da Histona H3 na serina 10 (H3S10f) nos cromossomos das células meristemáticas do modelo *L. sativa*. As células mitóticas foram tratadas com os fungicidas à base de TBZ e DFZ e os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo (água ultrapura). Ambos os fungicidas induziram alterações na distribuição e número de sinais do H3S10f. O imuno-sinal irregular foi considerado quando observadas marcas dispersas ao longo dos cromossomos ou nenhuma presença de tais marcas e foram descritos para células que apresentaram cromossomos aderentes, c-metáfases, pontes e também em metáfases e anáfases normais. No segundo trabalho o objetivo foi entender como a imunolocalização da H3S10f pode auxiliar na compreensão das alterações no ciclo celular, especialmente as aneugênicas. Os fungicidas comerciais à base dos princípios ativos TBZ e DFZ foram utilizados como agente indutor de alterações aneugênicas. As alterações aneugênicas do tipo aderência, c-metáfase, poliploidia e aneuploidia foram observadas e a maioria das células que expressaram essas alterações apresentaram problemas com a fosforilação da H3S10f. Os resultados mostraram que os eventos aneugênicos induzidos pela exposição das células do modelo vegetal *A. cepa* aos fungicidas baseados nos princípios TBZ e DFZ podem ser explicados pelo imuno-sinal epigenético da H3S10f.

Palavras-chave: Alterações aneugênicas. Cromossomos aderentes. Modelos vegetais. Epigenética. Imuno-sinal.

ABSTRACT

The active principles of commercial fungicides from the triazole class – Tebuconazole (TBZ) and Diphenconazole (DFZ) were detected in irregular amounts in food samples analyzed for the National Health Surveillance Agency (Anvisa), on The Program on Pesticide Residue Analysis (PARA). These substances are toxic for living beings, showing genotoxic, mutagenic and carcinogenic properties, even at low concentrations. In this context, it is important to elucidate the effects of these compounds as well as their toxicity mechanisms. In the present work the effects of TBZ- and DFZ-based fungicides were studied in higher plant as model, *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L., and the found results were divided in two works. The first one objectived to determine whether the changes in the mitotic cycle brought about by commercial fungicides containing the active principles TBZ and DFZ are related to the distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in chromosomes of meristematic cells of the plant model *L. sativa*. Mitotic cells were treated with commercial fungicides containing TBZ and DFZ and the results obtained were compared with a negative control (ultrapure water). Both fungicides were found to induce alterations in the distribution and number of signals of H3S10ph. The immune signal was considered irregular when scattered marks were observed throughout the chromosomes, or if such marks were absent and were found in cells contained sticky chromosomes, c-metaphases, anaphase bridges, and also in normal metaphases and anaphases. For the second, the objective was to understand how the immunolocalization of H3S10ph can help in understanding the alterations in the cell cycle, especially the aneugenic ones. Fungicides containing TBZ and DFZ as base active compounds were used as inducing agent of aneugenic alterations. Aneugenic alterations as sticky chromosomes, c-metaphases, polyploidy and aneuploidy were observed and the majority of the cells that expressed these kind of alterations presented problems with the phosphorylation of H3S10ph. The results showed that the aneugenic events in meristematic cells of *A. cepa* induced by the commercial TBZ- and DFZ-based products can be explained by the epigenetic immuno-signal of H3S10ph.

Keywords: Aneugenic alterations. Sticky chromosomes. Plants models. Epigenetics. Immuno-signal.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
INTRODUÇÃO	10
REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 A problemática dos Agrotóxicos	13
2.1.1 O uso dos Agrotóxicos no Brasil e sua Regulamentação.....	15
2.1.2 Os resultados das análises do PARA durante o período de 2013 a 2015.....	19
2.1.3 Fungicidas Triazóis: Tebuconazol (TBZ) e Difenconazol (DFZ) e seus efeitos toxicológicos	21
2.2 Bioensaios em Vegetais aplicados a toxicologia	25
2.3 A Citogenética Clássica aplicada a estudos de toxicologia	27
2.4 A Epigenética do Estresse em plantas	30
REFERÊNCIAS	34
SEGUNDA PARTE -	
ARTIGOS*	25
ARTIGO 1	45
ARTIGO 2	68

* SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1: Normas da Environmental Science and Pollution Research (versão preliminar). ARTIGO 2: sem identificação do periódico. Elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A relação entre ambiente e saúde torna-se cada vez mais um assunto relevante para população, devido a exposição da mesma à substâncias químicas. Resíduos industriais, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas, entre outras substâncias são lançadas constantemente no meio ambiente como resultado de uma economia que vem aproximando-se do limite da natureza sem alcançar o objetivo do bem-estar social.

Neste atual cenário econômico a agricultura brasileira é fundamentada majoritariamente por técnicas convencionais caracterizadas pela dependência do uso de agrotóxicos. Estes, por sua vez, são quaisquer substâncias químicas ou misturas das mesmas, usados para evitar, reduzir ou eliminar espécies indesejadas de plantas, animais e vetores de doenças de plantas e animais, que promovam danos durante o processo de produção e comercialização agrícola (PERES; MOREIRA, 2003). Estes produtos, quando utilizados, independente do modo de aplicação, apresentam elevada probabilidade de atingir o solo e as águas devido à lixiviação e a erosão promovida por ventos e pela água da chuva. Qualquer que seja o caminho do agrotóxico pelo ambiente o homem é um potencial receptor do mesmo (AUGUSTO et al., 2015).

O Brasil está entre os países que mais utilizam agrotóxicos no mundo. De acordo com o último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxico (PARA)¹, organizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram detectados resíduos em 58% dos alimentos testados, no período de 2013 a 2015. Das amostras com resíduos, 19,7% contêm agrotóxicos não autorizados ou acima de limites máximos (ANVISA, 2016). O uso dessas substâncias está altamente associado à incidência de doenças como o câncer (CARNEIRO et al., 2012; INCA, 2015). Em 2015, o Instituto Nacional do Câncer, em nota, se posicionou oficialmente pela produção de alimentos sem agrotóxicos (INCA, 2015).

Dentre os tipos de agrotóxicos existentes, os fungicidas são aplicados no controle de doenças provocadas por fungos. Foi relatado pelo PARA um número expressivo de detecções

¹ No item 2.1.2 Os resultados das análises do PARA durante o período de 2013 a 2016 serão mais detalhados.

de fungicidas do grupo químico Triazol em alimentos avaliados durante 2013 a 2015 (ANVISA, 2016). Neste grupo químico estão inseridos os princípios ativos Tebuconazol (TBZ), classe toxicológica IV (pouco tóxico) e Difenconazol (DFZ), classe toxicológicas I (extremamente tóxico). Estes princípios ativos, em estudo com eritrócitos humanos induziram a distúrbios, como a hemostasia e efeitos citotóxicos (TRENTO, 2017). Adicionalmente, estudos de Ecotoxicologia desenvolvidos a partir de Bioensaios com organismos modelo vegetais mostraram efeitos fitotóxicos, genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos em plântulas e células de ponta de raiz de *Allium cepa* e *Lactuca sativa*, incluindo aumento de alterações cromossômicas, nucleares e mutações (BERNARDES, et al., 2015; ARAGÃO, 2017).

Os vegetais superiores tem sido amplamente utilizados para fins de detecção de efeitos genotóxicos de substâncias diversas por apresentarem vantagens como baixo custo, fácil manutenção, alta sensibilidade a agentes mutagênicos e boa correlação com outros sistemas de testes (ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2008; GRANT, 1999; FISKEJÖ, 1985; PALMIERI et al., 2016). Esses estudos mostram o impacto sobre a estrutura e/ou comportamento dos cromossomos, destacando, principalmente, danos ao DNA. Entretanto, estudos atuais relatam que influências ambientais podem se estender para além da interação com a sequência de DNA, causando também alterações moleculares (BACCARELLI; BOLLATI, 2009), afetando a estrutura da cromatina ou a regulação do ciclo celular, por meio de alterações epigenéticas.

Mecanismos epigenéticos, tais como metilações do DNA e modificações pós-traducionais de histonas (HPTMs), alteraram a expressão do genoma sob influências exógenas, sem que ocorram mudanças nas sequências de DNA e podem ser herdados. Essas alterações podem envolver a atividade centromérica e silenciamento ou ativação da expressão gênica, as quais podem afetar a progressão do ciclo celular, a segregação e causar alterações cromossômicas e nucleares que, se não reparadas, podem ter como resultado a eliminação cromossômica ou a morte celular (GERNAND; DEMIDOV; HOUBEN, 2003; HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013; ISHII; TANAKA; TSUJIMOTO, 2010; MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004).

A fosforilação da serina 10 na Histona H3 (H3S10f) é a HPTM do ciclo celular mais estudada (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013). A H3S10f está envolvida com a coesão das cromátides irmãs (KASZAS; CANDE, 2000; PAULA et al., 2013;

SHIBATA; MURATA, 2004) e, segundo Houben et al. (1999), 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 a H3S10 fosforilada ocorre apenas no centrômero funcional (FU et al., 2012; HAN; LAMB; BIRCHLER, 2006; HOUBEN et al., 1999), indicando que se trata de uma marca epigenética para regiões (peri)centroméricas ativas (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013).

Dentre as alterações observadas no ciclo celular, na análise citogenética clássica de células expostas aos fungicidas à base dos princípios ativos Tebuconazol e Difenconazol, aquelas relacionadas com a progressão do ciclo e segregação dos cromossomos são as mais frequentes (BERNARDES et al., 2015, ARAGÃO, 2017). Neste sentido, a marca epigenética H3S10f representa uma ferramenta importante na elucidação dos mecanismos de ação desses princípios ativos sobre a célula.

Em uma iniciativa pioneira no Brasil, Freitas et al. (2016) investigaram o efeito do Spent Pot Lining (SPL)² e seus principais componentes no ciclo celular de *Lactuca sativa*, empregando a técnica de imunolocalização com detecção da H3S10f. Os resultados mostraram que as células em divisão normal apresentaram distribuição espaço temporal regular da H3S10f. Entretanto, foram identificadas anormalidades no ciclo celular, tais como c-metáfases, cromossomos aderentes, anáfases multipolares, células poliploides, e com micronúcleos em células de material exposto ao contaminante. Algumas dessas alterações foram relacionadas com a inativação de regiões pericentroméricas evidenciadas pela H3S10f.

É notório o risco a saúde e ao meio ambiente que os agrotóxicos representam. Além disso, ainda são escassos os trabalhos relacionados ao efeito dos mesmos nos organismos vivos. Portanto, este trabalho teve como objetivo compreender os efeitos dos fungicidas à base TBZ e DFZ, em células mitóticas de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L a partir da técnica imunolocalização da H3S10f. A fim de fortalecer iniciativas de regulação e controle destas substâncias. Além disso, compreender como a imunolocalização da H3S10f pode auxiliar na compreensão das alterações celulares, em especial as eneugênicas, causadas por substâncias químicas.

² O Spent Pot Line (SPL) é um resíduo sólido proveniente da indústria de alumínio, seus principais constituintes são cianeto, fluoreto e alumínio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A problemática dos Agrotóxicos

Os problemas gerados pelo modo como a sociedade se relaciona com a natureza tem levado ao esgotamento das fontes de riquezas e de sustentação da população, um desequilíbrio na dinâmica dos ambientes e a desigualdade das relações sociais (FERNANDES; SAMPAIO, 2008). No setor agrícola foi adotada a modernização conservadora no campo a partir de 1965, influenciada pelo capitalismo no campo e pela Revolução Verde. Segundo seus promotores, esta “Revolução Verde” seria fundamental para derrotar a fome que assolava boa parte da população mundial (LONDRES, 2011).

A Revolução Verde foi a denominação utilizada para o processo de modernização agrícola caracterizada pela implementação de sementes modificadas, uso de fertilizantes, máquinas e a dependência de agrotóxicos com a finalidade de obter menos perdas nas lavouras e acentuação da produtividade (AUGUSTO et al., 2015).

Os agrotóxicos são quaisquer substâncias, ou misturas das mesmas, usadas para evitar, reduzir ou eliminar “pragas” e “doenças” das lavouras. São considerados “pragas” e “doenças”, as espécies indesejadas de plantas, animais e vetores de doenças vegetais e animais, que promovem danos durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeiras e derivados (PERES; MOREIRA, 2003). A Lei de Agrotóxicos de julho de 1989, considera agrotóxicos e afins:

os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. O agrotóxico visa alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989).

Estes produtos podem ser classificados, de acordo com o organismo alvo em fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocida, acaricida, nematocida, raticidas, desfoliantes, moluscicidas e fumigantes, e ainda quanto à finalidade, ao modo de ação, à origem e à toxicidade (KRÜGER, 2009). Existem atualmente no mundo cerca de 20 grandes indústrias fabricantes de agrotóxicos. As principais empresas são: Syngenta, Bayer, Monsanto, BASF, Dow AgroSciences, Du Pont, MAI e Nufarm. Em 2014, a Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim) anunciou o aumento de 13% nas vendas de agrotóxicos no Brasil, com um faturamento líquido de US\$ 12,2 bilhões (R\$ 25 bilhões) (BRASIL, 2016). Os valores evidenciam a importância da comercialização dos agroquímicos frente aos interesses de grandes corporações transnacionais

Em 1962, a bióloga norte-americana Rachel Carson denunciou as consequências danosas do uso indiscriminado dos agrotóxicos em seu livro *Primavera Silenciosa* (AUGUSTO et al., 2015). A problemática em relação à utilização destes produtos é grande devido à prática do agronegócio que combina o uso abusivo de agrotóxicos com as informações (rótulos, orientações e receituários) deficientes sobre os mesmos e as dificuldades de percepção de perigo pelos trabalhadores e pela população (AUGUSTO et al., 2015; PERES; MOREIRA, 2003; SOBREIRA; ADISSI, 2003).

A aplicação de agrotóxicos nas lavouras, de fato, aumentara significativamente a produção de alimentos, no entanto a sociedade passou a consumir em alta escala produtos químicos destinados a eliminar pragas e doenças, gerando problemas de contaminação de alimentos, poluição ambiental e redução da biodiversidade (BELO et al., 2012). Embora a introdução dos agrotóxicos tenha aumentado a produtividade, é importante salientar que isso não resolveu o problema da fome no mundo: boa parte dos excedentes agrícolas gerados atualmente são commodities (AUGUSTO et al., 2015) e a fome segue assolando 815 milhões de pessoas que estão subnutridas (FAO, 2017). Em contrapartida os impactos sociais, com a expropriação das populações camponesas, e os impactos ambientais se elevaram. Os impactos na saúde se tornaram tão significativos, que passaram a representar um problema amplamente discutido em fóruns de âmbito nacional e internacional.

Os impactos na saúde pública são amplos, atingindo trabalhadores em diversos ramos de atividades, moradores do entorno de fábricas e fazendas, além dos consumidores dos

alimentos contaminados (AUGUSTO et al., 2015; PERES; MOREIRA, 2003). Os efeitos causados pela intoxicação com agrotóxicos podem ser de dois tipos:

1. Efeitos Agudos são aquelas resultantes da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 horas. São os mais relatados e afetam, principalmente, as pessoas expostas em seu ambiente de trabalho. São caracterizados por efeitos como irritação da pele e olhos, coceira, cólicas, vômitos, diarreias, espasmos, dificuldades respiratórias, convulsões e morte (INCA, 2015; PERES; MOREIRA, 2003).
2. Efeitos Crônicos são aqueles resultantes de uma exposição continuada afetam toda a população, pois são decorrentes da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e no ambiente, geralmente em doses baixas. Os efeitos adversos decorrentes da exposição crônica aos agrotóxicos podem aparecer semanas, meses, anos ou até mesmo gerações após o período de uso/contato com tais produtos dificultando a correlação com o agente. Dentre os efeitos associados à exposição crônica a ingredientes ativos de agrotóxicos podem ser citados infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2015; PERES; MOREIRA, 2003).

2.1.1 O uso dos Agrotóxicos no Brasil e sua Regulamentação

A venda de agrotóxicos, no Brasil, aumentou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$7 bilhões entre 2001 e 2008, alcançando valores recordes de US\$ 8,5 bilhões em 2011 (INCA, 2015). Este fato fez com que o Brasil, desde 2008, seja considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PELAEZ; DA SILVA; ARAUJO, 2013). Isso se deve ao nosso atual modelo de desenvolvimento voltado prioritariamente para produção de bens primários para exportação (AUGUSTO et al., 2015).

Estão registrados cerca de 1.295 agrotóxicos, 470 ingredientes ativos, 674 produtos técnicos e 2.000 componentes. De acordo com análises de amostras coletadas em todos os estados do Brasil, realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa (2016), 58% dos alimentos que são consumidos cotidianamente por nós estão contaminados pelos agrotóxicos. Adicionalmente, uma lista extensa de

agrotóxicos utilizados na agricultura brasileira é proibida na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos³. Estão presentes nessa lista, por exemplo: Cihexatina, Abamectina, Acefato, Carbofuran, Fosmete, Lactofem, Parationa Metfílica e Tiram⁴.

No Brasil, o processo de regulamentação dos agrotóxicos é estabelecido pela “Lei dos Agrotóxicos” nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Esta lei determina que os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (ANVISA, 2016). O registro dos agrotóxicos é uma etapa obrigatória em vários países, e tem finalidade de maximizar os benefícios para o usuário e minimizar os riscos à saúde humana e ambiental (PERES; MOREIRA, 2003).

Desta maneira, os órgãos governamentais envolvidos no processo de registro têm o dever de avaliar as características agronômicas, toxicológicas e ecotoxicológicas de cada substância/produto, como também de estabelecer as restrições e recomendações de uso necessárias para uma maior segurança na utilização dos agrotóxicos (PERES; MOREIRA, 2003). Essas competências são estabelecidas pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei e são atribuídas aos três órgãos envolvidos no registro: ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde; IBAMA, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (ANVISA, 2016).

O Ministério da Saúde, representado pela ANVISA, é responsável pela avaliação toxicológica do agrotóxico, pela definição dos LMR (Limites Máximos de Resíduos) e pelo monitoramento toxicológico. Ao Ministério do Meio Ambiente, representado pelo IBAMA, é atribuída a função de monitoramento ambiental, pela avaliação ecotoxicológica. Por fim, o Ministério da Agricultura é encarregado de avaliar a eficiência do agrotóxico e realizar a

³ Brasil permite consumo de 14 agrotóxicos proibidos mundialmente – The Greenest Post, 01/03/2016. Disponível em: <http://thegreenestpost.bol.uol.com.br/brasil-permite-consumo-de-14-agrotoxicos-proibidos-mundialmente/>. Acesso em: 25 de abril de 2017.

⁴ Lista de ingredientes ativos com uso autorizado no Brasil – Portal Anvisa, 20/01/2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201?p_p_auth=WXFcpfe9&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DWXFcpfe9%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-3%26p_p_col_count%3D3>. Acesso em: 26 de abril de 2017.

fiscalização em todo o Brasil, sendo o órgão federal que registra a maioria dos agrotóxicos (BRASIL, 2012).

A empresa interessada em registrar um agrotóxico, deve apresentar ao IBAMA informações sobre as propriedades físico-químicas das substâncias presentes naquele produto. São realizados testes sobre mobilidade e persistência em solos brasileiros, fotólise, hidrólise, testes de toxicidade aguda e crônica realizados com diferentes organismos não-alvos (microorganismos, minhoca, algas, peixes, abelhas, aves e mamíferos), além dos resultados dos estudos de bioconcentração em peixes e do potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico do produto (PERES; MOREIRA, 2003). Porém, ao contrário de outros países o registro dos agrotóxicos no Brasil não tem validade, sendo assim, essas empresas devem apresentar estudos que comprove a segurança apenas na ocasião do registro. Nos Estados Unidos, por exemplo, o período da licença de um agrotóxico é de 15 anos, na União Européia, de apenas 10 anos. Ambas as legislações exigem que seja provado que não há nenhum dano ao meio ambiente e a saúde humana. Desse modo, as empresas devem apresentar reavaliações toxicológicas e novos estudos para provar novamente que o produto é seguro⁵.

De acordo com os resultados, obtidos de testes ou estudos realizados em laboratórios, que tentam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais utilizados naquela concentração nos estudos, os agrotóxicos são classificados quanto à periculosidade ambiental, em cinco (5) classes: produtos impeditivos de obtenção de registro, produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I); produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II); produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (ANVISA, 2016) (TABELA 1).

⁵ Brasil ainda usa agrotóxicos proibidos em outros países – Carta Capital, 19/11/2015. Disponível em: <https://www.cartacapital.com.br/sustentabilidade/brasil-ainda-usa-agrotoxicos-ja-proibidos-em-outros-paises-9823.html>. Acesso em: 25 de abril de 2017.

Tabela 1 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa colorida
I	extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
II	altamente tóxico	entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
III	médiamente tóxico	entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	pouco tóxico	entre 50 e 500 mg/kg	Verde
-	muito pouco tóxico	acima de 5.000 mg/kg	-

Fonte: Adaptado de (PERES; MOREIRA, 2003).

De acordo com o exposto no portal da Anvisa⁶, é proibido o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins:

- Para os quais no Brasil não se disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública.
- Para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil.
- Considerados teratogênicos, que apresentem evidências suficientes nesse sentido, a partir de observações na espécie humana ou de estudos em animais de experimentação.
- Considerados carcinogênicos, que apresentem evidências suficientes nesse sentido, a partir de observações na espécie humana ou de estudos em animais de experimentação.
- Considerados mutagênicos, capazes de induzir mutações observadas em, no mínimo, dois testes, um deles para detectar mutações gênicas, realizado, inclusive, com uso de ativação metabólica, e o outro para detectar mutações cromossômicas.
- Que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica.
- Que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados.

⁶ Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro.>>
Acesso em: 30 de novembro de 2016.

- Cujas características causem danos ao meio ambiente.

Outro fator a ser considerado é que a ANVISA sofre forte pressão política. O setor do Agronegócio desde 1990 tem se empenhado para enfraquecer os setores da Saúde e do Meio Ambiente na regulação dos agrotóxicos por meio de várias iniciativas no Legislativo: desde o Projeto de Lei n. 6299/2002, ao qual foram apensados outros PLs (PL 3125/2000, PL 5852/2001, PL 5884/2005, PL 6189/2005, PL 2495/2000, PL 1567/2011; PL 4166/2012; PL 1779/2011, PL 3063/2011 e PL 1567/2011) que retiram competências da ANVISA e do IBAMA nas avaliações de agrotóxicos, em tramitação na Comissão de Constituição e Justiça da Câmara Federal e até articulações políticas veiculadas pela grande mídia para a criação de uma agência nacional de agroquímicos, que também visa a reduzir o papel dos setores responsáveis pela saúde humana e do ambiente (BÚRIGO et al., 2015).

A expectativa da população é de que o deferimento do registro de um agrotóxico signifique o reconhecimento e a garantia de que o produto, quando utilizado da maneira recomendada, esteja dentro dos limites de segurança aceitos para a saúde e o ambiente. Fica evidente que muitos são os meios que prejudicam a utilização dos agrotóxicos de maneira segura à saúde e ao meio ambiente e com isso a necessidade de fortalecer as medidas de regulação e controle dessas substâncias.

2.1.2 Os resultados das análises do PARA durante o período de 2013 a 2015

O PARA é um programa do governo que contribui para a segurança alimentar, com finalidade de prevenir intoxicações alimentares agudas ou crônicas resultantes da ingestão de alimentos com resíduo de agrotóxicos. Nele, são analisadas amostras de alimentos coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias (Estaduais/Municipais) de acordo com princípios e guias internacionalmente aceitos⁷, como o *Codex Alimentarius*⁸.

Os alimentos, são escolhidos de acordo com: os dados de consumo obtidos na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF); na disponibilidade dos alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação e no uso de agrotóxicos nas culturas. Com base nesses parâmetros, as últimas coletas para monitoramento foram realizadas no período de 2013 a 2015, foram avaliadas amostras de 25 culturas, são essas: arroz, abobrinha, abacaxi, alface, banana, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, goiaba, laranja, maçã, mamão, mandioca, manga, milho, morango, pepino, pimentão,

⁷ Este documento recomenda que a coleta seja feita no local em que a população adquire os alimentos, com vistas a obter amostras com características semelhantes ao que será consumido.

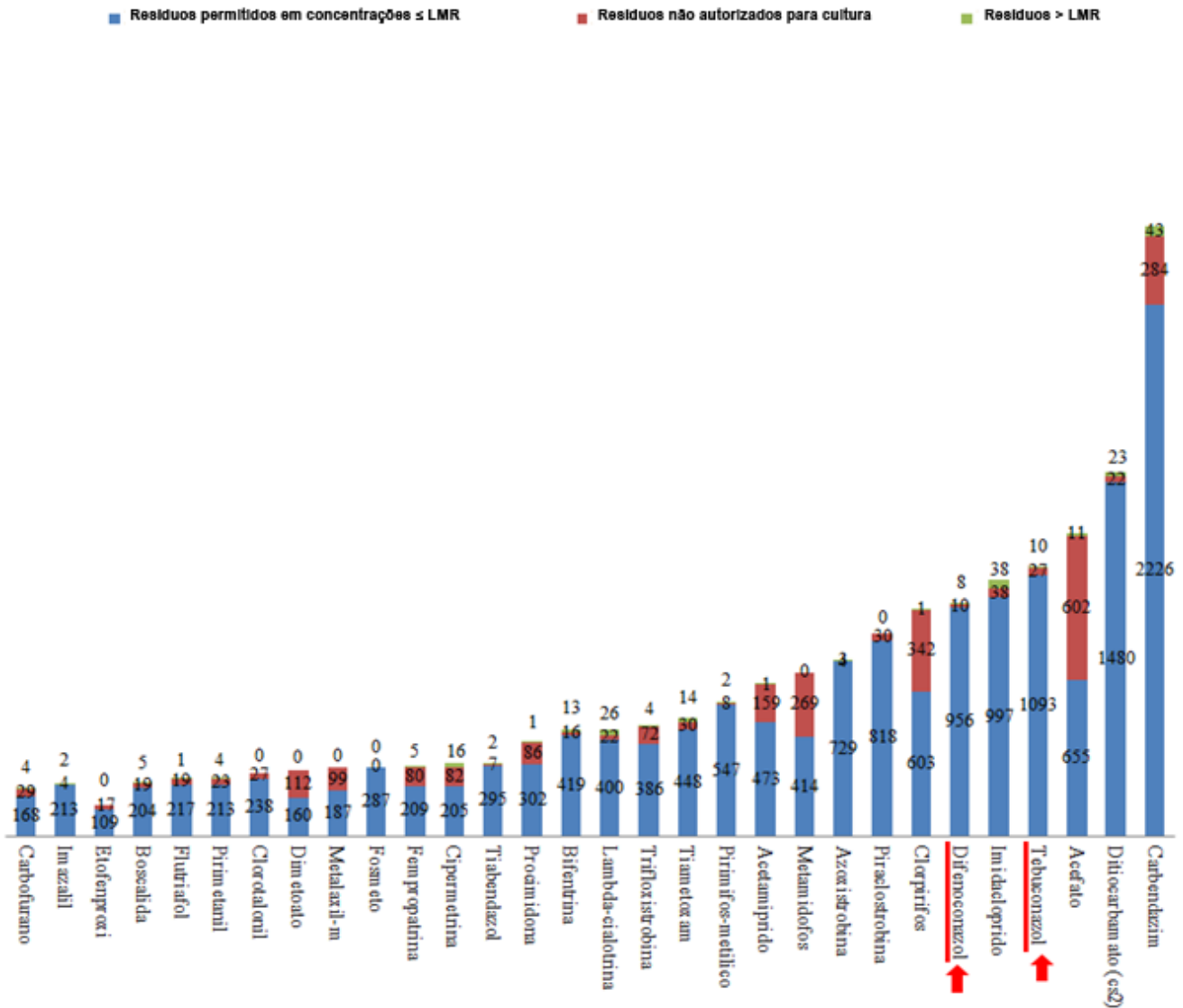
⁸Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed (Second Edition), 2009.

repolho, tomate, trigo e uva. De acordo com esta análise, ao todo foram 12.051 amostras de alimentos avaliados, sendo que 80.3% dos resultados das amostras monitoradas foram considerados satisfatórios quanto aos ingredientes ativos pesquisados, em 42% dessas amostras não foram detectados resíduos e 38.3% apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR (Limite Máximo de Resolução). As 19.7% amostras restantes foram considerados insatisfatórios por apresentarem resíduos de produtos não autorizados, ou autorizados, mas em concentrações acima do LMR (ANVISA, 2016).

De acordo com PARA o LMR “é um parâmetro agronômico, estabelecido legalmente pela ANVISA durante o registro do agrotóxico, em função da cultura agrícola e das instruções de uso contempladas na bula” (ANVISA, 2016). O LMR está diretamente relacionado com a qualidade dos alimentos comercializados, constituindo um dos componentes para o cálculo da exposição e avaliação do risco dietético que antecede o registro de um agrotóxico ou autorização da inclusão de novas culturas no registro (ANVISA, 2016).

Ao todo, foram pesquisados 232 agrotóxicos diferentes. Destes, 98 agrotóxicos não foram detectados nos alimentos monitorados. Foram detectados resíduos de 134 agrotóxicos diferentes nas 12.051 amostras analisadas, resultando em 22.721 detecções. Os grupos químicos que apresentaram o maior número de irregularidades foram: o grupo dos organofosforados, benzimidazóis, triazóis e neonicotinóides (PARA, 2016). Dentro do grupo químico dos Triazóis, o relatório mostrou um expressivo número de detecções do Tebuconazol (TBZ) e do Difenconazol (DFZ) (PARA, 2016). A Figura 1 apresenta no eixo X os nomes dos agrotóxicos com maior número de detecções e no eixo Y o número de amostras.

Figura 1 – Agrotóxicos com maior número de deteções (superior a 200), considerando todas as amostras analisadas do período de 2013 a 2015



Fonte: Adaptada de ANVISA (2016)

2.1.3 Fungicidas Triazóis: Tebuconazol (TBZ) e Difenconazol (DFZ) e seus efeitos toxicológicos

Dentre as classes de agrotóxicos, os fungicidas merecem atenção especial, pois são os mais utilizados, perfazendo 33% do total de agrotóxicos aplicados (SINDIVEG, 2016). Essas substâncias são utilizadas desde a antiguidade para o controle de doenças fúngicas, porém só tiveram reconhecimento quando Alexis Millardet desenvolveu a calda bordelesa, em 1882, para o controle do míldio-da-vidreira (ZAMBOLIM; JESUS, 2008).

Os fungicidas podem ser classificados quanto ao modo de ação em sistêmicos e de contato. Os sistêmicos, são aqueles que quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais, de forma a se distribuir uniformemente e ampliar o seu tempo de ação. Os de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico. E mesmo estes são, em boa parte, também absorvidos pela planta, penetrando em seu interior através de suas porosidades.⁹ Os fungicidas também são classificados com relação ao grupo químico em: triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol e dicarboximidas (ZAMBOLIM; JESUS, 2008).

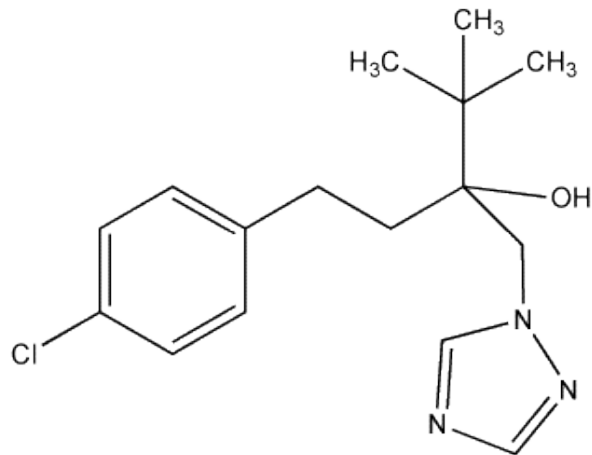
Os Triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formados por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. Caracterizam-se por serem sintéticos, apresentarem atividade biológica e se dividirem em três sais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazóis e 1,2,3-triazol (FREITAS et al., 2011). Como relatado anteriormente, o PARA detectou um número expressivo de fungicidas do grupo químico Triazol, dentre eles o TBZ e DFZ, em alimentos avaliados durante 2013 a 2015 (ANVISA, 2016).

O TBZ [(RS)-1-pchlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol] (FIGURA 2) age bloqueando a biossíntese do ergosterol, o principal componente da membrana plasmática dos fungos. Na falta do mesmo, a célula entra em processo de morte (SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999; TEBUCO, 2010). De acordo com dados da ANVISA o TBZ apresenta classificação toxicológica IV, sendo considerado pouco tóxico. É legalmente comercializado no Brasil, sendo usado em diversas formulações, em 37 produtos utilizados em diferentes culturas (AGROFIT, 2016). Estudos demonstram a atividade do TBZ em seres vivos, como exemplo a inibição da germinação e alterações cromossômicas e nucleares em células de vegetais modelo (BERNARDES et al., 2015; ARAGÃO, 2017), o

⁹ As informações a respeito da classificação dos fungicidas em sistêmicos e de contato foram obtidas a partir do site da Anvisa: <http://portal.anvisa.gov.br/duvidas-sobre-agrotoxicos-em-alimentos> (Acesso em 01/02/2017).

aumento da mortalidade de embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) com o aumento na concentração do fungicida (MACHADO et al., 2016), bem como possíveis efeitos adversos na unidade materno-placentária-fetal de ratas wistar durante o período gestacional (SOARES; MARTIN, 2015) e alterações sobre a hemostasia humana (TRENTO, 2017).

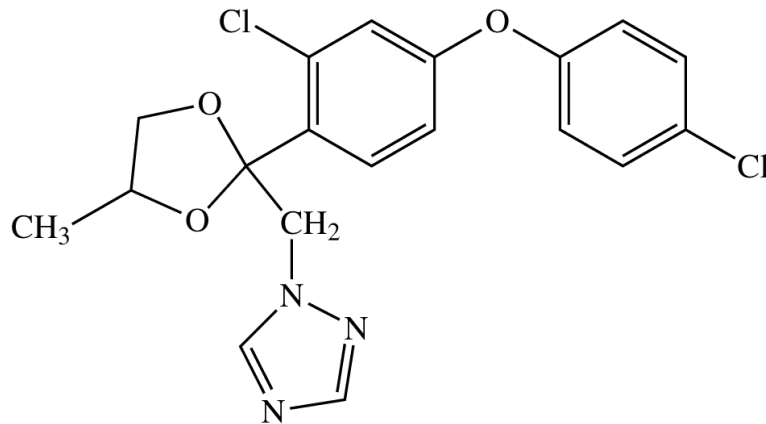
Figura 2 – Fórmula Química do Tebuconazol



Fonte: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35028>. Acesso em 20 de novembro 2016.

O DFZ {cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl] phenyl 4-chlorophenyl ether} (FIGURA 3) também é legalmente comercializado no Brasil e também atua inibindo a biossíntese de ergosterol, essencial à integridade da membrana celular, paralisando o desenvolvimento de diversas classes de fungos. De acordo com dados da ANVISA o DFZ apresenta classificação toxicológica I, sendo considerado altamente tóxico. Estudos demonstram que o DFZ possui efeitos genotóxicos no material genético de organismos vegetais como no *Allium cepa* e *Lactuca sativa* (BERNARDES et al., 2015; ARAGÃO, 2017). Além disso, são capazes de provocar alterações em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) (VIRGENS et al., 2015).

Figura 3 – Fórmula Química do Difenonazol



Fonte: <<http://www.insetimax.com.br/insetipedia/difenoconazol>>. Acesso em 20 de novembro 2016.

No trabalho de pesquisa de Aragão (2017) foram avaliados os efeitos tóxicos dos princípios ativos TBZ e DFZ a partir de diversos testes com o modelo vegetal *L. sativa*. Neste estudo foi observado um efeito fitotóxico dos dois princípios ativos, pois os mesmos reduziram o crescimento radicular. Com relação ao Índice Mitótico (IM), apenas os tratamentos com TBZ demonstraram redução do IM em relação ao controle negativo. Porém, Aragão (2017) relata que houve uma diminuição na quantidade de células em prófases e um aumento significativo na porcentagem de células em metáfases e telófases, evidenciando uma alteração do ciclo celular, caracterizando a ação citotóxica dos dois fungicidas.

O aumento na quantidade de alterações cromossômicas e nucleares foi expressivo caracterizando o potencial genotóxico dos princípios ativos. Houve aumento significativo de c-metáfases e cromossomos aderentes relacionando o mecanismo de ação a possíveis alterações no fuso mitótico (ARAGÃO, 2017). Quanto às alterações nucleares, neste mesmo trabalho, para os dois tratamentos foram observados um aumento significativo de núcleos condensados em relação ao controle negativo.

Os danos ao DNA foram quantificados pelo Teste Cometa, Teste TUNEL e avaliação da atividade enzimática por meio da quantificação das enzimas antioxidantes CAT, APX, SOD e POD. Aragão (2017) observou aumento de danos ao DNA, avaliado pelo Teste Cometa e TUNEL em todas as concentrações do TBZ, e apenas para o TUNEL no princípio ativo DFZ. A análise da atividade enzimática realizada neste mesmo trabalho demonstrou que apenas a enzima APX apresentou uma diferença estatística do controle negativo para o TBZ,

enquanto no DFZ apenas a enzima SOD foi diferente estatisticamente do controle negativo. Essas alterações nas atividades enzimáticas estão relacionadas ao estresse oxidativo, que conseqüentemente podem levar a morte celular (SOSA et al., 2013).

Bernardes et al. (2015) demonstram a fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos princípios ativos TBZ e DFZ por meio de análises macroscópicas, microscópicas e moleculares usando *A. cepa* como sistema de modelo de planta. Seus resultados demonstram que ambos os compostos causaram uma redução na germinação e no crescimento radicular do modelo vegetal. Houve um aumento das alterações nucleares em relação ao controle negativo, especificamente a frequência de núcleos condensados para TBZ. Para alterações cromossômicas, observaram-se baixas frequências de cromossomos perdidos, quebrados, aderentes, c-metáfases, pontes e c-metáfases poliplóides após a exposição a TBZ. Enquanto que, DFZ promoveu uma alta frequência de alterações cromossômicas, com a ocorrência de cromossomos perdidos e quebrados, c-metáfases, pontes e c-metáfases poliploides. No DNA genômico obtido a partir de tratamentos de DFZ e TBZ, observou-se degradação e fragmentação do DNA. Vale salientar que o estudo mostrou que mesmo em concentrações mais baixas, TBZ (considerado pela Anvisa pouco tóxico) foi mais citotóxico do que DFZ (considerado pela Anvisa altamente tóxico), causando uma redução significativa no IM (92,28%) em relação aos controles.

2.2 Bioensaios em Vegetais aplicados a toxicologia

A Toxicologia é uma ciência que estuda os efeitos dos compostos químicos nos organismos vivos. A mesma pode atuar: avaliando a ocorrência do agente tóxico, sua natureza, a toxicidade, mecanismos e danos que determinada substância química pode causar (HODGSON, 2004; ROBERTS; JAMES; WILLIAMS, 2014; ZAKRZEWSKI, 1994). Essa área de pesquisa utiliza de bioensaios como ferramenta para reprodução e compreensão dos efeitos da substância química de interesse. Os bioensaios podem ser realizados a partir de diferentes organismos, tanto procariontes como eucariontes, possibilitando a detecção ampla de danos ao DNA, como mutações, e aos cromossomos, como aberrações estruturais e numéricas (HOUK, 1992).

Os vegetais superiores tem sido amplamente utilizados para fins de detecção de efeitos genotóxicos de substâncias diversas. Os estudos mostram que os vegetais são altamente sensíveis a substâncias químicas e suas respostas nos testes podem ser comparadas aos testes realizados em outros organismos, por exemplo, o ser humano (ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2008; GRANT, 1999; FISKEJÖ, 1985; PALMIERI et al., 2016). Apresentam vantagem de serem mais simples, mais baratos, de mais fácil acesso e manutenção do que os testes com animais (FISKEJÖ, 1985, LEME; MARIN-MORALES, 2009). Sendo assim, se uma substância química provoca danos ao DNA de uma planta, esta substância deve ser considerada como tendo o potencial de danificar o DNA de outros organismos (RANK; NIELSEN, 1997).

Segundo relato de Fiskesjö (1985), o primeiro teste com plantas, que se tem registro, na identificação dos efeitos biológicos de poluidores ambientais foi em 1938, e o responsável foi o cientista Levan, que utilizou as pontas de raízes do gênero *Allium cepa* L. para identificar os efeitos citológicos da colchicina. Desde então, várias espécies têm sido utilizadas em experimentos de pesquisas para análise de efeito tóxico, como por exemplo *Hordeum vulgare* L., *Glycine max* L., *Tradescantia* L, *Vicia faba* L., *Zea mays* L e *Lactuca sativa* L. (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; SILVEIRA, 2016). Os testes compreendem aqueles macroscópicos, a exemplo dos bioensaios de germinação e crescimento e os microscópicos como as análises citogenéticas, testes de mutação de genes e testes moleculares. As instituições internacionais como a United Nations Environmental Program (UNEP), World Health Organization (WHO) e US Environmental Protection Agency (US EPA) aprovam a utilização dos bioensaios com plantas, para a prospecção de efeitos tóxicos de agentes químicos lançados no ambiente (GRANT, 1999).

Dos modelos citados anteriormente o *Allium cepa* L. (cebola), é o mais utilizado mundialmente. A espécie é uma monocotiledônea pertencente à família Amaryllidaceae. Apresenta número reduzido de cromossomos ($2n=2x=16$) e tamanho variando de 4,23 a 6,32 (BANDARU et al., 2011). Possui alta sensibilidade a agentes tóxicos, sendo um modelo para visualização de alterações cromossômicas e determinação do modo de ação do poluente em questão (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A espécie *Lactuca sativa* é comumente utilizada em estudos sobre efeitos alelopáticos em análises de germinação e crescimento da plântula (ARAGÃO et al., 2017; SOUSA et al.,

2009). Recentemente, a mesma espécie também tem sido utilizada como modelo para avaliar a genotoxicidade de compostos químicos através da avaliação do ciclo celular e suas possíveis alterações (ARAGÃO et al., 2017; SOUSA et al., 2009). Em 2017, Silveira, publicou um artigo correlacionando os modelos vegetais *A. cepa* e *L. sativa* demonstrando que as duas espécies são eficientes para bioensaios com aplicação em estudos toxicológicos. Trabalhos anteriores, envolvendo estudos sobre resíduos industriais ou químicos potencialmente tóxicos mostraram a sensibilidade do modelo *L. sativa* na detecção dos mecanismos de ação dos mesmos (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; CAMPOS et al., 2008a; HOU et al., 2014; PALMIERI et al., 2014).

L. sativa é uma eucotiledonea e pertence a família das Asteraceae, com número cromossômico considerado pequeno ($2n=2x=18$) e tamanho variando de 2,8 a 5,5 μ m (MATOBA et al., 2007), sendo facilmente visualizados ao microscópio óptico, assim como para *A. cepa*. Produz um grande número de sementes, as quais são pequenas, o que contribui para uma maior área de superfície de contato com a substância avaliada, apresentando ainda alta sensibilidade, fácil e rápida germinação (CAMPOS et al., 2008a).

2.3 A Citogenética Clássica aplicada a estudos de toxicologia

A citogenética é uma ciência que estuda a hereditariedade com bases citológicas e visa o estudo da estrutura (número e forma) e comportamento (organização e movimentação) dos cromossomos/cromatina no meio celular, buscando a compreensão da função dos cromossomos e suas implicações na transmissão, recombinação e expressão gênica (SUMNER, 2003). A citogenética é aplicada a estudos de citotaxonomia, de evolução, de caracterização de cariótipos de espécies, de medicina clínica, de melhoramento genético, de doenças humanas e de efeito citotóxico de agentes químicos ou físicos. Em relação à este ultimo, atualmente, estudos citogenéticos de avaliação de toxicidade têm sido amplamente empregados para análise de diversos compostos a partir de estudos do ciclo celular e índice mitótico de organismos modelo (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; KLANČNIK et al., 2011; DHO et al., 2010; KUMARI et al., 2011).

A análise do ciclo celular, que compreende intérfase (G1, S, G2) e a mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase), fornece informações sobre a organização e comportamento dos

cromossomos durante a divisão, e, em análises de toxicidade, permite a detecção de anormalidades, como as aberrações cromossômicas e nucleares que, em geral, são consequência do efeito de agentes tóxicos (ANDRADE; CAMPO; DAVIDE, 2008; ANDRADE, DAVIDE, GEDRAITE, 2010; GRANT, 1994).

O Índice Mitótico (IM) refere-se ao número total de células em divisão durante o ciclo celular, e qualquer alteração neste índice, aumento ou redução, auxilia na determinação do grau de citotoxicidade de um agente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Bernardes et al. (2015), verificou a diminuição do IM para os tratamentos com os fungicidas Tebuconazol e Difenconazol mesmo em concentrações inferiores à recomendada pelo fabricante em *Lactuca Sativa*.

As anormalidades cromossômicas e nucleares são indicadoras de toxicidade de agentes químicos. As anormalidades cromossômicas também conhecidas como aberrações são critérios muito disseminados nos estudos de mutagenicidade (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Estes são definidos como quaisquer alterações na estrutura ou no número dos cromossomos e originadas por quebras, inativação de estruturas, inibição da síntese ou replicação alterada do DNA de modo espontâneo ou induzida por exposição a agentes químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Várias dessas alterações são altamente prejudiciais à célula, muitas vezes irreversíveis fazendo com que a célula entre em processo de morte celular (PALMIERI, 2014).

Os efeitos causados pelas substâncias tóxicas, sejam elas químicas ou físicas, podem ter duas gêneses: efeito clastogênico e aneugênico (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008). O efeito clastogênico é decorrente de quebras no DNA, as quais tem como consequência deficiências, duplicações, inversões e translocações, que são evidenciadas nos cromossomos durante o ciclo mitótico como pontes em anáfase-telófase e fragmentos cromossômicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O efeito aneugênico está relacionado a inativação ou alteração de estruturas celulares relacionada ao movimento dos cromossomos durante a mitose, como, por exemplo, microtúbulos e centrômeros, provocando alterações na progressão do ciclo celular e podendo causar alterações numéricas, como as euploidias e aneuploidias (LEME; MARIN-MORALES, 2009; FREITAS et al., 2016).

No trabalho de Bernardes et al. (2015) e Aragão (2017), as alterações causadas pelos princípios ativos tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ) foram: pontes, cromossomos quebrados, c-metáfases, metáfases poliploides, cromossomos aderentes, e cromossomos

perdidos. O efeito aneugênico, alteração do funcionamento do fuso, fica evidente quando cromossomos não alinhados ao fuso também são observados entre as células tratadas com DFZ e TBZ. Recentemente, estudando o efeito de um poluente ambiental, derivado da produção e processamento do alumínio sobre a fosforilação da serina 10 na histona H3, na região pericentromérica dos cromossomos de alface Freitas et al. (2016) observaram que a deficiência da fosforilação é uma das causas da observação desses cromossomos não ligados ao fuso ao longo da divisão mitótica.

A presença de pontes e cromossomos quebrados sugere a ação clastogênica (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PANDA; PANDA 2002). A quebra cromossômica induzida pelo agente clastogênico leva à formação de fragmentos cromossômicos acêntricos. Os cromossomos que sofreram quebras perdem o telômero e, conseqüentemente, sua estabilidade. Esses cromossomos instáveis tendem a fundir-se a outros cromossomos, gerando cromossomos dicêntricos (CAMPOS et al., 2008b). Na ocasião da anáfase, o centrômero de cada cromossomo é ligado ao fuso de um dos polos da célula, a cromátide entre os centrômeros é vista como uma ponte entre os dois polos anáfasicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PANDA; PANDA 2002).

A presença de c-metáfases e metáfases poliploide, segundo Fenech (2000), caracteriza efeito de ação aneugênica, pois esta, resulta de alterações no funcionamento do fuso mitótico e divisão celular anormal que podem culminar com a formação de células aneuploides. A morte celular é um indicador de alta toxicidade e citologicamente é evidenciada pela presença de núcleos condensados (ANDRADE-VIEIRA et al, 2011). Esta, ocorre quando o organismo intoxicado aciona mecanismos que resultam na morte da célula danificada, sendo um processo geneticamente definido e associado com as alterações morfológicas e bioquímicas do organismo (DANON et al., 2000; XIONG; LI; LI, 2006). As principais características de morte celular em plantas é a condensação cromatídica, que pode ser evidenciada por núcleos muito pequenos e picnóticos (núcleos condensados) e a fragmentação celular observada em gel de agarose (DANON et al., 2000).

As anormalidades nucleares, que são alterações morfológicas no núcleo interfásico, como núcleo lobulados, polinúcleos, minicélulas e micronúcleos também estão relacionadas a ação tóxica de agentes químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009) e de acordo com Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) estas alterações são resultantes de células portadoras de pontes cromossômicas durante anáfase e telófase. Destas alterações nucleares

citadas os micronúcleos (MN) é a alteração mais difundida em trabalhos de avaliação de toxicidade. Eles são estruturas presentes no citoplasma que contém cromatina, revestido por uma membrana e não possuem ligação com o núcleo principal, podendo ser originado tanto por cromossomos inteiros como por fragmentos acêntricos (FENECH, 2000; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Além dos estudos a nível celular, atualmente existe uma tendência a uma abordagem molecular na área de toxicologia que permite uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados às alterações do ciclo celular descritas. Desta forma, a seguir trataremos com mais detalhes da Citogenética Molecular e dos estudos nessa área.

2.4 A Epigenética do Estresse em plantas

Nas células eucarióticas o DNA nuclear se encontra associado à proteínas histônicas e não histônicas formando uma complexa estrutura denominada cromatina. No progresso do ciclo celular, a cromatina passa por intensos rearranjos estruturais e espaciais. O remodelamento da cromatina possibilita a execução das principais funções nucleares: replicação, transcrição e condensação cromossômica (BRADBURY, 1992). Os rearranjos da eucromatina podem inibir ou facilitar a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios, tendo como consequência o silenciamento ou ativação gênica, esses eventos são de interesse da Epigenética (FUCHS et al., 2006; LEWIN, 2004).

A Epignética é o estudo de mudanças na expressão gênica que ocorrem independentemente das mudanças na sequência de DNA primária e podem ser herdadas (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Os estudos epigenéticos tem se destacado nas pesquisas em genômica funcional de plantas, uma vez que, a epigenética desempenha um papel importante na regulação gênica do desenvolvimento, resposta a estresses ambientais e na variação natural dos níveis de expressão gênica (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; SAHU et al., 2013; SPRINGER, 2013).

Os efeitos epigenéticos são atribuídos a uma variedade de mecanismos moleculares, a exemplo da metilação do DNA, expressão de pequenos RNAs, paramutação, arranjo de nucleossomas, e modificações de histonas (HTPMs). As histonas são proteínas alcalinas, consideradas as principais componentes proteicas do núcleo celular (PAWLAK; DECKERT,

2007). Essas proteínas nucleares são classificadas em histonas centrais, H2A, H2B, H3e H4, e histona ligante, H1. Apresentam dois domínios o núcleo globular e a cauda N-terminal em H3 e H4 ou caudas N- e C-terminais em H1, H2A e H2B (KALLEN; ZHANG; 2004).

As HTPMs como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deiminação e isomerização de prolina, geralmente, ocorrem nas caudas e estão associadas com funções distintas (CHEN; SHAOLEI; MENG, 2010; ESPINO et al., 2005; JENUWEIN; ALLIS, 2001; KOUZARIDES, 2007, SPRINGER, 2013). Essas modificações podem ser entendidas como ajustes do genoma frente a uma nova situação (LEVIN, 2002) e são fatores determinantes do controle epigenético que regulam a atividade gênica e as modificações da cromatina durante os ciclos celulares (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011), incluindo transcrição, reparo de DNA e apoptose (FERNANDEZ-CAPITILLO et al., 2004; KIMURA, 2005).

Na histona H3, os locais destas modificações pós-traducionais estão principalmente agrupados nos primeiros 40 aminoácidos do domínio N-terminal (EARLEY, et al., 2007; LEE et al., 2007, WOZNIAK et al., 2007). Tais modificações são necessárias para interações com domínios de proteínas específicos, tais como bromodomínios, que interagem com histona contendo resíduos de lisina acetilada (CHUA et al., 2005); cromodomínios, que se ligam a caudas de histonas lisadas com metila (LI et al., 2007); ou 14-3-3, que interagem com histona H3 fosforilada (MACDONALD et al., 2005, WINTER et al., 2008).

Dentre as fosforilações, a fosforilação da histona H3 é a HTPM mais estudada (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013). Observações iniciais em vários eucariotos mostraram que o nível de fosforilação da histona H3, que é mínimo na interfase, aumenta durante a mitose (GURTLEY; WALTERS; TOBEY, 1975, HENDZEL et al., 1997) e pode estar associada com a condensação e/ou segregação cromossômica, transcrição e reparo de danos ao DNA e ativação da morte celular (PAWLAK; DECKERT, 2007).

Com o desenvolvimento de anticorpos específicos para a histona H3 fosforilada na serina 10, Hendzel et al. (1997) foram capazes de mostrar, *in vivo*, um padrão temporal e espacial preciso da fosforilação de H3S10 em células de mamíferos. Eles descobriram que a fosforilação na serina 10 da H3 é iniciado no final G2 e, em seguida, se espalha por toda a cromatina, até ao final da mitose.

Apesar das histonas e algumas das suas modificações serem altamente conservadas, estudos demonstram que a distribuição espaço-temporal da H3S10f pode diferir entre as espécies (HANS; DIMITROV, 2001; HOUBEN et al., 2007). A fosforilação da H3 pode ocorrer no início da condensação cromossômica ou em estruturas já fortemente condensadas, em todo comprimento do cromossomo ou apenas na região pericentromérica, além disso, o padrão de fosforilação na mitose pode diferir da meiose em um mesmo organismo.

Por exemplo, em mamíferos, a fosforilação dependente do ciclo celular da H3 nas serinas 10/28 que se origina na região pericentromérica (GOTO et al., 1999) e se espalha ao longo dos cromossomas durante a fase de transição G2-M é mais susceptível de estar interligada com a iniciação da condensação cromossômica (VAN HOOSER et al., 1998). Na levedura, por outro lado, a fosforilação da H3 na serina 10 não é necessária para a progressão do ciclo celular, onde a fosforilação da histona H2B pode substituir a função da fosforilação da H3. Em plantas, a distribuição da fosforilação da H3 na serina 10 correlaciona-se com a posição pericentromérica durante a mitose e a meiose II (HOUBEN et al., 1999; KASZAS; CANDE, 2000; KURIHARA, et al., 2005; MANZANERO, et al., 2000; RESENDE et al., 2015) e serina 28 (GERNAND; DEMIDOV; HOUBEN 2003, ZHANG et al., 2005).

No entanto, a fosforilação da H3 apresenta uma característica comum em ambas às divisões celulares e não difere nos organismos estudados, os cromossomos são sempre fortemente fosforilados na metáfase e desfosforilados após saírem da mitose ou meiose (HANS; DIMITROV, 2001). Análises de cromossomos dicêntricos revelaram H3S10 hiperfosforilado somente no centrômero funcional (FU et al., 2012, Houben et al., 1999). Indicando que a fosforilação de H3S10 é uma marca epigenética para (peri) centrômeros ativos.

Estresses ambientais, como presença de metais pesados, irradiação UV, proliferadores de peroxissomos, poluentes e salinidade (BACARELLI; BOLLATI, 2009; FREITAS, et al., 2016; PAWLAK; DECKERT, 2007) podem perturbar a atividade de regulação epigenética, com isso, efeitos hereditários sobre as marcas epigenéticas e alterações na expressão do gene podem surgir (GRANT-DOWNTON; DICKINSON, 2006). Estudos recentes sugerem que as histonas podem participar da reação das células aos estressores ambientais (PAWLAK; DECKERT, 2007) .

Freitas et al. (2016) em uma abordagem epigenética sobre os efeitos do SPL e seus principais componentes sobre o ciclo celular de *Lactuca sativa L.* apresenta em seus resultados células em divisão normal com distribuição espaço temporal regular da fosforilação da histona H3 na serina10 (H3S10f). Entretanto, foram identificadas anormalidades no ciclo celular, tais como c-metáfases, cromossomos aderentes, anáfases multipolares, células poliploides, e com micronúcleos. Algumas dessas alterações provocadas pelo SPL e seus principais constituintes foram relacionadas com a inativação de regiões pericentroméricas evidenciadas pela H3S10f.

Segundo Burkhart et al, 2007, a fosforilação da histona H3 nas posições da serina 10 e 28 aumenta sob o estresse osmótico e parece ser uma resposta a vários estresses ambientais. Também foi observado o aumento da fosforilação da H3 e acetilação da H3 e H4 em resposta a estresse abiótico em Tabaco e *Arabidopsis* (SOKOL, 2007). Zao (2014) observou a combinação de estados de hiperacetilação e hipoacetilação de sítios de lisina nas caudas N-terminais de H3 e H4 de células de milho sob condições de estresse abiótico. Žabka et al. (2012) verificou que o tratamento com HU prolonga a fosforilação da H3 na serina 10 em cebola.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de atividades de 2013 e 2015. Brasília, 2016.

ANVISA. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília, 11 abril de 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPO, J. M. S; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 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**, San Diego, n. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, 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. 74, n. 4, p. 882-888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 30 de novembro de 2016.

ARAGÃO, F. B. **Prospecção da toxicidade e a atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa***. 2017. 94p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

AUGUSTO L. G. S. et al. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: CARNEIRO F. F., et al (Org(s)). **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.

BANDARU, V. R. et al. Image cytometric determination of nuclear and chromosomal DNA contents in *Allium cepa* L. **The Nucleus**, Lucknow, v. 54, n. 2, p. 71, 2011.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 381, 2011.

BACCARELLI, A; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current opinion in pediatrics**, Palo Alto, v. 21, n. 2, p. 243-251, 2009.

BRADBURY, E. M. Reversible histone modification on the chromosome cell cycle. **Bioessays**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 9-16, 1992.

BELO, M. S. S. P. et al. Uso de agrotóxicos na produção de soja do Estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, Rio de Janeiro, RJ, v. 37, n. 125, p.78-88, 2012.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, Amsterdam, v. 226, n. 207, p. 1-11, 2015.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de junho de 1989. Lei dos Agrotóxicos. Brasília: 1989.
Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074compilado.htm>
Acesso em 13/02/2017.

BRASIL. Manual de Procedimento para registro de Agrotóxicos. Brasília, DF, 2012
Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/agrotoxicos/Manual%20de%20Procedimentos%20para%20Registro%20de%20Agrot%C3%B3xicos.pdf> Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

BRASIL. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília, DF, 2016.

BURKHART, B. A.; KENNETT, S. B.; ARCHER, T. K. Osmotic stress-dependent repression is mediated by histone H3 phosphorylation and chromatin structure. **Journal of Biological Chemistry**, EUA, v. 282, n. 7, p. 4400-4407, 2007

BÚRIGO, A. C. et al. A crise do paradigma do agronegócio e as lutas pela agroecologia. In: CARNEIRO, et al (Org(s)). **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.

CABRERA G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, New York, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CAMPOS, J. M. S. et al. Chapter 5: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. In: **Narwal t al. (eds.), Plant Bioassays**, Studium Press, Houston, Texas. pp. 81-96, 2008a.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 22, n.1, p. 143-152, 2008b.

CHEN, M.; SHAOLEI L, V.; MENG, Y.. Epigenetic performers in plants. **Development, growth & differentiation**, Medford, v. 52, n. 6, p. 555-566, 2010.

CHUA, Y. L. et al. The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in Arabidopsis by histone acetylation at ASYMMETRIC LEAVES1. **Genes & development**, Melbourne, v. 19, n. 18, p. 2245-2254, 2005.

DANON, A. et al. Review plant programmed cell death: a common way to die. **Nature**, New York, v. 38, p. 647-655, 2000.

DHO, S. et al. Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. **Environmental and experimental botany**, Barcelona, v. 69, n. 1, p. 17-23, 2010.

EARLEY, K. W. et al. In vitro specificities of Arabidopsis co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. **The Plant Journal**, Medford, v. 52, n. 4, p. 615-626, 2007.

ESPINO, P. S. et al. Histone modifications as a platform for cancer therapy. **Journal of cellular biochemistry**, Medford, v. 94, n. 6, p. 1088-1102, 2005.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. The state of food security and nutrition in the world – 2017. Roma: FAO, 2017.

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

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

FERNANDES, V.; SAMPAIO, C. A. C. Problemática ambiental ou problemática socioambiental? A natureza da relação sociedade/meio ambiente. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 18, p. 87-94, 2008.

FREITAS, L. B. O. et al. **Química Nova**, v. 34. p.191 – 1804, 2011.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**. San Diego, v. 124, p. 426-434, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FERNANDEZ-CAPETILLO, O.; ALLIS, C. D.; NUSSENZWEIG, A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 12, p. 1671-1677, 2004.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FUCHS, J. et al. Chromosomal histone modification patterns: from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 4, p. 199-208, 2006.

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

GERNAND, 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 mono- and polycentric chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, Würzburg, v. 101, n. 2, p. 172-176, 2003.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, New York, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GOTO, H. et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. **Journal of Biological Chemistry**, *Amherst*, v. 274, n. 36, p. 25543-25549, 1999.

GRANT-DOWNTON, R. T.; DICKINSON, H. G. Epigenetics and its implications for plant biology 2. The ‘epigenetic epiphany’: epigenetics, evolution and beyond. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 11-27, 2005.

GUERRA, M. S. Os Cromossomos Metafásicos e o Ciclo Celular. In: GUERRA, M. dos S. (Ed.) **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 8-12, 1988.

GURTLEY, L. R.; WALTERS, R. A.; TOBEY, R. A. Sequential phosphorylation of histone subfractions in the Chinese hamster cell cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, Amherst, v. 250, n. 10, p. 3936-3944, 1975.

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**, Boston, v. 103, n. 9, p. 3238-3243, 2006.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, Stanford, v. 20, n. 24, p. 3021, 2001.

HENDZEL, M. J. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, p. 348-360, 1997.

HODGSON, E. **Textbook of Modern Toxicology**. (Ed). 3^a ed., John Wiley & Sons: New Jersey, cap 1, 2004.

HOU, J. et al. Seed germination, root elongation, root-tip mitosis, and micronucleus induction of five crop plants exposed to chromium in fluvo-aquic soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Malden, v. 33, n. 3, p. 671–676, 2014.

Houben, A.; Demidov, D.; Karimi-Ashtiyani, R. **Epigenetic control of cell division**. G. Grafi, N. Ohad (Eds.), *Epigenetic Memory and Control in Plants, Signaling and Communication in Plants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 155-175, 2013.

Houben, A. et al. Phosphorylation of histone H3 in plants—a dynamic affair. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, Pennsylvania, v. 1769, n. 5-6, p. 308-315, 2007.

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

Houk, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. Brasil, 2015. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento do inca sobre os agrototoxicos_06_abr_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrototoxicos_06_abr_15.pdf). Acesso em: 22 out. 2016.

Ishii, T. U. T.; Tanaka, H.; Tsujimoto, H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome research**, New York, v. 18, n. 7, p. 821-831, 2010.

Jenuwein, T.; Allis, C. D. Translating the histone code. **Science**, New York, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001.

Kaszas, 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**, Londres, v. 113, n. 18, p. 3217-3226, 2000.

Klančnik, K. et al. Use of a modified Allium test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and environmental safety**, New York, v. 74, n. 1, p. 85-92, 2011.

Kimura, H. Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. **DNA repair**, Chapel Hill, v. 4, n. 8, p. 939-950, 2005.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Shanghai, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 2009. 58p, Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental)-Univ. Feevale Univ. Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of hazardous materials**, New York, v. 190, n. 1, p. 613-621, 2011.

KURIHARA D. et al. **Mitotic phosphorylation of histone H3 in plants**. *Plant Cell Physiol* 46:S66. 2005.

LEE, S. et al. Epigenetic regulation of histone H3 serine 10 phosphorylation status by HCF-1 proteins in *C. elegans* and mammalian cells. **PloS one**, San Francisco, v. 2, n. 11, p. e1213, 2007.

LEWIN, B. **Genes VIII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004.

LEVIN, D. A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. New York: Oxford University Press. 2002.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, North Carolina, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**. Turku, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.

LI, B. et al. Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. **Science**, New York, v. 316, n. 5827, p. 1050-1054, 2007.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MACHADO, M. R. F. et al. Qualidade embrionária e sua influência nas repostas de testes de toxicidade em zebrafish- *Danio rerio*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4, n. 1, p.59-59, 2016.

MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, v. 109, n. 5, p. 308-317, 2000.

MACDONALD, N. et al. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. **Molecular cell**, v. 20, n. 2, p. 199-211, 2005.

MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.

MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T. C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, n. 2, p. 157-166, 1974.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat×maize zygotes. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 199-205, 2004.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30–35, 2014.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut.** Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PANDA, B. B; PANDA K .K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants, in: M.N.V. Prasad, K. Strzałka (Eds.), **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. Kluwer Academic Publishers.395–414, 2002.

PANDA, Brahma B.; PANDA, Kamal K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. In: **Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants**. Springer, Dordrecht, 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**, Bengaluru, v. 92, n. 2, p. 259-266, 2013.

PAWLAK, S.; DECKERT, J. Histone modifications under environmental stress. **Biology Letters**, London, v. 44, n. 2, p. 65-73, 2007.

PELAEZ, V; DA SILVA, L. R; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis. **Science and Public Policy**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 644-656, 2013.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio: Agrotóxico, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, 1997.

RESENDE, K. F. M. et al. Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in '*Pennisetum*' spp. Rich.(Poaceae). **Australian Journal of Crop Science**, Austráulia, v. 9, n. 5, p. 453, 2015.

ROBERTS, S. M.; JAMES, R. C.; WILLIAMS, P. L. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. John Wiley & Sons, 2014.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, USA, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical microbiology reviews**. Washington. v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SHIBATA, F; MURATA, M. Differential localization of the centromere specific proteins in the major centromeric satellite *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 117, n. 14, p. 2963-2970, 2004.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 178, p. 359-367, 2017.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (2016).

Sindiveg: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas.

<<http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolas-registra-queda-nas-vendas-em-2016/>>. Accessed on 20 October 2017.

SOARES, J. S.; MARTIN, M. R. C. Toxicidade materna e fetotoxicidade de ratas wistar tratadas com Tebuconazol, durante o período organogênico. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juíz de Fora, v. 16, n. 7, p. 7-19, 2015.

SOBREIRA, A. E. G; ADISSI, P. J. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 985-990, 2003.

SOKOL, Agnieszka et al. Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. **Planta**, v. 227, n. 1, p. 245-254, 2007.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, Maryland, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. Florence, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SUMNER, A. T. **Chromosomes organization and function**. North Berwick, Reino Unido: Blackwell, p.287, 2003.

TEBUCO. **Concentração Emulsionável**. Arapongas, PR. NORTOX. 2010. Bula.

TRENTO, M. V. C. **Tebuconazol e difenoconazol: Efeitos citogenotóxicos e sobre a homeostasia humana**. 2017. 44p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

VAN HOOSER, A. et al. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. **Journal of cell science**, Cambridge, v. 111, n. 23, p. 3497-3506, 1998.

VIRGENS, A. C. et al. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida. **Natureza on line**, Santa Teresa/ES, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

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

WINTER, S. et al. 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. **The EMBO journal**, London, v. 27, n. 1, p. 88-99, 2008.

WOZNIAK, R. J. et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. **Oncogene**, Stanford, v. 26, n. 1, p. 77, 2007.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Principles of Environmental toxicology**, American Chemical Society: Washington, 1994.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JUNIOR, W. C. **O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças – parte básica**. In: ZAMBOLIM, L. PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; JESUS JUNIOR, W. C. Produtos Fitossanitários: Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas. Viçosa: UFV/DFP, 2008. 652 p.

ZHANG, X. et al. Phosphoserines on maize CENTROMERIC HISTONE H3 and histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 17, n. 2, p. 572-583, 2005.

ZHAO, L. et al. Transcriptional regulation of cell cycle genes in response to abiotic stresses correlates with dynamic changes in histone modifications in maize. **PLoS One**, Finland, v. 9, n. 8, p. e106070, 2014.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - Normas da Environmental Science and Pollution Research (versão preliminar)

EFEITO DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE FUNGICIDAS A BASE DE TRIAZOIS EM CROMOSSOMOS MITÓTICOS DE *Lactuca sativa* L. E A FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3 NA SERINA 10.

EFFECT OF COMMERCIAL TRIAZOLE-BASED FUNGICIDES ON MITOTIC CHROMOSOMES OF *Lactuca sativa* L. AND THE PHOSPHORYLATION OF HISTONE H3 AT SERINE 10

ABSTRACT

Tebuconazole (TBZ) and Difenoconazole (DFZ), active principles of commercial fungicides from the triazole class, were detected in irregular amounts in food samples analyzed for the Anvisa in the Program on Pesticide Residue Analysis (PARA) in 2016. These substances are toxic for living beings, showing genotoxic, mutagenic and carcinogenic properties, even at low concentrations. In this context, it is important to elucidate the effects of these compounds as well as their toxicity mechanisms. Hence, this study aimed to determine whether the changes in the mitotic cycle brought about by commercial fungicides containing the active principles TBZ and DFZ are related to the distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in chromosomes of meristematic cells of the plant model *Lactuca sativa* L. Mitotic cells treated with commercial fungicides containing TBZ (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) and DFZ (31.25 $\mu\text{g L}^{-1}$) were compared with a negative control (Milli-Q water). Both fungicides were found to induce alterations in the distribution and number of signals of H3S10ph. The immune signal was considered irregular when scattered marks were observed throughout the chromosomes, or if such marks were absent. These irregularities were found in sticky chromosomes, c-metaphases, anaphase bridges, and also in normal metaphases and anaphases. This way, the present research contributes to understanding the mechanisms of action of TBZ and DFZ in mitosis.

Keywords: Tebuconazole, Difenoconazole, mitotic alterations, plant model, epigenetics, immune signal, sticky chromosomes.

1 Introduction

Brazil is considered the country with the highest use of pesticides in the world (Pelaez et al. 2013). The Program on Pesticide Residue Analysis (PARA), organized by the National Health Surveillance Agency (Anvisa), was started in 2001 with the aim of continuously evaluating the levels of pesticide residues in foods of plant origin that reach the table of consumers. The last sample collections for monitoring were carried out between 2013 and 2015, and residues were detected in 58% of the tested foods, which included samples of 25 crops: rice, zucchini, pineapple, lettuce, banana, potato, beet, onion, carrot, kale, bean, guava, orange, apple, papaya, cassava, mango, maize, strawberry, cucumber, bell pepper, cabbage, tomato, wheat, and grape.

Of the samples presenting residues, 19.7% contained products that were not authorized or above the maximum permitted limits (Anvisa 2016). The presence of these pesticide residues in foods is alarming, seeing that their use is highly associated with the incidence of diseases such as cancer (INCA 2015).

Among the pesticide classes, fungicides deserve special attention as they are the most used substances, amounting to 33% of the total of applied pesticides (Sindiveg 2016). The report mentioned above related the presence of significant amounts of the active principles Tebuconazole (TBZ) and Difenoconazole (DFZ) in the evaluated foods, both belonging to the chemical group of triazoles and found in commercial fungicides. TBZ belongs to the toxicological class IV and is considered little toxic, whereas DFZ is categorized as class I and considered extremely toxic (Anvisa 2016a, b).

Studies aiming to understand the toxicity mechanisms of these fungicides in living beings are relevant, since they may contribute to strengthen initiatives for regulation and control of such products. Among the biological assays proposed to investigate the toxicity of substances considered harmful to health and the environment, those using plants as models stand out for their simplicity and low cost (Grant 1999). Moreover, they present good correlation with other test models and systems, including animal models (Bianchi et al. 2015) and even human cells (Palmieri et al. 2016; Reis et al. 2017).

Among the plants used as models, *Lactuca sativa* L., a eudicot of the family Asteraceae, presents advantages such as high sensitivity and easy and rapid germination (Campos et al. 2008). Moreover, compared to other plant models, lettuce seeds can be purchased at low cost, with several varieties available on the market (Silveira 2016). Other

advantages concern the chromosome size, which varies from 2.8 to 5.5 μm (Matoba et al. 2007), and their small number, 18 chromosomes, being easily visualized under optical microscope.

The impact of TBZ- and DFZ-based fungicides on the structure or behavior of chromosomes of model plants has been previously described by Bernardes et al. (2015) and Aragão (2017). Among the alterations observed in the cell cycle using classical cytogenetic analyses, those related with progression of the cycle and segregation of the chromatids are the most frequent (Bernardes et al. 2015; Aragão 2017). It has been established that several environmental stressors, such as chemical pollutants, can modulate the epigenome (Baccarelli and Bollati 2009; Guéant et al. 2013). Hence, the alterations observed by Bernardes et al. (2015) and Aragão (2017) may arise from changes in epigenetic regulators that control the attachment of the chromosomes to the mitotic spindle.

The phosphorylation of histone H3 at serine 10 (H3S10f) is one of the epigenetic modifications that may elucidate the mechanisms of action explaining the effects of TBZ- and DFZ-containing fungicides on the progression of the cell cycle. This epigenetic mark is characterized as a post-translational modification involved in the cohesion of sister chromatids in plants (Kaszas and Cande 2000; Paula et al. 2013; Shibata and Murata 2004). According to Houben et al. (1999), H3S10f is an essential characteristic in the structure of the centromere/kinetochore, being necessary to ensure the mechanical stability of the centromere during chromosome movement. Analyses of dicentric chromosomes have revealed that the phosphorylated H3S10 only occurs in the functional centromere (Fu et al. 2012; Han, Lamb and Birchler 2006; Houben 1999), indicating that it constitutes an epigenetic mark for active (peri-) centromeric regions (Houben et al. 2013).

Given the toxic potential of pesticides and the lack of works regarding their effect on living organisms, it is essential to produce data that help understand the mechanisms which cause alterations in the cell cycle of organisms exposed to fungicides containing the active principles TBZ and DFZ. Thus, using the immunolocalization technique, the present study aimed to evaluate whether the alterations in the cell cycle caused by TBZ and DFZ fungicides are related to modifications in the phosphorylation pattern of histone H3 at serine 10 during mitosis in meristematic cells of *L. sativa*.

2 Material and Methods

2.1 Plant material and treatments

Seeds of *Lactuca sativa* L. var. Verônica (lettuce) obtained from the Vegetable Germplasm Database of the DAG/UFLA were used as biological material.

Two commercial products were used, each containing one of the active principles tested in this study. The solutions were prepared by diluting the commercial TBZ- and DFZ-based products in distilled water. The concentration used here corresponds to that recommended by the manufacturer for each fungicide: 50 µg/mL for the product containing the active principle TBZ and 31.25 µg/mL for the DFZ-based fungicide. Ultrapure (Milli-Q) water was used as negative control.

2.2 Germination and root exposure

The seeds were arranged in polyethylene Petri dishes of 9 cm containing filter paper soaked in 3 mL of ultrapure water for root protrusion (16 h for lettuce) (Silveira 2016).

The seeds presenting roots of 1-2 mm were subjected to the treatments in Petri dishes containing filter paper moistened with 3 mL of the active principles TBZ or DFZ. After 48 h of exposure, the roots were collected and fixed in Carnoy solution (ethanol : acetic acid, 3:1) and stored at -4°C.

The Petri dishes containing the seeds were kept in a B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) incubator throughout the experiment period at 24°C, in the dark to avoid the influence of light (Narwal et al. 2009).

2.3 Immunolocalization of histone H3 at serine 10 (H3S10f)

The fixed roots were washed with distilled water for three times of 5 min. Enzymatic digestion was performed using the cellulase enzyme “Onozuka R-10” (0.7%), cellulase (0.7%) (Sigma-Aldrich), pectolyase (1%) (Sigma-Aldrich) and cytohellicase (1%) (Sigma-Aldrich) in water bath at 37°C for 50 min. The slides were prepared by dissociation technique in solution of ethanol and acetic acid (2:1).

The slides were placed into a cuvette containing 1X citrate buffer, pH 6.0, and the set was heated in a microwave oven for 20 seconds at 800 W. Immediately afterwards, the slides were placed in a cuvette containing 1X PBS for 5 min. For blockage, 50 μ L of 10% BSA (bovine serum albumin) with 0.1% Triton-X100 were added to each slide, which were then kept for 1 h in moist chamber at room temperature (23°C). Subsequently, 100 μ L of a mixture of 10% BSA and 0.1% Triton-X100 plus 1 μ L of the primary antibody (H3S10f rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) were applied to the slides. The preparations were maintained in moist chamber at 4°C for at least 24 h, then washed in 1X PBS (3 times of 10 min) under stirring. A mixture of 100 μ L of 10% BSA with 0.1% Triton- X100 and 1 μ L of the secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology) was applied to each slide, which were kept in moist chamber for 1 h at 37°C. Soon afterwards the slides were washed for three times of 10 min in 1X PBS buffer, then counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole)/Vectashield H-1000 solution (1:100).

The evaluation was accomplished under an epifluorescence microscope Olympus BX60 at excitation/emission wavelengths of 358/461 nm for DAPI and 495/515 nm for FITC. The distribution pattern of H3S10f was determined from observation of presence or absence of the immune signal in cells with and without abnormalities. Five slides were evaluated per treatment, and at least 100 cells per slide. In addition, one slide without application of antibody was mounted for comparative control of immunolocalization. The latter procedure was performed to understand the mechanisms of action of fungicides containing active principles from the chemical class of triazoles, which have already been related to chromosome alterations.

2.4 Statistical analyses

The obtained quantitative data were subjected to analysis of variance ($\alpha = 0.05$), with the means being compared by Tukey test at 5% significance level using the statistical program SISVAR version 5.3 (Ferreira 2011).

3 Results

Evaluation of the total number of dividing cells (prophase, metaphase, anaphase and telophase) revealed reduction in mitotic division with the TBZ-based fungicide treatment, as

508 dividing cells were counted in the five evaluated slides, whereas 863 cells were computed for the control (Table 1). The same effect was not observed for the treatment with DFZ-based fungicide, since the total number of dividing cells (862) was not significantly different from the control (Table 1).

It is worth noting that, in all treatments, including the control, the entire slide surface was screened, and the presented number of cells in division (Table 1) represents the total observed number of dividing cells.

When the frequency of each division phase is considered, the major frequency of cells is found in metaphase. For the TBZ-based fungicide, a depression occurs in the proportion of cells in anaphase and telophase, whereas for the DFZ-based product the proportion of anaphases is similar to the control and for telophase an increased in the frequency was recorded (Table 1).

Both treatments led to a significant increase in the frequency of mitotic alterations in *L. sativa* cells. In the treatment with fungicide containing DFZ, 32% of the 862 observed mitotic cells presented chromosome alterations, whereas in the control for this treatment 0.4% of the cells presented alterations (Table 1). In the treatment with TBZ-based fungicide, 37% of the 508 evaluated cells presented abnormalities, whereas the respective control had 0.9% of cells with alterations (Table 1). However, when comparing the percentage of chromosome alterations between the cells treated with TBZ-based and DFZ-based fungicide, statistical significance is found (Table 1).

The following types of chromosome alterations and respective frequencies were observed for the treatment with TBZ-based fungicide: sticky chromosomes (72%), aneuploid (45%) and polyploid cells (27%), c-metaphases (31%), and bridges (14%) (Fig. 1a). For the DFZ-containing fungicide, the following alterations were observed: sticky chromosomes (86%), aneuploid (26%) and polyploid cells (40%), c-metaphases (29%), and bridges (12%) (Fig. 1b).

The frequency of non-oriented chromosomes in metaphase, laggard chromosomes in anaphase, multipolar anaphase, as well as micronuclei and buds in telophase in both treatments did not differ from those of the negative control (Fig.1a, b).

Regarding the phosphorylation pattern of histone H3S10, the cells of the negative control presented regular spatial-temporal distribution across the mitotic phases, as demonstrated in Fig. 2. The immune signal was observed in the pericentromeric region,

beginning at the end of prophase, becoming more intense in metaphase, continuing during anaphase, though with less intensity, and gradually disappearing in the course of telophase (Fig. 2).

In the analysis of cells with abnormalities, chromosomes were observed that did not present phosphorylation signals at serine 10 of histone H3, or which presented diffuse signal along the chromosome (Fig. 3); these were considered "irregular marks", different from the typical pericentromeric mark (Fig. 2). In the cells treated with the two analyzed fungicides, sticky chromosomes (Fig. 3a) presented a higher frequency of irregular signals, corresponding to 72% for the TBZ-based fungicide and 86% for that containing DFZ (Fig. 1a, b). Polyploid cells (Fig. 4a) presented more than 18 pericentromeric signals of H3S10f, evidencing the excess number of chromosomes (Fig. 4a). Polyploidy occurred in 27% of the mitotic cells for TBZ and 39% for DFZ and presented regular immune signal (Fig. 1a,b).

The evaluated c-metaphases presented regular pericentromeric phosphorylation signals (Fig. 4b) in 18% of the cells treated with the TBZ-based fungicide (Fig. 1a) and in 23% with the DFZ-based substance (Fig. 1b); however, also irregular marks occurred (Fig. 3b), at a frequency of 13% for TBZ and 6% for DFZ (Fig. 1a, b). C-metaphases with less chromosomes than that expected for the species (18 chromosomes) was also observed. These aneuploid cells (Fig. 4c) presented chromosomes with normal pericentromeric signals, but as the absented chromosomes were not observed, were considered an alteration with irregular immune signal (Fig. 1a, b).

With regard to chromosome bridges (Fig. 4d and 3e), 4% were found to exhibit regular signals, and 10% irregular signals for the TBZ-based fungicide (Fig. 1a). For treatment with the DFZ-based product, the frequencies of bridges with regular and irregular signals were 8% and 4%, respectively (Fig. 1b).

Some phases that were seemingly without alterations, observed in the meristematic cells treated with the fungicides, presented chromosomes with irregular phosphorylation signal (Fig. 3c, d), totaling 9% of the cells in division for TBZ (Fig. 1a) and 5% for DFZ (Fig. 1b).

Use of the immunolocalization technique with the H3S10f mark is recent in the investigation of risks and understanding of mechanisms of toxic substances or compounds, having been applied for the first time by Freitas et al. (2016) in cells of *L. sativa* treated with a residue from the aluminum industry. The observed decrease in the number of dividing cells in

the treatment with TBZ-based fungicide in relation to the negative control corroborates the description of Bernardes et al. (2015), who also verified a reduction in the mitotic index (MI) of meristematic cells of *Allium cepa* treated with the TBZ-based fungicide, even at the lowest concentrations. For the treatment with the DFZ-based product, the authors further reported no reduction in MI, endorsing the results of the present study, where the number of dividing cells in the treatments with DFZ-based fungicide was similar to the control. Studying the effect of the same TBZ- and DFZ based fungicides on the cell cycle of *L. sativa*, Aragão (2017) also observed a mitodepressive effect in the TBZ-based product. The reductions were greater than 50%, as observed in the present work, confirming the cytotoxicity of this fungicide (Fiskesjö, 1985).

The increase in metaphase frequency observed in the two fungicide treatments of this study is related to the significant number of chromosome alterations in metaphase, reflecting the effect of these substances on the mitotic cycle progression. Increase in the frequency of metaphases in detriment of the other phases and associated to progression of the cycle was also reported by Aragão (2017) in cells of *L. sativa* treated with fungicides containing TBZ and DFZ. The explanation for this phenomenon is related to the checkpoints of the cell cycle. One of these checkpoints occurs between metaphase and anaphase, mediated by the so called anaphase-promoting complex (APC). It acts by inhibiting the cycle progression when problems are identified at metaphase, such as the incorrect alignment of the chromosomes at the equatorial plate (Acquaviva and Pines, 2006). This inhibition paralyzes the cell division, which may be a reason for the considerable increase of metaphases in the treatments compared to the control.

With regard to the alterations observed throughout the mitotic cycle, a significantly higher frequency of cells with sticky chromosomes was reported in comparison to the other aberrations (Fig. 1a, b). Stickiness is considered an alteration of initially aneugenic effect (Fernandes et al. 2007), arising from malfunctioning of the mitotic spindle. According to Andrade-Vieira et al. (2011), this abnormality can be considered to result from extreme genotoxicity of the treatment in question and may cause cell death, which could justify the significant decrease in dividing cells for the TBZ-based fungicide treatment. In their work with *A. cepa*, Bernardes et al. (2015) reported a low frequency of chromosome alterations, strong mitodepressive effect and high number of condensed nuclei for TBZ-based fungicides. According to Andrade-Vieira et al. (2011), the presence of condensed nucleus is considered a

cytological evidence of cell death, supporting the hypothesis that the toxicity of the TBZ-containing fungicide is what leads the cell to trigger its cell death mechanisms.

The treatment with DFZ-based fungicide presented higher frequency of cell alterations than that containing TBZ, as also reported by Bernardes et al. (2015) for *A. cepa*. A higher frequency of such aberrations is due to the fact that the toxicity of the DFZ-based fungicide does not cause a significant decrease in MI. In view of these results, Anvisa's classification of the active principle TBZ as "little toxic" should be reviewed (Table 1).

As reported by Bernardes et al. (2015) and Aragão (2017), the cytotoxic effect of the fungicides is confirmed by unfavorable alterations such as inhibition of root development, hindrance of the mitotic cycle progression, and cell death. The aneugenic effect, reported as an alteration in the functioning of the spindle, becomes evident when sticky chromosomes, c-metaphases, polyploid and aneuploid cells, and bridges are frequently observed in cells treated with DFZ and TBZ. This suggests that phosphorylation deficiency may be one of the causes for the non-attachment of these chromosomes to the spindle throughout the mitotic division, as well as the increase in metaphase cells, since the attachment of the chromosomes to the spindle is necessary in order for the chromosome segregation and finalization of the mitotic division process to take place.

With regard to the phosphorylation pattern of histone H3S10, the mitotic cells of the negative control exhibited regular spatial-temporal distribution, as reported in the literature for different plant species, such as *Brachiaria* (Paula et al. 2013), *Pennisetum* (RESENDE et al., 2015), *Secale cereale* and *Triticum aestivum* (Manzanero et al. 2000), *Hordeum vulgare* and *Vicia faba* (Houben et al. 1999), and *Cestrum strigilatum* (Fernandes et al. 2008). In all these cases, the immune signal was observed in the pericentromeric region, with the mark starting at the end of prophase, being more intense in metaphase, maintaining a lower intensity in anaphase, and gradually disappearing in telophase. This characterization of the distribution of H3S10 phosphorylation in mitosis is in accordance with the description of Freitas et al. (2016) in *L. sativa* cells.

Hans and Dimitriv (2001) and Prigent and Dimitrov (2003) suggest that the presence of the marking for H3S10 phosphorylation serves as a signal for the cell that the chromosomes are ready to continue with anaphase, being thus essential for cell cycle progression. According to Paula et al. (2013), based on their results and reports of similar works (Manzanero et al. 2000; Houben et al. 1999; Kaszas and Cande 2000), the

phosphorylation of H3S10 in mitosis in plants could be involved in regulating the maintenance of cohesion between the sister chromatids. Nevertheless, it should be emphasized that the precise role of the H3S10 phosphorylation mechanism is still unclear in most organisms, and not restricted to the maintenance of sister chromatid cohesion (Paula et al. 2013).

Freitas et al. (2016) verified the correlation between cell alterations caused by spent potlining (SPL), a residue of the aluminum industry, and its main constituents (cyanide, fluoride and aluminum), and the function of histone H3 phosphorylation at serine 10; the results indicated the occurrence of chromosome alterations with and without irregularities of this epigenetic mark. Irregularities in the signal of histone H3 phosphorylation at serine 10 in the treated cells, such as in metaphases exhibiting sticky chromosomes with no or diffuse signal, different from the pericentromeric pattern established for normal plant cells, were also observed by Freitas et al. (2016). On the other hand, in the present work the observed c-metaphases displayed both normal as well as irregular signal, with frequent presence of aneuploidy. In the work of Freitas et al. (2016), differently from the observed in this study, all c-metaphases exhibited 18 pericentromeric signals of H3S10f, in accordance with the expected number of signals for the species, displaying 18 chromosomes. The presence of irregular signals at the phases which were seemingly without alterations indicates that these irregularities may have been due to the fungicides possibly exerting negative effects on the cell processes, such as progression of cell division. The occurrence of a significant percentage of alterations with phosphorylation at serine 10 of histone H3 with both treatments suggests that the fungicides may also have an influence on other mechanisms, such as the correct segregation of chromosomes and their attachment to the spindle fibers.

The considerable number of c-metaphases and polyploid cells suggests an antimitotic activity of the tested fungicides, be it by hindering the tubulin polymerization or by rupturing the microtubuli. Similar behavior was observed by Freitas et al. (2016) in cells treated with fluoride, in which 83.33% of the observed chromosome alterations presented normal H3S10f signal.

Works accomplishing the immunolocalization of β -tubulin to verify the action of substances considered toxic – arsenic (Dho et al. 2010) and cadmium in *Pisum sativum* L. (Fusconi et al. 2007), and chromium in *L. sativa* (Eleftheriou et al. 2012) – demonstrated that they can disturb the cellular spindle. Dho et al. (2010) reported that, in root cells, arsenic

causes conformational alterations in tubulin, leading to disassembly of the microtubuli, similarly to what occurs with colchicine. Fusconi et al. (2007) related that the cytoskeleton is highly sensitive to cadmium, seeing that alterations in the microtubuli were observed even at the lowest concentrations. Eleftheriou et al. (2012) noted that chromosome segregation and motility were inhibited, control of the cell division cycle was completely lost, formation of the cellular plaque was dissociated from the phragmoplast, and the abnormal mitotic spindles appeared at unexpected locations. All observed abnormalities were correlated to the disorganization of the microtubuli.

5 Conclusion

The toxic activity of fungicides derived from TBZ and DFZ in *L. sativa* was evidenced by the following observations:

- promotion of aneugenic damage;
- influence on the phosphorylation of histone H3 at serine 10 during the mitotic phases;
- induction of chromosome alterations, especially sticky chromosomes.

6 References

Acquaviva C, Pines J (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J. Cell Sci.* 119: 2401-2404. doi: 10.1242/jcs.02937

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2013 e 2015. Brasília.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016)a. Índice monográfico T32-Tebuconazol.

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T32%2B%25E2%2580%2593%2BTebuconazol.pdf/8e7d87dc-8400-4e3a-910b-dca69b043d77>. Accessed on 14 June 2017.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016)b. Índice monográfico D36-Difenoconazol.

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D36%2B%2BDifenoconazol.pdf/fce161cd-d3d4-41b2-b4ff-53438306cf4d>. Accessed on 14 June 2017.

Andrade-Vieira LF, Gedraite LS, Campos JM, Davide LC (2011). Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:882-888.doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.12.010

Aragão FB (2017). Prospecção da toxicidade e atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa*. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo.

Baccarelli A, Bollati, V (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr.* 21:243-251. doi: 10.1097/MOP.0b013e32832925cc

Bernardes PM, Andrade-Vieira LF, Aragão FB, Ferreira A, Ferreira MFS (2015). Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. *Water Air Soil Pollut.* 226:1-11. doi: 10.1007/s11270-015-2462-y

Bianchi J, Mantovani MS, Marin-Morales MA (2015). Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *J. Environ. Sci.* 36:102-111. doi:10.1016/j.jes.2015.04.016

Campos JMS, Viccini LF, Andrade LF, 404 Davide LC, Rodrigues GS (2008). Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. In: *Plant Bioassays*. Ed. Houston: Studium Press, 344 p.

Augusto LGS et al. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: Carneiro FF, et al (Org(s)). *Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.

- Dho S, Camusso W, Mucciarelli M, Fusconi A (2010). Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. *Environ. Exp. Bot.* 69:17-23. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.02.010
- Eleftheriou EP, Adamakis ID, Melissa P (2012). Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 249:401-416. doi: 10.1007/s00709-011-0292-3
- Fernandes T, Yuyama PM, Moraes AP, Vanzela AL (2008). An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. *Genome* 51:772-777. doi: 10.1139/G08-042
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88:252-259. doi: 10.1016/j.pestbp.2006.12.003
- Ferreira DF (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35:1039-1042. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001
- Fiskesjö G (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112. doi: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x
- Freitas AS, Cunha IMF, Andrade-Vieira LF, Techio VH (2016). Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124:426-434. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.11.017
- Fu S, Gao Z, Birchler J, Han F (2012). Dicentric chromosome formation and epigenetics of centromere formation in plants. *J. Genet. Genom.* 39:125-130. doi: 10.1016/j.jgg.2012.01.006
- Fusconi A, Gallo C, Camusso W (2007). Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers

for assessment of stress pollution. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 632:9-19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.03.012

Grant WF (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Res.* 426:107-112. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00050-0

Guéant JL, Namour F, Gueant Rodriguez RM, Daval JL (2013). Floate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* 24:279-289. Doi 10.1016/j.tem.2013.01.010

Kaszas E, Cande WZ (2000). 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. *J. Cell Sci.* 113:3217-3226.

Han F, Lamb JC, Birchler JA (2006). High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA* 103:3238-3243. doi: 10.1073/pnas.0509650103

Hans F, Dimitrov S (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20:3021-3027. doi: 10.1038/sj.onc.1204326

Houben A, Demidov D, Karimi-Ashtiyani R (2013). Epigenetic control of cell division. In: G. Grafi and N. Ohad (Eds.) *Epigenetic Memory and Control in Plants, Signaling and Communication in Plants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 155-175.

Houben A, Wako T, Furushima-Shimogawara R, Presting G, Künzel G, Schubert I, Fukui K (1999). The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J.* 18:675-679. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00496.x

INCA (2016). Instituto Nacional 481 de Câncer. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrototoxicos_06_abr_15.pdf. Accessed on 22 October 2016.

Manzanero S, Arana P, Puertas M, Houben A (2000). The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* 109:308-317. doi: 10.1007/s004120000087

Matoba H, Mizutani T, Nagano K, Hoshi Y, Uchiyama H (2007). Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas* 144:235-243. doi: 10.1111/j.2007.0018-0661.02012x

Narwal SS, Sampietro DA, Catalán CAN (2009). Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: Narwal et al. (Org.). *Plant Bioassays*. Texas: Studium Press Houston: 3-20.

Palmieri MJ, Andrade-Vieira LF, Trento MVC, Eleutério MWF, Lubber J, Davide LC, Marcussi S (2016). Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water, Air, Soil Pollut.* 227:1-10. doi: 10.1007/s11270-016-2809-z

Paula CM, Techio VH, Souza Sobrinho F, Freitas AS (2013). Distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis and meiosis in *Brachiaria* species. *J. Genet.* 92:259-266, 2013. doi: 10.1007/s12041-013-0261-z

Shibata F, Murata M (2004). Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* 117:2963-2970. doi: 10.1242/jcs.01144

Silveira GL (2016) Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. Dissertação – Universidade Federal de Lavras.

Sindiveg – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (2016). Sindiveg: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas. <http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolas-registra-queda-nas519-vendas-em-2016/>. Accessed on 20 October 2017.

Pelaez V, Silva L, Borges E (2013). Regulation of pesticides: a comparative analysis. *Sci. Public Policy* 40:644-656. doi: 10.1093/scipol/sct020

Resende KFM, et al. (2015) Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in '*Pennisetum*' spp. Rich.(Poaceae). *Australian Journal of Crop Science*, Australia, 9: 453.

Figure Captions

Fig 1 Frequency of mitotic cells of *Lactuca sativa* ($2n = 18$ chromosomes) considering the normal and abnormal phases and the regular or irregular (peri-) centromeric immune signal of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) after exposure to commercial fungicides with the active compound tebuconazole (a) and difenoconazole (b). Detailed graphics for each mitotic alteration and their respective immune signal conditions are given on the smaller charts on the right.

Fig 2 Example of regular (peri-) centromeric immune signal of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in the different mitotic stages of *Lactuca sativa* ($2n = 18$ chromosomes) cells in negative control (MiliQ water). Initial evidence of the immune signal is visible at late prophase (a), becoming more intense at metaphase (b), being maintained in anaphase (c) and disappearing in the course of telophase (d).

Fig 3 Example of mitotic cells of *Lactuca sativa* ($2n = 18$ chromosomes) with irregular immune signal of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) after exposure to commercial fungicides containing the active compounds tebuconazole and difenoconazole. (a) Sticky metaphase with weak or absent immune signal in some chromosomes; (b) C-metaphase with immune signal marks scattered throughout the chromosomes; (c) Regular metaphase with weak scattered immune signal marks. (d) anaphase with scattered marks throughout the chromosomes (e) Anaphase bridge with absent immune signal in some chromosomes.

Fig 4 Example of mitotic cells 549 of *Lactuca sativa* ($2n = 18$ chromosomes) with regular (peri-) centromeric immune signal of histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) after exposure to commercial fungicides containing the active compounds tebuconazole and difenoconazole. (a) Polyploid cells, (b) C-metaphase, (c) Aneuploid cell with 14 chromosomes, (d) Anaphase bridge.

Figure 1

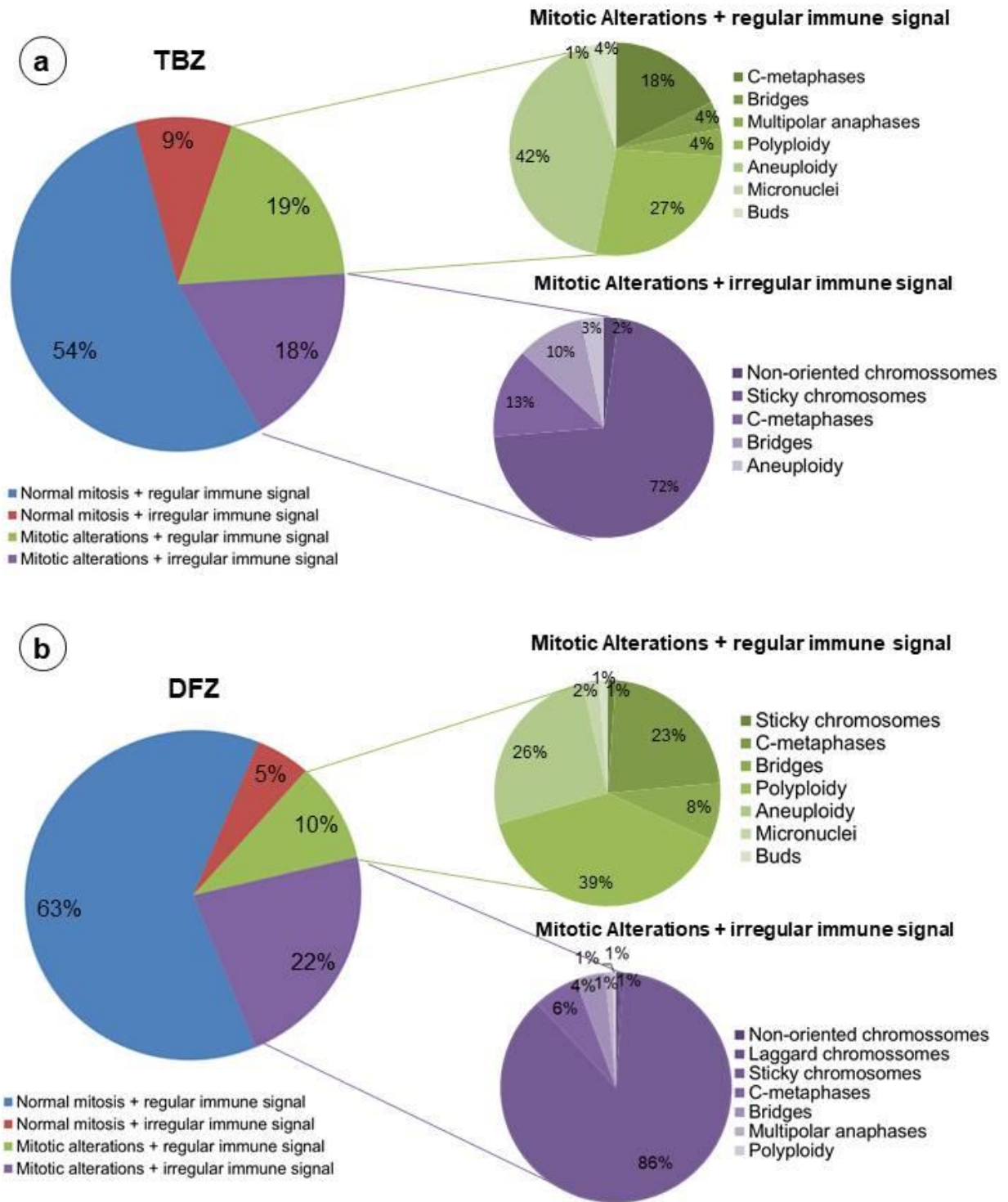


Figure 2

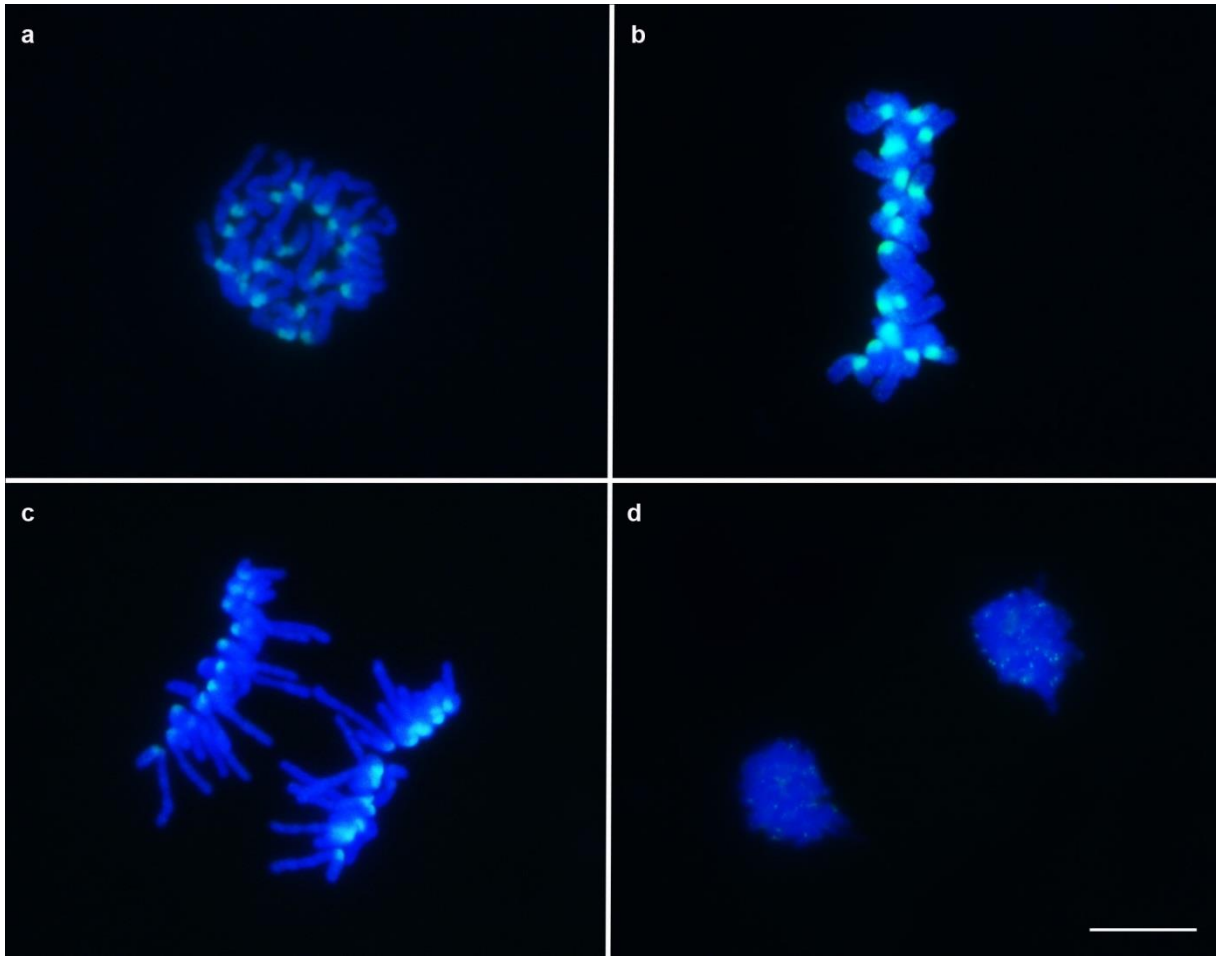


Figure 3

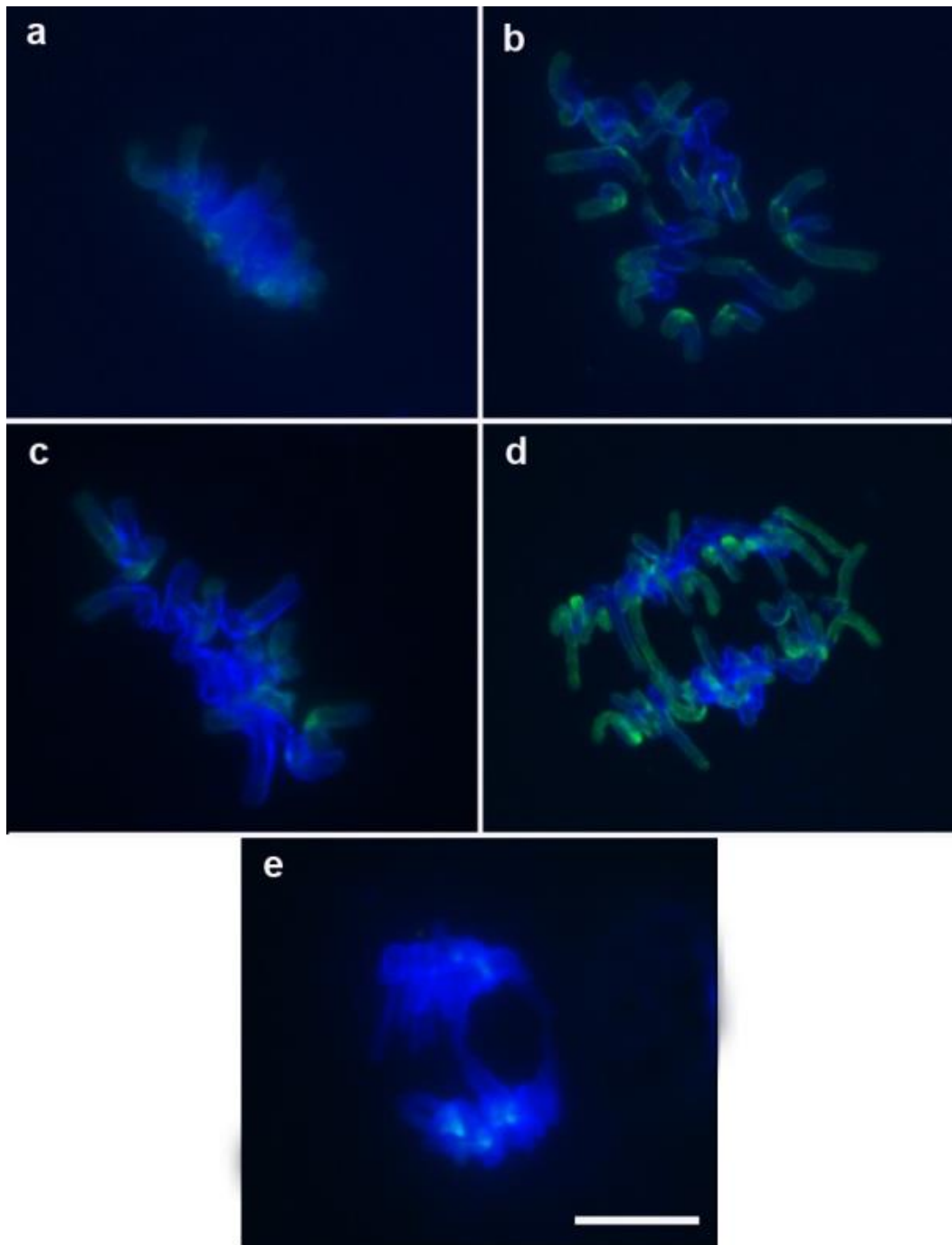
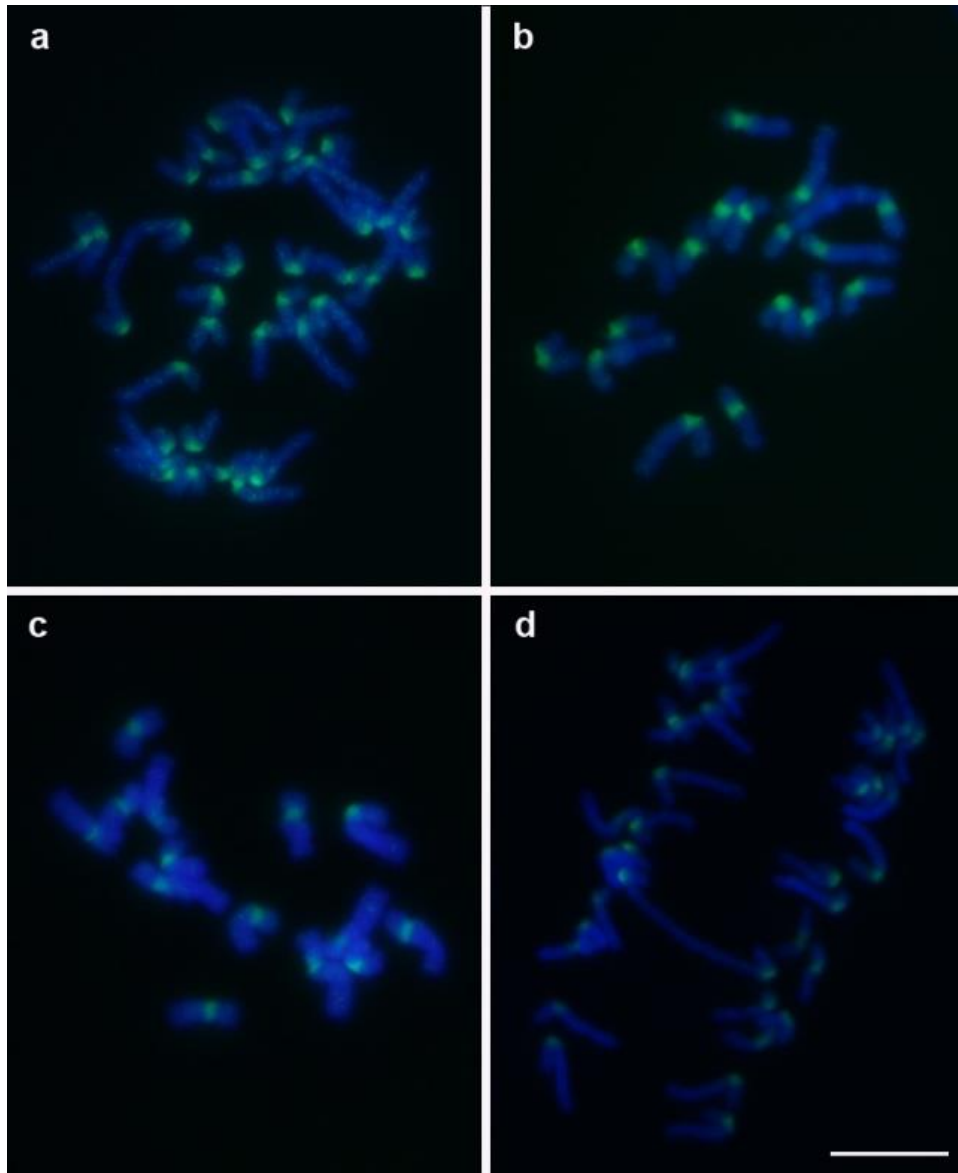


Figure 4



Table**Table 1**– Frequency of cells at each mitotic stage in *Lactuca sativa* L. meristems after 48 h of exposure to the active compounds tebuconazole and difenoconazole.

Fungicide basis	Dividing Cells*	Prophase (%)	Metaphase (%)	Anaphase (%)	Telophase (%)	TCA (%)
TBZ	508*	24.6*b ± 6.2	42.9*c ± 10.9	23.2*b ± 4.3	9.3*a ± 4.2	37A* (188 cells)
Negative control						
TBZ	919	44.9 ± 8.7	27.6 ± 4.2	9.5 ± 7.6	18.0 ± 2.1	0.9 (8 cells)
DFZ	862	23.8*c ± 3.7	44.0*d ± 10.2	12.8a ± 5.1	19.5*b ± 2.4	32B* (276 cells)
Negative control						
DFZ	807	50.2 ± 10.4	23.7 ± 9.2	14.1 ± 3.8	12.0 ± 3.1	0.4 (4 cells)

^aTotal number of dividing cells counted from five slides, each one prepared from five meristems.

Means followed by (*) in the columns present statistical difference (Tukey test, $p < 0.05$) in relation to the negative control (NC).

Different letters in the columns refer to statistical difference (Tukey test, $p < 0.05$) between the treatments. In the TCA column, distinct capital letters mean that the results differed statistically between the treatments (Tukey test, $p < 0.05$).

TBZ – tebuconazole; DFZ – difenoconazole; TCA – Total of chromosome aberrations

ARTIGO 2 – Normas da NBR6022 (ABNT, 2003)

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA HISTONA H3 FOSFORILADA NA SERINA 10
(H3S10f): FERRAMENTA PARA COMPREENSÃO DE ALTERAÇÕES NO CICLO
CELULAR**

**IMMUNOLOCALIZATION OF HISTONE H3 PHOSPHORYLED IN SERINE 10
(H3S10f): TOOL FOR COMPREHENSION OF CELL CYCLE ALTERATIONS**

RESUMO

Dentro da toxicologia o uso de modelos vegetais para prospecção de efeito de substâncias é muito disseminado. Nestes estudos cito(geno)tóxicos o agente pode ser classificado de acordo com seu mecanismo de ação em aneugênico e clastogênico. Estudos que auxiliam na compreensão dos mecanismos de ação de substâncias tóxicas são de extrema importância dentro da toxicologia ambiental. A Histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) é uma marca epigenética com funções relacionadas à progressão do ciclo celular. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo entender como a histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) pode auxiliar na compreensão das alterações no ciclo celular, especialmente as aneugênicas. Para tanto, foi realizada a imunolocalização da H3S10f em células de raízes de *Allium cepa* L. tratadas com agentes indutores de alterações, predominantemente aneugênicas, os fungicidas tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ) e como controle negativo foi usada água ultrapura. O padrão espaço-temporal da fosforilação da H3S10 em células do controle negativo de *Allium cepa* mostrou-se semelhante ao que é descrito para outros vegetais. Foram observadas alterações aneugênicas como cromossomos aderentes, c-metáfases, poliploidia e aneuploidia e a maioria das células que expressaram esse tipo de alteração apresentaram problemas com a fosforilação da H3S10f. Os resultados mostraram que os eventos aneugênicos em células meristemáticas de *A. cepa* induzidas pelos produtos comerciais TBZ e DFZ podem ser explicados pelo imuno-sinal epigenético de H3S10f.

Palavras-chave: Alterações aneugênicas. Alterações clastogênicas. Cromossomos aderentes. Modelo de planta. Epigenética. Imuno-sinal.

ABSTRACT

Within the toxicology the use of vegetal models for prospecting the effect of substances is very widespread. In these toxic cytogenetic studies, the agent can be classified according to its mechanism of action in aneugenic and clastogenic. Studies that help understanding the mechanisms of action of toxic substances are of extreme importance within environmental toxicology. Histone H3 phosphorylated at serine 10 (H3S10f) is an epigenetic label with functions related to cell cycle progression. In this sense, this work aimed to understand how the histone H3 phosphorylated in serine 10 (H3S10f) can help in the comprehension of the changes in the cell cycle, especially the aneugenics. For this, the immunolocalization of H3S10f was carried out in cells of *Allium cepa* L. roots treated with predominantly aneugenic altering agents, the fungicides tebuconazole (TBZ) and difenoconazole (DFZ), and as a negative control ultrapure water was used. The space-time domain of phosphorylation of H3S10 in cells of the negative control of *Allium* was similar to those described for other plants. Aneugenic alterations as sticky chromosomes, c-metaphases, polyploidy and aneuploidy were observed and the majority of the cells that expressed these kind of alterations presented problems with the phosphorylation of H3S10f. The results showed that the aneugenic events in meristematic cells of *A. cepa* induced by the commercial TBZ- and DFZ-based products can be explained by the epigenetic immuno-signal of H3S10f.

Keywords: Aneugenic alterations. Clastogenic alterations. Sticky chromosomes. Plant model. Epigenetics. Immuno-signal.

1 INTRODUÇÃO

Vivemos em um momento histórico em que o crescimento econômico é traduzido como sinônimo de progresso. A relação entre ambiente e saúde torna-se cada vez mais um assunto relevante para a população devido a sua exposição à resíduos da indústria têxtil, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas, entre outras substâncias que são lançadas constantemente no meio ambiente. Essas substâncias, muitas vezes, apresentam potencial genotóxico e mutagênico que podem levar a vários problemas de saúde e também afetar as gerações futuras, uma vez que estas alterações podem ser hereditárias (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Neste sentido, torna-se válido a realização de ensaios que demonstrem o risco toxicológico dos poluentes ambientais a fim de promover medidas preventivas. Os vegetais superiores têm sido amplamente utilizados como modelo para este fim. Estudos mostram que os vegetais são altamente sensíveis a substâncias químicas e suas respostas nos testes disponíveis podem ser comparadas às respostas de testes realizados em outros organismos, como vertebrados, incluindo mamíferos e até mesmo o ser humano (ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2008; GRANT, 1999; FISKEJÖ, 1985; PALMIERI et al., 2016). A comparação pode ser feita, devido a universalidade das propriedades do DNA. Sendo assim, se uma substância química provoca danos ao DNA em uma planta, esta substância deve ser considerada capaz de danificar o DNA de outros organismos (RANK; NIELSEN, 1997). Além disso, os testes com vegetais apresentam vantagens de serem mais simples, baratos, de fácil acesso e manutenção quando comparados com testes em animais, (FISKEJÖ, 1985, LEME; MARIN-MORALES, 2009), não tendo o empecilho de passarem por aprovações em comissões éticas ou necessitar de estrutura física para execução altamente especializada.

Dentre os vegetais utilizados nos bioensaios, o *Allium cepa* L. (cebola) se sobressai, é o modelo para detectar cito(geno)toxicidade das mais diversas substâncias, sendo mundialmente utilizado. O *A. cepa* é uma monocotiledônea pertencente à família Amaryllidaceae. O método de avaliação das alterações cromossômicas em raízes de *Allium* é aplicado desde o início dos anos 30, tendo sido reconhecido e amplamente disseminado na década de 90 (GRANT, 1994). Atualmente, é validado pelo Programa Internacional de

Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (GRANT, 1999). Pode ser empregado para a avaliação de diversos agentes como metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resíduos industriais e domésticos, extratos biológicos, entre outros (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Com relação aos *endpoints* utilizados para estudos toxicológicos a avaliação de alterações cromossômicas é de grande relevância, pois, além de estimar os efeitos cito(geno)tóxicos dos agentes testados, também possibilita a avaliação de sua ação clastogênica e aneugênica (RANK; NIELSEN, 1993). Desta forma, substâncias podem ser classificadas como clastogênicas ou aneugênicas em função do(s) tipo(s) de alteração(ões) que induzem com maior frequência (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

O efeito clastogênico resulta das quebras no DNA, que é evidenciado pela presença de pontes em anáfase-telófase e fragmentos cromossômicos durante o ciclo de divisão celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCH, MANTOVANI, MARIN-MORALES, 2015). O efeito aneugênico é resultante da inativação ou das alterações de estruturas celulares relacionadas ao movimento dos cromossomos durante a divisão celular, como, por exemplo, microtúbulos (FENECH, 2000) e centrômero (FREITAS et al., 2016), provocando alterações na progressão do ciclo celular. Sendo evidenciadas pela euploidias, poliploidias, c-metáfases e cromossomos aderentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCH, MANTOVANI, MARIN-MORALES, 2015).

A fosforilação da histona H3 na serina 10 é uma marca epigenética caracterizada como uma modificação pós-traducional envolvida com a coesão das cromátides irmãs (KASZAS; CANDE, 2000; PAULA et al., 2013; SHIBATA; MURATA, 2004) e trata-se de uma marca epigenética para regiões pericentroméricas ativas (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013) sendo facilmente observada nas preparações sobre um microscópio epifluorescente. Não obstante, a análises dos efeitos do alumínio sobre o ciclo celular demonstraram que as irregularidade do imuno-sinal podem estar relacionadas com problemas na progressão do ciclo (Freitas et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi entender como a imunolocalização da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) pode auxiliar na compreensão das alterações no ciclo celular, especialmente as aneugênicas. Como agente indutor de alterações foram

utilizados os fungicidas comerciais à base dos princípios ativos tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ). Estes fungicidas apresentam como princípios ativos substâncias do grupo químico triazol, e induziram em alta frequência a formação de alterações cromossômicas, predominantemente cromossomos aderentes e c-metáfases classificados como resultantes de ação aneugênica em trabalho anterior (BERNARDES et al, 2015).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Germinação, Tratamento e Exposição das raízes

Foram utilizadas sementes de *Allium cepa* L. var. *baia periforme* (cebola), da Isla® Sementes: Lote 107713-014-S2, taxa de germinação de 94%, data de análise em 30/05/2017 e validade por 2 anos. Trinta sementes foram dispostas em placas de Petri de polietileno de 9 cm contendo papel filtro embebido em 3 mL de água ultrapura para a protrusão radicular.

Para os tratamentos foram utilizados dois produtos comerciais, cada um contendo um dos princípios ativos testados no estudo. As soluções foram preparadas diluindo os produtos comerciais à base de TBZ e de DFZ em água destilada. A concentração utilizada no presente trabalho corresponde à concentração recomendada para cada fungicida, segundo o fabricante do produto comercial: 50µg/mL para o fungicida contendo o princípio ativo TBZ e 31.25µg/mL para o fungicida à base de DFZ. A água ultrapura (MiliQ) foi usada como controle negativo.

As sementes germinadas, contendo raízes de 1-2 mm de comprimento, foram submetidas aos tratamentos em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com 3 mL dos princípios ativos (TBZ ou DFZ). Após 48h de exposição, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy (Álcool: Ácido Acético, 3:1) e armazenadas a -4°C. Durante todo o período do experimento, as placas de Petri contendo as sementes foram acondicionadas em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a 24°C, no escuro para evitar a influência da luz (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009).

2.2 Imunolocalização da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f)

As raízes fixadas foram lavadas três vezes em água destilada por 5 minutos cada. Em seguida, foi realizada a digestão enzimática com a mistura de pectinase:celulase (100U:200U) e pectoliase (Sigma-Aldrich) em banho Maria, a 37°C, por 1h. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular em Álcool: Ácido Acético (2:1).

As lâminas contendo a preparação celular foram colocadas em uma cubeta com tampão citrato 1x pH 6.0, e o conjunto foi colocado por 20 segundos em micro-ondas, a 800W. Imediatamente após, as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo PBS 1x, por 5min. Para o bloqueio foi adicionado 50µL de BSA 10% (soro albumina bovino) com triton-X100 0,1% para cada lâmina, e após a lâmina foi armazenada por 1h em câmara úmida a temperatura ambiente (23°C). Posteriormente, foi aplicado sobre a lâmina, a mistura de 100µL de BSA 10% com triton-X100 0,1% e 1µL do anticorpo primário (H3S10f Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology). As lâminas foram mantidas em câmara úmida, a 4°C por, no mínimo, 24h, e então lavadas (3 vezes por 10 minutos cada) em PBS 1x sobre agitação. Em cada lâmina, foi aplicada a mistura de 100µL de BSA 10% com triton-X100 0,1% e 1µL do anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology). As lâminas foram mantidas em câmara úmida, por 1h, a 37°C. Logo após, foram realizadas as lavagens das lâminas em tampão PBS 1x por três vezes (10 minutos cada), as mesmas foram contracoradas com uma solução de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield H-1000 (1:100).

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. Foram avaliadas um total de 500 células por tratamento, sendo que aquelas que apresentaram anormalidades foram classificadas quanto ao padrão de distribuição da H3S10f. Este padrão foi considerado regular ou irregular a partir das observações dos eventos de ocorrência regular e ocorrência irregular do imuno-sinal. Além disso, uma lâmina sem aplicação do anticorpo foi montada para fins de controle comparativo com a imunolocalização.

2.3 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, empregando o programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

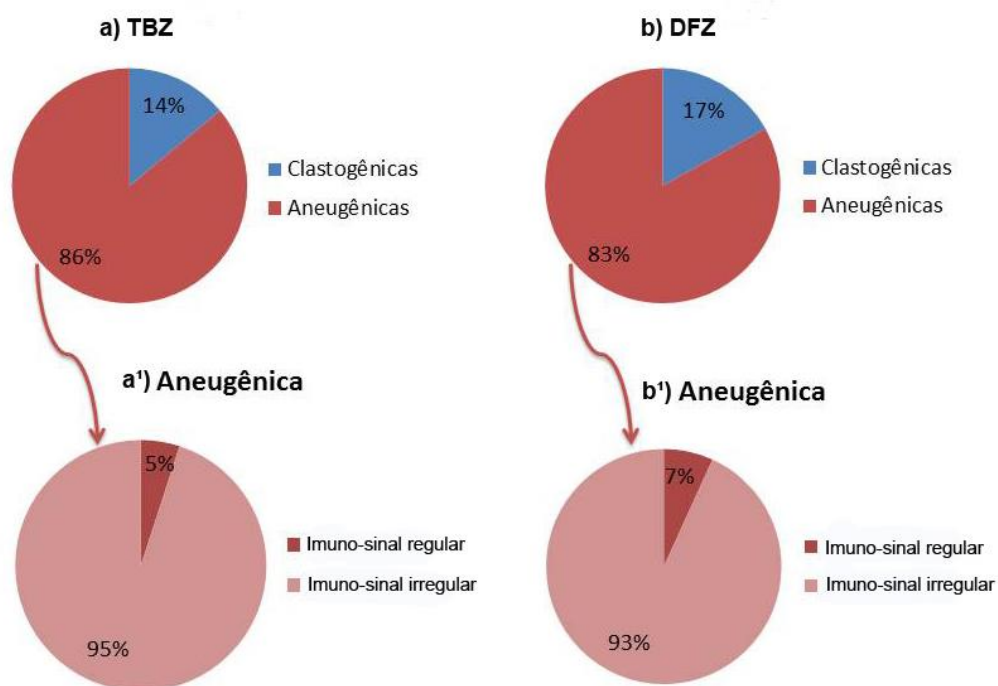
As alterações celulares observadas nas células mitóticas de *A. cepa* tratadas com fungicidas a base dos princípios ativos TBZ e DFZ foram classificadas em aneugênicas ou clastogênicas segundo Bianchi, Mantovani, Marin-Morales (2015). As alterações aneugênicas (cromossomos aderentes, c-metáfases, poliploidia, aneuploidia e anáfase multipolar – TABELA 1) representaram 86% das alterações no tratamento com o fungicida à base de TBZ e 83% para o tratamento com fungicida à base do DFZ (FIGURA 1). A maior frequência de alterações aneugênicas em células de *A. cepa* tratadas com fungicidas a base dos mesmos princípios ativos foi reportado anteriormente por Bernardes et al. (2015) corroborando os resultados do presente trabalho.

A presença de pontes foi o único tipo de alteração que contribuiu para o efeito clastogênico dos fungicidas a base dos princípios ativos TBZ e DFZ testados (TABELA 1). Além das alterações citadas, micronúcleos também foram observados, porém em menor frequência e somente para os tratamentos com fungicidas a base do princípio ativo TBZ (TABELA 1). Os micronúcleos (MN) podem ser resultantes tanto de fragmentos cromossômicos, tendo origem clastogênica, como de cromossomos inteiros que foram perdidos devido a um efeito aneugênico (FENECH, 2000; LEME; MARIN-MORALES, 2009). No entanto, altas frequências de micronúcleos requerem tratamentos de recuperação e a contabilização deve ser realizada em células filhas da geração F2 após a exposição (PALMIERI et al., 2017) e no presente trabalho eles foram contabilizados apenas em células em divisão mitótica (compreendendo as fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase) do meristema radicular, não permitindo maiores conclusões a respeito de sua presença.

Dentre as alterações aneugênicas observadas, a mais frequente foi a aderência, apresentando frequência média maior que 60% das células contabilizadas para os tratamentos

à base de TBZ e DFZ. Esse aumento na frequência de cromossomos aderentes em células tratadas diferiu estatisticamente das outras alterações (TABELA 1).

Figura 1 - Frequência de alterações Clastogênicas e Aneugênicas em células mitóticas de *Allium cepa* expostas aos fungicidas à base dos princípios ativos tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ). (a) TBZ e (b) DFZ. (a¹) e (b¹) detalhes para as alterações Aneugênicas, em relação a regularidade do imuno-sinal da fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f).



Legenda: (a) Frequência de alterações Clastogênicas e Aneugênica em células mitóticas de *Allium cepa* expostas ao fungicida à base do princípio ativo tebuconazol (TBZ); a¹) frequência de alterações Aneugênicas com imuno-sinal regular e irregular em células tratadas com TBZ. (b) Frequência de alterações Clastogênicas e Aneugênica de *Allium cepa* expostas ao fungicida à base do princípio ativo tebuconazol (DFZ); b¹) frequência de alterações Aneugênicas com imuno-sinal regular e irregular em células tratadas com DFZ. Fonte: Do autor (2018).

Tabela – 1 Frequência das alterações cromossômicas com imuno-sinal regular e irregular da fosforilação da serina 10 na histona H3 (H3S10f) em células mitóticas de *Allium cepa* tratadas com fungicidas à base dos princípios ativos tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ).

TBZ	Imuno-sinal regular	Imuno-sinal irregular
Cromossomos aderentes	0,00	67.77a ±16.5
C-metáfase/Poliploidia	3.24b ±2.5	7.53b ±5.8
Ponte	2.18b ±1.4	11.82b ±4.0
Multipolar	0.00	0.00
Aneuploidia	1.05b ±1.1	5.34b ±5.5
Micronúcleo	0.00	1.05b ±1.1
DFZ	Imuno-sinal regular	Imuno-sinal irregular
Cromossomos aderentes	0.00	66.12a ±5.9
C-metáfase/Poliploidia	2.43b ±1.8	8.07b ±4.7
Ponte	10.50b ±4.9	6.44b ±2.6
Multipolar	0.79b ±0.8	0.79b ±0.8
Aneuploidia	2.43b ±1.7	2.43b ±1.7
Micronúcleo	0.00	0.00

Legenda: Valores seguidos do desvio padrão médio relativo. Para cada tratamento, as médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatística entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$). Fonte: Do autor (2018).

A aderência é resultante do efeito de substâncias tóxicas sobre a estrutura da cromatina que podem causar a contração e a condensação cromossômica ou a despolimerização do DNA e dissolução parcial de nucleoproteínas e com isso contribuir para a ocorrência do emaranhamento de fibras de cromatina entre cromossomos não relacionados (MCGILL; PATHAK; HSU, 1974; KLASTERSKA; NATARAJAN; RAMEL, 1976; SALAM et al., 1993; TÜRKOĞLU, 2012;). Esta alteração é considerada um indício de alta toxicidade, estando intimamente relacionada à frequência expressiva de morte celular (FISKESJO, 1997, ANDRADE-VIEIRA et al., 2011) e pode ser apresentada em diferentes graus de severidade. Uma hipótese a ser levantada em consideração é a de que as aderências mais severas levariam

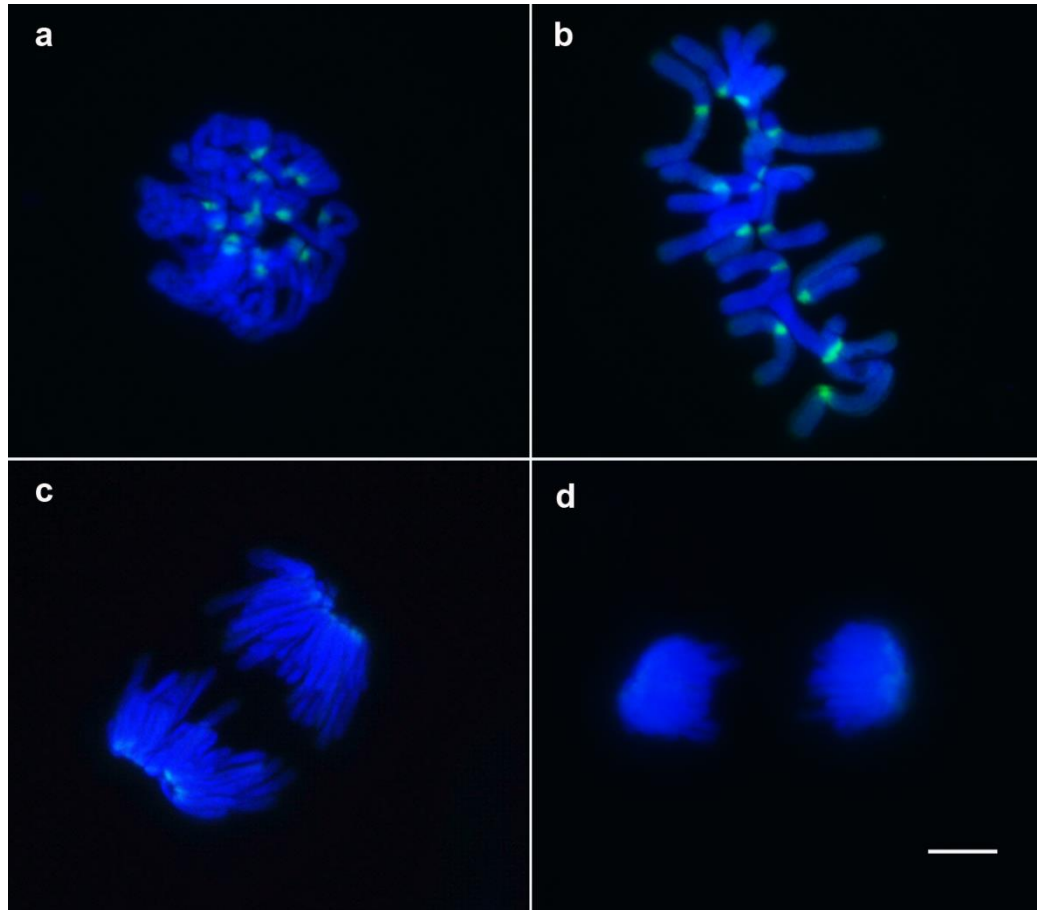
a morte celular pelo fato de já não poderem ser mais reparadas pela célula e que aquelas mais brandas poderiam prosseguir com a anáfase causando ponte cromossômica.

A ponte cromossômica foi a segunda alteração de maior frequência para ambos os tratamentos (TABELA 1). A ausência de fragmentos cromossômicos e a alta frequência de diferentes graus de aderência cromossômica corrobora a hipótese de que a ponte cromossômica pode ser originada de cromossomos aderentes com graus de aderência mais brandos. A aderência impede a separação completa das cromátides durante a anáfase, indicando um provável evento mutagênico na célula que resulta nas pontes cromossômicas (SALAM et al., 1993).

No que se refere ao imuno-sinal da H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f), foi observado que as diferentes fases da mitose em *A. cepa* apresentaram uma distribuição espaço-temporal padrão dessa marca epigenética para vegetais como descrito por Resende et al. (2015) para *Pennisetum*, por Paula et al. (2013) para *Brachiaria*, Manzanero et al. (2000) para *Secale cereale* e *Triticum aestivum*, Houben et al. (1999) para *Hordem vulgare* e *Vicia faba* e Fernandes et al. (2008) para *Cestrum strigilatum*. O imuno-sinal foi observado já em prófase, com intensidade máxima em metáfase, sendo mantido em menor intensidade em anáfase e mais fracamente em telófase (FIGURA 2), corroborando a descrição de que a fosforilação da serina 10 na histona H3 em vegetais superiores tem início em prófase, apresenta-se intensamente em metáfase, é mantido em menor intensidade em anáfase e diminui progressivamente até desaparecer em telófase (HOUBEN et al., 1999).

Anteriormente Žabka et al. (2012) utilizaram a marca epigenética da H3S10f para entender a regulação espaço-temporal da replicação de DNA em células de *A. cepa* tratadas com hidroximetilureia (HU). Eles descreveram que a fosforilação H3S10f inicia na prófase tardia e que os meristemas tratados com HU apresentam imuno-sinal forte desde a prófase até anáfase-telófase, demonstrando que o tratamento com HU prolonga a fosforilação ativando novos sítios para fosforilação. No entanto, eles não descrevem detalhadamente o imuno-sinal da H3S10f como apresentado no presente trabalho. Neste sentido, podemos considerar aqui a primeira descrição e representação do padrão de distribuição do imuno-sinal da H3S10f em células de *A. cepa*.

Figura 2 - Exemplo do imuno-sinal regular pericentromérico da fosforilação de Histona H3 na serina 10 (H3S10f) nas fases mitóticas de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) em células do controle negativo (água ultrapura).

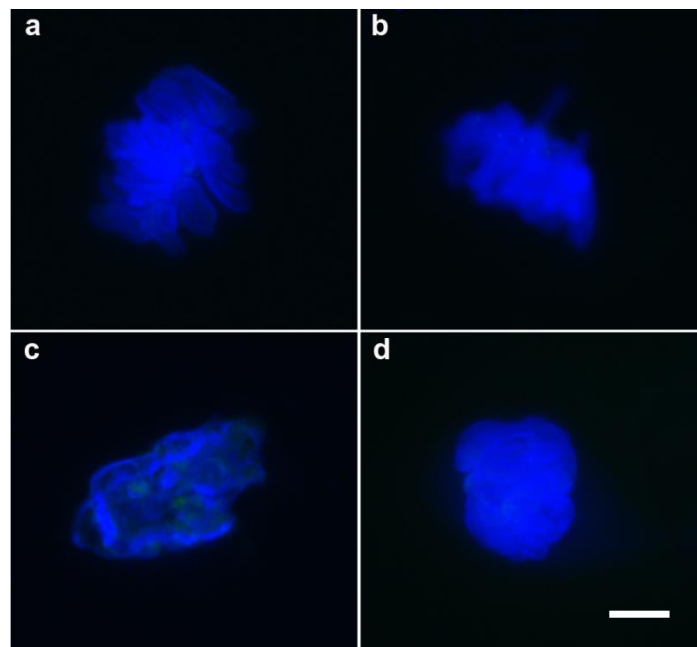


Legenda: A evidência inicial do imuno-sinal é sobre a prófase tardia (a) ficando mais intensa na metáfase (b) e permanecendo na anáfase (c), desaparecendo com a progressão da telófase (d). Fonte: Do autor (2018).

O imuno-sinal foi considerado irregular nas células observadas quando apresentou-se ausente em um ou mais cromossomos (FIGURA 3 a, b, d; 4 a, b, d; 5d) ou difuso (FIGURA 3 c; 4 c, f; 5 b, c) nas células tratadas, diferente do padrão pericentromérico já descrito anteriormente (FIGURA 2). Houve uma expressiva frequência de irregularidades no imuno-sinal de células com alteração aneugênica, representando 95% das alterações no tratamento com o princípio ativo à base de TBZ e 93% das alterações no tratamento com o princípio ativo à base de DFZ (FIGURA 1).

Foi observada a aderência cromossômica em diferentes graus, desde aquelas consideradas mais brandas, em que as cromátides ainda podem ser visualizadas (FIGURA 3 a, b), até as mais severas, onde é observada a formação de uma massa amorfa que poderá resultar em morte celular (FIGURA 3 c, d). Esses dois padrões de aderência cromossômica foram observados, tanto para os tratamentos com fungicidas a base do princípio ativo TBZ, como DFZ. Ademais, todos os cromossomos aderentes observados apresentaram problemas quanto a regularidade do imuno-sinal da H3S10f (TABELA 1). Isso pode se justificar pelo efeito potencial dessas substâncias sobre a estrutura da cromatina, podendo estar relacionado à dissolução de nucleoproteínas, neste caso a H3, corroborando Fernandes et al. (2008), que classifica aderência cromossômica com uma alteração aneugênica, por considerar que é um tipo de anormalidade que envolve a matriz proteica da cromatina e não o DNA propriamente dito.

Figura 3 - Exemplos de Cromossomos Aderentes com diferentes graus de severidade em células mitóticas de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) com imuno-sinal irregular da fosforilação da Histona H3 na serina 10 (H3S10f) após a exposição a fungicidas comerciais à base dos compostos ativos TBZ e DFZ.



Legenda: Cromossomo aderentes: (a), (b) grau de aderência mais brando com imuno-sinal irregular da H3S10f; (c), (d) grau de aderência mais severa com imuno-sinal irregular da H3S10f. Fonte: Do autor (2018).

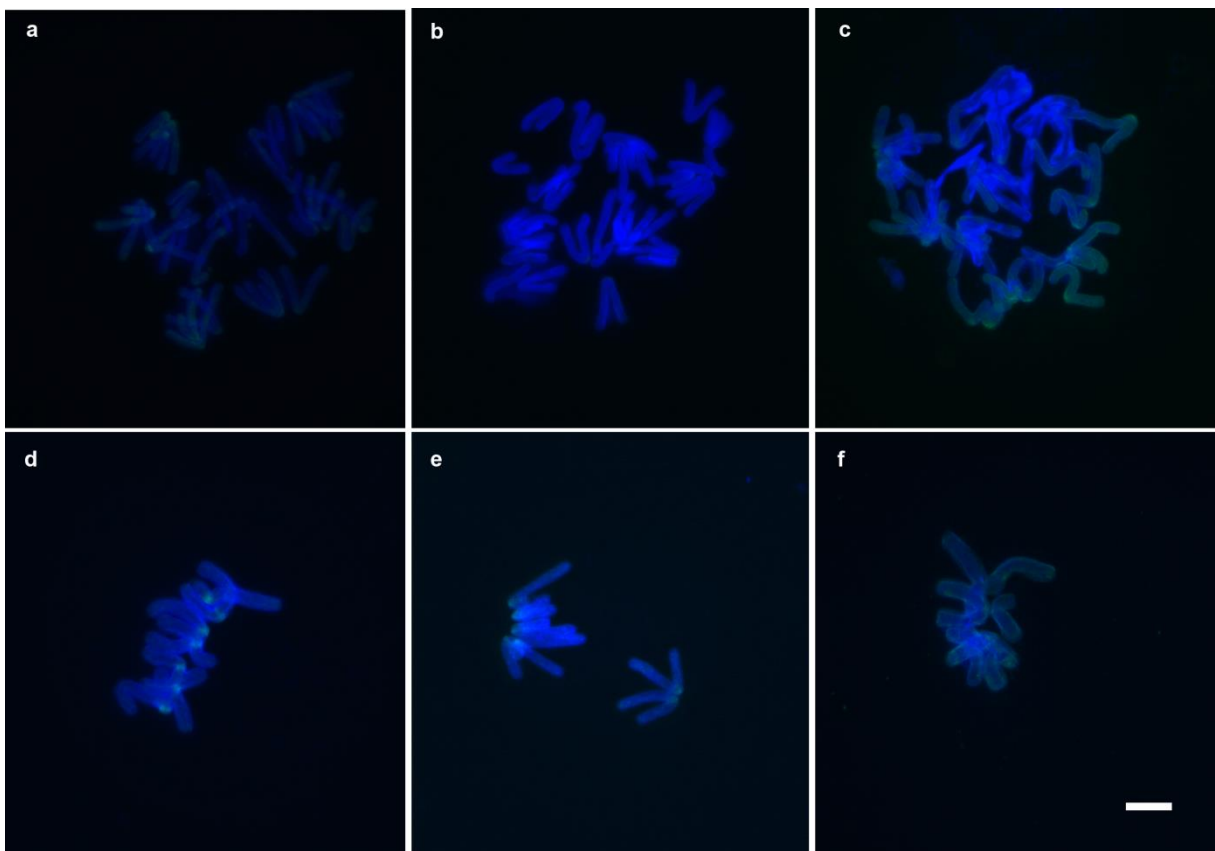
As c-metáfases normais e poliploides observadas nas células tratadas com os fungicidas à base de TBZ e DFZ também se apresentaram predominantemente com imunossinal da H3S10f irregular (Tabela 1, Fig 4 a, b, c). Corroborando Hans e Dimitriv (2001) e Prigent e Dimitrov (2003) que sugerem que a fosforilação da H3 constitui algum tipo de marcação dos cromossomos em metáfase, essencialmente necessária para os processos que operam após a metáfase sendo, dessa forma, fundamental para a progressão do ciclo celular. De fato, a marca H3S10f tem sido relacionada a uma marca epigenética para regiões pericentroméricas ativas (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013) e estudos tem demonstrado que em cromossomos dicêntricos, por exemplo, o imunossinal da H3S10 ocorre apenas no centrômero funcional (FU et al., 2012) enfatizando que a fosforilação H3S10 é uma característica essencial na estrutura do centrômero/cinetócoro, necessária para garantir uma estabilidade mecânica ao centrômero durante o movimento cromossômico (HOUBEN et al., 1999).

Neste sentido, a deficiência da fosforilação da H3S10 pode estar associada a falhas na progressão do ciclo celular e, portanto, aparecimento de c-metáfases. As c-metáfases são características de tratamentos com bloqueadores do ciclo celular cujo efeito sobre o fuso impede o attachment dos cromossomos e a organização dos mesmos na placa equatorial. Em estudo de cito-geno-toxicidade para prospecção de risco tóxico de poluentes ou substâncias químicas, as c-metáfases estão fortemente relacionadas a efeitos aneugênicos e a problemas na segregação dos cromossomos, seja pela ausência de fuso ou pela ausência do sinal para o attachment dos cromossomos (FERNANDES et al., 2007).

Ademais a indução de c-metáfases neste estudo de cito(geno)toxicidade é fortemente relacionada com a presença de células com números de cromossomos superior a $2x$, no caso do presente, maior que 16 cromossomos já que o número diploide de cromossomos em células de *A. cepa* é $2n = 2x = 16$ cromossomos. As células poliploides são descritas como consequência da ausência do fuso sob efeito prolongado (SHARMA; SEN 2002). No caso do presente trabalho, podemos relacionar a presença de células poliploides com a falta da fosforilação da H3S10 que impedirá a segregação dos cromossomos por estes não estarem ligados ao fuso mitótico. Na impossibilidade de progressão do ciclo a célula retorna para a interfase originando uma célula com número de cromossomos duplicado ao iniciar um novo ciclo mitótico (COSTA et al., 2017).

As células aneuploides, ao contrário das poliploides, apresentam número cromossômico inferior do que esperado para a espécie. As aneuploidias apareceram com imuno-sinal regular (FIGURA 4 d) e irregular (FIGURA 4 f). Quando regular observou-se que mesmo em menor número, a fosforilação H3S10 tornando-a ativa permitiu o prosseguimento da divisão (Figura 4 d, e). Quando irregular apareceram principalmente dispersas nos cromossomos (Figura 4 f).

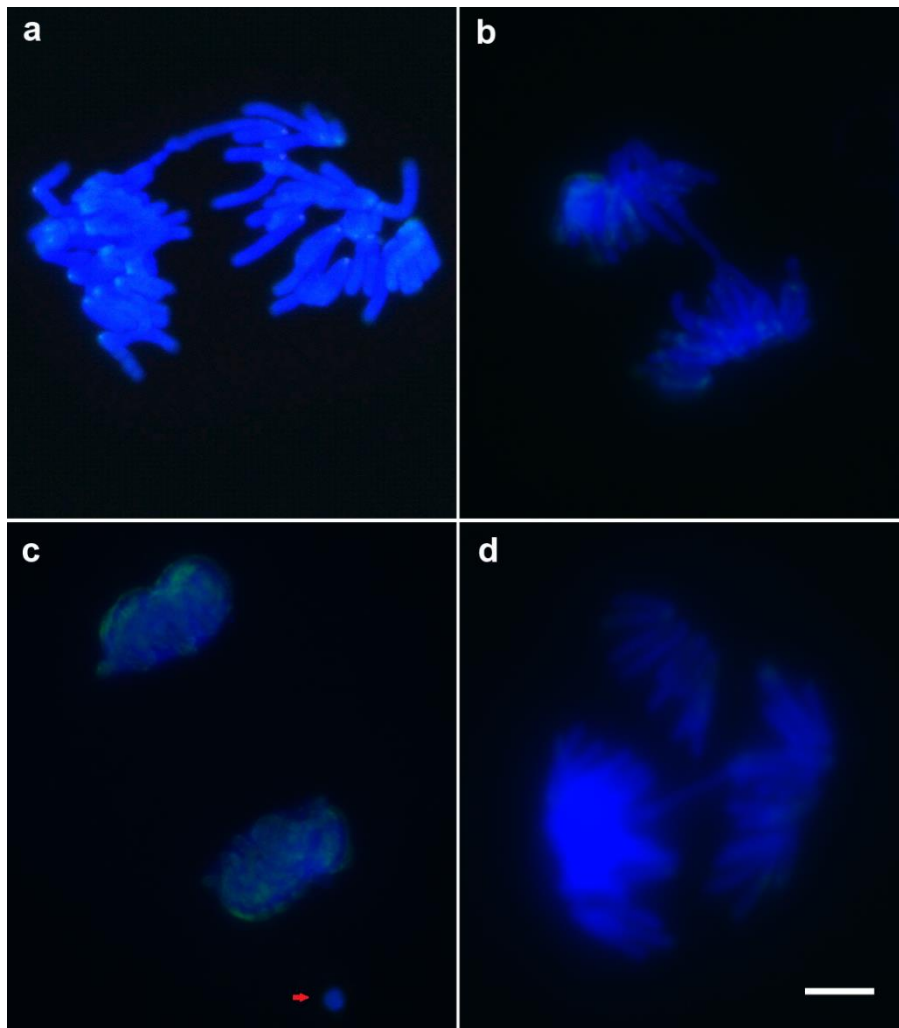
Figura 4 - Exemplos de alterações aneugênicas de células mitóticas de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) após a exposição aos fungicidas comerciais à base dos compostos ativos TBZ e DFZ



Legenda: Poliploidias: (a) c-metáfase poliploide apresentando cromossomos com e sem o imuno-sinal da H3S10f, (b) c-metáfase poliploide apresentando cromossomos com e sem o imuno-sinal da H3S10f, (c) poliploidia com imuno-sinal disperso; Aneuploidias: (d) metáfase aneuploide com imuno-sinal da H3S10f regular nos cromossomos presentes; (e) anáfase aneuploide com imuno-sinal da H3S10f regular nas cromátides presentes; (f) metáfase aneuploide com imuno-sinal da H3S10f disperso. Fonte: Do autor (2018)

Para as pontes cromossômicas (FIGURA 5 a, b, d) o tratamento à base TBZ apresentou uma maior frequência de alterações no imuno-sinal 11.8% para 2.18% com o imuno-sinal regular, já para o DFZ ocorreu o contrário, a frequência de imuno-sinal regular foi maior, 10.5%, do que imuno-sinal irregular, 6.44% (TABELA 1). A anáfase multi-polar foi observada apenas para o tratamento à base do princípio ativo TBZ, apresentando irregularidades no imuno-sinal (FIGURA 5 d). Em telófase, no tratamento com fungicida à base do princípio ativo DFZ, foi observado MN, a telófase apresentou-se com uma marca forte e difusa (FIGURA 5 c), diferente do que foi visto em células do controle negativo, onde o imuno-sinal já apresentava-se muito fraco e pontualmente onde é a região pericentromérica do cromossomo (FIGURA 2 d).

Figura 5 – Alterações cromossômicas em células mitóticas de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) tratadas com fungicidas à base dos princípios ativos TBZ e DFZ



Legenda: (a), (b) anáfases com imuno-sinal regular da H3S10f; (c) telófase com imuno-sinal irregular da H3S10f e MN na ponta da seta; (d) anáfase multipolar com ponte e imuno-sinal irregular da H3S10f.

4 CONCLUSÃO

Allium cepa apresentou típico padrão espaço-temporal da fosforilação da H3S10.

As alterações aneugênicas do tipo aderência, c-metáfase, poliploidia e aneuploidia apresentaram majoritariamente problemas com a fosforilação da H3S10, logo: (1) os eventos de aderência cromossômica podem ser explicados pela ocorrência de irregularidades da

H3S10f comprovando o caráter aneugênico desta alteração; (2) c-metáfases possivelmente originaram as células poliploides como consequência da ausência ou irregularidade da fosforilação na serina 10 da histona H3; (3) células aneuploides surgem de problemas na segregação dos cromossomos, mas, apresentam progressão normal do ciclo se os sinais de H3S10f são regulares.

A marca epigenética para a fosforilação da serina 10 na histona H3 apresenta-se em tamanho facilmente visível ao microscópio e pode ser usada para explicar a expressão de eventos aneugênicos induzidos pela exposição das células do modelo vegetal *A. cepa* em estudos de cito(geno)toxicidade de substâncias químicas e poluentes ambientais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPO, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008

ANDRADE-VIEIRA, 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. 74, n. 4, p. 882-888, 2011.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, Amsterdam, v. 226, n. 207, p. 1-11, 2015.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 36, p. 102-111, 2015.

COSTA, A. V. et al. Synthesis of Novel Glycerol-Derived 1, 2, 3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicide, Phytotoxic and Cytotoxic Activities. **Molecules**, Gotemburgo, v. 22, n. 10, p. 1666, 2017.

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

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

FERNANDES, V.; SAMPAIO, C. A. C. Problemática ambiental ou problemática socioambiental? A natureza da relação sociedade/meio ambiente. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 18, p. 87-94, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. **Plants for environmental studies**, v. 11, p. 307-333, 1997.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**. San Diego, v. 124, p. 426-434, 2016.

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

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, Stanford, v. 20, n. 24, p. 3021, 2001.

HOUBEN, A.; DEMIDOV, D.; KARIMI-ASHTIYANI, R. **Epigenetic control of cell division**. G. Grafi, N. Ohad (Eds.), *Epigenetic Memory and Control in Plants, Signaling and Communication in Plants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 155-175, 2013.

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

KASZAS, E; CANDE, 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**, Londres, v. 113, n. 18, p. 3217-3226, 2000.

KLÁŠTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A. T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, Maryland, v. 83, n. 2, p. 153-162, 1976

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, North Carolina, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**. Turku, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.

MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, Maryland, v. 109, n. 5, p. 308-317, 2000.

MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes:
A possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, Maryland, v. 47, n. 2, p. 157-166, 1974.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. **Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy**. In: NARWAL et al. (Org.). Plant Bioassays. Texas: Studium Press Houston, p. 3-20, 2009.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut.** Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

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**, Bengaluru, v. 92, n. 2, p. 259-266, 2013.

PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?. **Journal of cell science**, Londres, v. 116, n. 18, p. 3677-3685, 2003.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, 1997.

RESENDE, K. F. M. et al. Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in *Pennisetum* spp. Rich. (Poaceae). **Australian Journal of Crop Science**, Australia, v. 9, n. 5, p. 453, 2015.

SALAM, A. E. A. et al. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Guelph, v. 319, n. 2, p. 89-101, 1993.

SHARMA, A.; SEN, S. **Chromosome botany**. 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**, Londres, v. 117, n. 14, p. 2963-2970, 2004.

TÜRKOĞLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide biochemistry and physiology**, Massachusetts, v. 103, n. 3, p. 224-230, 2012.

ŽABKA, A.; POLIT, J. T.; MASZEWSKI, J. DNA replication stress induces deregulation of the cell cycle events in root meristems of *Allium cepa*. **Annals of botany**, Oxford, v. 110, n. 8, p. 1581-1591, 2012.