

O USO DE TÉCNICAS DE BANDAMENTO CROMOSSÔMICO EM *Allium cepa* COMO METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO DE GENOTOXICIDADE. Renata Caritá, Maria Aparecida Marin-Morales, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo. - Ciências da Vida - Ciências Biológicas - Departamento de Biologia - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Campus de Rio Claro.

A preservação do meio ambiente e a prevenção de efeitos danosos que este meio pode sofrer vêm sendo uma preocupação constante e crescente no mundo atual. A utilização acentuada de produtos como agroquímicos, fármacos, cosméticos, corantes e muitos outros vem causando um aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2003). Sabe-se que muitos destes compostos podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, sem que se expressem de imediato (VOGEL, 1982) e, quando lançados no ambiente, podem representar um risco para a saúde do homem, pelo seu inerente potencial para induzir mutações (TAVARES, 1991).

Conhecer os processos mutacionais e os fatores que os produzem é importante, pois possibilita administrar e minorar os riscos (SILVA *et al.*, 2003), além de servir na identificação e análise das substâncias que são capazes de interagir com o material genético dos organismos. Estudos de genética toxicológica permitem avaliar os efeitos diretos dos xenobiontes sobre o DNA e efeitos deletérios ou mesmo letais de agentes diversos sobre os organismos (ARNAIZ, 1995).

Efeitos genotóxicos podem induzir quebras no DNA, promovendo perda de material genético e mutações que inviabilizam a célula ou que decorram em processos carcinogênicos. Atualmente, a genotoxicidade é avaliada utilizando-se diversos testes que incluem vários organismos e resultam em informações seguras e precisas, quanto à potencialidade em causar lesão no DNA (FERNANDES, 2005). Estes testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são, segundo Moraes (2000), indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental, como também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes.

Resultados provenientes de bioensaios genéticos podem, segundo Houk (1992), constituir informações relevantes à saúde humana. Como o alvo dos estudos toxicológicos é o DNA, o qual existe em todas as formas celulares vivas, pode-se inferir que compostos que se mostram reativos com o DNA de uma espécie têm o potencial para produzir efeitos semelhantes em outras espécies.

O estudo de danos no DNA é parte essencial da genética toxicológica, assim como a avaliação da indução de mutação cromossômica constitui um evento importante para estudos de carcinogênese. Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração, herdável, da função gênica. Sendo assim, o estudo detalhado, minucioso e ordenado das técnicas que detectam e mostram o modo de ação e os meios de prevenir o incremento de mutações devido, principalmente, a causas antrópicas, deve merecer uma atenção especial (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O surgimento de diversas técnicas de coloração cromossômica tem aumentado a quantidade de informações sobre a composição e a disposição do DNA de diferentes constituições ao longo dos cromossomos. Estas técnicas, chamadas de bandeamentos cromossômicos, possibilitam uma análise mais detalhada da organização estrutural dos cromossomos do que as técnicas convencionais de coloração (ROWLAND, 1981; BERNINI, 1997).

Na técnica de banda C, os cromossomos são expostos a uma solução básica (geralmente de hidróxido de bário) e em seguida a uma solução salina a temperatura elevada. Durante esse procedimento, o DNA é fragmentado e, progressivamente, eliminado do cromossomo. Aparentemente, a associação do DNA com as proteínas na heterocromatina é diferente e mais resistente às condições da técnica de bandamento C do que a associação DNA-proteína da eucromatina. Assim, há uma maior extração de DNA na eucromatina, que quando submetida à coloração, apresenta-se menos corada que a heterocromatina, cujas porções constituem blocos escuros denominados bandas C (GUERRA, 1988). Estudos realizados por Nuti Ronchi (1986a, b) mostram uma localização preferencial de quebras cromossômicas em regiões teloméricas, frequentemente associada à heterocromatina.

A introdução de técnicas que utilizam corantes fluorescentes fornece subsídios para o estudo da organização e estrutura molecular da heterocromatina, por permitir o conhecimento do conteúdo dos pares de base do material genético. Alguns fluorocromos têm afinidade por pares de base específicas (AT ou CG), produzindo bandas fluorescentes de baixa ou de forte intensidades nas regiões heterocromáticas. O DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindole) é um fluorocromo que apresenta

reação específica para regiões ricas em AT. Já a cromomicina A₃ (CMA₃) e a quinacrina são fluorocromos de reações específicas para regiões ricas em CG (BERNINI, 1997).

Outra técnica que fornece subsídios ao estudo citogenético é a que localiza as regiões organizadoras de nucléolo. A coloração pela prata é utilizada para visualizar as atividades do sítio DNAr, visto que somente as Regiões Organizadoras de Nucléolo (RON), funcionalmente ativas, são coradas pela prata (MILLER, 1976 a, b).

Células coradas com soluções de azul de toluidina, na presença de altas concentrações de íons de Mg²⁺, geralmente mostram ausência de metacromasia devido ao DNA do complexo DNA-proteína ter uma concentração de íon menor do que aquela observada para o RNA do complexo RNA-proteína. A concentração de Mg²⁺, a qual abole a metacromasia de DNA ou RNA em um complexo de núcleo-proteína, é conhecida como seu ponto de concentração crítica de eletrólitos (CEC). (MELLO *et al.*, 1993). Segundo Mello *et al.* (1995), trocas na metacromasia, devido ao RNA nucleolar, poderiam ser compreendidas pela realização da técnica de variante de CEC.

Como sistema-teste, o material biológico utilizado consistiu de sementes de *Allium cepa* submetidas à germinação em águas coletadas de três pontos distintos do Ribeirão Claro (Bacia do Rio Corumbataí, município de Rio Claro-SP), sendo dois nas proximidades de emissários de esgotos domésticos (Emissário da zona central da cidade- Vila Paulista e Emissário CECAP) e um outro em uma represa margeada com remanescente de mata natural (caracterizado por ambiente não impactado). A germinação também foi realizada na concentração de 0,84 ppm do herbicida trifluralina (controle positivo). Os meristemas foram submetidos à metodologia sequencial de bandamentos cromossômicos (C, NOR, e fluorocromos CMA₃/DAPI) e à metodologia de variante de CEC.

Foi confirmada a presença de irregularidades cromossômicas (anáfases e telófases com ponte cromossômica e quebras cromossômicas) e celulares (micronúcleos) para todos os ensaios.

A metodologia de coloração sequencial pôde auxiliar na compreensão da constituição do material genético ao longo dos cromossomos (diferenciação linear da cromatina), e permite identificar porções relacionadas com eventos de quebras e perdas deste material, além de avaliar a existência de sítios de maior fragilidade e, portanto, maior susceptibilidade às alterações cromossômicas.

A aplicação da técnica de bandamento por Fluorocromo permitiu a caracterização da constituição do material genético quanto à riqueza de bases do DNA. Segundo Kim *et al.* (2002), a espécie *Allium cepa* apresenta suas regiões teloméricas ricas em ligações GC, apresentando assim marcação CMA₃ positiva. A metodologia de bandamento por fluorocromo base específico pôde, então, contribuir para a investigação da caracterização do material genético envolvido com o dano ocasionado pelos poluentes ambientais.

A metodologia de bandamento C pode constituir em uma importante ferramenta na avaliação de efeitos clastogênicos, causados por poluentes ambientais e pode ser útil na localização das quebras cromossômicas em sistemas-teste de *Allium cepa*, principalmente, relacionadas à caracterização das porções perdidas, quanto à constituição da cromatina.

A metodologia de bandamento cromossômico NOR pode auxiliar nos estudos de mutagenicidade, principalmente, para avaliação de alterações decorrentes de poliploidização induzidas por xenobiontes. Esses efeitos puderam ser detectados por esta técnica, tanto pela visualização de um número maior de nucléolos, quanto pelo aumento do número de cromossomos marcados. A metodologia de bandamento NOR também permitiu caracterizar a constituição de micronúcleo, quanto à presença ou ausência de nucléolo.

A metodologia de variante de CEC (concentração crítica de eletrólitos) se mostrou bastante eficiente na caracterização de nucléolos e estruturas de RNA nucleolar.

Desse modo, os resultados até agora obtidos indicam que aplicação de técnicas que avaliam as mudanças na caracterização linear da cromatina pode constituir importantes ferramentas complementares para estudos de mutagenicidade de xenobiontes. A metodologia de variante de CEC também se mostrou eficiente para a caracterização das variações dos domínios nucleolares das células submetidas à ação de químicos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARNAIZ, R.R. *Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos*. 2 ed. México: [s.n.], 1995. 267 p.

- BERNINI-Jr. C. **Análise citogenética e diferenciação cromossômica em espécies do gênero *Brachiaria* Grisebach**. 1997. 97f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.
- FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 31-35, 1988.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research**. [S.I.] v.277, p.91-138, 1992.
- KIM, E. S.; PUNINA, E. O.; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI – Banding Patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, St. Petersburg, v. 38, n. 4, p. 392-398, 2002.
- MELLO, M. L. S., VIDAL, B. C., DANTAS, M. M. AND MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.** 26; 1-36, 1993.
- MELLO, M. L. S. Relocation of RNA Metachromasy at Mitosis. **Acta Histochem. Cytochem.**28; 149-154, 1995.
- MILLER, D.: **Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse - man somatic hybrid cells**. *Exp. Cell. Res.*, New York, v. 101, p. 235-243, 1976 a.
- MILLER, O. J.: **Expression of human and suppression mouse nucleolar organizer activity in mouse-man somatic cell hybrids**. *Proc. Nato Acad. Sci., USA*, v. 73, p.4531-4535, 1976 b.
- MORAES, D.S.L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 2000. 158 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- NUTI RONCHI V.; BONATTI, S.; DURANTE, M. Preferential localization of chemically induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes. - II. 4-epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane interacts specifically with highly repetitive sequences of DNA in *Allium cepa*. **Envir. Exp. Bot.**, v.26, n.2, p.127-135, 1986 b.
- NUTI RONCHI V.; BONATTI, S.; TURCHI, G. Preferential localization of chemically induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes. - I. Exogenous thymidine enhances the cytologic effects of 4-epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane. **Envir. Exp. Bot.**, v. 26, p.115-126, 1986 a.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.;MARQUES, E.K. **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356 p.
- ROWLAND R.E. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. **Theor. Appl. Genet.**, v.60, p.275-280, 1981.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424 p.: il.
- TAVARES, D.C. **Estudos da possível ação genotóxica do alcalóide boldina em sistemas de células de mamífero "in vitro" e "in vivo"**.1991. 205f. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade do Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.
- VOGEL, E.W. Assessment of chemically-induced genotoxic events. In: **Prospectives and Limitations**. Leiden, The Netherlands: Universitaire Pers Leiden, v.2, p. 24, 1982.