

# ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE MICRONÚCLEO EM *ALLIUM CEPA*, PARA FUTURAS ANÁLISES DE MUTAGENICIDADE DOS RIOS DA REGIÃO DO VALE DO JAMARI, RONDÔNIA, AMAZÔNIA OCIDENTAL

## ADAPTATION OF THE TECHNIQUE OF MICRONUCLEUS IN *ALLIUM CEPA* FOR FUTURE ANALYSIS OF MUTAGENICITY OF THE RIVERS OF JAMARI VALLEY, RONDÔNIA, WESTERN AMAZON

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

dionatas@icbusp.org

Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Francisco Carlos da Silva

fcsbiologicalscience@gmail.com

Centro Universitário de Ji-paraná -CEULJI/ULBRA

Renato André Zan

renato-zan@hotmail.com

Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Patric de Oliveira Poletto

oliveira\_poletto@hotmail.com

Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Leandro José Ramos

leandrojramos@hotmail.com

Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

**RESUMO:** O presente estudo objetivou fazer uma adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, recomendada por Fiskejö (1985), substituindo Metanol e Giemsa pelo kit Panótipo Rápido LB. Obtiveram-se bons resultados com a substituição do Metanol e do Giemsa pelo kit Panótico Rápido LB, visto sua eficiência em corar ácidos nucleicos, obtendo uma boa visualização das células, índice mitótico, micronúcleos, pontes anafásicas e telofásicas, sendo esta metodologia indicada em futuras análises de mutagenicidade em rios da região do Vale do Jamari.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade. Micronúcleo. *Allium cepa*

**ABSTRACT:** This study aimed to make technique adjustment of micronuclei in *Allium cepa*, recommended by Fiskejö (1985), by replacing methanol and Giemsa by Panotico Rapido LB kit. We obtained good results with the replacement of methanol and Giemsa by Panotipo Rapido LB, as its efficiency in stain nucleic acids, obtaining a good visualization of cells, mitotic index, micronuclei, anaphase and telophase bridges, and this methodology is indicated in future examinations of mutagenicity in the river Vale do Jamari.

**Keywords:** Mutagenicity. Micronucleus. *Allium cepa*

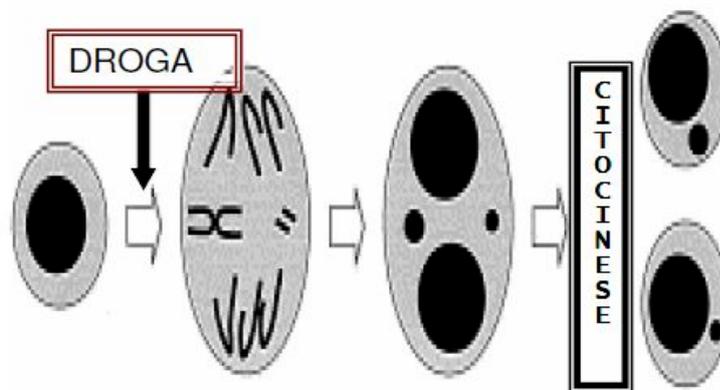
## 1. INTRODUÇÃO

A toxicidade é relacionada com a detecção, composição química e ação biológica de substâncias tóxicas, a toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de ser prejudicial, causando dano grave ao organismo (BARROS e DAVINO, 2008). A via de administração, duração e frequência de exposição são os fatores mais importantes que

influenciam a toxicidade ao organismo mesmo ele, sendo encontrado no interior das células, não está livre de sofrer constantes alterações e mutações (RABELLO-GAY, 1991).

A mutação é definida como qualquer alteração no DNA, podendo ser súbita e herdável, uma vez ocorrida, é mantida e transmitida às moléculas-filhas na estrutura do material genético, e na maioria das vezes, pode desenvolver uma série de problemas maléficis, mas para a sobrevivência da espécie, a mutação também é uma fonte de variabilidade genética dos seres vivos, decorrente de modificações estruturais no material genético (ALMEIDA e XAVIER, 2005).

As mutações podem ser observadas através da formação de micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma, se manifestam em células por divisão, com resultados de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos pólos das células durante a mitose ou a meiose (MILLER, 1973). Um cromossomo inteiro ou fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (COSTA e MENK, 2000; FENECH, 1993), (Figura 1).



**Figura 1.** Formação de micronúcleos em células eucarióticas (SILVA et al., 2011).

O teste de micronúcleos detecta mutagênese em organismos eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico. Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, podendo os micronúcleos ser avaliados para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de teste com roedores e plantas (SILVA et al., 2011).

Para que o micronúcleo seja visualizado é necessária uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, sendo, necessário fazer o cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea e raízes (VILLELA e LAU, 2003).

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagênicidade de plantas medicinais, por sua sensibilidade e exatidão, e, porque as raízes da *A. cepa* possuem processo de divisão celular similar aos do homem (GAVRONSKI, 2008).

A utilização do teste de micronúcleo em *A. cepa*, é indicada devido ao baixo custo, disponibilidade da matéria prima, não exigência de equipamentos elaborados e de aprovação em comitê de ética e pesquisa (CEP), aplicabilidade em vários cursos (Química, Farmácia e Biologia), boa correlação com resultados de outros testes, bem visto pela comunidade científica mundial, além do curto período de tempo necessário para a elaboração dos testes.

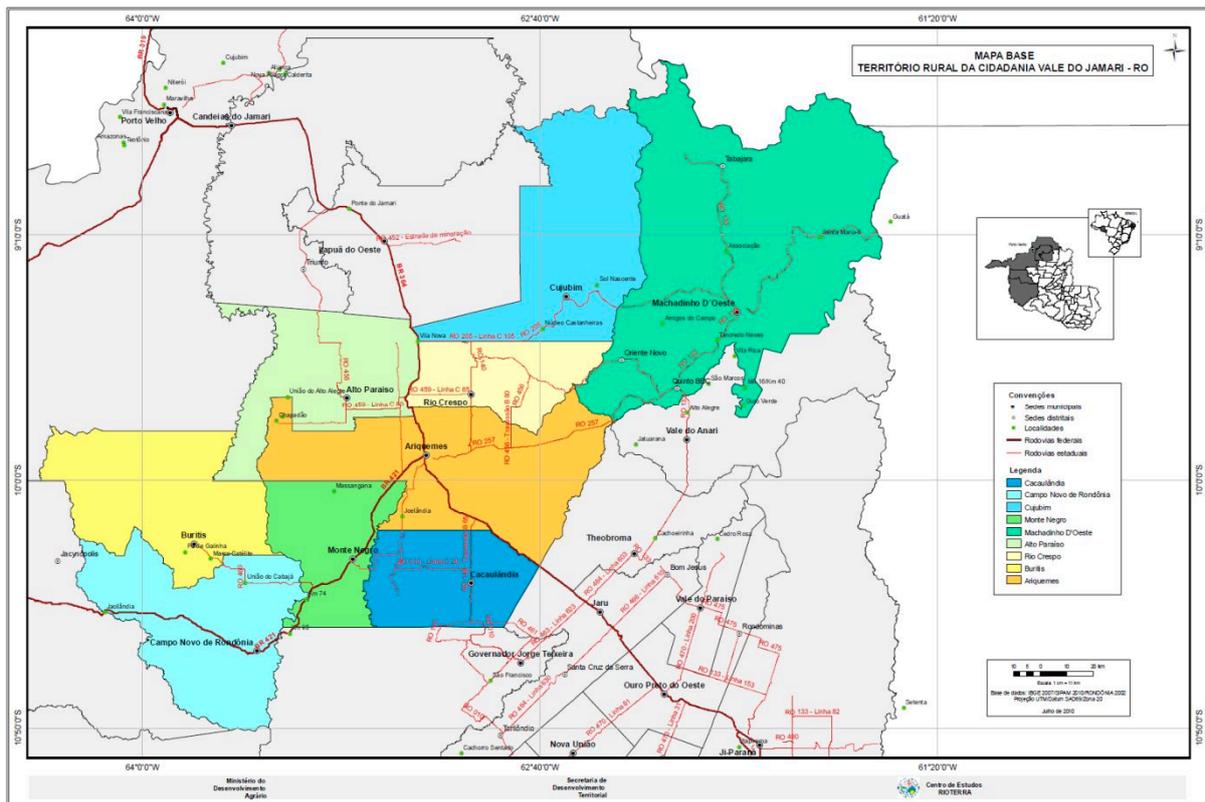
O presente estudo objetivou fazer uma adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, recomendada por Fiskejö (1985), substituindo Metanol e Giemsa pelo kit Panótipo Rápido LB.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudo**

A região do Vale do Jamari (Figura 2), está localizada na região centro norte do estado de Rondônia, sendo composta pelos municípios: Campo Novo de Rondônia, Buritis, Monte Negro, Alto Paraíso, Cacaúlândia, Cujubim, Rio Crespo, Machadinho do Oeste e Ariquemes (MENEGUETTI et al., 2011).

A hidrografia da região é formada por vários rios e igarapés, onde nos mesmos são despejados diariamente dejetos humanos, excretas de laticínios e frigoríficos, justificando uma análise de mutagênicidade, já que os mesmos são fontes de abastecimento de água dos municípios acima citados, e nunca foram realizados testes similares.



**Figura 2.** Mapa na Região do Vale do Jamari, Rondônia (TERRITÓRIOS, 2011).

## 2.2 Experimento

O experimento contou com 20 unidades de *A. cepa* de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis, sendo que 10 foram postas a germinar sobre frascos de 50 ml, com a parte inferior mergulhada em água coletada da Companhia de Águas e Esgotos do Estado de Rondônia (CAERD) e 10 em água mineral (Figura 3).



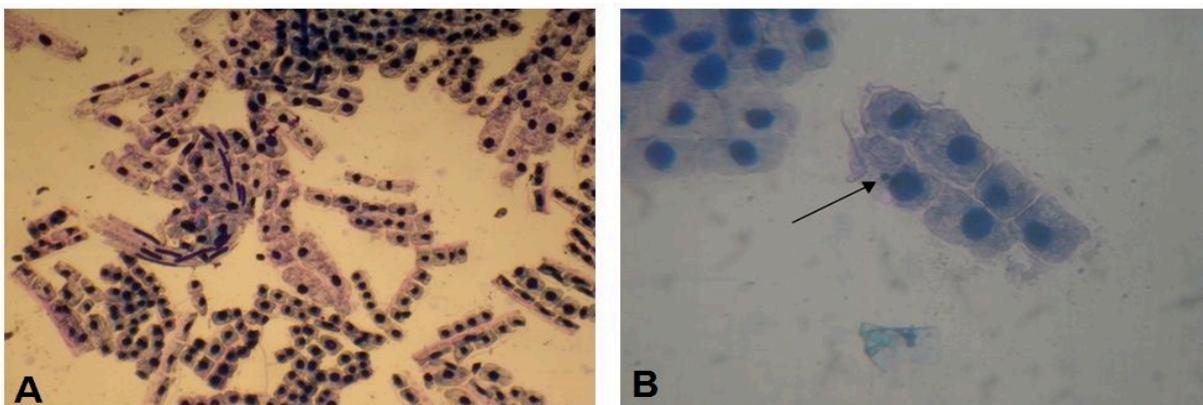
**Figura 3.** Germinação de *A. cepa* (FÃO E ZAN, 2011)

Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas foram coletados com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento, sendo lavados em água destilada, seguida de hidrólise com HCL 1N por 10 minutos em banho-maria a 60C°, sendo os tubos resfriados em água corrente. Após nova lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram feitos esfregaços em duas lâminas por *A. cepa*, sendo postas em seguida sobre gelo seco por 30 segundos para retirada da lamínula e aguardado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem, em seguida as mesmas foram coradas com o kit Panótico Rápido LB que é composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1%, segundo xantenos a 0,1% e terceiro tiazinas a 0,1%, sendo as lâminas submersas 10 vezes em cada recipiente com submersões de 1 segundo de duração na sequência descrita acima. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secadas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contados micronúcleos encontrados em 1000 células.

### 3. RESULTADOS DE DISCUSSÕES

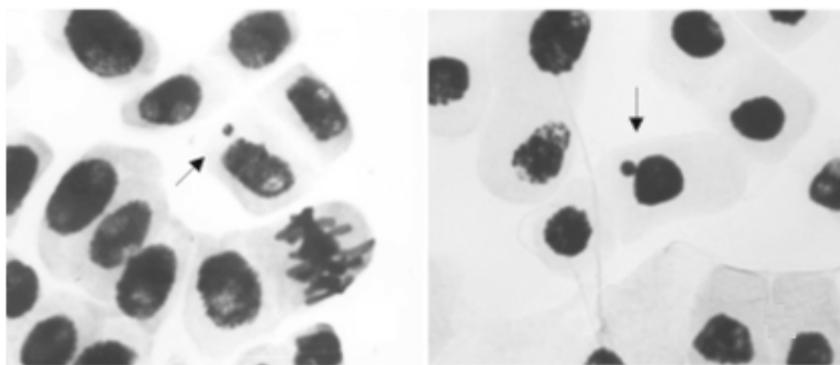
Nas células dos meristemas germinados na água da CAERD houve um índice de 2,8 micronúcleos por 1000 células, enquanto na água mineral o índice foi de 2,3/1000. Após a análise Anova, Teste Tukey realizado pelo Software Graphpad PRISM 5.0, foi observado que não houve significância estatística entre as amostras analisadas ( $p>0.05$ ), não havendo um aumento nos índices de mutagenicidade.

As lâminas ficaram bem visíveis, com uma ótima coloração dos núcleos, e boa visualidade dos limites celulares, podendo ser observados todos os estágios de divisões celulares ocorrido no processo de mitose, em especial a formação dos micronúcleos, como podem ser observados na (Figura 4).



**Figura 4.** A – Células de *A. cepa* (ocular:10x, objetiva 10x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular:10x, objetiva 40x).

A qualidade das lâminas elaboradas com esse método é equivalente as preparadas seguindo metodologia indicada por Fiskejö (1985), como pode ser observado na (Figura 5), em estudo realizado por Matsumoto et al., 2006, ressaltando ainda que a (Figura 4), não foi retocada em softwares de imagens, podendo a qualidade ficar ainda superior a indicada na mesma.



**Figura 5.** Micronúcleo em célula de *A. cepa* (MATSUMOTO et al., 2006).

#### 4. CONCLUSÃO

Obtiveram-se bons resultados com a substituição do Metanol e do Giemsa pelo kit Panótico Rápido LB, visto sua eficiência em corar ácidos nucléicos, obtendo uma boa visualização das células, índice mitótico, micronúcleos, pontes anafásicas e telofásicas, sendo esta metodologia indicada em futuras análises de mutagênicidade em rios da região do Vale do Jamari.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N; XAVIER, J. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus novergicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. Revista de Biologia e Ciências da Terra. 5(2), 2005.

BARROS, S.B.M; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. p.59-70.  
COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2000.

FÃO, F; ZAN, R A. Extração, análise de potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Mull. Arg), na cidade de Ariquemes, Rondônia, Amazônia Ocidental. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2011.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*, 285:35-44, 1993.

FISKEJÖ, G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicological and Waters Quality. International Journal*, 9:235-241, 1985.

Matsumoto, S.T; Mantovani, M.S; Malagutti, M.I.A; Dias, A.L; Fonseca, I.C; Marin-Morales, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol*, 29(1):148-158, 2006 .

MENEGUETTI, D.U.O; SILVA, F.C; PELLEZZI, D.C; SOUZA, N.C; RAMOS, L.J. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari - Rondônia, Brazil. X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), São Pedro – SP, 2011

MILLER, R.C. The Micronucleus Test as an *in Vivo* Cytogenetic Method. *Environmental Health Perspectives*. Institute for Medical Research Camden, New Jersey, 1973.

RABELLO-GAY, M.N. *Genética Toxicológica: Bases e Metas*. Instituto Butantan, São Paulo, 1991.

SILVA, F. C; BARROS, M.A.B; VIANA, R.R; ROMÃO, N.F; OLIVEIRA, M.S; MENEGUETTI, D.U.O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. *Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*, 2(1):13-22, 2011.

TERRITÓRIOS. Disponível em <<http://www.territorios-ro.org.br/wp/wp-content/uploads/mapa-base-territorio-vale-jamari.pdf>>. Acesso em 15 de maio de 2011.

VILLELA, V. I; LAU, A. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva, J; Edrtmann, B; Henriques, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 158-159.