

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cynthia Elaine de Oliveira

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
CITOGENOTOXIDADE EM *Allium cepa* L.: UMA ABORDAGEM
COMPARATIVA COM A CITOGENÉTICA**

JUIZ DE FORA – MG

2015

CYNTHIA ELAINE DE OLIVEIRA

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
CITOGENOTOXIDADE EM *Allium cepa* L.: UMA ABORDAGEM
COMPARATIVA COM A CITOGENÉTICA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos

JUIZ DE FORA – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Elaine de Oliveira, Cynthia.

Citometria de fluxo como metodologia para análise de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: uma abordagem comparativa com a citogenética / Cynthia Elaine de Oliveira. -- .
88 p.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, .

1. Citometria de fluxo. 2. Citogenética. 3. Cloreto de sódio. 4. Morte celular. 5. Índice mitótico. I. Salabert de Campos, José Marcello, orient. II. Título.

CYNTHIA ELAINE DE OLIVEIRA

**CITOMETRIA DE FLUXO COMO METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
CITOGENOTOXIDADE EM *Allium cepa* L.: UMA ABORDAGEM
COMPARATIVA COM A CITOGENÉTICA**

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado em Ciências Biológicas. Área: Genética/Biotecnologia

Aprovada em 07 de maio de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Marcello Salabert Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Universidade Federal de Lavras
Lavras - MG

JUIZ DE FORA – MG

2015

"Se eu encontrar em mim desejos que nada neste mundo pode satisfazer, eu só posso concluir que eu não fui feito para este lugar."

C.S. Lewis

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas, à minha amada mãe Jane, minha irmã Suellen e ao meu noivo Wexley. Ao meu pai e irmão, Saulo(s) da minha vida, que me fazem tanta falta. E às minhas sobrinhas Manuella, Ana Cecília e Andressa, meus melhores presentes...

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia), a UFJF, CAPES, CNPq e FAPEMIG pela bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

Agradeço ao meu Deus, por ter me dado vida. Não vida somente, mas vida plena. Mesmo sem eu merecer, ele me ama de maneira incondicional e a sua graça me capacita a prosseguir e a alcançar os meus objetivos.

À minha mãe, que com todas as suas limitações sempre fez o seu melhor. Abriu mão de seus desejos em prol dos meus. Mesmo cansada fazia comida para eu levar marmita... Meu exemplo de garra, fé, amor, carinho e dedicação.

Minha irmã, Suellen, por todo carinho e empenho, sempre me ajudando em todas as situações. Agradeço a Deus por você ser mais do que uma irmã para mim – uma amiga!

Agradeço também ao meu noivo, Wexley, por fazer a minha vida mais doce, feliz e cheia de amor. Você é meu porto-seguro. Durante todo esse tempo estive ao meu lado me incentivando e cuidando de mim. Te amo!

Às minhas sobrinhas, que pelo simples fato de existirem encham o meu coração de alegria.

Ao meu pai e meu irmão, que enquanto estiveram presentes sempre foram exemplos para mim e me ensinaram a encarar as dificuldades sorrindo. Saudades!

Ao meu cunhado, aos meus demais familiares e a toda família do meu noivo, por todo apoio e carinho.

Ao meu orientador, José Marcello, por ter me aturado desde a iniciação científica. Agradeço por todo o conhecimento dispensado, todas as conversas e boas risadas. Não poderia deixar de agradecer à sua esposa, Beatriz, pelas deliciosas comidas em dias de longos experimentos.

Agradeço aos demais professores da Genética: Saulo, Lyderson, Carlos e Marcelo, por toda disponibilidade em ajudar quando necessário.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF (e também aos que não estão mais lá) por todas as boas experiências. Pelas conversas, risadas, troca de conhecimentos e ajuda nos trabalhos. Não vou arriscar citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém.

À Christiane, por ser uma amiga de pensamento tão parecido com o meu. Por ter estado comigo no ensino médio, graduação e mestrado, compartilhando as conquistas, decepções, dificuldades e marmitas. É impossível imaginar minha vida sem a sua, somos Watson e Crick!

À Ana Paula, por ser essa amiga tão especial... Por alegrar os meus dias na UFJF com seu jeito único. Somos irmãs de mães diferentes, apesar de você querer roubar a minha e ainda dizer que me pareço com a sua...

Agradeço também aos irmãos da Igreja de Nova Vida, por todo carinho comigo e por todas as orações. Aos meus pastores, pelos conselhos e incentivos. Às crianças da Geração Vida, por despertarem o melhor de mim e me ensinarem a simplicidade da vida. Àqueles que são verdadeiros amigos e sempre torceram pela minha felicidade...

A todos os meus amigos, de perto ou de longe, por contribuírem com a minha felicidade e sucesso. "É impossível ser feliz sozinho!"

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O teste de *Allium cepa* L. tem sido rotineiramente empregado para a avaliação de ecotoxicologia e prospecção de efeitos biológicos. A estratégia mais comum associada ao teste é a análise de parâmetros citogenéticos, tais como índice mitótico e percentual de alterações cromossômicas. O uso da citometria de fluxo para a análise de citogenotoxicidade e mutagênese em *A. cepa* ainda é um aspecto pouco explorado. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer parâmetros de citometria de fluxo para a análise de citogenotoxicidade em *A. cepa*, utilizando como agente mutagênico o cloreto de sódio. Bulbos de *A. cepa* foram expostos em água destilada por um período mínimo de 24 horas e em seguida submetidos às concentrações de cloreto de sódio (0; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500mM) por 2, 4, 8, 12 e 24 horas. O cloreto de sódio foi utilizado por ser conhecido na literatura como indutor de morte celular em plantas. Os parâmetros considerados na citometria de fluxo foram: intensidade de fluorescência, FSC (tamanho nuclear) e SSC (complexidade nuclear). Já na análise citogenética, os parâmetros avaliados foram índice mitótico (IM) e alterações cromossômicas. Foi realizado ensaio cometa nos tratamentos expostos por 24 horas para a averiguação de fragmentação do DNA. Células controle foram caracterizadas quanto ao tamanho nuclear, por meio de técnicas citogenéticas e pela citometria de fluxo. Houve redução no IM com o aumento da concentração e tempo de exposição aos tratamentos. Da mesma forma, os resultados de citometria de fluxo indicaram uma diminuição gradual significativa no percentual de células em G1, S e S + G2. Nos tratamentos com índice mitótico próximo ou igual a zero foram observadas características de morte celular, como condensação do núcleo (diminuição do FSC e intensidade de fluorescência) e fragmentação do material genético (aumento de sub-G1 e coeficiente de variação); esta fragmentação também foi observada no ensaio cometa. Os resultados da análise de complexidade interna (SSC) foram inversamente proporcionais aos dados de tamanho nuclear (FSC), indicando que a condensação da cromatina ocorre de maneira irregular. Diante dos resultados, pode-se identificar que estes parâmetros de citometria de fluxo podem ser utilizados com segurança na avaliação de morte celular em *A. cepa*, considerando as características de condensação do núcleo e fragmentação do DNA. Curiosamente, em todas as análises a concentração 62,5mM de NaCl se destacou por apresentar um elevado percentual de c-metáfases e algumas metáfases poliploidizadas. Esta mesma concentração foi testada quanto à capacidade de induzir c-metáfases em células de alface e tomate e os resultados sugerem o cloreto de sódio como potencial agente antimitótico.

Palavras-chave: cloreto de sódio; índice mitótico; morte celular; condensação nuclear.

ABSTRACT

Allium cepa L. assay has been routinely used for the evaluation of ecotoxicology and prospecting of biological effects. The most common strategy associated with this test is the analysis of cytogenetic parameters such as mitotic index and percentage of chromosomal abnormalities. The use of flow cytometry for cytogenotoxicity and mutagenesis analysis in *A. cepa* is still an unexplored aspect. The present work aims to establish parameters from flow cytometry for cytogenotoxicity analysis in the *Allium cepa* test using with mutagen, sodium chloride. *A. cepa* bulbs were exposed in distilled water for a minimum of 24 hours and then exposed to the concentrations of sodium chloride (0, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500mM) for 2, 4, 8, 12 and 24 hours. The sodium chloride was used because it is known in the literature as an inducer of cell death in plants. The parameters considered in flow cytometry were: fluorescence intensity, FSC (nuclear diameter) and SSC (nuclear complexity). In the cytogenetic analysis, the parameters evaluated were: mitotic index (MI) and chromosomal alterations. Comet assay was carried out in treatments exposed for 24 hours to the investigation of DNA fragmentation. Control cells were characterized by nuclear size, either by cytogenetic as by flow cytometry. A decrease in the percentage of dividing cells was observed in a dose-time dependent. Likewise, the results of flow cytometry showed significant decrease in the percentage of cells in G1, S and S + G2. In the treatments with mitotic index equal or close to zero features of cell death were observed as nuclei condensation (decrease of the FSC and fluorescence intensity) and fragmentation of genetic material (increased sub-G1 and coefficient of variation); this fragmentation was also viewed by comet assay. The results of analysis of internal complexity (SSC) were inversely proportional to the FSC data indicating that chromatin condensation occurs irregularly in the nuclear membrane. From the results, you can identify those parameters that flow cytometry can be used safely in assessing cell death in *A. cepa*, considering the characteristics of the nucleus condensation and DNA fragmentation. Interestingly, in all analyzes the NaCl concentration 62,5mM stood out with a high percentage of c-metaphase and some polyploid metaphase. This same concentration was tested for ability to induce c-metaphases lettuce and tomato cells and the results suggest the potential sodium chloride as antimetabolic agent.

Keywords: sodium chloride; mitotic index; cell death; nuclei condensation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise por citometria de fluxo do tamanho dos núcleos de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> numa situação controle.	31
Figura 2	Histograma de frequências dos diâmetros nucleares, de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> , estimados por análise citogenética.	32
Figura 3	Percentual de divisão de células de cebola tratadas com cinco concentrações de cloreto de sódio e controle em água destilada.	33
Figura 4	Diferentes níveis de degradação celular, em comparação ao controle, observados nos tratamentos que apresentaram índice mitótico próximo ou igual a zero.	34
Figura 5	Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de <i>A. cepa</i> . Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 2 horas de exposição.	35
Figura 6	Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de <i>A. cepa</i> . Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 4 horas de exposição.	35
Figura 7	Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de <i>A. cepa</i> . Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 8 horas de exposição.	36
Figura 8	Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de <i>A. cepa</i> . Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 12 horas de exposição.	37
Figura 9	Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de <i>A. cepa</i> . Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 24 horas de exposição.	38
Figura 10	Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> submetidas a concentrações de NaCl.	44
Figura 11	Histograma de frequência dos núcleos nas diferentes fases do ciclo celular.	47
Figura 12	Análise de intensidade de fluorescência, FSC (diâmetro nuclear) e SSC (complexidade nuclear) após os tratamentos com NaCl.	50
Figura 13	Ensaio cometa realizado em células de <i>Allium cepa</i> tratadas com soluções de cloreto de sódio (NaCl).	51
Figura 14	C-metáfases induzidas em células de cebola com o tratamento de	58

62,5mM de NaCl por 8 horas de exposição.

- Figura 15** Gráfico indicando o percentual de c-metáfases em células de alface expostas aos tratamentos com 62,5mM de NaCl por 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas de exposição em comparação ao controle negativo (água destilada) e 8-hidroxiquinoleína (HQ) por 3 horas de exposição. **61**
- Figura 16** C-metáfases obtidas em células de alface após exposição a 62,5mM de NaCl em diferentes tempos de exposição. **62**
- Figura 17** Gráfico indicando o percentual de c-metáfases em células de tomate expostas aos tratamentos com 62,5mM de NaCl por 4, 5, 6, 7 e 8 horas de exposição em comparação ao controle negativo (água destilada) e 8-hidroxiquinoleína (HQ) por 4 horas de exposição. **63**
- Figura 18** C-metáfases obtidas em células de tomate expostas a 62,5mM de NaCl em diferentes tempos de exposição. **63**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 2 horas de exposição.	39
Tabela 2	Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 4 horas de exposição.	40
Tabela 3	Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 8 horas de exposição.	41
Tabela 4	Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 12 horas de exposição.	42
Tabela 5	Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 24 horas de exposição.	43
Tabela 6	Percentuais de células nas diferentes fases do ciclo celular e de subpartículas-G1 após exposição ao NaCl em diferentes concentrações e tempos de exposição.	45
Tabela 7	Intensidade de fluorescência, FSC, SSC e coeficiente de variação dos núcleos em G1 de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> após exposição ao cloreto de sódio em diferentes concentrações e tempos de exposição.	48
Tabela 8	Porcentagem de c-metáfases em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> tratadas com 62,5mM de NaCl por 4 e 8 horas.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIP	Ácido 2-aminoindano-2-fosfônico
ANOVA	Análise de variância
BOA	Benzoxazolina-2(3H)-1
C	Conteúdo de um conjunto haploide de cromossomos
CHO	"Chinese hamster ovary" - células de ovário de hamster chinês
CV	Coefficiente de variação
DNA	"Deoxyribonucleic acid" - Ácido Desoxirribonucléico
F1	Células da primeira geração de divisão
FSC	"Forward Scatter" - detector de dispersão da luz frontal
G1	"Gap 1" - primeira fase da intérfase
G2	"Gap 2" - fase da intérfase que precede a mitose
HCL	Ácido clorídrico
HQ	8-hidroxiquinoleína
ID	Índice de danos (ensaio cometa)
IF ^a G1	Intensidade de fluorescência dos núcleos em G1
IM	Índice mitótico
LB01	"Lysis Buffer" - tampão de lise
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MN	Micronúcleo
N	Normal (unidade de concentração)
NaCl	Cloreto de sódio
NiO	Óxido de níquel
PCD	"Programmed Cell Death" - morte celular programada
S	Fase de síntese de DNA
SPL	"Spent Pot Liner" - resíduo sólido da indústria do alumínio
SSC	"Side Scatter" - detector de dispersão lateral da luz
sub-G1	Partículas com quantidade de DNA inferior a 2C
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Citometria de fluxo	19
2.2 Algumas aplicações da citometria de fluxo na avaliação de mutagênese	20
2.3 Morte celular e sua detecção por citometria de fluxo	21
2.4 Cloreto de sódio (NaCl) e efeitos citogenotóxicos	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Modelo biológico	26
4.2 Delineamento	26
4.3 Caracterização das células meristemáticas de <i>A. cepa</i> por análise citogenética e citometria de fluxo	27
4.4 Aplicação da citometria de fluxo na avaliação de citogenotoxicidade de NaCl e comparação com os dados de análise citogenética	28
4.5 Ensaio Cometa.....	28
4.6 Análise estatística	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Caracterização das células meristemáticas de <i>A. cepa</i> por citogenética e citometria de fluxo	30
5.2 Aplicação da citometria de fluxo na avaliação de citogenotoxicidade de NaCl e comparação com os dados de análise citogenética	32
5.2.1 Análise citogenética	32
5.2.2 Análise por citometria de fluxo	44
5.2.3 Ensaio Cometa.....	49

6 DISCUSSÃO	52
7 UMA UTILIZAÇÃO PRÁTICA DO NaCl - EXPERIMENTOS EXTRAS	58
8 CONCLUSÕES	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO A - Referência dos artigos revisados quanto ao uso da citometria de fluxo no ensaio de <i>A. cepa</i>	87

1 INTRODUÇÃO

Testes mutagênicos, utilizando modelos vegetais, têm sido rotineiramente empregados para a avaliação de ecotoxicologia e prospecção de efeitos biológicos (PESNYA e ROMANOVSKY, 2013; RADIC' et al., 2014). Dentre os modelos utilizados nos ensaios de citogenotoxicidade destaca-se *Allium cepa* L. (cebola), bastante empregado por apresentar pequeno número cromossômico ($2n=16$), cromossomos de tamanhos relativamente grandes e ser um teste de baixo custo e fácil execução. Além disso, os efeitos observados nas células de *A. cepa* demonstram boa correlação com aqueles observados em células de mamíferos (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982).

O teste de *A. cepa* 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 e MARIN-MORALES, 2009).

A estratégia mais comum associada ao teste é a análise de parâmetros citogenéticos, tais como índice mitótico e percentual de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais (YILDIZ et al., 2009; KURÁS et al., 2009; TEERARAK et al., 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009; SOUSA et al., 2009). De modo geral, os percentuais de células em divisão (índice mitótico) e as alterações cromossômicas são calculados como uma resposta a tratamentos diferenciados. O decréscimo ou aumento dos percentuais de células em divisão podem ser considerados parâmetros seguros para determinar a presença de agentes citotóxicos (SMALA-KINCL et al., 1996). A análise de alterações cromossômicas em todas as fases da divisão celular, como proposto inicialmente por Fiskesjö (1985), torna a avaliação dos efeitos mais compreensiva, uma vez que promove uma melhor investigação dos mecanismos de ação dos agentes testes. Várias alterações podem ser detectadas, podendo-se citar: pontes e fragmentos em anáfase, segregação desigual ou tardia de cromossomos, ascensão precoce de cromossomos, perda de cromossomos, anáfase/telófase multipolar, c-metáfases, cromossomos aderentes, etc (FERNANDES et al., 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009). Alterações como pontes e fragmentos são

indicativos de efeitos clastogênicos, enquanto que perda de cromossomos, segregação tardia, ascensão precoce, multipolaridade e c-metáfases são indicativos de efeitos aneugênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Adicionalmente ao uso desses parâmetros, Ma et al. (1995) descreveram a avaliação de micronúcleos em células meristemáticas F1 (primeira geração de divisão) como um dos indicadores mais simples de citogenotoxicidade.

Apesar de os parâmetros citogenéticos serem bastante difundidos neste ensaio, o uso da citometria de fluxo para a análise de citogenotoxicidade e mutagênese em *A. cepa* ainda é um aspecto pouco explorado. Mesmo que a técnica já tenha sido utilizada em alguns trabalhos, atualmente a sua utilização ainda se encontra bastante restrita. Para conhecimento, foram revisados 172 artigos, publicados desde o ano de 2010 até março de 2015, que utilizaram o ensaio de *A. cepa* (ANEXO A).

De todos os trabalhos, apenas um (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012) utilizou a citometria de fluxo para determinar os efeitos do agente testado sobre as células meristemáticas de cebola. Estes autores avaliaram o efeito de um resíduo sólido gerado na fabricação do alumínio sobre células meristemáticas de *A. cepa* e a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o efeito sobre o ciclo celular.

Dos trabalhos restantes, quatro despertam interesse. Türkoğlu (2013) e Türkoğlu (2012) estimaram o conteúdo de DNA por citofotometria. Nesta técnica, núcleos interfásicos são corados com *Feulgen* e as lâminas são preparadas e analisadas em microscópios acoplados com microespectrofotômetros. Os valores de DNA são obtidos com base na densidade óptica e convertidos em picogramas, utilizando um valor 2C de uma espécie padrão. Eles também calcularam o volume interfásico nuclear medindo o diâmetro dos núcleos corados e aplicando a fórmula $\frac{4}{3}\pi r^3$, onde r é o raio do núcleo. Todavia, estas estimativas podem ser feitas com rapidez e precisão por citometria de fluxo.

Já Leme et al. (2012) e Ghosh et al. (2012) realizaram o ensaio de citogenotoxicidade tanto em células de *A. cepa* como em modelos animais e aplicaram a citometria de fluxo somente para as células animais. Isto pode ser explicado pelo fato de haver vários kits e protocolos bem estabelecidos para o estudo de células animais (AVLASEVICH et al., 2011). No trabalho de Leme et al. (2012), por exemplo, foi utilizado o kit "*In Vitro MicroFlow Kit*" (Litron) para a detecção de micronúcleo

(MN) em células de ovário de hamster chinês (CHO). O método utiliza coloração sequencial para diferenciar MN de fragmentos de cromatina derivados de células em apoptose ou necrose e, segundo os próprios autores, permite quantificar um grande número de células em curto período de tempo. Ghosh et al. (2012), por sua vez, realizaram a citometria de fluxo de células sanguíneas humanas tratadas com nanopartículas de prata e correlacionaram os dados de aumento da dispersão frontal e lateral da luz com a presença da nanopartícula dentro das células.

Apesar do conhecimento que se tem sobre as possibilidades da técnica de citometria de fluxo, os dados ainda são incipientes na pesquisa com plantas. Portanto, o aprofundamento dessa abordagem representa a introdução/consolidação de uma ferramenta rápida e confiável na detecção de irregularidades cromossômicas e de ciclo celular no ensaio de *A. cepa*, além de contribuir na elucidação dos mecanismos de morte celular associados à exposição a extratos/substâncias biológicas ou agentes físicos e químicos ambientais neste modelo de estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica inicialmente desenvolvida para a contagem e análise de células sanguíneas (CÔRTE-REAL et al., 2002). No entanto, o uso desta tecnologia generalizou-se para outras áreas e tem se expandido nos estudos com células vegetais (DOLEŽEL, 1997, DOLEŽEL et al., 2007).

Inúmeras aplicações da citometria de fluxo já estão bem estabelecidas em plantas, como a determinação de quantidade de DNA e tamanho de genoma (GSCHWEND et al., 2013), determinação de ploidia (NADLER et al., 2012), estudos envolvendo híbridos (CAMPOS et al., 2009), análise de ciclo celular (SANDOVAL et al., 2003), determinação de mixoploidia e aneuploidias (ROUX et al., 2003), detecção de polissomatia (DOLEŽEL, 1997), análise de estabilidade genômica em materiais *in vitro* (MALLÓN et al., 2010) e avaliação de pólen (KRON et al., 2014).

O princípio do método se baseia na detecção da dispersão da luz e/ou fluorescência de partículas que fluem numa suspensão líquida. Por analisar partículas suspensas, a técnica permite análises com muita rapidez e grande número amostral e garante que as partículas analisadas (núcleos ou organelas, por exemplo) sejam lidas aleatoriamente, sem subjetividade (DOLEŽEL, 1997).

A suspensão líquida, que contém as partículas a serem analisadas, é corada com um fluorocromo e submetida a um aparelho denominado citômetro de fluxo, que contém uma câmara de fluxo preenchida por um líquido envolvente (“sheath fluid”). Este líquido apresenta uma velocidade de fluidez muito maior que a suspensão líquida e, através de um fenômeno físico denominado focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, uma a uma, no centro do fluxo (DOLEŽEL, 1997).

No momento em que as partículas movem-se uma a uma elas intersectam um feixe de luz e a dispersão de luz ou intensidade de fluorescência de cada partícula é captada por receptores. Os fótons dispersos frontalmente são analisados por um detector da dispersão frontal (FSC) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são

analisados pelos detectores de dispersão lateral (SSC) (CÔRTE-REAL et al., 2002).

A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA. Os dados são apresentados na forma de histogramas, onde a intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA (DOLEŽEL, 1997). É importante ressaltar que as células encontram-se em cíclicas divisões celulares. No modelo de ciclo celular apresentado por HOWARD e PELC (1986), o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante o período de crescimento celular (fase G1) uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haploide de cromossomos). Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e na fase seguinte (fase G2) o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 4C, até ocorrer a mitose (fase M) durante a qual a célula se divide formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C.

A leitura da fluorescência emitida por cada núcleo é plotada em um histograma que se forma em tempo real em um computador acoplado ao citômetro de fluxo. O eixo horizontal do gráfico representa a intensidade de fluorescência relativa que é diretamente proporcional à quantidade de DNA. E o eixo vertical representa a frequência de núcleos com cada intensidade de fluorescência (ou quantidade de DNA – 2C, 4C e em duplicação). Todavia, as medições do conteúdo de DNA sempre apresentam variações. As variações observadas são expressas em coeficientes de variação (CV = desvio padrão dividido pela média) (DOLEŽEL et al., 2007).

2.2 Algumas aplicações da citometria de fluxo na avaliação de mutagênese

Apesar de nos últimos anos o uso da citometria de fluxo ser bastante restrito no teste de *A. cepa*, alguns estudos envolvendo a técnica em ensaios de mutagênese que utilizam modelos vegetais já foram relatados. Rayburn e Wetzel (2002) analisaram a variação no conteúdo de DNA nuclear induzida por cromossomos aderentes em células de milho. Monteiro et al. (2010) analisaram a genotoxicidade do cádmio em três plantas e correlacionaram o aumento do coeficiente de variação do pico G0/G1 ao efeito clastogênico desse metal. Biradar et al. (1994) verificaram alterações na quantidade de DNA em núcleos de milho, induzidas pela

exposição ao fungicida Triconazole. Efeito de sincronização sobre as células de *Vicia faba* foi verificado por citometria de fluxo após a exposição ao ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP) (CVIKROVA et al., 2003). Retardo no ciclo celular em células meristemáticas de alface (*Lactuca sativa*) foi relatado após a exposição ao composto Benzoxazolina-2(3H)-1 (BOA) utilizando a citometria como ferramenta de análise (SÁNCHEZ-MOREIRAS et al., 2008).

Kuras et al. (2006) descreveram mudanças na estrutura cromossômica, atividade mitótica e conteúdo de DNA nuclear em células de *A. cepa* expostas à extratos aquosos da planta *Uncaria tomentosa*. A citometria de fluxo foi uma das estratégias utilizadas na elucidação dos mecanismos de ação do extrato dessa espécie, demonstrando inibição do ciclo celular na transição de G2 para mitose.

Faisal et al. (2013) analisaram os mecanismos de morte celular em tomate após exposição a nanopartículas de NiO e verificaram um aumento de subpartículas G1 nos gráficos de citometria de fluxo que correspondiam à ocorrência de morte celular.

Os mutagênicos físicos também são indutores de alterações cromossômicas que, por sua vez, podem levar a alterações na quantidade de DNA. Selvan e Thomas (1995) verificaram, por citometria de fluxo, a presença de alterações na quantidade de DNA em células meristemáticas de bulbos de *A. cepa* que haviam sido tratados com radiação gama.

Andrade-Vieira et al. (2012) analisaram o efeito do “Spent Pot Liner” (SPL) sobre a atividade mitótica e conteúdo de DNA nuclear em células meristemáticas de *A. cepa*. Eles avaliaram a frequência de células nas fases G1, S e G2, as partículas em sub-G1, o tamanho nuclear pelos dados de dispersão de luz frontal (FSC) e a fragmentação do DNA pelo teste de TUNEL e concluíram que este resíduo da indústria do alumínio induz morte celular semelhante a apoptose em células de cebola.

2.3 Morte celular e sua detecção por citometria de fluxo

A investigação sobre o processo de morte celular em plantas tem crescido consideravelmente nos últimos anos, dada a importância da morte celular para o desenvolvimento e defesa das plantas (DOORN et al., 2011). Grande parte do

conhecimento que se tem sobre morte celular advém de estudos com células animais. No entanto, em muitos aspectos, os processos em plantas se mostram diferentes, gerando controvérsias na classificação dos tipos de morte celular em plantas (DOORN et al., 2011).

A apoptose ou morte celular programada (PCD – Programmed Cell Death) é um dos três principais tipos de morte celular em animais. Comparado com os outros dois (morte celular por autofagia e necrose), a apoptose ou PCD é o processo de morte celular mais bem conhecido, tanto citologicamente, quanto bioquimicamente (KROEMER et al., 2009). A apoptose é acompanhada por uma redução do volume celular, condensação da cromatina, segmentação nuclear e poucas modificações estruturais das organelas citoplasmáticas (DOORN et al., 2011). Seu principal marcador morfológico é o fato de a membrana plasmática permanecer intacta até os estágios finais, em que ocorre a fragmentação da célula em pequenas vesículas revestidas por membrana (os corpos apoptóticos) (SHABALA, 2009; DOORN et al., 2011). Finalmente, estes corpos são fagocitados e degradados por enzimas lisossomais ou células especializadas. Embora, frequentemente, a apoptose esteja associada com a ativação de caspases e a fragmentação oligonucleossomal de DNA, estes processos podem também acontecer em mortes celulares não apoptóticas, sendo assim critérios insuficientes para sua classificação (DOORN et al., 2011; KROEMER et al., 2009).

Um considerável número de artigos descrevem a “apoptose em plantas” ou então o que se chama de “morte celular programada semelhante a apoptose” (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; JOSEPH e JINI, 2010; REAZEI et al., 2013). Doorn et al. (2011) sugerem que haja o uso incorreto do termo apoptose em plantas. Primeiro, a condensação de cromatina e a fragmentação do DNA são frequentemente apontadas como características da apoptose, mas elas podem também ser observadas durante a morte celular por autofagia ou necrose (LEE et al., 2001; FINK e COOKSON et al., 2005; HOYER-HANSEN et al., 2005). Segundo, os tratamentos frequentemente induzem a uma condensação do protoplasto vegetal, mas não da célula em si, que pode morfológicamente se assemelhar à condensação celular apoptótica. Contudo, as células animais que se condensam durante a apoptose permanecem com a sua membrana plasmática intacta até a formação dos corpos apoptóticos (NUNEZ et al., 2010), enquanto que os protoplastos que

condensam em resposta ao estresse usualmente possuem membrana plasmática danificada e não fragmentam em corpos apoptóticos (HEATH, 2005).

A confusão aqui percebida nas classificações de morte celular denota a necessidade de investigação destes processos em plantas.

Apesar das controvérsias, a citometria de fluxo representa uma técnica útil na investigação destes processos. Pela citometria de fluxo, algumas características morfológicas da morte celular podem ser investigadas pela análise de parâmetros morfométricos (FSC e SSC) (ORMEROD et al., 1995). A dispersão da luz frontal ou FSC (Forward Scatter) permite analisar o diâmetro ou tamanho celular/nuclear e a dispersão lateral da luz (SSC – Side Scatter) , por sua vez, a granulosidade e/ou densidade celular/nuclear.

A estimativa da quantidade de DNA com o uso de corantes, como o iodeto de propídeo, também permite a detecção de alguns parâmetros de morte celular por citometria de fluxo. A condensação do DNA nuclear tem sido apontada como uma das etapas dos processos de morte celular. Essa condensação geralmente dificulta a ligação do iodeto ao DNA, o que pode ser identificado como uma diminuição na intensidade de fluorescência e detectado como um deslocamento do pico G1 para a esquerda na análise de um histograma por citometria de fluxo (O`BRIEN et al., 1998). A clivagem do DNA por endonucleases tem sido apontada como um evento posterior à condensação do DNA em alguns casos. Como consequência, as células em estágios de morte celular perdem fragmentos de DNA e a análise desses núcleos por citometria evidencia uma população de células, designadas como sub-G1, com intensidade de fluorescência para DNA reduzida (ORMEROD et al., 1995).

2.4 Cloreto de sódio (NaCl) e efeitos citogenotóxicos

A morte celular desempenha um papel importante na adaptação de plantas expostas à salinidade (REZAEI et al., 2013; JOSEPH e JINI 2010). Um dos efeitos conhecidos do estresse salino em plantas é a indução de morte celular. Sabe-se que o cloreto de sódio (NaCl) induz este processo por gerar desequilíbrio iônico em *Arabidopsis* (HUH et al., 2002) e em tabaco (SHABALA et al., 2007; SHABALA, 2009).

Rezaei et al. (2013) utilizou a concentração 500mM de NaCl para induzir PCD

em células de trigo em suspensão. O tratamento destas células durante 12 horas induziu mudanças na morfologia nuclear e clivagem internucleosomal no DNA.

Lin et al. (2006) realizaram citometria de fluxo de protoplastos de tabaco submetidos ao NaCl para avaliar ao mesmo tempo os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), estado de transição de permeabilidade do poro mitocondrial (PTP) e morte celular. A morte celular foi detectada considerando como parâmetro o aumento de partículas antes de G1 (sub-G1). O aumento e diminuição de ROS e PTP foram observados antes do aparecimento do processo de morte celular, indicando que o mesmo induzido por estresse salino em tabaco é mediado por espécies reativas de oxigênio e redução no potencial de membrana mitocondrial.

Estudos sobre os efeitos do cloreto de sódio sobre o índice mitótico e percentual de aberrações cromossômicas são escassos. Hossain et al. (2004) relataram a inibição do índice mitótico e o aumento do percentual de alterações cromossômicas em raízes de *Chrysanthemum morifolium* R. submetidas a concentrações crescentes de NaCl, sendo que a aberração mais frequente foi ponte em anáfase. Tabur e Demir (2009) relataram que sementes de cevada cultivadas em diferentes concentrações de NaCl mostraram uma diminuição significativa do índice mitótico e maior número de anormalidades cromossômicas. Radic' et al. (2005) sugeriram que altas concentrações de sal (300, 450 e 600 mM de NaCl) causam a inibição total de atividade mitótica e anomalias cromossômicas em células meristemáticas de *Centaurea ragusina* L.

Katsuhara e Kawasaki (1996) relataram que houve deformação nuclear de células meristemáticas de cevada expostas por 12 horas a 500mM de NaCl. A degradação nuclear foi observada quando as raízes foram expostas a concentrações de NaCl superiores a 300mM durante 24 horas, sendo acompanhada por fragmentação do DNA testada em gel de agarose por eletroforese. Katsuhara (1997) identificou marcação TUNEL-positivo de células de cevada expostas ao NaCl e propôs, juntamente com os dados de Katsuhara e Kawasaki (1996), que a inibição do índice mitótico e as características morfológicas observadas estavam associadas à indução de morte celular nestas células.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer parâmetros de citometria de fluxo para a análise de citogenotoxicidade no teste de *Allium cepa*, utilizando como agente mutagênico o cloreto de sódio.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar parâmetros de citometria de fluxo para a análise de populações celulares de *Allium cepa* e relacionar com dados citogenéticos destas células.
- Utilizar o NaCl como agente citogenotóxico e testar a eficiência da citometria de fluxo como método de detecção das alterações evidenciadas pela análise citogenética.
- Contribuir para o conhecimento dos efeitos citogenotóxicos do NaCl.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo biológico

Para a condução dos experimentos, *Allium cepa* (cebola) ($2n=2x=16$) foi utilizada como modelo biológico. Em todos os ensaios foram utilizados bulbos saudáveis, de tamanhos similares e obtidos comercialmente.

4.2 Delineamento

Cento e vinte bulbos de cebola foram lavados em água corrente e as camadas de tecido morto, descartadas. Para a obtenção das raízes, os mesmos foram expostos em água destilada por um período mínimo de 24 horas (ou até emitirem raízes). Os bulbos com quantidade de raízes inferior a sete foram descartados. Noventa e três bulbos foram selecionados para os experimentos.

4.2.1 Citometria de fluxo

Para cada tratamento investigado por citometria de fluxo foram utilizados três bulbos. De cada bulbo foram coletadas seis raízes, sendo estas utilizadas para o preparo de uma amostra. Ou seja, para cada amostra de citometria foram utilizadas seis raízes provenientes do mesmo bulbo. Foram analisadas três amostras por tratamento (delineamento inteiramente ao acaso composto por três repetições).

As suspensões nucleares foram obtidas segundo o método descrito por Galbraith et al (1983). Resumidamente, os seis meristemas de cada amostra foram seccionados, com o auxílio de uma lâmina, em uma placa de Petri contendo 1mL do tampão de lise LB01, sobre o gelo. Após o isolamento dos núcleos, a suspensão nuclear foi filtrada por uma rede de nylon com cerca de 45 μ m, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Esta suspensão foi então corada com 50 μ L de iodeto de propídeo (1mg/mL) e analisada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II.

4.2.2 Análise citogenética

Para a análise citogenética, foram utilizados os mesmos bulbos da citometria. De cada bulbo, foi utilizada uma raiz para a confecção de uma lâmina. Foram analisadas três lâminas por tratamento (delineamento inteiramente ao acaso composto de três repetições).

As raízes coletadas foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e mantidas no freezer por um período mínimo de 24 horas. Para confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 5N por 20 minutos e posteriormente lavadas em água destilada. A região meristemática foi separada do restante da raiz e colocada sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45% sendo posteriormente esmagada entre lâmina e lamínula. A lamínula foi retirada com auxílio de nitrogênio líquido e as células coradas com Giemsa 10% (por 4 minutos), procedendo-se então à análise das lâminas ao microscópio de luz.

4.3 Caracterização das células meristemáticas de *A. cepa* por análise citogenética e citometria de fluxo

Para a caracterização das células, três bulbos tratados apenas com água destilada foram utilizados. Foram analisadas três amostras por citometria de fluxo, de acordo com o item 4.2.1. Os seguintes parâmetros foram analisados: Intensidade de fluorescência, FSC (tamanho nuclear) e SSC (complexidade nuclear). O FSC dos núcleos analisados foi determinado por comparação com *beads* (CaliBRITE Beads, Becton Dickinson, tamanho de 6 μ M).

Destes mesmos bulbos, também foi feita análise citogenética conforme o item 4.2.2. Em cada lâmina foram caracterizados aleatoriamente 50 núcleos (interfásicos e com característica de condensação nuclear) quanto ao diâmetro nuclear. O diâmetro (em μ m) de cada núcleo foi medido com auxílio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

4.4 Aplicação da citometria de fluxo na avaliação de citogenotoxicidade de NaCl e comparação com os dados de análise citogenética

Seis concentrações de NaCl (0; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500mM) e cinco tempos de exposição (2, 4, 8, 12 e 24 horas) foram investigados. Água destilada foi utilizada como controle negativo.

Para análise citogenética, as raízes foram coletadas, fixadas e as lâminas obtidas pelos mesmos procedimentos descritos no item 4.2.2. Os parâmetros analisados foram IM e alterações cromossômicas. As análises do índice mitótico foram feitas contando-se seis campos por lâmina, na objetiva de 40x, somando-se um total aproximado de 1500-2000 células analisadas por lâmina. O IM foi calculado dividindo-se o número de células em divisão pelo número total de células analisadas e multiplicando-se por 100. Todas as células em divisão das três lâminas foram quantificadas e analisadas quanto a presença de alterações cromossômicas. O percentual total de alterações foi calculado dividindo-se o total de alterações encontradas pelo número de células em divisão. Em tratamentos onde foi possível verificar um efeito de condensação e/ou fragmentação nuclear, foram analisados 150 núcleos (3 repetições de 50 núcleos) quanto ao diâmetro nuclear.

A análise dos tratamentos por citometria de fluxo foi realizada conforme o item 4.2.1. Os parâmetros avaliados foram: Intensidade de fluorescência, FSC (tamanho nuclear) e SSC (complexidade nuclear).

4.5 Ensaio Cometa

Uma vez que características de morte celular foram detectadas após exposição ao NaCl, o ensaio cometa foi realizado na tentativa de identificar fragmentação de DNA. Para a realização do ensaio, raízes de cebola foram tratadas com as cinco concentrações de NaCl e o controle em água destilada pelo período de exposição de 24 horas. Após este período, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1). Aproximadamente 20 meristemas para cada tratamento foram macerados em 300µL de tampão de lise Tris.MgCl₂ (0,2M Tris, pH 7,5; 4mM MgCl₂-6H₂O; 0,5% w/v Triton X-100). A suspensão nuclear obtida foi filtrada por uma rede de nylon com cerca de 45 µm. As lâminas foram previamente revestidas com

uma camada de agarose 1%. Posteriormente, 50 μ L da suspensão nuclear foi misturado à 50 μ L de agarose 1% aplicado sobre a lâmina e coberto com lamínula plástica. Após 5 minutos no gelo as lamínulas foram retiradas. As lâminas foram mergulhadas em tampão de lise (1M NaCl; 30mM NaOH, 0,5% w/v SDS, pH 12.3) por 1 hora, na geladeira e, em seguida, colocadas na cuba eletroforética com tampão de eletroforese gelado (30mM NaOH e 1,5mM EDTA, pH>12,3) por um período de repouso de 1 hora. Após o repouso, a corrente elétrica foi ligada a 25V (1V cm⁻¹) por 20 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes em água destilada. Cada lâmina foi corada com 60 μ L de iodeto de propídeo (20 μ g/mL) e analisada em microscópio de fluorescência. Para cada tratamento, 25 núcleos (aqui denominados cometas) foram analisados através de análise visual. Nesta análise, as imagens foram capturadas no aumento de 400x e os cometas obtidos foram classificados em cinco classes de dano, denominadas de classe 0 a classe 4 (0 – sem dano; 1 – dano mínimo; 2 – dano médio; 3 – dano intenso e 4 – dano máximo). O índice de danos (ID) de cada tratamento foi calculado pelo somatório dos produtos da multiplicação do número de cometas de cada classe pelo dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4). O valor máximo de ID possível é 100, considerando que os 25 cometas analisados sejam classe 4.

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, com o auxílio do software de criação de planilhas e análise de dados (Microsoft Excel).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das células meristemáticas de *A. cepa* por citogenética e citometria de fluxo

Os resultados obtidos na análise por citometria de fluxo das células meristemáticas de *A. cepa* são mostrados na figura 1. Na análise de intensidade de fluorescência dos núcleos corados com iodeto de propídeo, o pico G1 foi ajustado para o canal 100 (figura 1a) e este padrão foi mantido em todas as análises realizadas neste trabalho. A linearidade do citômetro foi checada pela posição do pico G2 que esteve no canal $201,03 \pm 0,04$, podendo-se assim considerar esta medida como adequada para as análises.

Na análise de uma população controle de células meristemáticas de *A. cepa*, os núcleos em G1 representam $43,44 \pm 2,01\%$ dos núcleos; S $19,43 \pm 1,89\%$; G2/Prófase $27,11 \pm 1,78$ e sub-G1, $10,02 \pm 3,21$ (figura 1a).

Os núcleos em G1 apresentaram uma média de diâmetro 1,97 vezes maior do que as *beads* analisadas ($6\mu\text{m}$), portanto, um diâmetro de $11,82\mu\text{m}$ (figura 1b). Para os núcleos em G1, a variação observada foi de $7,50\mu\text{m}$ a $14,32\mu\text{m}$ (figura 1e). Os núcleos em S mostraram-se em média 2,66 vezes maiores do que as *beads* (diâmetro de $15,96\mu\text{m}$) (figura 1c) e a variação observada de $13,04\mu\text{m}$ a $20,60\mu\text{m}$ (figura 1e). Os núcleos em G2/prófase foram 3,35 vezes maiores ($20,10\mu\text{m}$) (figura 1d) com variação entre $17,43\mu\text{m}$ a $25,32\mu\text{m}$ (figura 1e).

Com estes resultados é possível perceber que alguns diâmetros nucleares não permitem distinguir os maiores núcleos em G1 dos núcleos no início da fase S. O mesmo é válido para núcleos no final da fase S e início de G2/Prófase (regiões de sobreposição). Excluindo estas regiões de sobreposição, podemos perceber tamanhos nucleares característicos dos núcleos em G1 (entre $7,5$ e $13,03\mu\text{m}$), S (entre $14,33$ e $17,42\mu\text{m}$) e G2/Prófase (entre $20,61$ e $25,32\mu\text{m}$). (figura 1e).

Diante destes resultados, a análise citogenética foi realizada objetivando-se identificar estes núcleos.

Um histograma representativo dos diâmetros nucleares das células meristemáticas de *Allium cepa*, obtidos pela análise citogenética, é mostrado na

figura 2. Nesta mesma figura são demonstradas as regiões de tamanhos nucleares determinadas pelas análises de citometria de fluxo. É possível notar que a maioria dos núcleos está na faixa considerada como diagnóstico para os núcleos em G1, o que se espera para uma população normal, seguido de núcleos em S e G2/prófase. Tais resultados corroboram a análise por citometria de fluxo.

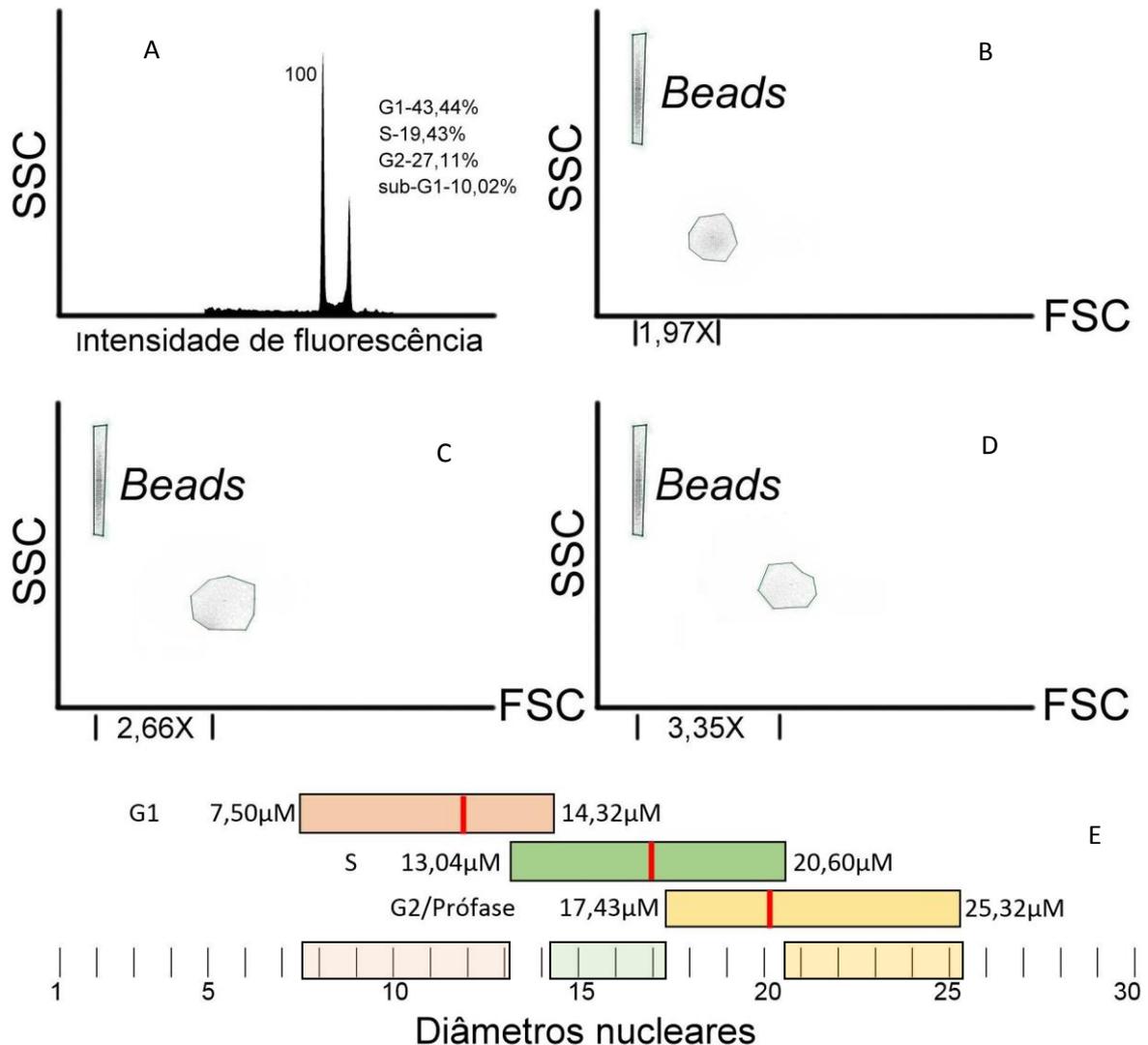


Figura 1: Análise por citometria de fluxo do tamanho dos núcleos de células meristemáticas de *Allium cepa* numa situação controle. (a) Intensidade de fluorescência dos núcleos; o pico G1 foi ajustado para o canal 100; são mostrados os percentuais de núcleos em cada fase do ciclo celular. (b) Análise de FSC dos núcleos em G1; eles são 1,97X maiores do que as *beads*. (c) Análise de FSC dos núcleos em S; eles são 2,66X maiores do que as *beads*. (d) Análise de FSC dos núcleos em G2/prófase; eles são 3,35X maiores do que as *beads*. (e) Variação nos diâmetros dos núcleos em G1, S e G2/prófase. A linha em vermelho indica a média de diâmetro destas populações (11,82μm para G1; 15,96μm para S e 20,10μm para G2/Prófase). Na escala de 1 a 30 é possível identificar as regiões onde os diâmetros nucleares não se sobrepõem; G1 pode ser caracterizado como possuindo um diâmetro entre 7,5μm a 13,03μm; S entre 14,33μm e 17,42μm e G2/Prófase entre 20,61μm e 25,32μm.

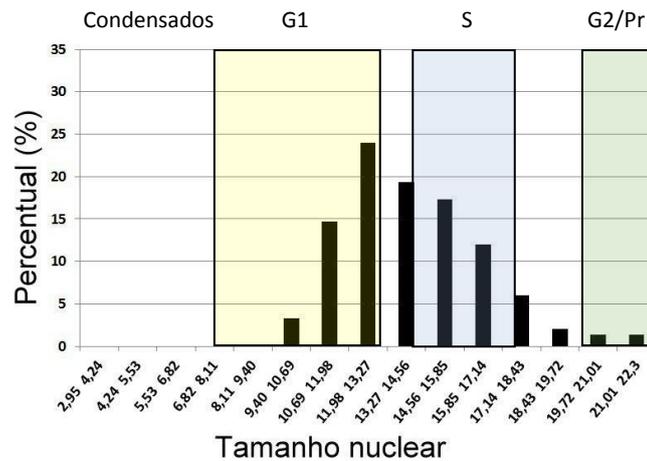


Figura 2: Histograma de frequências dos diâmetros nucleares, de células meristemáticas de *A. cepa*, estimados por análise citogenética. Segundo a análise por citometria de fluxo, os núcleos considerados condensados teriam diâmetros menores do que $7,50\mu\text{m}$, em G1 entre $7,50\mu\text{m}$ e $13,03\mu\text{m}$ (retângulo amarelo); em S entre $14,33\mu\text{m}$ e $17,42\mu\text{m}$ (retângulo azul) e em G2/Prófase entre $20,61\mu\text{m}$ e $25,32\mu\text{m}$ (retângulo verde). Este parâmetro foi utilizado como padrão para detectar efeitos sobre o ciclo celular nos experimentos conduzidos posteriormente.

5.2 Aplicação da citometria de fluxo na avaliação de citogenotoxicidade de NaCl e comparação com os dados de análise citogenética

5.2.1 Análise citogenética

Os resultados da análise de índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com diferentes soluções de cloreto de sódio e controle, são apresentados na figura 3.

Foi observado que as maiores concentrações de NaCl utilizadas (250 e 500mM) reduziram o índice mitótico desde o menor tempo de exposição (2 horas) chegando a inibi-lo completamente após 12 e 24 horas de exposição (figura 3). Com o maior tempo de exposição (24 horas), todas as concentrações (exceto 31,25mM) reduziram o índice mitótico em comparação com o controle negativo (figura 3).

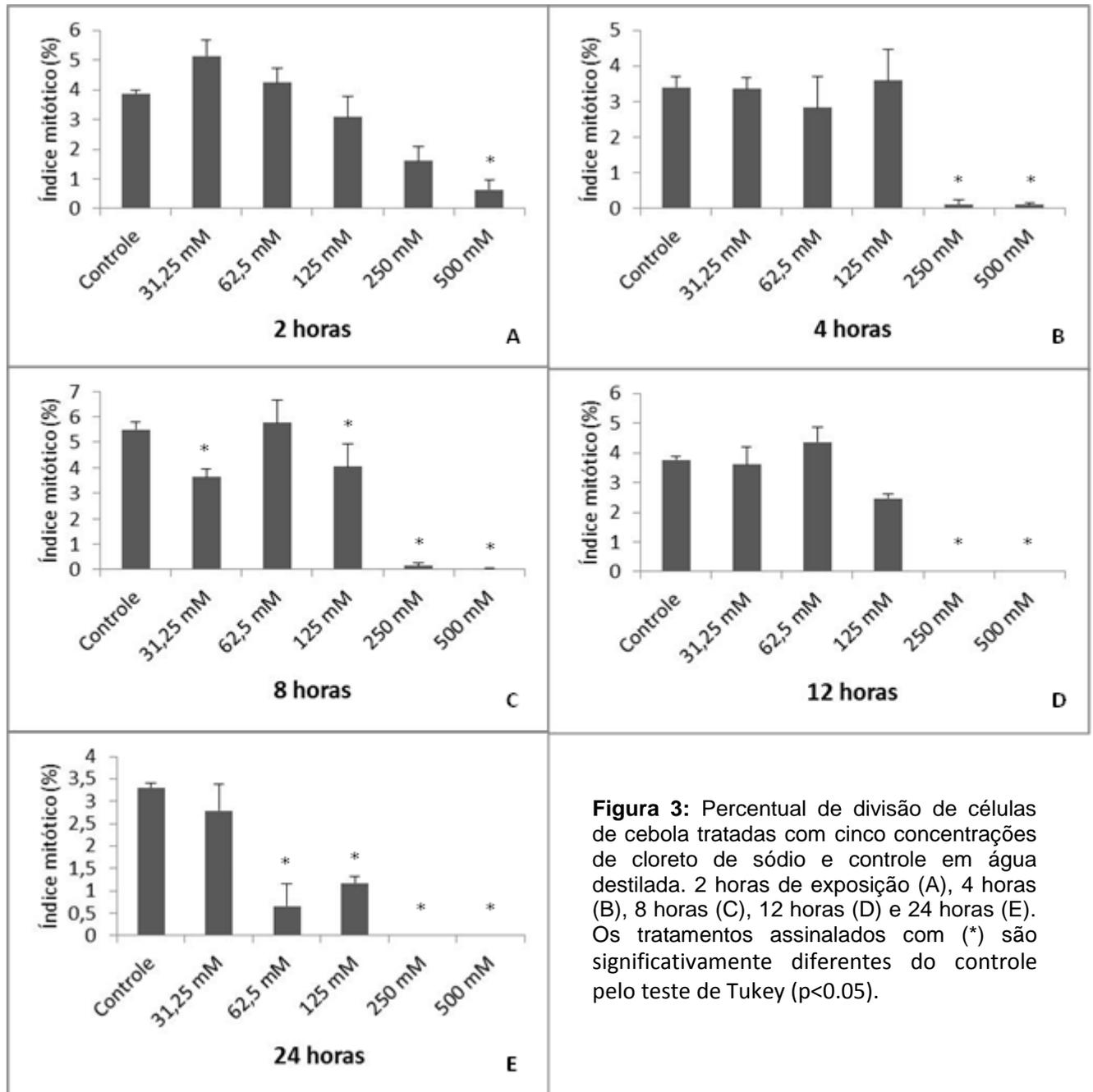


Figura 3: Percentual de divisão de células de cebola tratadas com cinco concentrações de cloreto de sódio e controle em água destilada. 2 horas de exposição (A), 4 horas (B), 8 horas (C), 12 horas (D) e 24 horas (E). Os tratamentos assinalados com (*) são significativamente diferentes do controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os tratamentos com índice mitótico próximo ou igual a zero apresentaram características morfológicas semelhantes às descritas para morte celular. O aspecto das células nesta condição variou com a intensidade dos tratamentos. As características observadas foram condensação nuclear, membrana nuclear irregular (núcleos disformes), alto índice de fragmentação nuclear e, em casos extremos, não foram observados núcleos individualizados (figura 4).

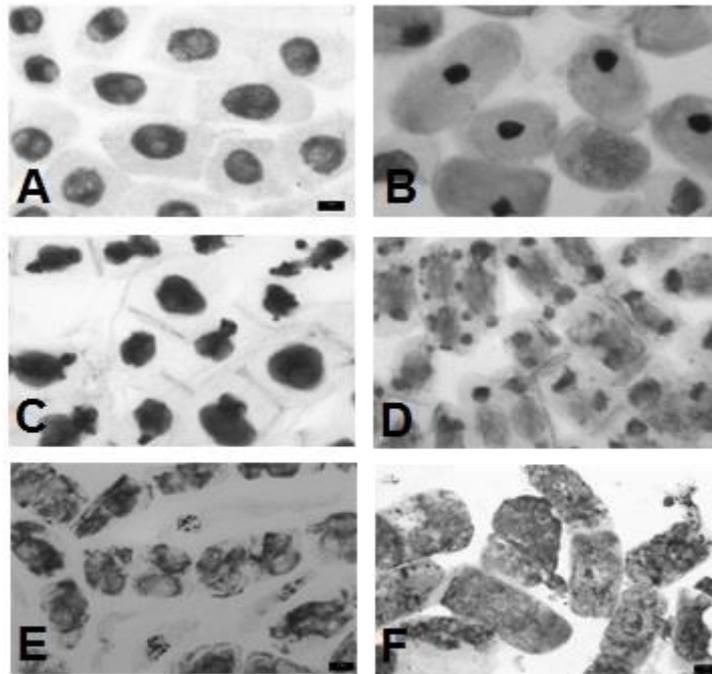


Figura 4: Diferentes níveis de degradação celular, em comparação ao controle, observados nos tratamentos que apresentaram índice mitótico próximo ou igual a zero. A – Controle 12 horas; B – 500mM de NaCl 4 horas; C – 500mM de NaCl 8 horas; D – 500mM de NaCl 12 horas; E – 250mM de NaCl 24 horas; F – 500mM de NaCl 24 horas. Barra 5 μ m.

Os resultados das análises citogenéticas de diâmetro nuclear mostrados nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9, referem-se respectivamente aos tempos de exposição de 2, 4, 8, 12 e 24 horas. No caso de fragmentação, as estimativas correspondem aos remanescentes de núcleos, picnóticos, observados.

Após 2 horas de exposição, percebe-se uma diminuição dos diâmetros dos núcleos expostos à concentração de 500mM (figura 5). Essa redução foi, em média, de 21,98% em comparação com o controle (figura 5).

Após 4 horas de exposição, percebe-se uma diminuição dos diâmetros dos núcleos expostos às concentrações de 250 e 500mM (figura 6). Após exposição à concentração de 250mM os diâmetros nucleares foram, em média, 19,53% menores do que no controle (figura 6). Essa mesma redução foi percebida após exposição ao tratamento com 500mM (núcleos 13,86% menores em relação ao controle).

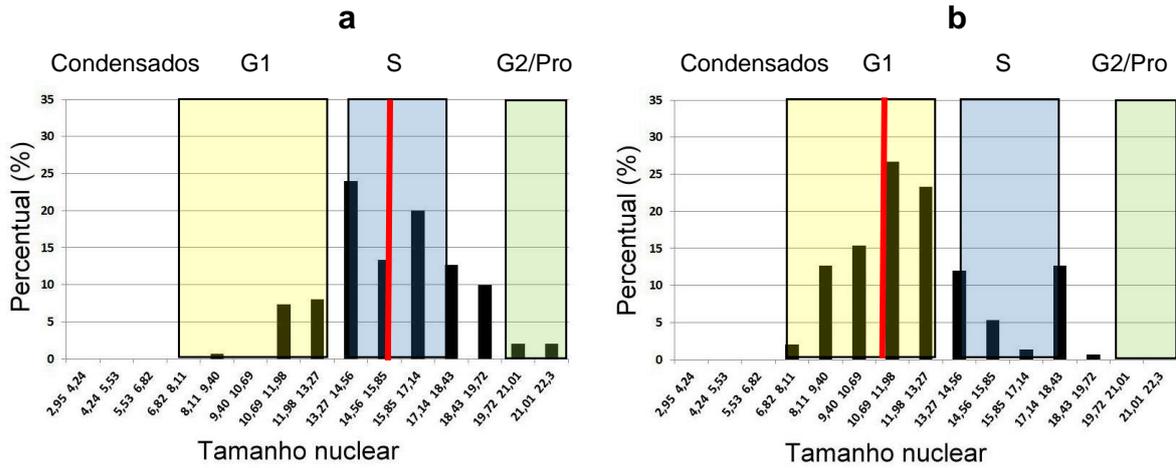


Figura 5: Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de *A. cepa*. Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 2 horas de exposição. (a) Controle (média dos diâmetros – 15,58 μ m); b) 500mM (média dos diâmetros – 12,17 μ m). Linha em vermelho demonstra a posição das médias. Núcleos condensados - diâmetros menores do que 7,50 μ m; em G1 entre 7,50 μ m e 13,03 μ m (retângulo amarelo); em S entre 14,33 μ m e 17,42 μ m (retângulo azul) e em G2/Prófase entre 20,61 μ m e 25,32 μ m (retângulo verde).

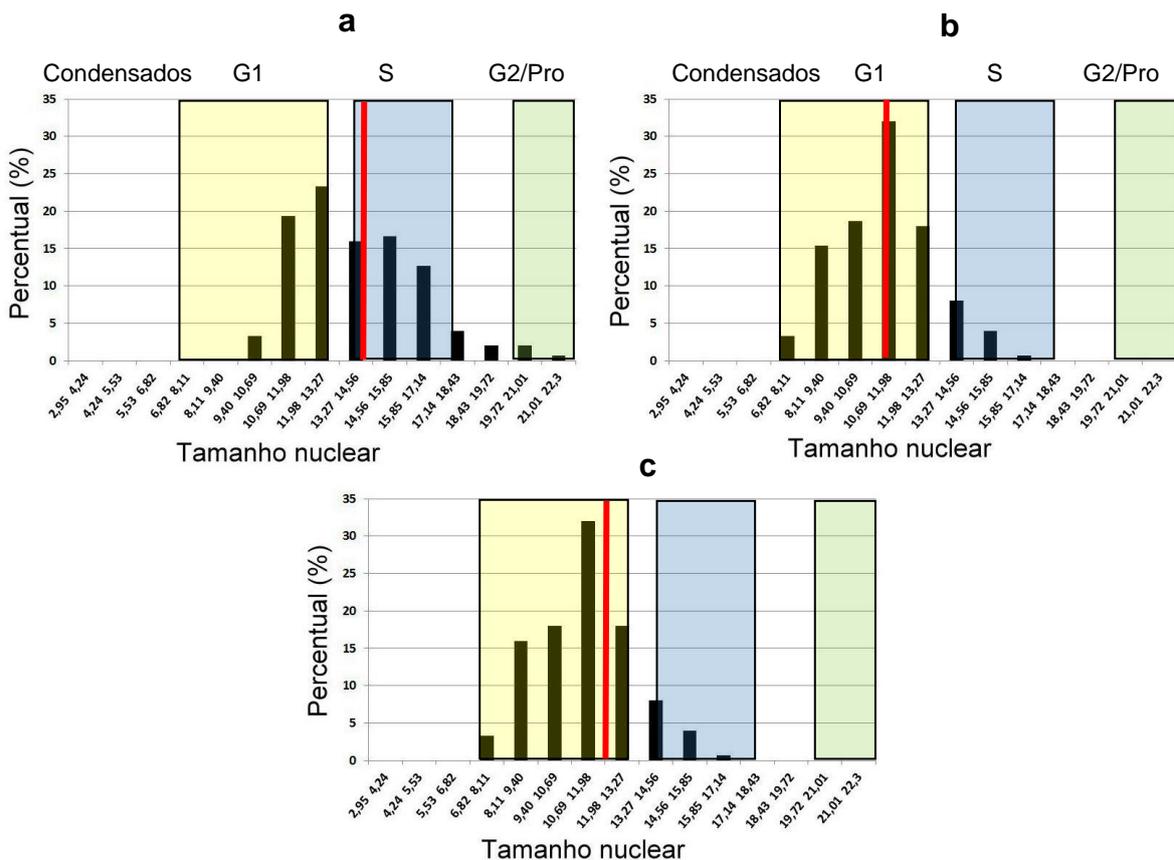


Figura 6: Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de *A. cepa*. Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 4 horas de exposição. (a) Controle (média dos diâmetros – 13,938 μ m); b) 250mM (média dos diâmetros – 11,21 μ m); c) 500mM (média dos diâmetros – 12 μ m). Linha em vermelho demonstra a posição das médias. Núcleos condensados - diâmetros menores do que 7,50 μ m; em G1 entre 7,50 μ m e 13,03 μ m (retângulo amarelo); em S entre 14,33 μ m e 17,42 μ m (retângulo azul) e em G2/Prófase entre 20,61 μ m e 25,32 μ m (retângulo verde).

Após 8 horas de exposição, percebe-se uma diminuição dos diâmetros dos núcleos expostos às concentrações de 250 e 500mM (figura 7). A concentração de 250mM reduziu os diâmetros nucleares em 22,88% em relação ao controle (figura 7). Essa redução também foi percebida após exposição ao tratamento com 500mM (núcleos 25,21% menores em relação ao controle).

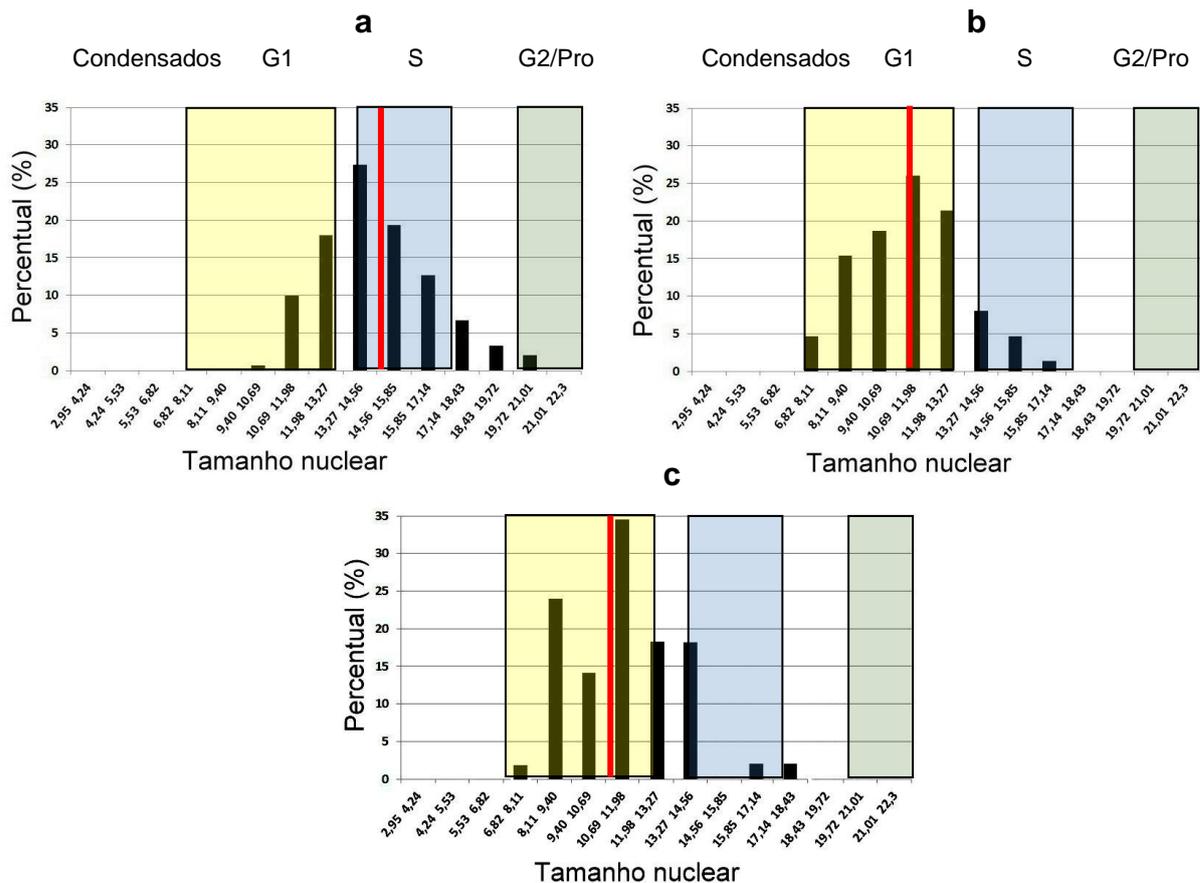


Figura 7: Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de *A. cepa*. Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 8 horas de exposição. (a) Controle (média dos diâmetros – 14,60µM); b) 250mM (média dos diâmetros – 11,26µM); c) 500mM (média dos diâmetros – 10,92µM). Linha em vermelho demonstra a posição das médias. Núcleos condensados - diâmetros menores do que 7,50µM; em G1 entre 7,50µm e 13,03µm (retângulo amarelo); em S entre 14,33µm e 17,42µm (retângulo azul) e em G2/Prófase entre 20,61µm e 25,32µm (retângulo verde).

Após 12 horas de exposição, foi detectada uma diminuição dos diâmetros dos núcleos expostos às concentrações 125, 250 e 500mM (figura 8). Após exposição à concentração de 125mM os diâmetros nucleares foram 14,31% menores do que no controle (figura 8). Essa redução foi percebida após exposição aos tratamentos com 250 e 500mM (núcleos 25,11% e 52,16% menores em relação ao controle, respectivamente). Percebe-se nos tratamentos com 250 e 500mM, pela primeira vez,

a presença de núcleos condensados (de acordo com os valores determinados pela citometria), representando 4,98% e 42,53% dos núcleos analisados, respectivamente. No tratamento com 500mM não foi possível identificar núcleos na fase S e em G2/prófase, evidenciando ausência de divisão celular.

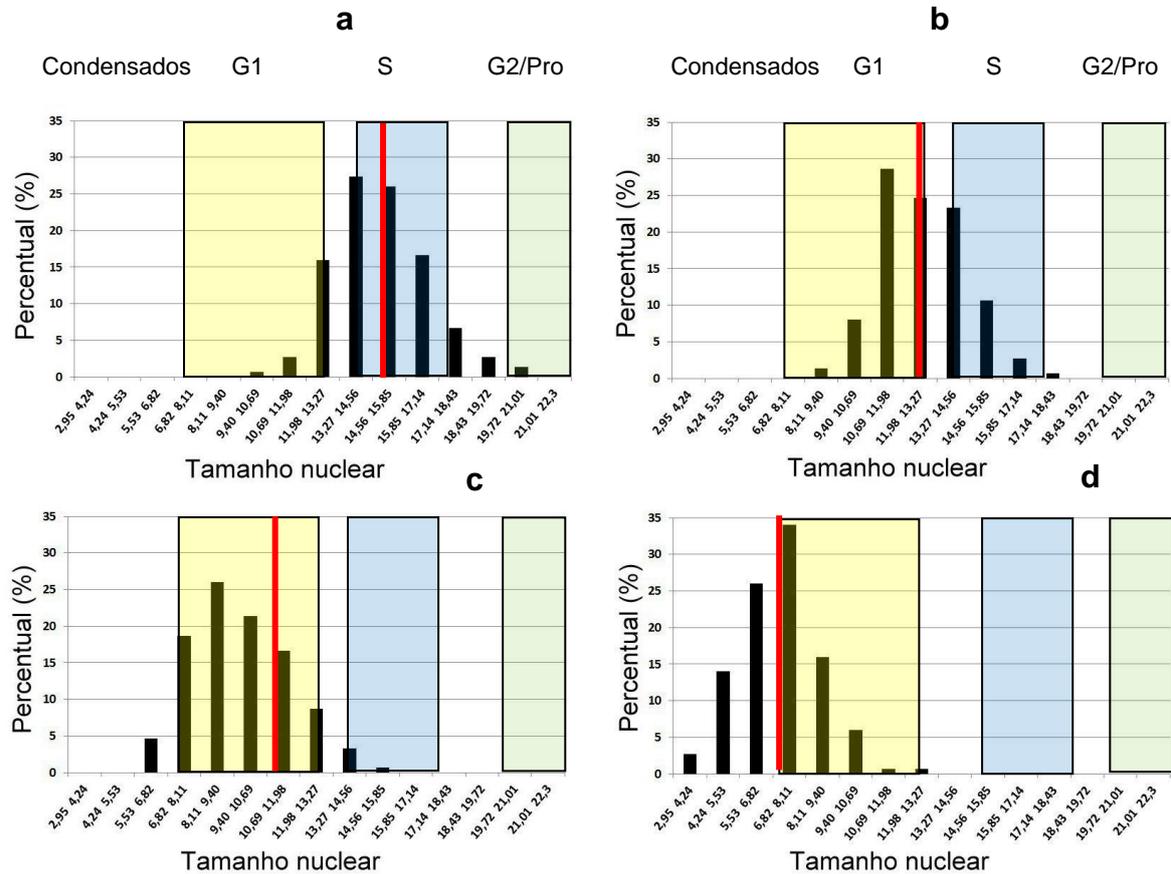


Figura 8: Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de *A. cepa*. Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 12 horas de exposição. (a) Controle (média dos diâmetros – 14,82µM); b) 125mM (média dos diâmetros – 12,70µM); c) 250mM (média dos diâmetros – 11,10µM); d) 500mM (média dos diâmetros – 7,09µM). Linha em vermelho demonstra a posição das médias. Núcleos condensados - diâmetros menores do que 7,50µm; em G1 entre 7,50µm e 13,03µm (retângulo amarelo); em S entre 14,33µm e 17,42µm (retângulo azul) e em G2/Prófase entre 20,61µm e 25,32µm (retângulo verde).

Após 24 horas de exposição, percebe-se uma diminuição dos diâmetros dos núcleos expostos às concentrações de 62,5 a 250mM (figura 9). Para o tratamento com 500mM não foi possível detectar núcleos intactos, tornando a análise inviável. Após exposição à concentração de 62,5mM os diâmetros nucleares foram 4,70% menores do que no controle (figura 9). Essa mesma redução foi percebida após exposição aos tratamentos com 125 e 250mM (núcleos 4,97% e 39,17% menores

em relação ao controle, respectivamente). Neste último, percebe-se um percentual quase nulo de núcleos entrando em divisão (apenas 3,57%).

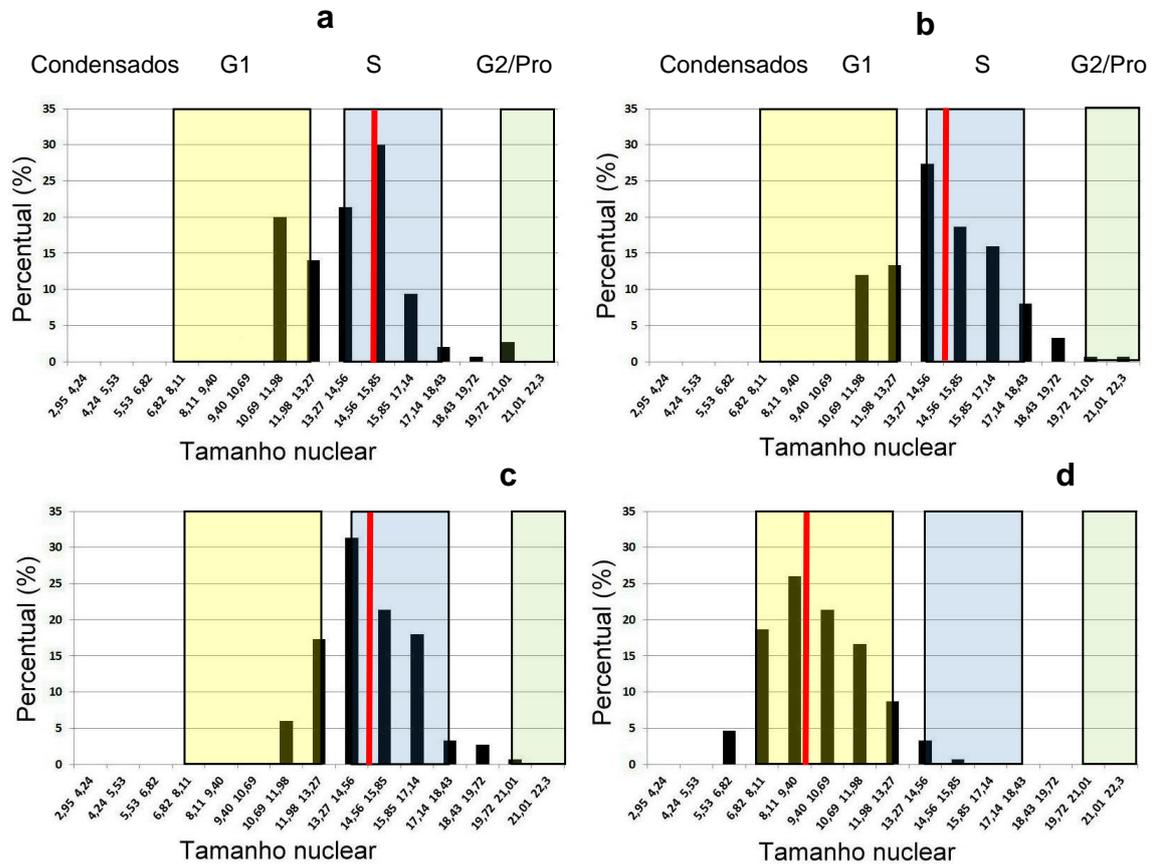


Figura 9: Análise citogenética dos núcleos meristemáticos de *A. cepa*. Histograma de frequências dos diâmetros nucleares após 24 horas de exposição. (a) Controle (média dos diâmetros – 15,322μm); b) 62,5mM (média dos diâmetros – 14,60μm); c) 125mM (média dos diâmetros – 14,58μm); d) 250mM (média dos diâmetros – 9,32μm). Linha em vermelho demonstra a posição das médias. Núcleos condensados - diâmetros menores do que 7,50μm; em G1 entre 7,50μm e 13,03μm (retângulo amarelo); em S entre 14,33μm e 17,42μm (retângulo azul) e em G2/Prófase entre 20,61μm e 25,32μm (retângulo verde).

O número de brotos, micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas e o percentual de alterações cromossômicas estão apresentados nas tabelas 1 (2 horas de exposição), 2 (4 horas de exposição), 3 (8 horas de exposição), 4 (12 horas de exposição) e 5 (24 horas de exposição).

Tabela 1 – Número de brotos, micronúcleos, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 2 horas de exposição.

	Controle	31,25mM	62,5mM	125mM	250mM	500mM
Brotos	4	0	0	2	5,67	5,67
Micronúcleo	1	0,33	0	0,33	2,67	2
Ponte nucleoplasmática	0	0	0	0	6,67	5
Quebra em metáfase	0	0	0	0	0	0
Quebra em anáfase	0	0,85	0	0	0	0
Quebra em telófase	0	0	0,34	0,42	0	0
Perda em metáfase	0	0,22	0,29	0	0	0
Perda em anáfase	0	0	0	0	0	0
Perda em telófase	0	0	0,61	0	0,35	0
Ponte em anáfase	0	0	1,46	3,74	13,08	0
Ponte em telófase	1,88	0,94	2,01	0,80	14,23	6,94
Multipolaridade	0	0	0	0	0	0
Aderentes	0,70	2,32	1,27	4,52	58,43	86,62
C-metáfase	0	0,42	1,28	0,38	0	0
Poliploidia	0	0	0	0	0	0
Tardio em metáfase	0	0,08	0	0,19	0	0
Tardio em anáfase	0,56	6,44	4,37	6,16	8,46	0
Tardio em telófase	1,42	0,52	1,59	2,02	4,95	0
Segregação desigual	0	0	0	0	0	0
TOTAL DE ALTERAÇÕES	1,00	1,94	1,88	3,38	33,21*	40,62*

* Total de alterações significativamente diferente do controle pelo teste de Tukey 5%.

Diferenças significativas nos percentuais totais de alterações foram observadas nos tratamentos com 250 e 500mM de NaCl já após 2 horas de exposição (tabela 1). Para o tratamento com 250mM o percentual total de alterações foi em média 33,21 vezes maior do que o controle e 40,62 vezes maior para o tratamento com 500mM. As principais alterações que contribuíram, neste caso, para os aumentos nos percentuais foram: brotos, pontes nucleoplasmáticas, pontes cromossômicas, cromossomos aderentes e segregação tardia.

Tabela 2 – Número de brotos, micronúcleo, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 4 horas de exposição.

	Controle	31,25mM	62,5mM	125mM	250mM	500mM
Brotos	0,33	0	0,33	5,67	15,33	2,33
Micronúcleo	0	0,33	0	0	0	0,67
Ponte nucleoplasmática	0	0	0	0,67	5,67	1,67
Quebra em metáfase	0	0	0	0	0	0
Quebra em anáfase	0	0	0	0	0	0
Quebra em telófase	0,37	0	0	0	0	0
Perda em metáfase	0	0,53	0,15	0	0	0
Perda em anáfase	0	0	0	5,19	0	0
Perda em telófase	0	0	2,70	0	0	0
Ponte em anáfase	1,09	1,88	3,03	2,71	0	0
Ponte em telófase	0,24	1,11	1,80	3,58	55,56	0
Multipolaridade	0	0	0	0	0	0
Aderentes	0,77	2,57	2,17	2,51	77,32	93,94
C-metáfase	0,44	16,02	14,53	14,12	0	0
Poliploidia	0	0,23	0,15	0,14	0	0
Tardio em metáfase	0	0,23	0,44	0,14	0	0
Tardio em anáfase	1,62	1,28	4,42	3,52	0	0
Tardio em telófase	0	2,56	1,80	1,11	0	0
Segregação desigual	0	0	1,28	0	0	0
TOTAL DE ALTERAÇÕES	0,84	9,55	9,14	12,41	36,45*	24,29*

* Total de alterações significativamente diferente do controle pelo teste de Tukey 5%.

Foram observadas diferenças significativas no percentual total de alterações nos tratamentos com 250 e 500mM de NaCl por 4 horas de exposição. Para o tratamento com 250mM o percentual total de alterações foi em média 43,39 vezes maior do que o controle enquanto que o tratamento com 500mM foi 28,92 vezes maior. As principais alterações que contribuíram, neste caso, para os aumentos nos percentuais foram: brotos, pontes nucleoplasmáticas, pontes cromossômicas e cromossomos aderentes (tabela 2).

Ainda em 4 horas de exposição, percebe-se aumentos nos percentuais de perda em anáfase (125mM de NaCl) e c-metáfase (31,25 a 125mM).

Tabela 3 – Número de brotos, micronúcleo, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 8 horas de exposição.

	Controle	31,25mM	62,5mM	125mM	250mM	500mM
Brotos	2	5,67	6,33	12	7	#
Micronúcleo	0,33	2	2	1	0	#
Ponte nucleoplasmática	0	1	0	1	6	#
Quebra em metáfase	0	0	0	0	0	#
Quebra em anáfase	0	0	0	0	0	#
Quebra em telófase	0	0	0	0	0	#
Perda em metáfase	0	0	0,33	0,31	0	#
Perda em anáfase	0	2,22	4,47	0	0	#
Perda em telófase	0	0,72	17,39	11,90	0	#
Ponte em anáfase	0	0	1,39	15,00	0	#
Ponte em telófase	3,45	1,21	0,98	6,83	16,67	#
Multipolaridade	0	0	1,15	0	0	#
Aderentes	0	1,46	1,36	3,49	72,22	#
C-metáfase	0,50	7,53	16,80	8,19	0	#
Poliploidia	0	0	0,22	0	0	#
Tardio em metáfase	0,46	0,11	0	0,16	0	#
Tardio em anáfase	1,37	4,60	13,71	11,11	0	#
Tardio em telófase	1,31	0	13,68	9,21	0	#
Segregação desigual	0	0,60	2,29	2,22	0	#
TOTAL DE ALTERAÇÕES	1,48	3,97	11,26	7,28	11,39	#

* diferente do controle pelo teste de Tukey 5%. # Tratamentos sem células em divisão.

Embora com 8 e 12 horas de exposição não tenham sido observados aumentos significativos nos percentuais totais de alterações cromossômicas, percebe-se aumentos em perdas cromossômicas, pontes, cromossomos aderentes, c-metáfases, poliploidia, segregação tardia e desigual (análise estatística não realizada), em algumas concentrações (tabelas 3 e 4).

Tabela 4 – Número de brotos, micronúcleo, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 12 horas de exposição.

	Controle	31,25mM	62,5mM	125mM	250mM	500mM
Brotos	1,33	2	9,33	3,33	#	#
Micronúcleo	0,33	0,33	1,33	0,33	#	#
Ponte nucleoplasmática	0	1	0,33	0,33	#	#
Quebra em metáfase	0	0	0	0	#	#
Quebra em anáfase	0	0	0	0	#	#
Quebra em telófase	0	0	0	0	#	#
Perda em metáfase	0	0,50	0,47	0	#	#
Perda em anáfase	0,49	13,33	20	0	#	#
Perda em telófase	0	7,02	31,29	0	#	#
Ponte em anáfase	0	0,62	0	0	#	#
Ponte em telófase	1,21	9,08	0	0	#	#
Multipolaridade	0	0	0	0	#	#
Aderentes	0,15	1,30	0,77	12,30	#	#
C-metáfase	0	8,04	8,60	0	#	#
Poliploidia	0	0,25	5,99	0	#	#
Tardio em metáfase	0,24	0	0,19	0	#	#
Tardio em anáfase	1,84	6,17	8,33	0	#	#
Tardio em telófase	1,29	1,61	10,83	0	#	#
Segregação desigual	0	1,15	12,27	0	#	#
TOTAL DE ALTERAÇÕES	0,69	4,36	9,05	4,90	#	#

* Total de alterações significativamente diferente do controle pelo teste de Tukey 5%. # Tratamentos sem células em divisão.

Tabela 5 – Número de brotos, micronúcleo, ponte nucleoplasmática e percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com cinco concentrações de NaCl e controle em água destilada por 24 horas de exposição.

	Controle	31,25mM	62,5mM	125mM	250mM	500mM
Brotos	4,33	2	1	2,67	#	#
Micronúcleo	0,33	0	0,67	1	#	#
Ponte nucleoplasmática	0	0	0	0	#	#
Quebra em metáfase	0	0	0	0	#	#
Quebra em anáfase	0	0	0	0	#	#
Quebra em telófase	0	0	0	0	#	#
Perda em metáfase	0	0	1,11	0,78	#	#
Perda em anáfase	0	0	0	0	#	#
Perda em telófase	0	0	0	16,67	#	#
Ponte em anáfase	0	0	0	0	#	#
Ponte em telófase	0,32	0	0	42,26	#	#
Multipolaridade	0	0	0	0	#	#
Aderentes	1,40	2,07	75,75	91,90	#	#
C-metáfase	0	0,32	4,44	0	#	#
Poliploidia	0	0,24	0	0	#	#
Tardio em metáfase	0	0,07	0	0	#	#
Tardio em anáfase	0,79	2,25	0	0	#	#
Tardio em telófase	0	0	0	4,76	#	#
Segregação desigual	0	0,38	0	0	#	#
TOTAL DE ALTERAÇÕES	0,66	1,46	30,54*	36,89*	#	#

* Total de alterações significativamente diferente do controle pelo teste de Tukey 5%. # Tratamentos sem células em divisão.

Com 24 horas de exposição, tanto o tratamento com 62,5mM como o tratamento com 125mM aumentaram significativamente os percentuais totais de alterações cromossômicas, principalmente devido à perdas cromossômicas, pontes cromossômicas e cromossomos aderentes (tabela 5).

Algumas das principais alterações encontradas estão ilustradas na figura 10.

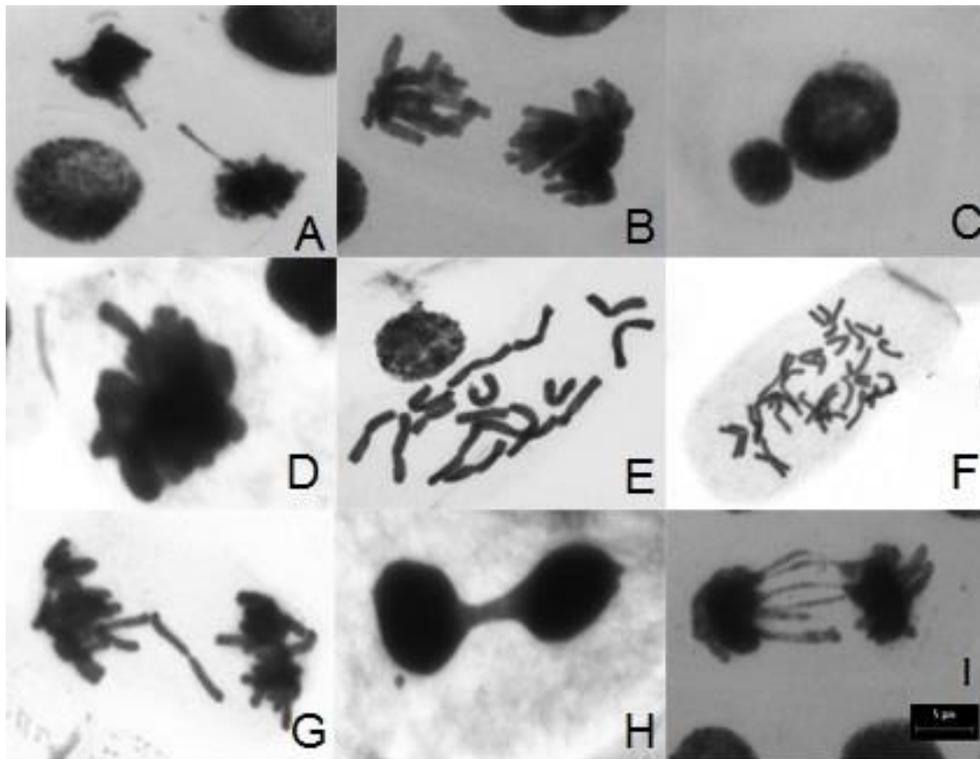


Figura 10: Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* submetidas a concentrações de NaCl. A – segregação tardia em telófase; B – segregação desigual; C – broto; D – aderente; E – c-metáfase; F – célula poliploide; G – perda de cromossomo em telófase; H – ponte nucleoplasmática; I – ponte em telófase. Barra 5 µm.

5.2.2 Análise por citometria de fluxo

Na tabela 6 são apresentados os percentuais de células nas diferentes fases do ciclo celular e de subpartículas-G1 após exposição ao NaCl nas diferentes concentrações e tempos de exposição. Onde: G1 é a fase da intérfase na qual os núcleos possuem conteúdo 2C de DNA; S é a fase de síntese do DNA; G2 é a fase que os núcleos possuem conteúdo 4C e Sub-G1 são partículas com quantidade de DNA inferior a 2C.

Tabela 6: Percentuais de células nas diferentes fases do ciclo celular e de subpartículas-G1 após exposição ao NaCl em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Concentração	Tempo de exposição	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	S + G2 (%)	Sub-G1 (%)
Controle (0mM)		42,00	19,12	26,34	45,46	12,54
31,25 mM	2h	43,72	17,18	23,56	40,74	15,54
62,5 mM		44,79	15,67*	20,78*	36,45*	18,76*
125 mM		46,47	15,11*	20,53*	35,64*	17,89*
250 mM		40,01	12,34*	15,67*	28,01*	31,98*
500 mM		39,29	10,34*	4,75*	15,09*	45,67*
Controle (0mM)		4h	42,50	18,78	27,45	46,32
31,25 mM	42,78		17,65	24,67	42,32	14,90
62,5 mM	40,23		22,45*	24,67	47,12	12,65
125 mM	48,75*		13,24*	18,78*	32,02*	19,23*
250 mM	42,34		10,34*	12,67*	23,01*	34,65*
500 mM	24,57*		7,54*	2,11*	9,65*	65,78*
Controle (0mM)	8h	44,35	18,99	26,56	44,45	10,10
31,25 mM		44,23	18,00	25,68	43,68	12,09
62,5 mM		38,78*	23,45*	28,78*	52,23*	8,99
125 mM		49,14	11,76*	14,56*	26,32*	24,54*
250 mM		34,67*	8,74*	7,89*	16,63*	48,70*
500 mM		22,56*	4,32*	0,78*	5,10*	72,34*
Controle (0mM)	12h	43,78	19,89	25,56	45,45	10,77
31,25 mM		45,78	18,78	26,01	44,79	9,43
62,5 mM		39,89*	24,56*	27,89	52,45*	7,66
125 mM		50,30*	8,93*	10,32*	19,25*	30,45*
250 mM		32,10*	5,43*	5,78*	11,21*	56,69*
500 mM		10,54*	1,23*	0,34*	1,57*	87,89*
Controle (0mM)	24h	42,78	19,64	26,67	46,31	10,91
31,25 mM		40,72	17,98	22,34*	40,32*	18,96*
62,5 mM		37,64*	25,21*	28,90	54,11*	8,25
125 mM		50,92*	4,56*	9,09*	13,65*	35,43*
250 mM		20,78*	2,45*	4,67*	7,12*	72,10*
500 mM		0,37*	2,76*	0,11*	2,87*	96,76*

G1 é a fase da intérfase na qual os núcleos possuem conteúdo 2C de DNA; S é a fase de síntese do DNA; G2 é a fase que os núcleos possuem conteúdo 4C e Sub-G1 são partículas com quantidade de DNA inferior a 2C. * Médias estatisticamente diferentes em relação ao controle (Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se observar que a partir de 2 horas de exposição a concentrações iguais ou superiores a 62,5mM há uma redução significativa nos percentuais de células entrando em divisão (indicado pelos núcleos em S e G2 ou pelo somatório S+G2). Paralelamente, o percentual de sub-G1 aumenta significativamente a partir de 62,5mM (incluindo este) (tabela 6). De modo geral, este efeito é observado à medida que se aumenta a concentração de NaCl utilizada ou o tempo de exposição (redução de células entrando em divisão e aumento de sub-G1) (tabela 6). Após 24 de exposição, por exemplo, a maior concentração analisada (500mM de NaCl) apresentou um somatório de S e G2 (indicativo de células entrando divisão) 16,13

vezes menor do que o controle. No maior tempo de exposição (24 horas), mesmo a menor concentração testada (31,25mM) apresentou efeito significativo em diminuir o percentual de células em S e S+G2 e aumentar o percentual de subpartículas G1.

Contrariando esta expectativa, o tratamento com 62,5mM de NaCl após 4 horas de exposição induziu um aumento significativo no percentual de núcleos na fase S. Após 8 horas de exposição, o mesmo tratamento induziu aumentos significativos nos percentuais de núcleos na fase S, G2 e no somatório S+G2, sendo o mesmo comportamento percebido após 12 e 24 horas de exposição, exceto para os núcleos na fase G2.

Na figura 11 são mostrados histogramas representativos destas análises. O tratamento controle apresentou em média um baixo percentual de sub-G1 e alto percentual de células entrando em divisão (S + G2) (figura 11a). Após exposição à concentração de 62,5mM por 8 horas percebe-se um aumento nas frequências de núcleos na fase S e G2 (figura 11b). Já após exposição às maiores concentrações (250mM por 4 horas; figura 11c) (500mM por 24 horas; figura 11d) percebe-se um aumento das subpartículas-G1 e diminuição dos núcleos entrando divisão (S e G2).

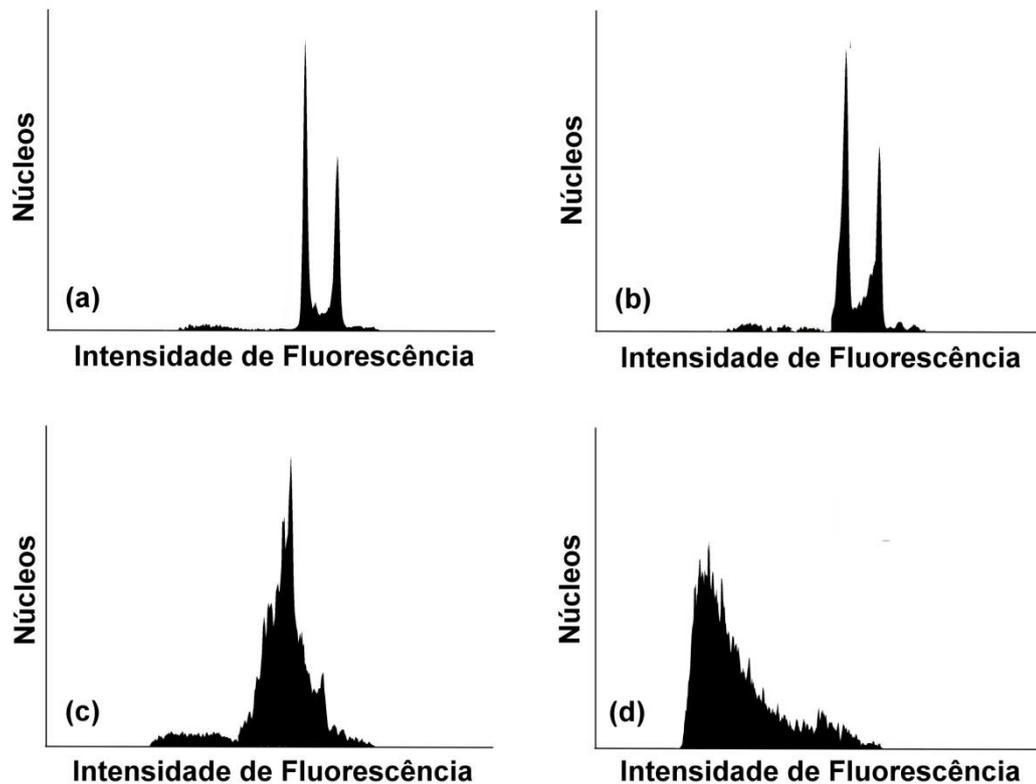


Figura 11: Histograma de frequência dos núcleos nas diferentes fases do ciclo celular. (a) Controle; (b); 62,5mM 8h; (c) 250 mM 4h; (d) 500mM 24h

Na tabela 7, são apresentados os dados de intensidade de fluorescência, FSC, SSC e coeficiente de variação dos núcleos em G1. FSC são os dados de tamanho relativo dos núcleos em G1 identificados pelo detector de fluorescência frontal. SSC são os dados de complexidade dos núcleos em G1 identificados pelos detectores de fluorescência laterais.

Com relação à intensidade de fluorescência dos núcleos em G1 percebe-se uma redução da mesma com o aumento do tempo de exposição ou concentração de NaCl investigada (tabela 7). Este efeito é primeiramente percebido pelo tratamento com 500mM após 4 horas de exposição. Neste tratamento, os núcleos em G1 apresentaram uma redução na sua intensidade de fluorescência de 6,79% em comparação com o controle. Após 24 horas de exposição, o mesmo efeito é percebido para todas as concentrações testadas, exceto a concentração de 31,25mM, sendo a redução média de intensidade de fluorescência para estes tratamentos de 12,29% (tabela 7).

Tabela 7: Intensidade de fluorescência, FSC, SSC e coeficiente de variação dos núcleos em G1 de células meristemáticas de *A. cepa* após exposição ao cloreto de sódio em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Concentração	Tempo de exposição	IF ^a G1	FSC	SSC	CV
Controle (0mM)		100,00	100,00	100,00	2,11
31,25 mM	2h	101,23	99,87	99,89	2,89
62,5 mM		98,78	99,23	99,76	2,90
125 mM		99,75	98,76	96,78	3,11*
250 mM		100,23	98,76	96,45	3,45*
500 mM		97,38	100,45	92,34	3,67*
Controle (0mM)		100,00	100,00	100,00	2,22
31,25 mM	4h	98,78	100,01	99,87	2,78
62,5 mM		99,43	99,87	102,34	3,12*
125 mM		99,29	99,42	101,23	4,56*
250 mM		100,12	87,65*	108,98*	5,67*
500 mM		93,21*	82,34*	111,34*	5,89*
Controle (0mM)		100,00	100,00	100,00	2,21
31,25 mM	8h	101,45	98,43	99,89	2,98
62,5 mM		100,23	97,54	98,76	3,45*
125 mM		99,83	98,99	104,56	4,78*
250 mM		82,34*	79,40*	113,45*	6,23*
500 mM		89,85*	70,54*	124,89*	6,78*
Controle (0mM)		100,00	100,00	100,00	2,56
31,25 mM	12h	99,83	99,64	102,34	2,23
62,5 mM		96,52	92,34	102,38	3,56*
125 mM		94,32*	85,67*	97,56	4,78*
250 mM		90,74*	74,34*	124,56*	5,11*
500 mM		85,43*	70,01*	135,67*	6,78*
Controle (0mM)		100,00	100,00	100,00	2,34
31,25 mM	24h	94,56	96,56	98,78	2,90
62,5 mM		92,34*	84,58*	107,89*	4,11*
125 mM		90,76*	69,80*	121,34*	5,67*
250 mM		85,78*	64,56*	128,90*	6,12*
500 mM		81,98*	59,87*	139,89*	5,98*

IF^a G1 são os dados de intensidade de fluorescência dos núcleos em G1. FSC são os dados de tamanho relativo dos núcleos em G1, identificados pelo detector de fluorescência frontal. SSC são os dados de complexidade dos núcleos em G1, identificados pelos detectores de fluorescência laterais. CV é o coeficiente de variação do pico G1. * Médias estatisticamente diferentes em relação ao controle (Tukey, $p < 0,05$).

Efeito similar ao observado para intensidade de fluorescência, redução dos valores com o aumento do tempo de exposição e concentração de NaCl, foi observado para o FSC (diâmetro nuclear). A redução deste parâmetro foi primariamente detectada após exposição a 250mM de NaCl por 4 horas (núcleos 1,21 vezes menores do que o controle) chegando a um valor máximo de redução após exposição ao tratamento de 500mM de NaCl por 24 horas (núcleos 1,67 vezes menores do que o controle) (tabela 7).

Já o SSC dos núcleos demonstrou um efeito antagônico, aumentando com a

intensificação do tempo de exposição e concentração de NaCl utilizada, chegando a valores 1,39 vezes maiores do que o controle após exposição à 500mM de NaCl por 24 horas.

Com relação ao coeficiente de variação (CV), este aumenta com a intensificação do tempo de exposição e concentração de NaCl utilizada. Comparando, por exemplo, o maior tempo de exposição (24 horas) com a maior concentração utilizada (500mM) com o tratamento controle ocorreu um aumento de aproximadamente 155% no CV.

Histogramas representativos destas análises são mostrados na figura 12. Após exposição às concentrações de NaCl percebe-se uma diminuição nas intensidades de fluorescência dos núcleos G1. Isso pode ser percebido por um deslocamento da posição do pico G1 nestes tratamentos em comparação com os tratamentos controle (figura 12 a, c, e). Percebe-se também uma redução do FSC (diâmetro nuclear) após exposição ao NaCl e aumento do SSC (figuras 12 b, d, f).

5.2.3 Ensaio Cometa

Os valores do índice de danos encontrado foram: 0 para o controle; 2 para 31,25mM de NaCl; 7 para 62,5mM de NaCl; 16 para 125mM de NaCl; 85 para 250mM de NaCl e 72 para 500mM de NaCl. Os valores são apresentados em unidade arbitrária.

A figura 13 (b e c) ilustra um cometa classe 4, obtido com o tratamento de 250mM de NaCl por 24 horas. As células do controle permaneceram intactas enquanto que este tratamento formou uma imagem semelhante a um cometa, que é devido à fragmentação do DNA. Os fragmentos menores de DNA migram na lâmina coberta com agarose em uma velocidade maior que os fragmentos grandes, formando um rastro.

Os cometas obtidos com 500mM de NaCl, por 24 horas de exposição, apresentaram difusão radial ao invés de uma cauda (e por isso o dano foi classificado com classe 3).

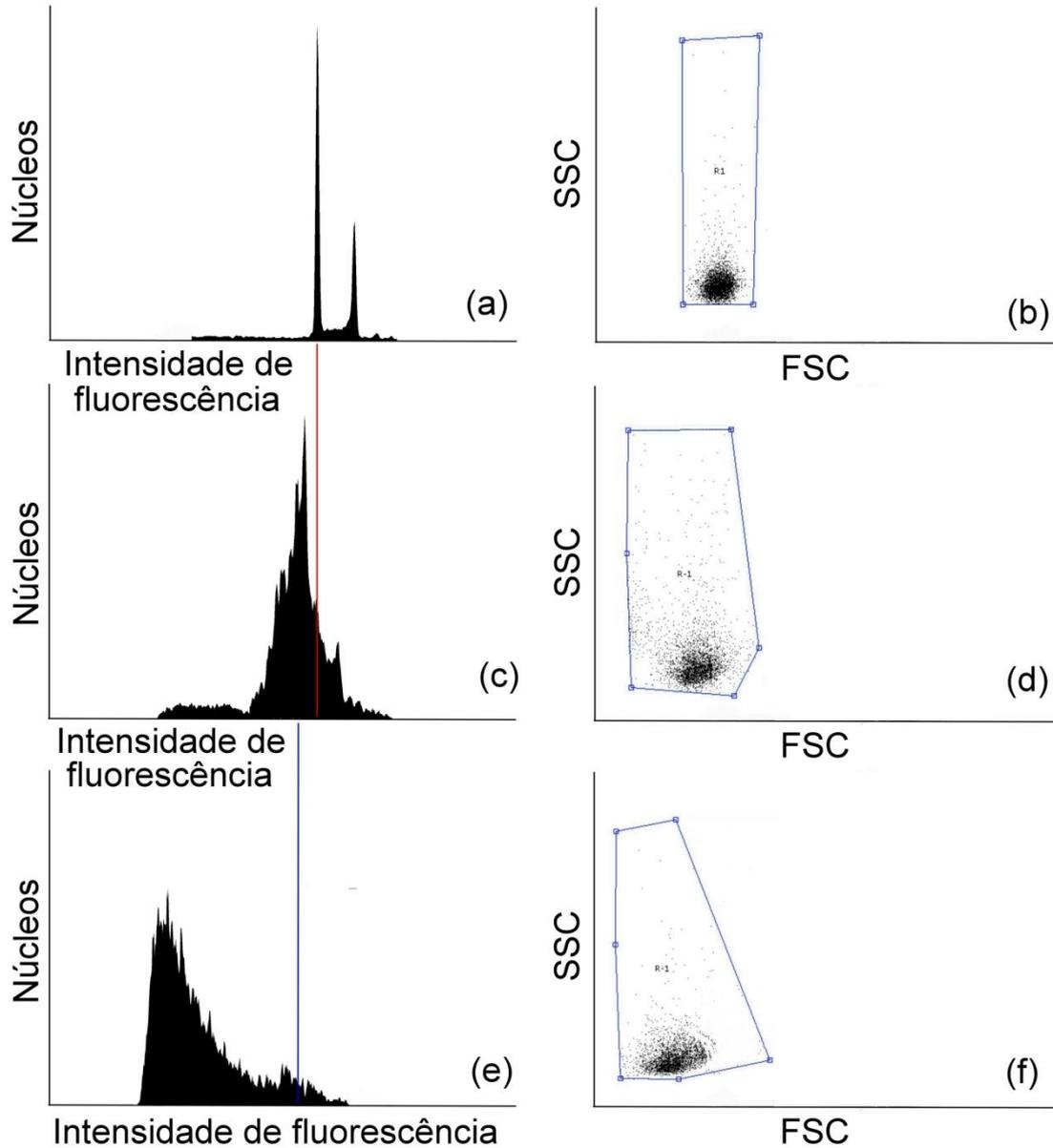


Figura 12: Análise de intensidade de fluorescência, FSC (diâmetro nuclear) e SSC (complexidade nuclear) após os tratamentos com NaCl. Em (a), (c) e (e) são mostrados, respectivamente, as intensidades de fluorescência dos núcleos controle, 250mM por 4 horas e 500mM por 24 horas. A linha em vermelho marca a posição do pico G1 do controle. A linha em azul marca a posição do pico G1 do tratamento de 250mM por 4 horas. Em (b), (d) e (f) são mostrados, respectivamente, o FSC e SSC dos núcleos controle, 250mM por 4 horas e 500mM por 24 horas.

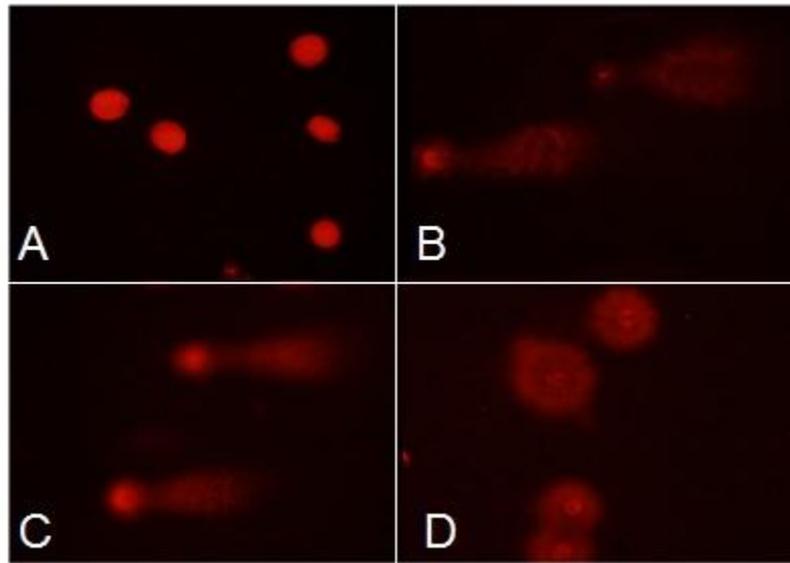


Figura 13: Ensaio cometa realizado em células de *Allium cepa* tratadas com soluções de cloreto de sódio (NaCl). A: Controle (água destilada) por 24 horas, núcleos normais. B e C: células tratadas com 250mM de NaCl (24 horas), núcleos assemelham-se à figura de um cometa comprovando fragmentação do DNA. D; células tratadas com 500mM de NaCl (24 horas) mostrando degradação.

6 DISCUSSÃO

A caracterização das células meristemáticas de *A. cepa*, por análise citogenética e citometria de fluxo, permitiu estimar o diâmetro dos núcleos em diferentes fases do ciclo celular, em uma situação controle, e esses dados foram utilizados posteriormente na identificação de condensação nuclear. É importante salientar que, com a utilização de beads, a citometria de fluxo demonstra-se uma metodologia útil na determinação de diâmetros nucleares. Esta medida, raramente utilizada em ensaios de citogenotoxicidade, pode ser adotada como uma estratégia útil na identificação de efeitos relacionados ao aumento ou redução de FSC. Além do diâmetro nuclear, a citometria permite ainda amostrar dados de complexidade nuclear da população de células analisadas, além de informações de intensidade de fluorescência relacionadas à quantidade de DNA presente nestes núcleos. Como vantagem, a citometria permite ainda a análise rápida de um grande número amostral (LEME et al., 2012). No presente trabalho, por exemplo, foram analisados 10 mil núcleos em aproximadamente 2 minutos, sendo esta análise limitada quando se utiliza ferramentas da citogenética.

O NaCl foi utilizado neste trabalho como um agente teste na procura de parâmetros de citometria de fluxo que pudessem ser ajustados na análise de citogenotoxicidade. Sua escolha baseou-se na ampla disponibilidade na literatura de efeitos relacionados à inibição da divisão celular, indução de anormalidades cromossômicas e características citomorfológicas associadas à morte celular (HOSSAIN et al., 2004; KATSUHARA e KAWASAKI, 1996; KATSUHARA, 1997; RADIĆ et al., 2005; REZAEI et al., 2013; TABUR e DEMIR, 2009). Estes parâmetros foram investigados pela análise citogenética no ensaio de *A. cepa* e correlacionados aos dados obtidos por citometria de fluxo para o ajuste da técnica neste tipo de análise.

Neste trabalho, a análise citogenética das células expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição ao NaCl revelou uma diminuição do índice mitótico (em uma resposta dose-tempo-dependente). A redução do índice mitótico e a indução de aberrações cromossômicas em células meristemáticas já foram

relatadas em outras plantas submetidas a concentrações crescentes de NaCl. Hossain et al. (2004) expuseram raízes de *Chrysanthemum morifolium* R. a 0, 50, 75 e 100 mM de NaCl por 1 e 2 semanas e relataram inibição do índice mitótico dependente da dose e do tempo. Também relataram que as principais alterações encontradas foram: pontes, viscosidade, quebras, separação precoce, cromossomos perdidos e tardios, anáfase anormal e micronúcleos. Radić et al. (2005) investigaram o efeito citogenotóxico do cloreto de sódio em plântulas de *Centaurea ragusina* L. expostas a 150, 300, 450 e 600 mM de NaCl por 10 dias. Foi observado aumento do índice mitótico com a concentração de 150mM e inibição do IM em concentrações maiores. Com 450 e 600mM foram observados efeitos danosos à membrana plasmática e ao núcleo. Dentre as alterações cromossômicas encontradas por estes autores, destacam-se quebras cromossômicas, distúrbios de cromatina (pontes em anáfase e viscosidade) e falhas de fuso (anáfases anormais, multipolaridade, cromossomas tardios, aneuploidia e poliploidia).

De acordo com Anuradha e Rao (2001) a inibição da divisão celular por estresse salino pode estar relacionada com efeitos osmóticos, inibição de DNA, RNA e síntese de proteína. O acúmulo de íons Na e Cl, em tecidos vegetais, acarreta em toxicidade iônica devido a mudanças nas relações Na/K, Na/Ca e Cl/NO, provocando desde reduções no desenvolvimento até morte das plantas.

O efeito de inibição do índice mitótico, confirmado no presente trabalho pela análise citogenética, pôde ser detectado pela citometria de fluxo, mais uma vez demonstrando a utilidade da técnica em detectar parâmetros celulares de citogenotoxicidade. Embora a citometria de fluxo não permita avaliar as células em divisão, quando se trabalha com uma população de núcleos, os percentuais de células na fase S e G2/Prófase podem ser utilizados como um parâmetro correspondente de divisão celular. Usando, portanto, o somatório (S + G2/Prófase) como um parâmetro de células em divisão, notam-se efeitos significativos para quase todos os tratamentos investigados, exceto o tratamento de 31,25mM que apresenta efeito somente após 24 horas de exposição. Nota-se, por conseguinte, que este parâmetro avaliado pela citometria de fluxo pode representar uma medida mais sensível ao efeito de agentes testados do que a medida de índice mitótico calculada pela análise citogenética.

Com relação às alterações cromossômicas observadas neste trabalho, as

mais frequentes foram: brotos, pontes nucleoplasmáticas, pontes cromossômicas, cromossomos aderentes e segregação tardia, corroborando com os dados apresentados na literatura como efeito do NaCl.

A formação de brotos e, posteriormente micronúcleos, é consequência de cromossomos perdidos e fragmentos (BRIAND e KAPOOR, 1989). Tais alterações poderiam ser responsáveis pela detecção de células com variação na quantidade de DNA, manifestado na citometria de fluxo pelo aumento do CV dos picos G1. Do mesmo modo, como explicado para brotos e micronúcleos, a ocorrência de quebras e pontes conduziria à perda de DNA e aumento de CVs, fatos evidenciados nos resultados deste trabalho.

A formação de pontes nucleoplasmáticas e cromossômicas acontece geralmente através da ocorrência de rearranjos cromossômicos com a formação de cromossomos dicêntricos, ou através da ocorrência de quebras terminais nos cromossomos conduzindo à fusão de cromátides (SINGH, 2003). Neste caso, as pontes são classificadas como alterações clastogênicas, que são aquelas relacionadas à ocorrência de quebras no DNA (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Entretanto, de acordo com Marcano et al. (2004) a aderência da cromatina também pode determinar pontes cromossômicas, uma vez que os cromossomos tendem a permanecer unidos. Giacomelli (1999) salienta que as pontes formadas por aderência podem ser múltiplas e ainda persistir até a fase de telófase. Nos nossos resultados, pontes em telófase foram relatadas. Sendo assim, as pontes cromossômicas também poderiam ocorrer em manifestação a um efeito tóxico sobre a cromatina. Deste modo, a distinção entre a ocorrência de pontes por um efeito clastogênico ou tóxico não é fácil. A ocorrência de um alto percentual de cromossomos aderentes neste trabalho, e o relato de viscosidade como efeito em outras plantas submetidas ao NaCl, representa uma evidência a favor do efeito tóxico.

A presença de cromossomos aderentes foi a alteração com maior frequência relatada neste estudo. Segundo Fiskesjö e Levan (1993) a viscosidade reflete efeito altamente tóxico na cromatina, sendo considerada uma alteração irreversível que pode levar à morte celular. Rayburn e Wetzel (2002) utilizaram a citometria de fluxo para avaliar células de milho com alta frequência de cromossomos aderentes. Segundo estes autores, esta alteração surge de um empacotamento errado do DNA

durante a formação dos cromossomos, no qual os cromossomos podem se aderir uns aos outros através de pontes cromatídicas. Durante a progressão do ciclo celular para anáfase, a detecção de pontes anafásicas pode ocorrer e algumas vezes esta ponte persiste até telófase e o final da divisão celular, assim constituindo as pontes nucleoplasmáticas (FENECH et al., 2011). Quando estas pontes se rompem, muitas alterações cromossômicas podem acontecer: a distribuição desigual de material genético pode resultar em duplicações ou deleções ou mesmo na perda de fragmentos cromossômicos. A citometria de fluxo, segundo estes autores pode ser uma ferramenta útil na detecção destes efeitos (RAYBURN e WETZEL, 2002). Os nossos resultados corroboram o fato de que tais alterações contribuem para o aumento do CV do pico G1 em um histograma por citometria.

Ao contrário do efeito tóxico geralmente relatado, o tratamento com 62,5mM de NaCl evidenciou inúmeras alterações relacionadas a falhas no fuso mitótico, como c-metáfases e poliploidia. Interessante notar que esta mesma concentração, por 4, 8 e 12 horas, induziu aumentos significativos nos percentuais de células em S, G2 e S+G2 pela análise por citometria de fluxo. Ao observar o tratamento com 62,5mM de NaCl por 8 horas, pela análise citogenética, verificamos que o índice mitótico foi similar ao controle enquanto que a menor concentração (31,25mM) pelo mesmo tempo de exposição apresentou resultado significativo de inibição da divisão celular. Experimentos adicionais com esta concentração foram realizados na tentativa de explorar este efeito característico e os resultados são descritos no item 7 (Uma utilização prática do NaCl – experimentos extras).

Katsuhara e Kawasaki (1996) e Katsuhara (1997) relataram que determinadas concentrações de NaCl (acima de 300mM) induziram inibição do índice mitótico, bem como deformação nuclear e fragmentação do DNA em células de cevada. Rezaei et al. (2013) também relataram que 500mM de NaCl induziu mudanças na morfologia nuclear e clivagem internucleosomal no DNA de células de trigo. Em ambos os trabalhos, as características morfológicas observadas foram associadas à indução de morte celular.

Os nossos resultados também sugerem que células de *A. cepa* expostas às maiores concentrações de NaCl testadas apresentaram características morfológicas semelhantes de morte celular. As características observadas foram: condensação nuclear, membrana nuclear irregular (núcleos disformes), alto índice de

fragmentação nuclear e, em casos extremos, não foram observados núcleos individualizados.

A condensação da cromatina/núcleo e a fragmentação do DNA são frequentemente citadas como características apoptóticas. No entanto, não são específicas para apoptose, uma vez que também podem ser observadas durante a necrose e a morte celular autofágica (FINK e COOKSON, 2005). Muitas vezes, erroneamente, estes dois marcadores são utilizados como diagnósticos para a ocorrência de apoptose ou morte celular programada semelhante a apoptose em plantas (DOORN et al., 2011).

Se uma célula morre por necrose ou apoptose depende em parte da natureza do sinal, o tipo de tecido, o estágio de desenvolvimento do tecido e do meio fisiológico (ZEISS, 2003). Parece que em doses baixas, agentes tóxicos preferencialmente induzem vias de morte celular programada e apenas doses muito elevadas levam a necrose (LENNON et al., 1991, GOMEZ-LECHÓN et al., 2002). Por vezes, estes processos podem ocorrer simultaneamente (ZEISS, 2003).

Considerando as características citomorfológicas, nem sempre é possível distinguir a apoptose de necrose. Cotran et al. (1999) compararam algumas das principais características citomorfológicas de apoptose e necrose e consideraram a picnose e a cariorréxis como características comuns a ambos os processos, enquanto que cariólise é restrita a necrose. Entende-se por picnose a condensação da cromatina, estágio no qual o núcleo apresenta volume reduzido e aspecto hipercondensado. Na cariorréxis ocorre perda dos limites nucleares e fragmentação do núcleo picnótico. Já na cariólise, ocorre a dissolução da cromatina e a perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente.

A condensação nuclear e da cromatina percebida pela análise citogenética também foi observada pela análise de FSC por citometria de fluxo neste trabalho. Todos os tratamentos que demonstraram redução significativa dos diâmetros nucleares pela análise citogenética, demonstraram o mesmo efeito pela análise por citometria de fluxo e, de modo geral, os percentuais de redução observados em ambas as ferramentas são semelhantes.

Alguns autores, afirmam ainda que a condensação do DNA dificulta o acesso dos fluorocromos ao núcleo na metodologia de citometria de fluxo (O'BRIEN et al., 1998; ANDRADE-VEIRA et al., 2012). Este efeito poderia ser detectado por uma

diminuição nas intensidades de fluorescência dos núcleos G1, caracterizado pelo deslocamento deste pico para a esquerda (O`BRIEN et al., 1998; ANDRADE-VEIRA et al., 2012). Este efeito foi observado neste trabalho na análise por citometria de fluxo. Na maioria dos casos, a redução de FSC está relacionada com a diminuição nas intensidades de fluorescência, exceto para os menores tempos de exposição.

Em uma etapa posterior à condensação da cromatina/núcleo, no processo de morte celular, o DNA é fragmentado. A fragmentação do DNA, demonstrada pela análise citogenética e pelo ensaio cometa, também foi observada pela citometria de fluxo com o aumento do coeficiente de variação do pico G1 e a frequência elevada de partículas antes de G1 (sub-G1). Nos tratamentos mais elevados não foi possível identificar núcleos individualizados pela análise citogenética (figura 4 – f), os picos G1, S e G2 não foram observados nitidamente e a frequência de sub-G1 encontrada foi elevada. Este pode ser um indicativo da identificação de cariólise por citometria de fluxo. Os cometas obtidos com a maior concentração pelo maior tempo de exposição apresentaram difusão radial ao invés de uma cauda. Segundo Faisal et al. (2013) a difusão radial pode aparecer em células onde ocorreu degradação nuclear necrótica.

Segundo Elmore (2007), durante a condensação da cromatina, o material nuclear pode se agregar periféricamente sob a membrana nuclear ou também pode haver núcleos uniformemente densos. Os dados de SSC, deste trabalho, revelam que quanto maior o nível de condensação (valores de FSC baixos) maiores os níveis de complexidade interna dos núcleos, indicando que a cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo se acumular em grânulos na membrana nuclear.

Como já citado, a análise citogenética também evidencia a presença de núcleos irregulares (núcleos disformes) e alto índice de fragmentação nuclear. Na citometria de fluxo estas alterações poderiam ser entendidas como um aumento da complexidade dos núcleos (aumento de SSC). Este efeito foi observado no presente trabalho.

Diante dos resultados, discutimos que tanto a apoptose como a necrose podem ocorrer em resposta ao estresse salino, variando de acordo com a concentração/tempo de exposição testados.

7 UMA UTILIZAÇÃO PRÁTICA DO NaCl - EXPERIMENTOS EXTRAS

7.1 Introdução

Em todas as análises anteriores, a concentração de 62,5mM de NaCl se destacou por apresentar um resultado característico: elevado percentual de c-metáfases com condensação dos cromossomos (figura 14). Também foram observadas metáfases poliploidizadas. Ao repetir os tratamentos de 62,5mM de NaCl por 4 e 8 horas, com novos bulbos, a porcentagem de c-metáfases encontrada foi de aproximadamente 27% (tabela 8), um valor considerável se comparado a outros antimitóticos comumente utilizados. Estes resultados abrem caminho para o estudo e a utilização de NaCl na obtenção de c-metáfases em plantas.

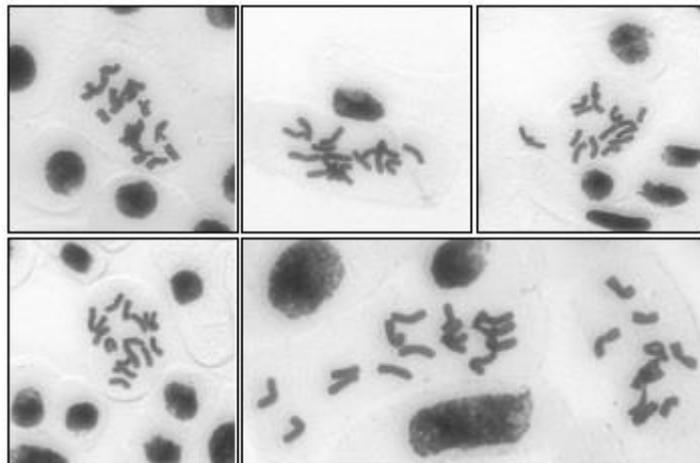


Figura 14: C-metáfases induzidas em células de cebola com o tratamento de 62,5mM de NaCl por 8 horas de exposição.

Tabela 8: Porcentagem de c-metáfases em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com 62,5mM de NaCl por 4 e 8 horas.

Tratamentos	4 horas	8 horas
Controle	0,83	0,27
NaCl 62,5mM	26,73*	27,03*

(*) valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

O que se pode encontrar na literatura a este respeito é que a endopoliploidia já foi observada em tecidos de plantas que tinham sido expostas a salinidade. Entende-se endopoliploidia como sínteses sucessivas de DNA não seguidas por mitose, o que gera núcleos com conteúdo de DNA maior que 4C.

CATARINO (1965; 1968) verificou que a água do mar induziu endopoliploidia em *Lobularia maritima* e *Bryophyllum crenatum*. CECCARELLI et al (2006) descreveram a endoreduplicação dos cromossomos em células de *Sorghum bicolor* cv. 610 que haviam sido tratadas com nível sub letal de salinidade (150mM de NaCl) durante seu desenvolvimento precoce. Todavia, outra variedade da mesma espécie (*S. bicolor*, DK 34-Alabama) não sobreviveu à exposição com a mesma concentração de NaCl.

ANDREA et al (2008) avaliaram o conteúdo de DNA nuclear de células de raízes de *Allium cepa* e calos de *Nicotiana bigelovii* expostas ao cloreto de sódio e adicionaram evidências de que a endoreduplicação dos cromossomos ocorre em plantas como uma resposta adaptativa à salinidade.

No nosso trabalho, foi possível observar que a concentração 62,5mM de NaCl por 12 horas de exposição induziu um percentual considerável de metáfases poliploidizadas e que esta mesma concentração por 8 horas de exposição induziu um elevado percentual de c-metáfases. Desta forma, pode-se inferir que o cloreto de sódio induz a endopoliploidização por afetar o funcionamento do fuso mitótico e bloquear o ciclo celular em metáfase. O progresso do ciclo celular é impedido, porque não há o funcionamento normal do fuso, não ocorre separação das cromátides irmãs e a célula retorna para G1 com o dobro de cromossomos.

Se, conforme relatado, a endopoliploidização é uma resposta adaptativa comum de plantas à salinidade e, no nosso trabalho, na concentração que induziu poliploidia, por um tempo menor de exposição, foi possível encontrar metáfases bloqueadas. Seria possível utilizar o NaCl como antimitótico nos estudos de citogenética em plantas? Seria ele um agente com potencial similar à colchicina e 8-hidroxiquinoleína (HQ), porém menos tóxico aos seres humanos?

Para responder a estas perguntas, sementes de alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) foram expostas à concentração 62,5mM de NaCl por diferentes tempos de exposição e o percentual de c-metáfases foi calculado em comparação ao controle negativo (água destilada) e positivo (tratamento com 8-

hidroxiquinoleína já citado na literatura para cada espécie).

7.2 Material e métodos

7.2.1 *Lactuca sativa*

Sementes de alface, da marca *Feltrin*, foram germinadas em placa de Petri contendo água destilada, por 24 horas. Algumas raízes foram coletadas da placa de Petri e imediatamente fixadas e analisadas como controle negativo. As outras sementes foram imersas em solução de 62,5mM de NaCl por 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas e também em solução de 3mM de 8-hidroxiquinoleína (HQ), na geladeira, por 3 horas. Após os tempos de exposição, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e mantidas no freezer por um período mínimo de 24 horas. Para confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico 1N por 15 minutos à temperatura de 60°C. As raízes foram lavadas em água destilada e a região meristemática foi separada do restante da raiz e colocada sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45% sendo posteriormente esmagada entre lâmina e lamínula. A lamínula foi retirada com auxílio de nitrogênio líquido e as células coradas com Giemsa 10% (por 4 minutos), procedendo-se então à análise das lâminas ao microscópio de luz. Foram analisadas cinco lâminas por tratamento, cada lâmina constituída por um meristema. Foi avaliado o percentual de c-metáfases em relação ao total de metáfases encontrado nas lâminas.

7.2.2 *Solanum lycopersicum*

Sementes de tomate, da marca *Topseed Garden*, foram germinadas em placa de Petri contendo água destilada, por cinco dias. Algumas raízes foram coletadas da placa de Petri e imediatamente fixadas e analisadas como controle negativo. As outras sementes foram imersas em solução de 62,5mM de NaCl por 4, 5, 6, 7 e 8 horas e também em solução de 3mM de 8-hidroxiquinoleína (HQ), na geladeira, por 4 horas. Após os tempos de exposição, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e mantidas no freezer por um período mínimo de 24 horas. Para confecção das lâminas, as raízes foram digeridas com 4% (v/v) celulase

Onozuka R10 (Serva) e 40% (v/v) pectinase (Sigma) por 30 minutos a 37°C e, em seguida, hidrolisadas em ácido clorídrico 5N por 20 minutos à temperatura ambiente. As raízes foram lavadas em água destilada e a região meristemática foi separada do restante da raiz e colocada sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45% sendo então esmagada entre lâmina e lamínula. A lamínula foi retirada com auxílio de nitrogênio líquido e as células coradas com Giemsa 10% (por 4 minutos), procedendo-se então à análise das lâminas ao microscópio de luz. Foram analisadas cinco lâminas por tratamento, cada lâmina constituída por um meristema. O parâmetro analisado foi o percentual de c-metáfases em relação ao total de metáfases encontrado nas lâminas.

7.3 Resultados

7.3.1 *Lactuca sativa*

O percentual de c-metáfases está apresentado no gráfico a seguir (figura 15).

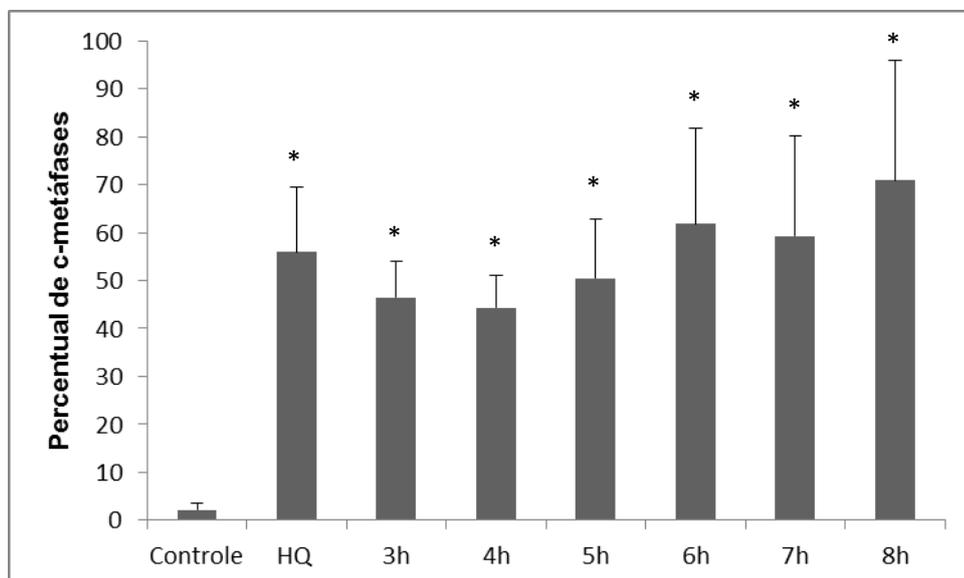


Figura 15: Gráfico indicando o percentual de c-metáfases em células de alface expostas aos tratamentos com 62,5mM de NaCl por 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas de exposição em comparação ao controle negativo (água destilada) e 8-hidroxiquinoleína (HQ) por 3 horas de exposição. (*) tratamentos significativamente diferentes do controle e iguais entre si pelo teste de Tukey (5%).

Foi possível observar que a concentração 62,5mM de NaCl foi capaz de induzir c-metáfases em células meristemáticas de alface. E, em todos os tempos de

exposição testados, o resultado encontrado foi estatisticamente igual ao tratamento com HQ, o que indica que o NaCl pode ser utilizado como antimitótico para esta espécie com a mesma eficiência que a 8-hidroxiquinoleína. As metáfases encontradas variaram quanto à condensação dos cromossomos (figura 16). Em alguns tratamentos foi possível identificar metáfases poliploidizadas.

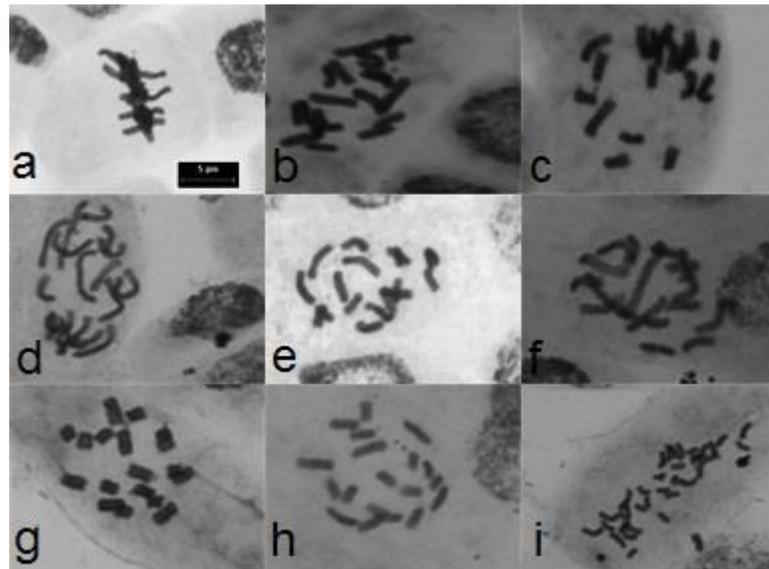


Figura 16: C-metáfases obtidas em células de alface após exposição a 62,5mM de NaCl em diferentes tempos de exposição. (a) controle (água destilada) – metáfase normal; (b) tratamento com HQ – metáfase bloqueada; (c) 62,5mM de NaCl por 3 horas; (d) 62,5mM de NaCl por 4 horas; (e) 62,5mM de NaCl por 5 horas; (f) 62,5mM de NaCl por 6 horas; (g) 62,5mM de NaCl por 7 horas; (h) 62,5mM de NaCl por 8 horas; (i) metáfase poliploidizada - 62,5mM de NaCl por 8 horas. Barra 5µm.

7.3.2 *Solanum lycopersicum*

O percentual de c-metáfases está apresentado na figura 17. Tanto o tratamento com 8-hidroxiquinoleína (HQ) por 4 horas, quanto os tratamentos com 62,5mM de NaCl por 4, 5, 6, 7 e 8 horas de exposição foram capazes de induzir um percentual de c-metáfases maior que 90%. Comprovando que o cloreto de sódio também pode ser utilizado na obtenção de c-metáfases em células de tomate. As metáfases bloqueadas estão ilustradas na figura 18.

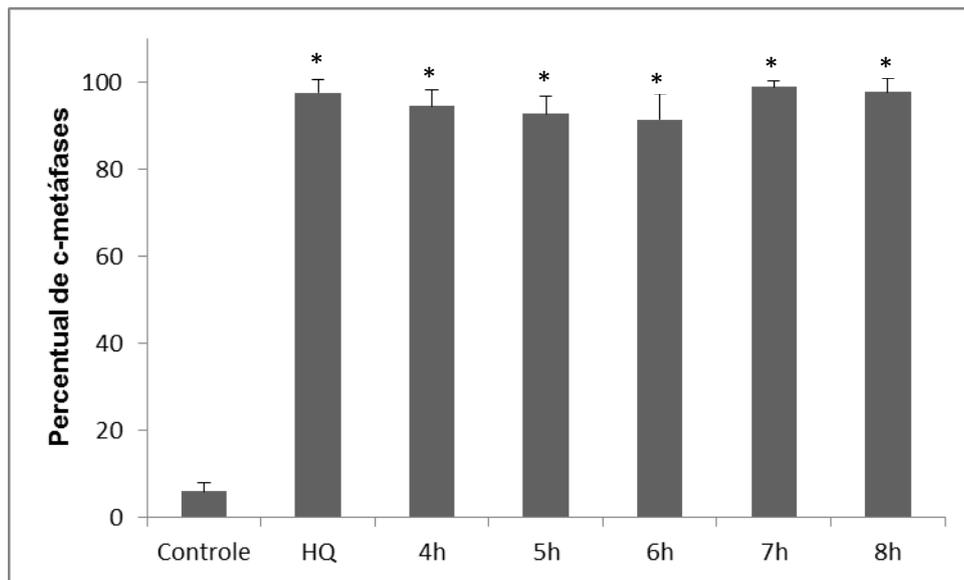


Figura 17: Gráfico indicando o percentual de c-metáfases em células de tomate expostas aos tratamentos com 62,5mM de NaCl por 4, 5, 6, 7 e 8 horas de exposição em comparação ao controle negativo (água destilada) e 8-hidroxiquinoleína (HQ) por 4 horas de exposição. (*) tratamentos significativamente diferentes do controle e iguais entre si pelo teste de Tukey (5%).

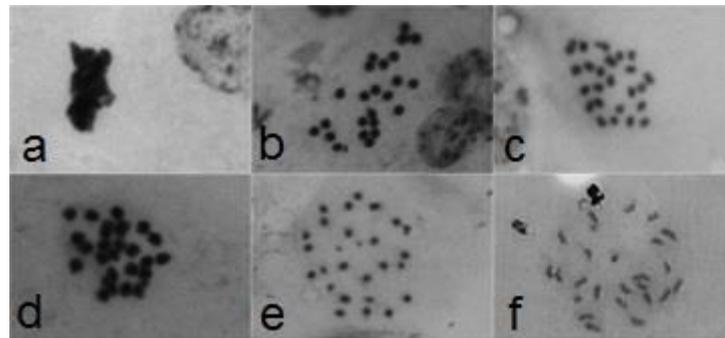


Figura 18: C-metáfases obtidas em células de tomate expostas a 62,5mM de NaCl em diferentes tempos de exposição. (a) controle (água destilada) – metáfase normal; (b) tratamento com HQ – metáfase bloqueada; (c) 62,5mM de NaCl por 4 horas; (d) 62,5mM de NaCl por 5 horas; (e) 62,5mM de NaCl por 6 horas; (f) 62,5mM de NaCl por 8 horas de exposição.

7. 4 Conclusão

Estes resultados corroboram a hipótese de que a endopoliploidia é uma resposta comum em plantas expostas à salinidade e nos fazem inferir que o cloreto de sódio age afetando o funcionamento do fuso mitótico podendo resultar no aparecimento de células poliploides. Diante disso, é possível afirmar que o cloreto de sódio, em concentrações específicas, pode atuar como agente antimitótico e ser utilizado em estudos de citogenética de plantas. O nosso trabalho evidencia que a

concentração 62,5mM de NaCl foi capaz de bloquear metáfases em três espécies de plantas distintas (*Allium cepa*, *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*) e propõe a sua utilização/estudo em outras espécies de plantas.

8 CONCLUSÕES

- Os diâmetros nucleares foram determinados por análise citogenética e citometria de fluxo;
- O cloreto de sódio induziu inibição do índice mitótico e várias alterações cromossômicas, dentre as quais a mais frequente foi aderência cromossômica;
- A inibição da divisão celular parece estar relacionada com a diminuição de células na fase S e G2;
- A alta frequência de cromossomos aderentes pode ter influência no aumento do CV do pico G1;
- Em alguns tratamentos foram observadas características citomorfológicas semelhantes às descritas para morte celular;
- A condensação nuclear foi determinada pela citometria através da diminuição nos dados de FSC e da intensidade de fluorescência dos núcleos em G1;
- A fragmentação do DNA foi detectada pelo aumento da frequência de sub-G1 e também do CV do pico G1;
- Os resultados da análise de complexidade interna (SSC) foram inversamente proporcionais aos dados de FSC;
- O NaCl foi apontado como potencial agente antimitótico em plantas.

Em suma, pode-se concluir que a citometria de fluxo representa uma ferramenta útil na avaliação de citogenotoxicidade no modelo de *A. cepa*. Não propomos que esta técnica substitua a análise citogenética, mas afirmamos que os parâmetros aqui investigados asseguram o seu uso neste ensaio. A citometria pode ser utilizada a priori da análise citogenética para oferecer resultados gerais sobre o efeito do agente testado e quais concentrações/tempos de exposição são interessantes de serem investigadas pela análise citogenética.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDA, A.; BENOURETH, D.E.; TABEL, M.; LIMAN, R.; KONUK, M.; KHALLEF, M.; TAHER, A. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, **187**: 21. 2015.

ABU, N.E.; MBA, K.C.; Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, **3(2)**: 44-51. 2011.

ACHARY, V.M.M.; PARINANDI, N.L.; PANDA, B.B. Calcium channel blockers protect against aluminium-induced DNA damage and block adaptive response to genotoxic stress in plant cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **751(2)**: 130–138. 2013.

ADEYEMO, O.A.; FARINMADE, A.E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**, **12(13)**: 1459–1466. 2013.

AKDENIZ, D.; OZMEN, A. Antimitotic effects of the biopesticide oxymatrine. **Caryologia**, **64(1)**: 117–120. 2011.

AKINBORO, A.; MOHAMED, K.B.; ASMAWI, M.Z.; SOFIMAN, O.A. Mutagenic and antimutagenic potentials of fruit juices of five medicinal plants in *Allium cepa* L.: Possible influence of DPPH free radical scavengers. **African Journal of Biotechnology**, **10(51)**: 10520–10529. 2011.

AKINBORO, A.; MOHAMED, K.B.; ASMAWI, M.Z.; SULAIMAN, S.F.; SOFIMAN, O.A. Antioxidants in aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) suppress mitosis and cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. cells. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, **12(11)**: 915-922. 2011.

AKYIL, D.; OKTAY, S.; LIMAN, R.; EREN, Y.; KONUK, M. Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Achillea teretifolia*. **Turkish Journal of Biology**, **36**: 441–448. 2012.

ALVIM, L.B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L.A.; LIMA, C.A.A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, **6(12)**: 255–265. 2011.

ANANTHAKRISHNAN, M.; KUMARASAMY, K.; ANTONY, A.S. Genotoxic effects of furadan and endosulphan on (*Allium cepa*) root tips. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, **6(1)**: 1-6. 2013.

ANDRADE, L.R.; BRITO, A.S.; MELER, A.M.G.S.; ZANIN, H.; CERAGIOLI, H.J.; BARANAUSKAS, V.; CUNHA, K.S.; IRAZUSTA, S.P. Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot

test and *Allium cepa* test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **99**: 92–97. 2014.

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

ANDRADE-VIEIRA, L.F.; GEDRAITE, L.S.; CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C. 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**, **74**: 882–888. 2011.

ANDREA, B.; CACERES, M.E.; CIONINI, G.; CIONINI, P.G. A DNA cytophotometric study of salt adaptation in *Allium cepa* and *Nicotiana bigelovii*. **Caryologia**, **61(2)**: 176-181. 2008.

ANDRIOLI, N.B.; SOLONESK, S.; LARRAMENDY, M.L.; MUDRY, M.D. Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **742**: 48-53. 2012.

ANDRIOLI, N.B.; SOLONESK, S.; LARRAMENDY, M.L.; MUDRY, M.D. Induction of microtubule damage in *Allium cepa* meristematic cells by pharmaceutical formulations of thiabendazole and griseofulvin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **772**: 1–5. 2014.

ANURADHA, S.; RAO, S.S.R. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation**, **33(2)**: 151–153. 2001.

ASITA, A.O.; HATANE, B.H. Cytotoxicity and genotoxicity of some agropesticides used in Southern Africa. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, **4(10)**: 175-184. 2012.

ASITA, A.O.; MOKHOBLO, M.M. Clastogenic and Cytotoxic Effects of Four Pesticides Used to Control Insect Pests of Stored Products on Root Meristems of *Allium cepa*. **Environment and Natural Resources Research**, **3(2)**: 133–145. 2013.

ATHANÁSIO, C.G.; PRÁ, D.; RIEGER, A. Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **Hindawi Publishing Corporation – The Scientific World Journal**, 1–6. 2014.

AVLASEVICH, S.; BRYCE, S.; BOECK, M.; ELHAJOUJI, A.; GOETHEM, F. V.; LYNCH, A.; NICOLETTE, J.; SHI, J.; DERTINGER, S. REVIEW: Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. **Mutagenesis**, **26(1)**: 147–152. 2011.

BARBOSA, J.S.; CABRAL, T.M.; FERREIRA, D.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **73**: 320–325. 2010.

BERTANZA, G.; PAPA, M.; PEDRAZZANI, R.; REPICE, C.; MAZZOLENI, G.; STEIMBERG, N.; FERETTI, D.; CERETTI, E.; ZERBINI, I. EDCs, estrogenicity and genotoxicity reduction in a mixed (domestic + textile) secondary effluent by means of ozonation: A full-scale experience. **Science of the Total Environment**, **458–460**: 160–168. 2013.

BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P.K. Evaluation of Antimitotic and Genotoxic Effects of the Triterpenoid Enriched Extract from *Trichosanthes dioica* Root. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, **4(1)**: 20-23. 2012.

BHUJBAL, S.S.; DESHMUKH, R.P.; BIDKAR, J.S.; THATTE, V.A.; AWASARE, S.S.; GARG, P.P. Evaluation of cytotoxic activity of barks of *Mimusops elengi*. **EurAsian Journal of BioSciences**, **5**: 73-79. 2011.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E.L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **74(4)**: 826–833. 2011.

BIRADAR, D.P.; PEDENSE, W.L.; RAYBURN, A.L. Nuclear DNA analysis of maize seedlings treated with the triazole fungicide, Triticonazole. **Pesticide Science**, **41**: 291-295. 1994.

BRIAND, C.H.; KAPOOR, B.M. The cytogenetic effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativum* L. **Cytologia**, **54**: 203–209. 1989.

CAMPOS, J.M.S.; CALDERANO, C.A.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F.; SANTOS, M.O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **4 (1)**: 38-44. 2009.

CÂNDIDO, A.C.S.; SILVA, C.B.; SIMIONATTO, E.; BIGATON, D.; SCALON, S.P.Q.; PERES, M.T.L.P. Atividade fitotóxica de *Croton doctoris* S. Moore. **Ciência Rural, Santa Maria**, **43(4)**: 645-652. 2013.

CARDOSO, G.H.S.; DANTAS, E.B.S.; SOUSA, F.R.C.; PERON, A.P. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. **Brazilian Journal Biology**, **74(4)**: 886–889. 2014.

CARVALHO, I.M.C.M.M.; CAVALCANTE, A.A.M.; DANTAS, A.F.; PEREIRA, D.L.A.; ROCHA, F.C.C.; OLIVEIRA, F.M.; SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**, **82**: 1056–1061. 2011.

CATARINO, F.M. Endopoliploidia e diferenciacao. Inducao experimental de endopoliploidia em *Lobularia maritima* e *Bryophyllum crenatum*. **Portugaliae Acta Biologica Ser. A**, **11**: 1-218. 1968.

CATARINO, F.M. Salt water, a growth inhibitor causing endopolyploidy. **Portugaliae Acta Biologica Ser. A**, **9**: 131-152. 1965.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; SAGIR, S. Physiological, Anatomical, Biochemical, and Cytogenetic Effects of Thiamethoxam Treatment on *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L. **Environmental Toxicology**, 635-643. 2011.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; ÇAVUŞOĞLU, K.; ÇİÇEK, F. Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. **Journal of Agricultural Sciences**, **17**: 131-142. 2011.

CECCARELLI, M.; SANTANTONIO, E.; MARMOTTINI, F.; AMZALLAG, G.N.; CIONINI P.G. Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, **227**: 113-118. 2006.

CERETTI, E.; ZANI, C.; ZERBINI, I.; GUZZELLA, L.; SCAGLIA, M.; BERNA, V.; DONATO, F.; MONARCA, S.; FERETTI, D. Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles. **Water Research**, **44(5)**: 1462–1470. 2010.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C.S. Biosolid Soil Application: Toxicity Tests under Laboratory Conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, 1-9. 2012.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, and Soil Pollution**, **224(1523)**: 1-14. 2013.

CHUKWUJEKWU, J.C.; STADEN, J.V. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. **South African Journal of Botany**, **92**: 147–150. 2014.

CİĞERCI, I.H.; LIMAN, R.; OZGUL, E.; KONUK, M. Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests. **Cytotechnology**, **67**: 157–163. 2015.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, **71**: 19-33. 2002.

COSTA, T.C.; BRITO, K.C.T.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K.A.; RODRIGUES, M.L.K.; MINELLA, J.P.G.; MATSUMOTO, S.T.; VARGAS, V.M.F. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **75**: 63–72. 2012.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. Sensibilidade de sementes de

hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**, **25(3)**: 19–27. 2012.

CVIKROVA, M.; BINAROVA, P.; CENKLOVA, V.; EDER, J.; DOLEZEL, J.; MACHAČKOWA, I.. Effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on cell cycle progression in synchronous meristematic cells of *Vicia faba* roots. **Plant Science**, **164**: 823-832. 2003.

DELARMELENA, J.M.; BATITUCCI, C.M.C.P.; GONÇALVES, J.L.O. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, **17(2)**: 149-159. 2012.

DEMISSIE, A.G.; ASHENAFI, A.; AREGA, A.; ETENASH, U.; KEBEDE, A.; TIGIST, A. Effect of *Parthenium hysterophorus* L. on Germination and Elongation of Onion (*Allium cepa*) and Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Research Journal of Chemical and Environmental Sciences**, **1(2)**: 17–21. 2013.

DITIKA, K.; ANILA, M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potency of cr(vi)-doped river water of nen-shkodra lowland, Albania, on *Allium cepa* L. **Journal of Environmental Research And Development**, **7(4)**: 1322–1332. 2013.

DIZDARI, A.M.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, **8**: 19–26. 2013.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, **38 (3)**: 285-302. 1997.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J.; Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, **2**: 2233–2244. 2007.

DOORN, W.G.; BEERS, E.P.; DANGL, J.L.; FRANKLIN-TONG, V.E.; GALLOIS, P.; HARA-NISHIMURA, I.; JONES, A.M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E.; MUNDY, J.; MUR, L.A.J.; PETERSEN, M.; SMERTENKO, A.; TALIANSKY, M.; BREUSEGEM, F.V.; WOLPERT, T.; WOLTERING, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOVA, P.V. Morphological classification of plant cell deaths. **Cell Death and Differentiation**, 1–6. 2011.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V.E.P.; TONIAL, I.B.; SAUER, T.P. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, **186**: 1793–1800. 2014.

DÜSMAN, E.; FERREIRA, M.F.S.; BERTI, A.P.; MARIUCCI, R.G.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Investigation of cytotoxic and mutagenic effects of *Malpighia glabra* L. (barbados cherry) fruit pulp and vitamin C on plant and animal test systems. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **32(2)**: 405–411. 2012.

ELEFTHERIOU, E.P.; ADAMAKIS, I.D.S.; MELISSA, P. Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. **Protoplasma**, **249**: 401–416. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, **35**: 495–516. 2007.

FAISAL, M.; SAQUIB, Q.; ALATAR, A.A.; AL-KHEDHAIRY, A.A.; HEGAZY, A.K.; MUSARRAT, J. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. **Journal of Hazardous Materials**, **250–251**: 318–332. 2013.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (müll. arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, **7(1)**: 91-98. 2012.

FATEMEH, K.; KHOSRO, P. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous root extract of *Arctium lappa* on *Allium cepa* Linn root tip cells. **International journal of Agronomy and Plant Production**, **3(12)**: 630–637. 2012.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLE, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, **26(1)**: 125–132. 2011.

FERETTI, D.; CERETTI, E.; GUSTAVINO, B.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; MONARCA, S.; RIZZONI, M. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity using plant tests. **Journal of Public Health Research**, **1**: 31-37. 2012.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **72**: 1680–1686. 2009.

FERNANDEZ, V.; DIANA, D.F.; FERNÁNDEZ, D.; GÓMEZ, M.C.V.; ABREU, J.S.; CASTIGLIONI, D.; SALES, L.; MARTINEZ, M.; LÓPEZ, D.; BOBADILLA, N.; ALFONSO, J.; LE QUESNE, A.M.; MONGES, D.; VERA, M. Efecto antimitótico y citotóxico del extracto etanólico de *Genipa americana* L. sobre tejido meristemático de *Allium cepa* L. y cultivo celular NCTC-929. **Steviana**, **3**: 48-53. 2011.

FERREIRA, C.F.; FRUEH, A.B.; DÜSMAN, E.; HECK, M.C.; VICENTINI, V.E.P. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, **7(2)**: 46-54. 2012.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, **73**: 1907–1916. 2005.

FIRBAS, P.; AMON, T. *Allium* Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal Bioremediation & Biodegradation**, **4**: 1-5. 2013.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, **102**: 99-112. 1985.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test. **ATLA** **21**: 139–149. 1993.

FRESCURA, V.D.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; TEDESCO, S.B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium Cepa* cell cycle. **Caryologia**, **65**: 27–33. 2012.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, **220 (4601)**: 1049-1051. 1983.

GARAJ-VRHOVAC, V.; OREŠČANIN, V.; GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; RUK, D.; KOLLAR, R.; BRKANAC, S.R.; CVJETKO, P. Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and plant cells. **Chemosphere**. 2013.

GERAS'KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of *Allium*-test. **Chemosphere**. 2011.

GEREMIAS, R.; BORTOLOTTI, T.; WILHELM-FILHO, D.; PEDROSA, R.C.; FÁVERE, V.T. Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **79**: 116–121. 2012.

GHODAKE, G.; SEO, Y.D.; LEE, D.S. Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, **186(1)**: 952–955. 2011.

GHOSH, M.; PAUL, J.; JANA, A.; DE, A.; MUKHERJEE, A. Use of the grass, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash for detoxification and phytoremediation of soils contaminated with fly ash from thermal power plants. **Ecological Engineering**, **74**: 258–265. 2015.

GHOSH, M.; MANIVANNAN, J.; SINHA, S.; CHAKRABORTY, A.; MALLICK, S. K.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. **Mutation Research**, **749**: 60– 69. 2012.

GHOSH, M.; PAUL, J.; SINHA, S.; MUKHERJEE, A. Comparative evaluation of promutagens o-PDA, m-PDA and MH for genotoxic response in root cells of *Allium cepa* L. **Nucleus**, **53(1–2)**: 45–50. 2010.

GHURDE, M.U.; DESHMUKH, V.R.; PULATE, P.V.; MALODE, S.N. Cytotoxic and genotoxic potential assesment of leaf extract of *Jasminum officinale* L. Var. Grandiflorum L. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, **2(3)**: 112-117. 2012.

GIACOMELLI, F.R.B. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul. **Dissertação de Mestrado em Genética – Universidade Estadual de Maringá, PR.** 131p. 1999.

GOLDONI, A.; GOLFETO, C.; TEIXEIRA, J.B.; BLUMM, G.; WILHELM, C.M.; TELOˆKEN, F.; BIANCHI, H.; SCHMITT, J.L.; GEHLEN, G.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, L.B. Cytotoxic and genotoxic evaluation and chemical characterization of sewage treated using activated sludge and a floating emergent macrophyte filter in a municipal wastewater treatment plant: a case study in Southern Brazil. **Environmental Earth Sciences**, **72**: 1503–1509. 2014.

GOMES, K.M.S.; OLIVEIRA, M.V.G.A.; CARVALHO, F.R.S.; MENEZES, C.C.; PERON, A.P. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology**, **33(1)**: 218-223. 2013.

GOMEZ-LECHON, M.J., O'CONNOR, E., CASTELL, J.V., JOVER, R. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. **Toxicology. Science**, **65**: 299-308. 2002.

GONZÁLEZ, P.S.; MAGLIONE, G.A.; GIORDANA, M.; PAISIO, C.E.; TALANO, M.A.; AGOSTINI, E. Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. **Environmental Science and Pollution Research**, **19**: 482–491. 2012.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **113**: 47–54. 2014.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, **99**: 273-291. 1982.

GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; NISHISAKA, C.S.; LIMA, R.; OEHLK, K.; GREINER, R.; FRACETO, L.F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquaterbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, **278**: 163–171. 2014.

GRILLO, R.; SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Poly(-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, **231– 232**: 1– 9. 2012.

GRIPPA, G.A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, **23(1-2)**: 11-16. 2010.

GSCHWEND, A. R.; WAI, C. M.; ZEE, F.; ARUMUGANATHAN, A. K.; MING, R. Genome size variation among sex types in dioecious and trioecious Caricaceae species. **Euphytica**, **189**: 461–469. 2013.

GUPTA, A.K.; AHMAD, M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems. **Journal of Hazardous Materials**, **201-202**: 92–99. 2012.

GUSTAVINO, B.; CERETTI, E.; ZANI, C.; ZERBINI, I.; RIZZONI, M.; MONARCA, S.; FERETTI, D. Influence of Temperature on Mutagenicity in Plants Exposed to Surface Disinfected Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection**, **4**: 638–647. 2012.

HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, **44**: 321–334. 2005.

HEMACHANDRA, C.K.; PATHIRATNE, A. Assessing Toxicity of Copper, Cadmium and Chromium Levels Relevant to Discharge Limits of Industrial Effluents into Inland Surface Waters Using Common Onion, *Allium cepa* Bioassay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **94**: 199–203. 2014.

HERRERO, O.; MARTIN, J.M.P.; FREIRE, P.F.; LOPEZ, L.C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M.J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, **743**: 20–24. 2012.

HOSSAIN, Z.; MANDAL, A. K. A.; SHUKLA, R.; DATTA, S. K. NaCl stress - its chromotoxic effects and antioxidant behavior in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Plant Science**, **166**: 215–220. 2004.

HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, **49 (2)**: 207-218. 1986.

HOYER-HANSEN, M.; BASTHOLM, L.; MATHIASSEN, I.S.; ELLING, F.; JACOBSEN, M. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. **Cell Death and Differentiation**, **12**: 1297–1309. 2005.

HUH, G-H.; DAMSZ, B.; MATSUMOTO, T.K.; REDDY, M.P.; RUS, A.M.; IBEAS, J.I.; NARASIMHAN, M.L.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA P.M. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. **The Plant Journal**, **29(5)**, 649-659. 2002.

İLBAŞ, A.; GONEN, U.; YILMAZ, S.; DADANDI, M.Y. Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells. **Turkish Journal of Botany**, **36**: 263–268. 2012.

IWALOKUN, B.A.; OYENUGA, A.O.; SAIBU, G.M.; AYORINDE, J. Analyses of Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Loranthus micranthus* using the *Allium cepa* Test. **Journal of Biological Sciences**, **3(5)**: 459–467. 2011.

JADHAV, S.B.; PHUGARE, S.S.; PATIL, P.S.; JADHAV, J.P. Biochemical degradation pathway of textile dye Remazol red and subsequent toxicological

evaluation by cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, **65**: 733-743. 2011.

JIANG, Z.; QIN, R.; ZHANG, H.; ZOU, J.; SHI, Q.; WANG, J.; JIANG, W.; LIU, D. Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescent probe, microtubular immunofluorescence and comet assay. **Plant Soil**, **383**: 357–372. 2014.

JOSEPH, B.; JINI, D. Salinity Induced Programmed Cell Death in Plants: Challenges and Opportunities for Salt-tolerant Plants. **Journal of Plant Sciences**, 1-15. 2010.

KARASMAILOGLU, M.C. Investigation of the Cytotoxic and Genotoxic Effects of *Artemisia annua* Methanol Extract with the *Allium* Test. **Ekoloji**, **23(91)**: 64-74. 2014.

KATAEVA, M.; KOTSERUBA, V.; TEREKHINA, N.; KUTLUNINA, N.; BELJAEVA, A. *Allium* Root-Micronucleus (*Allium*-MCN) Test on the Genotoxicity of Soil Samples Contaminated with Heavy Metals. **World Applied Sciences Journal**, **17(8)**: 992-1000. 2012.

KATSUHARA, M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. **Plant Cell Physiology**, **38**: 1091-1093. 1997.

KATSUHARA, M.; KAWASAKI, T. Salt Stress Induced Nuclear and DNA Degradation in Meristematic Cells of Barley Roots. **Plant Cell Physiology**, **37(2)**: 169-173. 1996.

KERN, D.I.; SCHWAICKHARDT, R.O.; LUTTERBECK, C.A.; KIST, L.T.; ALCAYAGA, E.A.L.; MACHADO, E.L. Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **68**: 64–73. 2015.

KERN, D.I.; SCHWAICKHARDT, R.O.; MOHR, G.; LOBO, E.A.; KIST, L.T.; MACHADO, E.L. Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. **Science of the Total Environment**, **443**: 566–572. 2013.

KLANČNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; KOCE, J.D. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **74**: 85–92. 2011.

KLASTERSKA, I.; NATARAJAN, A.T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, **83**: 153–162. 1976.

KOPLIKU, K. e MESI (DIZDARI), A. Toxicity Screening of Water Sources in Flooded Agricultural Areas of Nën-Shkodra Lowland Using *Allium cepa* L. Assay. **Journal of Environmental Science and Engineering A1**: 1197-1202. 2012.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H. et al. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, **16**: 3–11. 2009.

- KRON, P.; KWOK, A.; HUSBAND, B. C. Flow cytometric analysis of pollen grains collected from individual bees provides information about pollen load composition and foraging behaviour. **Annals of Botany**, **113 (1)**: 191-197. 2014.
- KULKARNI, M.G.; ASCOUGH, G.D.; VERSCHAEVE, L.; BAETEN, K.; ARRUDA, M.P.; STADEN, J.V. Effect of smoke-water and a smoke-isolated butenolide on the growth and genotoxicity of commercial onion. **Scientia Horticulturae**, **124**: 434–439. 2010.
- KUMAR, D.S.; CHAKRABARTY, D.; VERMA, A.K.; BANERJI, B.K. Gamma ray induced chromosomal aberrations and enzyme related defense mechanism in *Allium cepa* L. **Caryologia**, **64(4)**: 388-397. 2011.
- KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, **190**: 613–621. 2011.
- KURAS, M.; NOWASKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, **107**: 211-221. 2006.
- KURAS, M.; PILARSKI, R.; NOWASKOWSKA, J.; ZOBEL, A.; BRZOST, K.; ANTOSIEWICZ, J.; GULEWICZ, K. Effect of Alkaloid-Free and Alkaloid-Rich preparations from *Uncaria tomentosa* bark on mitotic activity and chromosome morphology evaluated by *Allium Test*. **Journal of Ethnopharmacology**, **12**: 140-147. 2009.
- KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **73**: 949–954. 2010.
- KWASNIEWSKA, J.; NALECZ-JAWECKI, G.; SKRZYPCZAK, A.; PLAZA, G.A.; MATEJCZYK, M. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **75**: 55–62. 2012.
- LACERDA, L.P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A.P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **86(3)**: 1147–1150. 2014.
- LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V.D.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, **432**: 180–188. 2012.
- LEE, C.Y.; BAEHRECKE, E.H. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. **Development**, **128**: 1443–1455. 2001.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; OLIVEIRA, D.P.; FERRAZ, E.R.A.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; ZOCOLO, G.J.; MARIN-MORALES, M.A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, **199–200**: 343–349. 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, **682**: 71–81. 2009.

LENNON, S.V., MARTIN, S.J., COTTER, T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, **24**: 203-214. 1991.

LERDA, D.; BISTONI, M.B.; PELLICIONI, P.; LITTERIO, N. *Allium cepa* as a biomonitor of ochratoxin A toxicity and genotoxicity. **Plant Biology**, **12**: 685–688. 2010.

LIMA, R.; FEITOSA, L.O.; MARUYAMA, C.R.; BARGA, M.A.; YAMAWAKI, P.C.; VIEIRA, Y.J.; TEIXEIRA, E.M.; CORRÊA, A.C.; MATTOSO, L.H.C.; FRACETO, L.F. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. **International Journal of Nanomedicine**, **7**: 3555–3565. 2012.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ.H.; OZTURK, N.S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 1-5. 2014.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. **Chemosphere**, 1-5. 2013.

LIMAN, R.; GÖKÇE, U.G.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **22(3)**: 541-548. 2012.

LIMAN, R.; CIGERCI, I.H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **99**: 61–64. 2011.

LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, Y. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. **Chemosphere**, **80**: 1056–1061. 2010.

LIN, J.; WANG, Y.; WANG, G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. **Journal of Plant Physiology**, **163**: 731-739. 2006.

LUZ, A.C.; PRETTI, I.R.; DUTRA, J.C.V.; BATITUCCI, M.C.P. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, **14(4)**: 635-642. 2012.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, **334**: 185-195. 1995.

MAGDALENO, A.; JUÁREZ, A.B.; DRAGANI, V.; SAENZ, M.E.; PAZ, M.; MORETTON, J. Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. **Journal of Toxicology**, 1–10. 2014.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M.A.; MANTOVANI, M.S.; JAMAL, C.M.; NATI, N.; PASSOS, T.S.; MATSUMOTO, S.T. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, **33(1)**: 176-181. 2010.

MALLÓN, R.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J.; GONZÁLEZ, M. L. In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultriae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. **Plant Cell**, **101 (1)**: 31-39. 2010.

MALODE, S.N.; LANDE, S.R.; SHELKE, P.B. Cytotoxic effect of *Mimosa pudica* L. Leaf extract on *Allium cepa* root tip cells. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, **2(3)**: 104-108. 2012.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL-CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. **Environmental Research Letters**, **94**: 221–226. 2004.

MARSIGLIA, J.D.C.; LOSS, A.C.C.; STANGE, V.S.; BELCAVELLO, L.; LUZ, A.C.; BATITUCCI, M.C.P. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw.. **Natureza on line**, **9(1)**: 30-34. 2011.

MAŠKOVIĆ, P.; MAKSIMOVIĆ, J.D.; MAKSIMOVIĆ, V.; BLAGOJEVIĆ, J.; VUJOŠEVIĆ, M.; MANOJLOVIĆ, N.T.; RADOJKOVIĆ, M.; CVIJOVIĆ, M.; SOLUJIĆ, S. Biological activities of phenolic compounds and ethanolic extract of *Halacsya sendtneri* (Boiss) Dörfner. **Central European Journal of Biology**, **7(2)**: 327-333. 2012.

MASOOD, F.; MALIK, A. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. **Science of the Total Environment**, **444**: 153–160. 2013.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, **85**: 13–18. 2011.

MAZZEO, D.E.C.; LEVY, C.E.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, **408**: 4334–4340. 2010.

- MEENA, D.; SINGH, S.K.; CHAUDARI, S.K. Effect of Sr²⁺ on Mitotic Activity and Chromosomal Behavior in Root Meristem of *Allium cepa* L. **International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology**, **6(2)**: 197-201. 2013.
- MENDES, S.S.; ANDRADE, J.A.; XAVIER, M.A.; JUNIOR, J.A.S.; PANTALEÃO, S.M.; ESTEVAM, C.S.; GARCIA, C.A.B.; FERRARI, S.F. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **22(1)**: 76-81. 2012.
- MICHALSKA-KACYMIROW, M.; KUREK, E.; SMOLIS, A.; WIERZBICKA, M.; BULSKA, E. Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to selenium inorganic compounds. **Anal Bioanal Chem**, **406**: 3717–3722. 2014.
- MIŠÍK, M.; KNASMUELLER, S.; FERK, F.; CICHNA-MARKL, M.; GRUMMT, T.; SCHAAR, H.; KREUZINGER, N. Impact of ozonation on the genotoxic activity of tertiary treated municipal wastewater. **Water Research**, **45**: 3681-3691. 2011.
- MOHAMMED, K.P.; AAREY, A.; TAMKEEN, S.; JAHAN, P. Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research**, **777**: 29–32. 2015.
- MONTEIRO, M.S.; RODRIGUEZ, E.; LOUREIRO, J.; MANN, R.M.; SOARES, A.M.V.M.; SANTOS, C. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2010.
- MUSANOVIC, J.; RAMIC, N.; NEFIĆ, H.; DZUBUR, A. Chromosome aberration and irregular cell cycle in *Allium cepa* root cells caused by different concentrations of Alprazolam. **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health**, **5(6)**: 407-418. 2013.
- NADLER, J. D.; POOLER, M.; OLSEN, R. T.; COLEMAN, G. D. In vitro induction of polyploidy in *Cercis glabra* Pamp. **Scientia Horticulturae**, **148**: 126–130. 2012.
- NAG, S.; DUTTA, R.; PAL, K.K. Chromosomal aberrations induced by acetamiprid in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, **3(2)**: 1-5. 2013.
- NETTO, E.; MADEIRA, R.A.; SILVEIRA, F.Z.; FIORI, M.A.; ANGIOLETO, E.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, **35(3)**: 511–516. 2013.
- NEVES, E.S.B.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, L.H.G.M.; PERON, A.P. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **86(3)**: 1131-1136. 2014.
- NUNES, E.A.; LEMOS, C.T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T.N.; OLIVEIRA, N.C.D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, **84**: 47–53. 2011.

NUNEZ, R.; SANCHO-MARTINEZ, S.M.; NOVOA, J.M.L.; LOPEZ-HERNANDEZ, F.J. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. **Cell Death and Differentiation**, **17**: 1665–1671. 2010.

O'BRIEN, I.E.O., BAGULEY, B.C., MURRAY, B.G., MORRIS, B.A.M., FERGUSON, I.B. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **Plant Journal**, **13**: 803-814. 1998.

OLIVEIRA, L.M.; VOLTOLINI, J.C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambiente & Água**, **6(1)**: 90-103. 2011.

OLORUNFEMI, D.I.; OGUNSANWO, M.W. Evaluation of the differential growth conditions, heavy metal composition and cytogenetics of *Allium cepa* by the use of chromosome aberration bioassay. **Science World Journal**, **6(2)**: 1-5. 2011.

OLORUNFEMI, D.I.; OMO-ATAGA, S.O.; OFOMATA, R.C. Studies on the physicochemical properties and genotoxicity of effluents from a dairy industry. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, **5(2)**: 11 – 18. 2012.

ONYEMAOBI, O.I.; WILLIAMS, G.O.; ADEKOYA, K.O. Cytogenetic effects of two food preservatives, sodium metabisulphite and sodium benzoate on the root tips of *Allium cepa* Linn. **Ife Journal of Science**, **14(1)**: 155-165. 2012.

ORMEROD, M. G.; PAUL, F.; CHEETHAM, M.; SUN, X.M.. Discrimination of apoptotic thymocytes by Forward Light Scatter. **Cytometry**, **21**: 300. 1995.

OZAKCA, D.U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **107**: 38–43. 2013.

PALANIKUMAR, L.; RAGUNATHAN, I.; PANNEERSELVAM, N. Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Turkijan Journal Biology**, **35**: 145-152. 2011.

PANDA, K.K.; ACHARY, V.M.M.; KRISHNAVENI, R.; PADHI, B.K.; SARANGI, S.N.; SAHU, S.N.; PANDA, B.B. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. **Toxicology in Vitro**, **25**: 1097–1105. 2011.

PANNEERSELVAM, N.; PALANIKUMAR, L.; GOPINATHAN, S. Chromosomal aberrations induced by Glycidol in *Allium cepa* L root meristem cells. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, **3(2)**: 300–304. 2012.

PATIL, A.V.; JADHAV, J.P. Evaluation of phytoremediation potential of *Tagetes patula* L. for the degradation of textile dye Reactive Blue 160 and assessment of the toxicity of degraded metabolites by cytogenotoxicity. **Chemosphere**, **92(2)**: 225–232. 2013.

PATIL, B.C.; BHAT, G.I. A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternatea* L. **Cytologia**, **57**: 259–264. 1992.

PAUL, A. ; NAG, S.; SINHA, K. Cytological Effects of Blitox on Root Mitosis of *Allium cepa* L. **International Journal of Scientific and Research Publications**, **3(5)**: 1-7. 2013.

PAWLOWSKI, Â.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; SOARES, G.L.G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, **80**: 96–103. 2012.

PAZ, M.F.C.J.; ALENCAR, M.V.O.B.; SOARES, R.L.L.; COSTA, D.A.F.; NUNES, A.T.; CAVALCANTE, A.A.C.M. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthus sucuuba*: uma questão de saúde pública. **Revista Interdisciplinar**, **6(1)**: 52-61. 2013.

PEDRAZZANI, R.; CERETTI, E.; ZERBINI, I.; CASALE, R.; GOZIO, E.; BERTANZA, G.; GELATTI, U.; DONATO, F.; FERETTI, D. Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **84**: 274–281. 2012.

PERON, A.P.; MARIUCCI, R.G.; ALMEIDA, I.V.; DÜSMAN, E.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), on vegetal and animal test systems. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, **13(97)**: 1-9. 2013.

PESNYA, D. S.; ROMANOVSKY, A. V. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, **750**: 27– 33. 2013.

PIERANTOZZI, P.; ZAMPINI, C.; TORRES, M.; ISLA, M.; VERDENELLI, R.A.; MERILES, J.M.; MAESTRI, D. Physico-chemical and toxicological assessment of liquid wastes from olive processing-related industries. **Journal of the science of Food and Agriculture**, **92**: 216–223. 2012.

PING, K.Y.; DARAH, I.; YUSUF, U.K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of euphorbia hirta: An *Allium cepa* assay. **Molecules**, **17**: 7782–7791. 2012.

PINHO, D.S.; STURBELLE, R.T.; MARTINO-ROTH, M.G.; GARCIAS, G.L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **20(2)**: 165-170. 2010.

PROMKAEW, N.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; JAMPATONG, S.; ROJANAVIPART, P. Toxicity and Genotoxicity of Pendimethalin in Maize and Onion. **Kasetsart Journal (Nat. Sci.)**, **44**: 1010 – 1015. 2010.

PULATE, P.V.; GHURDE, M.U.; DESHMUKH, V.R. Cytological effect of the biological and chemical silver-nano particle in *Allium cepa* (L). **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, **1**: 32-35. 2011.

RADIĆ, S.; PROLIĆ, M.; PAVLICA, M. E PEVALEK-KOZLINA, B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. **Environmental and Experimental Botany**, **54**: 213–218. 2005.

RADIĆ, S.; VUJČIĆ, V.; CVETKOVIĆ, Z.; CVJETKO, P.; OREŠČANIN, V. The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. **Science of the Total Environment**, **466–467**: 84–89. 2014.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M.M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, **408**: 1228–1233. 2010.

RAI, P.D.; PAUDEL, N.; SHAKYA, S.R. Cytological Effects of Leaf Extract of *Artemisia vulgaris* L. on Meristematic Cells of *Allium cepa* L. **Our Nature**, **10**: 242–248. 2012.

RAINHO, C.R.; CORRÊA, S.M.; MAZZEI, J.L.; AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I. Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitro-Derived in Respirable Airborne Particulate Matter Collected from Urban Areas of Rio de Janeiro (Brazil). **BioMed Research International**, 1-9. 2013.

RAINHO, C.R.; KAEZER, A.; AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in N-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **82(4)**: 925-932. 2010.

RATHNASAMY, S.; MOHAMED, K.B.; SULAIMAN, S.F.; AKINBORO, A. Evaluation of cytotoxic, mutagenic and antimutagenic potential of leaf extracts of three medicinal plants using *Allium cepa* chromosome assay. **International Current Pharmaceutical Journal**, **2(8)**: 131-140. 2013.

RAY, S.; KUNDU, L.M.; GOSWAMI, S.; ROY, G.C.; CHATTERJEE, S.; DUTTA, S.; CHAUDHURI, A.; CHAKRABARTI, C.S. Metaphase arrest and delay in cell cycle kinetics of root apical meristems and mouse bone marrow cells treated with leaf aqueous extract of *Clerodendrum viscosum* Vent. **Cell Proliferation**, **46**: 109–117. 2013.

RAYBURN, A.L.; WETZEL, J.B. Flow Cytometric Analyses of Intraplant Nuclear DNA Content Variation Induced by Sticky Chromosomes. **Cytometry**, **49**: 36–41. 2002.

RENJANA, P.K.; ANJANA, S.; THOPPIL, J.E. Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, **5(2)**: 311-316. 2013.

REZAEI, A.; AMIRJANI, M. R.; MAHDIYEH, M. Programmed Cell Death Induced by Salt Stress in Wheat Cell Suspension. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, **3(1)**: 35-39. 2013.

ROA, O.; YEBER, M.C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Brazilian Journal of Biology**, **72(3)**: 471–477. 2012.

RODRIGUES, F.P.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; GUEDES, C.L.B.; JORDÃO, B.Q. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, **33(1)**: 169–175. 2010.

ROMANO, E.; RASCHI, A.B.; GONZÁLEZ, A.M.; JAIME, G.; FORTUNA, M.A.; HERNÁNDEZ, L.R.; BACH, H.; BENAVENTE, A.M. Phytotoxic activities of (2R)-6-hydroxytremetone. **Plant Physiology and Biochemistry**, **49**: 671–675. 2011.

ROSSATO, L.V.; TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; FARIAS, J.G.; NICOLOSO, F.T. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **82(4)**: 857–860. 2010.

ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; DOLEZEL, J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, **21**: 483–490. 2003.

SABOO, S.S.; KHADABADI, S.; TAPADIYA, G.G. In vitro Evaluation of Antimitotic, Antiproliferative, DNA fragmentation and Anticancer activity of Chloroform and Ethanol extracts of *Revia hypocrateriformis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, S503–S508. 2012.

SAMUEL, O.B.; OSUALA, F.I.; ODEIGAH, P.G.C. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. **African Journal of Environmental Science and Technology**, **4(1)**: 021–027. 2010.

SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M., PEÑA, T.C.; REIGOSA, M.J. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. **Phytochemistry**, **69**: 2172–2179. 2008.

SANDOVAL, A.; HOCHER, V. E VERDEIL, J. L. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. **Plant Cell Reports** **22 (1)**: 25–31. 2003.

SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K.; MURTHY, R.C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **96**: 93–100. 2010.

SELVAN, E.; THOMAS, P. Application of flow cytometric DNA measurements in the detection of irradiated onions. **Journal of Science of Food and Agriculture**, **67**: 293–297. 1995.

SHABALA, S. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signaling. **Journal of Experimental Botany**, **60(3)**: 709–712. 2009.

SHABALA, S.; CUIN, T.; PRISMALL, L.; NEMCHINOV, L. Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. **Planta**, **227**: 189-197. 2007.

SHACHI, S. Antimitotic activity of a New Compound Isolated from the Flower of *Prosopis juliflora*. **Research Journal of Recent Sciences**, **1(6)**: 22-26. 2012.

SHAIKH, S.; NAZAM, N.; LONE, M.I.; AHMAD, W. Dichlorophen and Dichlorovos mediated genotoxic and cytotoxic assessment on root meristem cells of *Allium cepa*. **Science Diliman**, **24(1)**: 13-22. 2012.

SHARMA, A.; KUMAR, M.; KAUR, S. *Cuminum cyminum* Linn. and *Coriandrum sativum* Linn. extracts modulate Chromium genotoxicity in *Allium cepa* chromosomal aberration assay. **Nucleus**, **54(2)**: 99-105. 2011.

SIDDIQUI, A.H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, **179**: 241–253. 2011.

SILVA, D.S.B.S.; BARBOZA, B.; GARCIA, A.C.F.S.; OLIVEIRA, B.; ESTEVAM, C.S.; NETO, V.A.; SANTOS, A.L.L.M.; DIAS, A.S.; SCHER, R.; PANTALEAO, S.M. Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **23(2)**: 273-278. 2013.

SILVA, D.S.B.S.; GARCIA, A.C.F.S.; MATA, S.S.; OLIVEIRA, B.; ESTEVAM, C.S.; SCHER, R.; PANTALEAO, S.M. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **21(1)**: 92-97. 2011.

SILVA, R.M.G.; OLIVEIRA, V.M.; VALADARES, F.; MECINA, G.F.; SILVA, L.P. Genotoxic activity and toxicity of *Baccharis trimera* Less. regarding the bioaccumulation of heavy metals. **Journal of Medicinal Plants Research**, **6(26)**: 4321- 4327. 2012.

SINGH, M.; DAS, A.; SINGH, D.; MAITI, P.; SHABBIR, M.; DAS, A. HIGH genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**, **12**: 321–327. 2014.

SMALA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TONAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, **368**: 171-179. 1996.

SOLTYS, D.; RUDZIN'SKA-LANGWALD, A.; KUREK, W.; GNIAZDOWSKA, A.; SLIWINSKA, E.; BOGATEK, R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. **Planta**, **234**: 609–621. 2011.

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, **62**. 2009.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, **185**: 1627–1636. 2012.

STURBELLE, R.T.; PINHO, D.S.; RESTANI, R.G.; OLIVEIRA, G.R.; GARCIAS, G.L.; MARTINO-ROTH, M.G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Brazilian Journal of Pharmacology**, **20(3)**: 409-415. 2010.

TABET, M.; ABDA, A.; BENOURETH, D.E.; LIMAN, R.; KONUK, M.; KHALLEF, M.; TAHER, A. Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, **187**: 26. 2015.

TABREZ, S.; AHMAD, M. Genotoxicity of trichloroethylene in the natural milieu. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, **215**: 333–338. 2012.

TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. **Mutation Research**, **726**: 15–20. 2011.

TABUR, S.; DEMIR, K. Cytogenetic response of 24-epibrassinolide on the root meristem cells of barley seeds under salinity. **Plant Growth Regulation**, **58**: 119-123. 2009.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, **101**: 5677–5684. 2010.

TEERARAK, M.; BHINIJA, K.; THITAVASANTA, S.; LAOSINWATTANA, C. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**. **121**: 228-232. 2009.

TIMOTHY, O.; IDU, M.; OLORUNFEMI, D.I.; OVUAKPORIE-UVO, O. Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. **South African Journal of Botany**, **91**: 71–74. 2014.

TRUSHIN, M.V.; RATUSHNYAK, A.Y.; ARKHAROVA, I.A.; RATUSHNYAK, A.A. Genetic Alterations Revealed in *Allium cepa*-Test System under the Action of Some Xenobiotics. **World Applied Sciences Journal**, **22(3)**: 342-344. 2013.

TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Toxicology and industrial health**, 1-10. 2013.

TÜRKOĞLU, Ş. 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**, **103**: 224–230. 2012.

VELLUTI, F.; MOSCONI, N.; ACEVEDO, A.; BORTHAGARAY, G.; CASTIGLIONI, J.; FACCIO, R.; BACK, D.F.; MOYNA, G.; RIZZOTTO, M.; TORRE, M.H. Synthesis, characterization, microbiological evaluation, genotoxicity and synergism tests of new nano silver complexes with sulfamoxole X-ray diffraction of [Ag₂(SMX)₂]-DMSO. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **141**: 58–69. 2014.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MALTEMPI, P.P.P; MARIN-MORALES, M.A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, **1(3)**: 1–12. 2011.

VIANA, L.Á.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V.E.P. Mutagenicity and cytotoxicity of liquid waste, press water and pond water, produced in the cassava flour industry, and of antitoxic sodium thiosulfate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **94**: 453–458. 2013.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **Journal of Hazardous Materials**, **176**: 952–956. 2010.

YEKEEN, T.A.; AKINTARO, O.I.; AKINBORO, A.; AZEEZ, M.A. Evaluation of cytogenotoxic and nutrient composition of three commonly consumed vegetables in south-western, Nigeria. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, **13(2)**: 7452-7466. 2013.

YILDIZ, M.; CIGERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, **75**: 934-938. 2009.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Veterinary Pathology**, **40**: 481–95. 2003.

ZOU, J.; YUE, J.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of Cadmium Stress on Root Tip Cells and Some Physiological Indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, **54(1)**: 129–141. 2012.

ANEXO A - Referência dos artigos revisados quanto ao uso da citometria de fluxo no ensaio de *A. cepa*.

172 artigos publicados nos últimos cinco anos, sobre o teste de *A. cepa*.

ABDA et al 2015; ABU e MBA 2011; ACHARY et al 2013; ADEYEMO e FARINMADE 2013; AKDENIZ e OZMEN 2011; AKINBORO et al 2011; AKINBORO et al 2011; AKYIL et al 2012; ALVIM et al 2011; ANANTHAKRISHNAN et al 2013; ANDRADE et al 2014; ANDRADE-VIEIRA et al 2012; ANDRADE-VIEIRA et al 2011; ANDRIOLI et al 2012; ANDRIOLI et al 2014; ASITA e HATANE 2012; ASITA e MOKHOBO 2013; ATHANÁSIO et al 2014; BARBOSA et al 2010; BERTANZA et al 2013; BHATTACHARYA e HALDAR 2012; BHUJBAL et al 2011; BIANCHI et al 2010; CÂNDIDO et al 2013; CARDOSO et al 2014; CARVALHO et al 2011; ÇAVUŞOĞLU et al 2011; ÇAVUŞOĞLU et al 2011; CERETTI et al 2010; CHRISTOFOLETTI et al 2012; CHRISTOFOLETTI et al 2013; CHUKWUJEKWU e STADEN 2014; CIĞERCI et al 2015; COSTA et al 2012; CUCHIARA et al 2012; DELARMELENA et al 2012; DEMISSIE et al 2013; DITIKA e ANILA 2013; DIZDARI e KOPLIKU 2013; DÜSMAN et al 2014; DÜSMAN et al 2012; ELEFTHERIOU et al 2012; FÃO et al 2012; FATEMEH e KHOSRO 2012; FERETTI et al 2012; FERNANDEZ et al 2011; FERREIRA et al 2012; FIRBAS e AMON 2013; FRESCURA et al 2012; GARAJVRHOVAC et al 2013; GERAS'KIN et al 2011; GEREMIAS et al 2012; GHODAKE et al 2011; GHOSH et al 2015; GHOSH et al 2012; GHOSH et al 2010; GHURDE et al 2012; GOLDONI et al 2014; GOMES et al 2013; GONZÁLEZ et al 2012; GOUJON et al 2014; GRILLO et al 2014; GRILLO et al 2012; GRIPPA et al 2010; GUPTA e AHMAD 2012; GUSTAVINO et al 2012; HEMACHANDRA e PATHIRATNE 2014; HERRERO et al 2012; İLBAŞ et al 2012; IWALOKUN et al 2011; JADHAV et al 2011; JIANG et al 2014; KARASMAILOGLU 2014; KATAEVA et al 2012; KERN et al 2015; KERN et al 2013; KLANČNIK et al 2011; KOPLIKU e MESI (DIZDARI) 2012; KULKARNI et al 2010; KUMAR et al 2011; KUMARI et al 2011; KWANKUA et al 2010; KWASNIEWSKA et al 2012; LACERDA et al 2014; LAUGHINGHOUSE IV et al 2012; LEME et al 2012; LERDA et al 2010; LIMA et al 2012; LIMAN et al 2014; LIMAN 2013; LIMAN et al 2012; LIMAN et al 2011; LIMAN et al 2010; LUZ et al 2012; MAGDALENO et al 2014; MALINI et al 2010; MALODE et al 2012; MARSIGLIA et al

2011; MAŠKOVIĆ et al 2012; MASOOD e MALIK 2013; MAZZEO et al 2011; MAZZEO et al 2010; MEENA et al 2013; MENDES et al 2012; MICHALSKA-KACYMIROW et al 2014; MIŠÍK et al 2011; MOHAMMED et al 2015; MUSANOVIC et al 2013; NAG et al 2013; NETTO et al 2013; NEVES et al 2014; NUNES et al 2011; OLIVEIRA et al 2011; OLORUNFEMI e OGUNSANWO 2011; OLORUNFEMI et al 2012; ONYEMAOBI et al 2012; OZAKCA e SILAH 2013; PALANIKUMAR et al 2011; PANDA et al 2011; PANNEERSELVAM et al 2012; PATIL e JADHAV 2013; PAUL; NAG e SINHA 2013; PAWLOWSKI et al 2012; PAZ et al 2013; PEDRAZZANI et al 2012; PERON et al 2013; PESNYA e ROMANOVSKY 2013; PIERANTOZZI et al 2012; PING et al 2012; PINHO et al 2010; PROMKAEW et al 2010; PULATE et al 2011; RADIĆ et al 2014; RADIĆ et al 2010; RAI et al 2012; RAINHO et al 2013; RAINHO et al 2010; RATHNASAMY et al 2013; RAY et al 2013; RENJANA et al 2013; ROA et al 2012; RODRIGUES et al 2010; ROMANO et al 2011; ROSSATO et al 2010; SABOO et al 2012; SAMUEL et al 2010; SAXENA et al 2010; SHACHI 2012; SHAIKH et al 2012; SHARMA et al 2011; SIDDIQUI et al 2011; SILVA et al 2011; SILVA et al 2012; SILVA et al 2013; SINGH et al 2014; SOLTYS et al 2011; SOUZA et al 2012; STURBELLE et al 2010; TABET et al 2015; TABREZ e AHMAD 2012; TABREZ e AHMAD 2011; TEERARAK et al 2010; TIMOTHY et al 2014; TRUSHIN et al 2013; TÜRKOĞLU 2013; TÜRKOĞLU 2012; VELLUTI et al 2014; VENTURA-CAMARGO et al 2011; VIANA et al 2013; WU, YI e YI 2010; YEKEEN et al 2013; ZOU et al 2012.