

CARACTERIZAÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Rosinete Ferreira¹

¹ Especialização em Biologia Celular e Molecular pela FAVENI, Docente na SEEDF, profarosinetebiologa@gmail.com.

RESUMO- Os organismos vivos encontram-se inseridos nos mais diversos ambientes do planeta, muitos dos quais, podem de algum modo ser nocivos às suas células e biomoléculas orgânicas. Dessa forma, o material genético celular está constantemente sujeito a agressões capazes de causar lesões e mutações ao material genético. As lesões consistem em alterações provisórias no material genético, quando não reparadas podem converter-se em mutações. Estas últimas são modificações permanentes e herdáveis no DNA, ocorrem em nível gênico e cromossômico (aberrações cromossômicas). Com isso surge a mutagenicidade que estuda as mutações no DNA. E também a genotoxicidade, termo mais amplo que se refere à danos que ocorrem no material genético. Diante disto se propôs esse trabalho com o objetivo de caracterizar aberrações cromossômicas encontradas em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. Este estudo consiste em pesquisa bibliográfica em fontes como livros, artigos, teses, dissertações e monografias. Foram identificadas as seguintes AC, micronúcleo; quebra, ponte, aderência, perda e atrasos cromossômicos; célula binucleada, poliploide e multipolar e broto nuclear, como resultado de substâncias aneugênicas ou clastogênicas, que podem ocorrer em qualquer fase do ciclo mitótico. Estudos que caracterizem corretamente as ACs quanto a nomenclatura, seu processo de desencadeamento no ciclo celular são necessários, pois agentes genotóxicos e mutagênicos induzem alterações na molécula de DNA, podendo levar a um comprometimento das gerações futuras, além de promover efeitos imediatos como o comprometimento da saúde dos organismos expostos.

PALAVRAS-CHAVE: Aberrações Cromossômicas. Genotoxicidade. Mutagenicidade. Ciclo Celular.

ABSTRACT- Living organisms are inserted in the most diverse environments on the planet, many of which, in some way, can be harmful to their cells and organic biomolecules. Thus, the cellular genetic material is constantly subject to aggressions capable of causing injuries and mutations to the genetic material. The lesions consist of temporary changes in the genetic material, when not repaired they can become mutations. The latter are permanent and inheritable changes in DNA, occurring at the gene and chromosomal level (chromosomal aberrations). With that comes the mutagenicity that studies the mutations in DNA. And also genotoxicity, a broader term that refers to damage that occurs in genetic material. In view of this, this work was proposed in order to characterize chromosomal aberrations found in studies of genotoxicity and mutagenicity. This study consists of bibliographic research in sources such as books, articles, theses, dissertations and monographs. The following CA, micronucleus; breakage, bridging, adhesion, loss and chromosomal delays; binucleated, polyploid and multipolar cell and nuclear sprout, as a result of aneugenic or clastogenic substances, which can occur at any stage of the mitotic cycle. Studies that correctly characterize CAs in terms of identification, nomenclature, their triggering process in the cell cycle, genotoxic and mutagenic agents are necessary to induce changes in the DNA molecule, which may lead to a compromise of future generations, in addition to promoting immediate effects such as compromising the health of the exposed organisms.

KEYWORDS: Chromosomal Aberrations. Genotoxicity. Mutagenicity. Cell cycle.

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes descobertas da ciência, foi o conhecimento da estrutura tridimensional da molécula de DNA que ocorreu em 1953, por Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins, quando trabalhavam em Cambridge, no Reino Unido. Eles construíram modelos de cartolina e arame para entender e descrever o DNA, e o resultado foi publicado em duas páginas da revista *Nature*, em 25 de abril de 1953, há pouco mais de 50 anos. O texto de 900 palavras era acompanhado de um esboço simples da dupla hélice e atraiu pouca atenção da comunidade científica. O estudo só ganhou destaque em 1957, quando cientistas demonstraram que o DNA se auto-replica, ganharam o prêmio Nobel lhes em 1962, causando uma revolução na investigação científica ligada às ciências da vida (A descoberta do DNA e o projeto genoma, 2005).

A descoberta da dupla hélice do DNA abriu caminho para a moderna biologia molecular e genética, aponta para horizontes ainda mais fantásticos como, por exemplo, o de medicamentos personalizados de acordo com o código genético de cada um. Pelo menos teoricamente seria possível, e mais simples, obter-se medicamentos mais eficazes e com melhor perfil toxicológico (A descoberta do DNA e o projeto genoma, 2005).

A molécula de DNA exerce função de comandos em todo o organismo, dessa forma precisa-se manter sua integridade. No entanto pode ser danificada por vários fatores classificados como endógenos e exógenos. O dano endógeno ao DNA é primariamente causado pelos radicais livres. Enquanto os exógenos são agentes ambientais como a luz ultravioleta, a radiação ionizante e os químicos (SOARES et al., 2014).

Os radicais livres formados na célula, que quimicamente são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade tende a se ligar a outro elétron (ANDRADE et al., 2010). Estas moléculas também desempenham papel importante no processo de mutagênese e carcinogênese (RIBEIRO, 2010).

Entre todos os radicais livres gerados em organismos vivos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) representam a classe mais importante (SILVA; GONÇALVES, 2010). As EROs são moléculas de oxigênio altamente reativas, originadas como subprodutos de reações redox, que se apresentam tanto como radicais livres, como na forma molecular de um não radical. Essas moléculas podem ser geradas como resultado da excitação molecular, formando oxigênio singlete ou de sucessivas adições de elétrons ao O₂, reduzindo-o ao radical aniônico superóxido, radical hidroperoxila, ou peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Também podem ser originadas de fontes exógenas como por exemplo, de agrotóxicos e poluentes em geral (BARBOSA et al., 2014).

As EROs podem comprometer a funcionalidade de organelas celulares, ácidos nucléicos, lipídeos e proteínas e com isso causar danos aos tecidos e órgãos. Para garantir a homeostase celular é necessário, portanto, que haja um equilíbrio entre a produção de EROs e a concentração de agentes antioxidantes que combatem essas espécies reativas (SILVA; GONÇALVES, 2010). Quando esse equilíbrio é rompido é gerado uma condição conhecida como estresse oxidativo, definido como sendo o desbalanço entre a produção das espécies reativas de oxigênio e a quantidade de antioxidante disponível na célula para eliminar essas estruturas (TIAN et al., 2015).

Os radicais livres podem danificar o DNA, causando quebras e modificações nas bases purínicas e pirimídicas e também no açúcar desoxirribose, levando à alterações na expressão gênica, mutação e apoptose celular. Outra ação deletéria dos radicais livres é a peroxidação lipídica (HIRATA et al., 2004). Doenças como síndrome de Cockayne, tricotiodistrofia e diversos tipos de cânceres estão associadas a presença dessas pequenas moléculas (BERRA et al., 2006).

Os agentes exógenos que são os ambientais, em contato com o DNA alteram-os provocando agressões físicas e/ou químicas, gerando lesões. As lesões são danos a estrutura do DNA podem ser de vários tipos como os aductos de DNA, ligações cruzadas, quebra de fita simples, quebra na dupla fita, quebras cromossômicas, deleções ou substituição de sequências de nucleotídeos, dímeros de pirimidina, dentre outras (SILVA et al., 2010). A maioria delas causa distorções estruturais na molécula resultando em impedimentos para os processos de replicação e transcrição ou em modificações de uma ou algumas bases, alterando assim a sequência nucleotídica do DNA, as lesões quando não reparadas podem converter-se em mutações (DELUNARDO, 2010; PIZZAIA, 2013).

Mutações são alterações permanentes que ocorrem no DNA, sendo transmitida às células-filhas. Podem ocorrer em todos os seres vivos e são importantes para a evolução e diversidade das espécies. Algumas mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas; outras, podem causar a morte celular e por isso também não são detectáveis; por fim, algumas são potencialmente perigosas e conduzem ao processo carcinogênico (RIBEIRO et al., 2003).

As mutações apresentam-se tanto em nível gênico, quanto em nível cromossômico (aberrações cromossômicas). As gênicas, referem-se a mudanças de uma ou poucas subunidades no polímero de DNA, por substituição, perda ou ganho de nucleotídeo, alterando geralmente apenas o funcionamento de um gene (BEIGUELMAN, 2008). Já as aberrações cromossômicas, são modificações grosseiras do material genético, e podem ter efeitos drásticos ao organismo, pois provocam desorganização da informação genética como um todo, que pode chegar a impedir a viabilidade do organismo no qual se manifestam (FAGUNDES, 2012). Esse autor também classifica essas anomalias do cariótipo como numéricas, quando existe a adição ou a perda de cromossomos, e como estruturais (translocação, inversão e duplicação, entre outras) quando ocorrem rearranjos do material genético de um cromossomo ou entre cromossomos.

As aberrações cromossômicas podem interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de estarem associadas ao envelhecimento, à morte celular e à diversas patologias (BARBOSA, 2014). A perpetuação do material genético de geração a geração depende da estabilidade e manutenção das taxas de mutação em níveis mínimos e da eficácia do sistema de reparo de DNA celular sobre as lesões primariamente formadas (BEIGUELMAN, 2008).

Os organismos vivos encontram-se inseridos nos mais diversos ambientes do planeta, muitos dos quais, podem de algum modo ser nocivos às suas células e biomoléculas orgânicas. Dessa forma, o material genético celular está constantemente sujeito a agressões ambientais capazes de causar lesões e mutações ao material genético (FERREIRA et al., 2016). Excetuando o controle laboratorial, dificilmente é encontrado um ambiente desprovido de agentes mutagênicos ou genotóxicos encontrados na natureza. (BEIGUELMAN, 2008).

Os agentes genotóxicos são definidos como qualquer substância ou produto químico, físico ou biológico que danifique o DNA nuclear de forma direta ou indireta, afetando assim o metabolismo celular (OLIVEIRA, 2012). A capacidade de uma substância em danificar o DNA relaciona-se com a genotoxicidade desta substância, podendo ainda tal lesão ser também potencialmente mutagênica e/ou carcinogênica (NAI et al., 2015).

Dessa forma, a genética toxicológica estuda os processos que alteram a estrutura físico-química do DNA causando lesões a esta molécula. Portanto, esta área da genética avalia os efeitos da toxicidade ao DNA causados por agentes físicos, químicos e biológicos (endógenos e exógenos ao organismo) e seus efeitos nocivos à saúde. A literatura científica associa intimamente os mecanismos de mutagênese e carcinogênese, pois relata que a indução de mutações em genes alvos críticos, bem como o acúmulo destas mutações na célula podem levar ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO et al., 2003). Também segundo GÜEZ et al. 2012

alterações nas células somáticas de mamíferos estão intimamente relacionadas ao aparecimento de tumores malignos e benignos no homem (GÜEZ et al., 2012).

É de suma importância diferenciar os conceitos de genotoxicidade e mutagenicidade. Mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e hereditárias na estrutura do material genético da célula. Essas mutações podem ocorrer em um único gene ou em um conjunto de genes e nos cromossomos (DEARFIELD, 2002). Ou seja, incluem-se no conceito de mutações as aberrações cromossômicas estruturais (clastogênese) e numéricas (aneugênese). Enquanto Genotoxicidade é um termo mais amplo que se refere à habilidade da substância interagir com o DNA ou com o aparato celular que regula o genoma, tais como fusos mitóticos e topoisomerasas, alterando a estrutura, a informação ou a segregação do DNA

Para Anvisa (2018) a genotoxicidade nem sempre está associada à mutagenicidade, pois se refere a todos os danos ao DNA (inclusive mutagênese). Portanto, para a análise da genotoxicidade são incluídos ensaios que: fornecem indicação de dano ao DNA mesmo que não haja evidência direta de mutação; caso dos ensaios de síntese não programada de DNA; troca de cromátides-irmã; quebras de fitas de DNA; formação de aducto de DNA; erros na formação de proteínas que atuem no fuso mitótico e ciclo celular e de recombinação mitótica (EFSA, 2011), ou seja, qualquer estudo que avalie a função celular envolvendo dano ou interferência na replicação ou no reparo do DNA (USEPA, 2012).

Diante do que foi exposto estudos que caracterizam as aberrações cromossômicas são imprescindíveis pois a mutações em genes alvos críticos, podem levar alterações nas células somáticas de mamíferos estão intimamente relacionadas ao aparecimento de tumores malignos e benignos no homem (FERREIRA et al., 2016). O objetivo desse trabalho foi caracterizar, através da revisão de literatura, aberrações cromossômicas encontradas em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, a partir do processo de lesão e mutação do DNA, dos conceitos de genotoxicidade de mutagenicidade e principalmente do conhecimento dos eventos que ocorrem nas fases do ciclo celular mitótico.

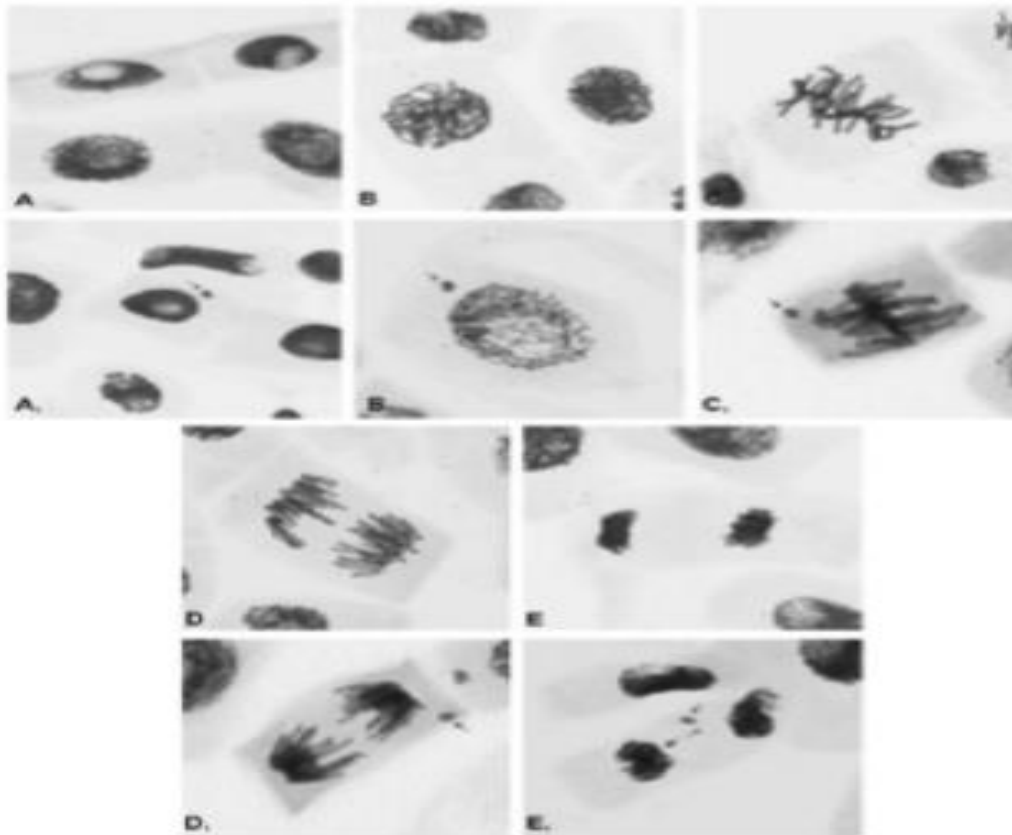
2 DESENVOLVIMENTO

O potencial genotóxico e mutagênico de uma amostra é avaliado através da detecção de aberrações cromossômicas (AC) em frequência aumentada nas células tratadas ou expostas em relação ao controle negativo (BAGATINI et al., 2007; FERREIRA et al., 2015; DA COSTA et al., 2016; DA SILVA LIMA et al., 2018). As aberrações cromossômicas são caracterizadas por quaisquer mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, que pode ocorrer de forma espontânea ou induzida pela exposição a agentes físicos e químicos (DIAS, et al., 2014).

Segundo Leme; Marin-Morales (2009), as alterações cromossômicas do meristema radicular das raízes de cebola de *Allium cepa* são excelentes indicadores para verificação de agentes genotóxicos presentes comprovados pela presença de alterações como micronúcleo, C-metáfase, pontes, quebra, perda, aderência e atraso cromossômica, célula binucleada, célula com multipolaridade e broto nuclear. E também mutagênicas quando existe perda e quebra de cromossomos e /ou quando ocorrem rearranjos do material genético de um cromossomo ou entre cromossomos (FERREIRA et al., 2016).

As anormalidades nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico, podendo ser uma consequência das aberrações mitóticas (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Uma das formas citológicas de anormalidade nuclear é a formação do micronúcleo (figura 1), que consiste num núcleo pequeno que se assemelha ao núcleo principal e que parecem nas células filhas em decorrência de danos não reparados ou reparados erroneamente, induzidos nas células parentais.

Figura 1: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos à agentes químicos. (A) Intérfase normal; (A1) Intérfase com micronúcleo; (B) Prófase normal; (B1) Prófase com micronúcleo; (C) Metáfase normal; (C1) Metáfase com micronúcleo; (D) Anáfase normal; (D1) Anáfase com micronúcleo; (E) Telófase normal; (E1) Telófase com micronúcleo.

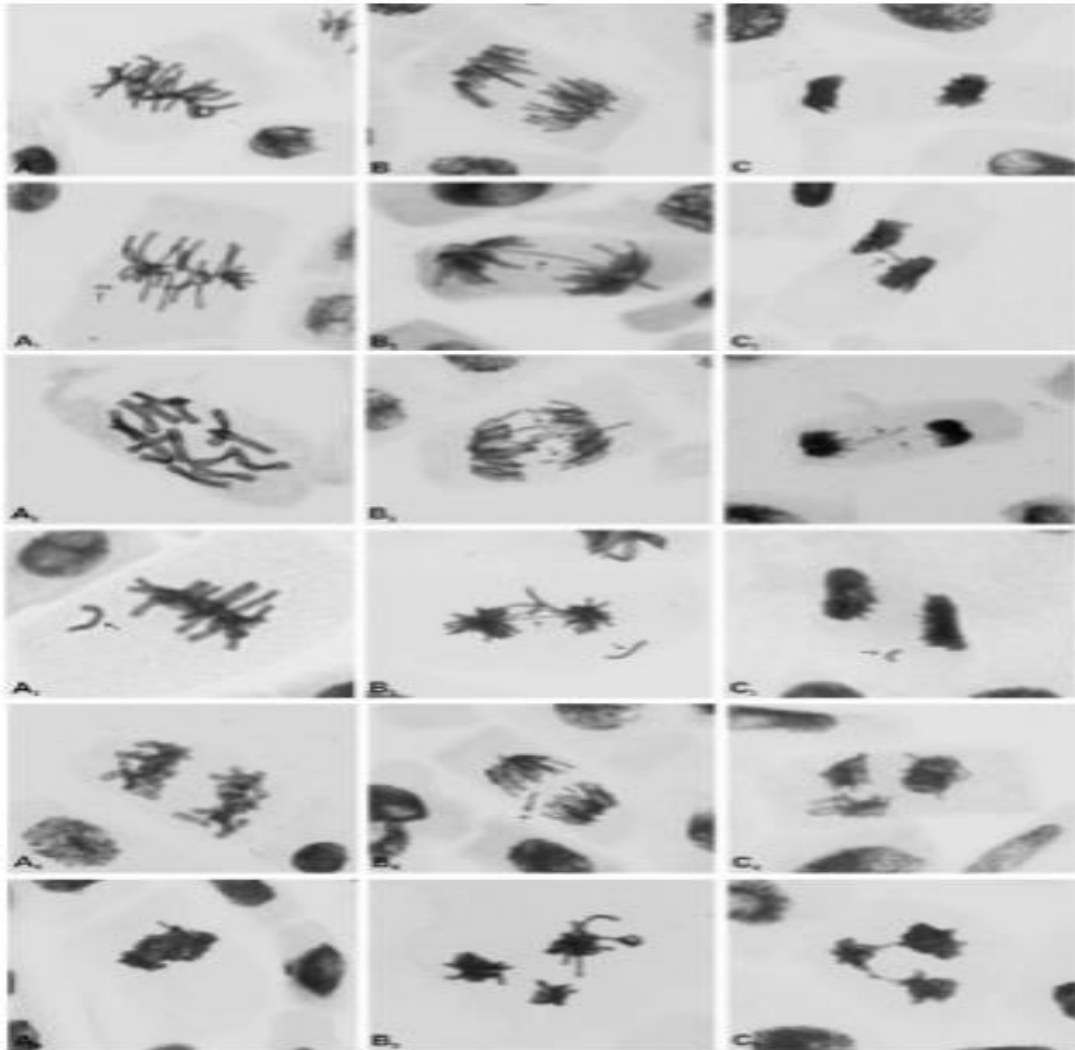


Fonte: Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009.

Segundo Fenech e Crott (2002), micronúcleos podem ser resultados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular. A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular (DE CARVALHO et al., 2017). O teste de micronúcleo permite inferir sobre o efeito genotóxico e mutagênico de compostos e amostras, a vantagem consiste em não depender do cariótipo da espécie envolvida, podendo ser aplicado em qualquer população de células (MACÊDO et al., 2008).

As C-metáfase (figura 2) se caracterizam pela inativação do fuso mitótico das células (FISKEJÖ, 1985), fazendo com que o ciclo celular seja interrompida na fase de metáfase, podendo assim ser observado o cromossomo espalhado pela célula muito condensado e com o centrômero bem definido (PIZZAIA, 2013). Também podem resultar em células multinucleadas, embora o resultado mais frequente sejam a indução de células poliplóides e de células com micronúcleos (FISKEJÖ, 1993).

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos à agentes químicos. (A) Metáfase normal; (A1) Metáfase com quebra cromossômica; (A2) C-metáfase; (A3) Metáfase com perda cromossômica; (A4) Célula binucleada em metáfase; (A5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B1) Anáfase com ponte cromossômica; (B2) Anáfase com quebra cromossômica; (B3) Anáfase com perda cromossômica e ponte; (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C1) Telófase com ponte cromossômica; (C2) Telófase com a perda cromossômica e ponte; (C3) Telófase com quebra cromossômica; (C4) Telófase multipolar; (C5) Telófase Multipolar com ponte cromossômica.



Fonte: Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009.

Célula com brotamento nuclear (figura 3), neste caso o núcleo mostra-se em constrição, formando um broto, esse broto possui mesma morfologia e coloração do núcleo e seu diâmetro pode variar de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ do tamanho do núcleo original, parece ser originado de um mecanismo de amplificação do DNA (TOMAZ et al., 2016).

As aderências ou cromossomos pegajosos com mostra na figura 3, são alterações na estrutura do cromossomo que forma uma aglomeração por causa da perda das características normais de condensação (BABICH et al., 1997).

As células binucleadas (figura 3) com dois núcleos principais de intensidade e tamanho semelhantes, geralmente os núcleos apresentam-se muito próximo, originada de falha na citocinese durante processo de replicação celular (TOMAZ et al., 2016). Ocasionalmente apresentam pontes nucleoplásmicas (PNP) entre os núcleos. Estes são provavelmente

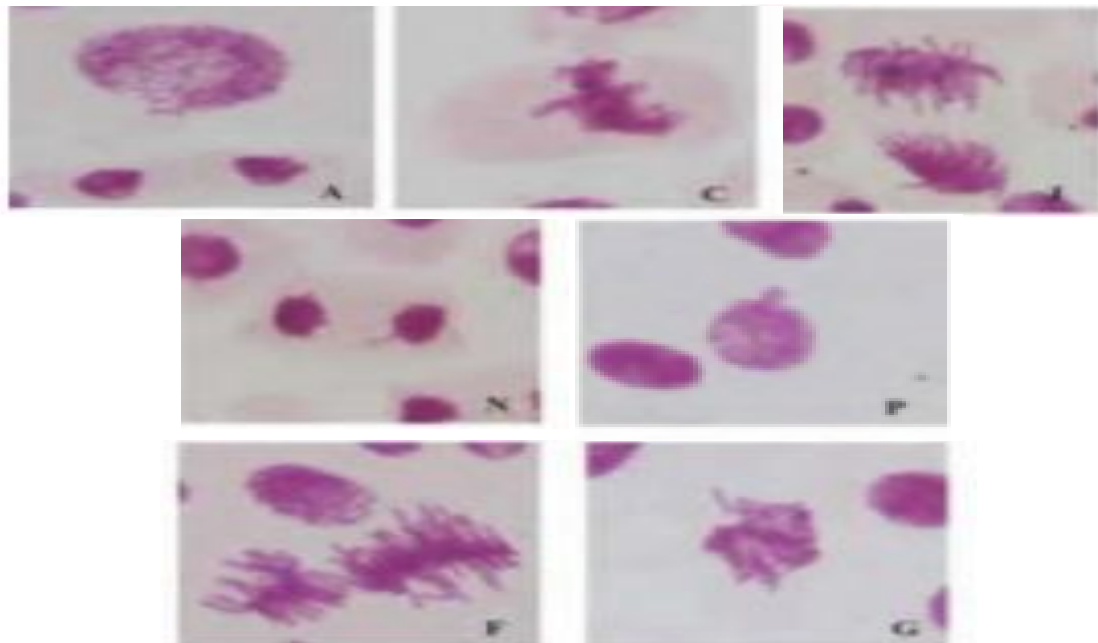
cromossomas dicêntricos em que os dois centrômeros foram deslocados para polos opostos da célula (VALENTE et al., 2017).

Dessa forma, as substâncias aneugênicas inativam o fuso mitótico e causam alterações como perda de cromossomo, c-metáfase, anáfases multipolares e cromossomo pegajoso (FENECH, 2000). Enquanto as clastogênicas provocam quebras cromossômicas, sendo possível observar na célula a presença de fragmentos e pontes em anáfase e telófase (ALMEIDA, 2013).

Em ambos os casos, os efeitos, quando da leitura dessas fitas, são variados, e vão desde a não expressão de um gene à expressão de um oncogene que, em sua posição original, era regulado (VALENTE et al., 2017).

Este mesmo autor explica que, os mecanismos de correção se encarregam de impedir que esses erros tenham maiores consequências, reparando-os, em que o processo de correção de quebras pode ocorrer de forma incorreta, resultando em outras aberrações cromossômicas estruturais, como deleções, formação de anéis, translocações e inversões, no processo de deleção ocorre a perda de um fragmento do cromossomo.

Figura 3 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa*. A) prófase poliplóide (seta); C) metáfase com aderência cromossômica; F) metáfase poliplóide (seta); G) anáfase com aderência cromossômica; J) anáfase poliplóide; N) telófase com atraso cromossômico (seta); P) broto nuclear (seta).



Fonte: Ambrósio 2012.

Deleções podem ser terminais, quando o cromossomo perde o final de um de seus braços, ou intersticiais, quando a deleção ocorre no meio do braço e a parte terminal deste se une a ele. A formação de anéis ocorre quando um cromossomo perde suas terminações dos braços p (braço curto) ou q (braço longo), com posterior junção de seus braços (VALENTE et al., 2017).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agentes genotóxicos e mutagênicos induzem alterações na molécula de DNA, podendo levar a um comprometimento das gerações futuras, pela característica de herdabilidade que apresentam, além de promover efeitos imediatos como o comprometimento da saúde dos

organismos expostos. Dessa forma as aberrações cromossômicas constituem ferramentas em estudos de investigação do potencial genotóxico, mutagênico e até carcinogênico de substâncias. Em que identificá-las corretamente, conhecer a nomenclatura exata, e em fase precisamente ocorrem são imprescindíveis para um estudo de análise citogenética.

Foi observado também que as aberrações cromossômicas podem ocorrer em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e são variadas, micronúcleo; quebra, ponte, aderência, perda e atrasos cromossômicos; célula binucleada, poliploide e multipolar; e broto nuclear.

REFERÊNCIAS

A descoberta do DNA e o projeto genoma. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 51, n. 1, p. 1 de fevereiro de 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010442302005000100001&lng=en&nrm=iso>. acesso em 19 de maio de 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302005000100001>.

ALMEIDA, Mara Ribeiro de. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes Tp53 e Ephx2 em ratos tratados com Caryocar villosum**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANDRADE E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p. 79-85, 2010.

ANVISA. PARECER Nº 7/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIARE/ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/18.+PTR+mutagenicidade.pdf/beba21d1-510a-439c-83e2-5e92cdec05eb?version=1.0>. Acesso em: 11 de abril de 2020.

BABICH, H.; SEGALL, M.A.; FOX, K.D. The Allium test - a simple, eukaryotegenotoxicity assay. *The American Biology Teacher*, Reston, v. 59, n. 9, p. 580-583, nov.-dec. 1997.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. de; TEDESCO, s. B. Divulgação Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, n.17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BARBOSA, B. F. F. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antimutagenicidade do fruto da palmeira Jaçara (*Uuterpe edulis* Martius) em ratos Wistar**. Ribeirão Preto, SP, 2014, 82p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

BEIGUELMAN, B. **GENÉTICA DE POPULAÇÕES HUMANAS**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

BERRA, Carolina M.; MENCK, Carlos FM; DI MASCIO, Paolo. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

DA COSTA, Mary Helen Pestana; DA SILVA, Priscila Cordeiro Costa; DA ROCHA, Carlos Alberto Machado. Efeitos do cromo hexavalente sobre o crescimento de raízes e ciclo celular no meristema da ponta da raiz de *Allium cepa*. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 6, n. 3, p. 40-44, 2016.

DA SILVA LIMA, Michele Vieira et al. Análise da citotoxicidade e genotoxicidade de *Hibiscus sabdariffa* L. in natura e industrializado, e comparação da toxicidade entre as formas analisadas da planta. **Multitemas**, v. 23, n. 55, p. 121-132, 2018.

DE CARVALHO, Luciane Gomes et al. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.

DEARFIELD, Kerry L. et al. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1-2, p. 121-135, 2002.

DELUNARDO, F. A. C. Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo. 2010. 82 p. Dissertação (Mestre em Ecologia de Ecossistemas) - Centro Universitário Vila Velha. Vila Velha. 2010.

DIAS, M.G.; CANTO-DOROW, T.S.; COELHO, A.P.D.; TEDESCO, S.B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Campinas, v.16, n.2, p.202-208, 2014.

EFSA Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA journal*. 2011; 9(9):2379.

FAGUNDES, Gabriela Elibio. Influência de sucos de hortaliças fonte de luteína e beta-caroteno sobre a genotoxicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos. 2013.

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

FENECH, Michael; CROTT, Jimmy W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 131-136, 2002.

FERREIRA, Rosinete; LIMA, R. N.; SOUSA, J. M. de C.; OLIVEIRA, E. C. A. Potencial Citotóxico E Genotóxico Das Águas Superficiais Do Rio Parnaíba Na Área Urbana Do Município De Floriano - Pi Em Sistema Teste Vegetal *Allium cepa* L. Monografia. p.92. 2016.

FERREIRA, R.; NUNES, N.M.F.; OLIVEIRA, E. C. A. Potencial genotóxico e citotóxico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. Através do bioensaio *Allium cepa*. In: 67ª Reunião Anual da SBPC, 2015, São Carlos - SP. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. São Carlos: Sociedade Brasileira de Progresso para a ciência. v. 67. p. 8293-8293, 2015.

FISKESJÖ, Geirid; *Allium cepa* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicological and Waters Quality*. 9:235–241, 1985.

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental toxicology and water quality**, v. 8, n. 3, p. 291-298, 1993.

GÜEZ, Camila Martins et al. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 461-467, 2012.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. de M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmacy Bonaerense**, Curitiba, v. 23, n.3, p. 418-24, 2004.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida; Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682: 71–81, 2009.

NAI, Gisele Alborghetti et al. Evaluation of genotoxicity induced by repetitive administration of local anaesthetics: an experimental study in rats. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 65, n. 1, p. 21-26, 2015.

OLIVEIRA, Rita de Cássia Silva de. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PIZZAIA, D. Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Tese – Genética e Melhoramento, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

RIBEIRO, Juliana Carvalho. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) in vivo**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. S. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

SILVA, A. A. da; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. **UNOPARUNOPAR Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 9, n. 1, p. 67-70, 2010.

TIAN, Yufen et al. Effect of Aldicarb Exposure on Cellular Immunity and Antioxidant Capacity in Kun-ming Mice. **Health**, v. 7, n. 07, p. 830, 2015.

TOMAZ, Bianca Caroline Alvim; DA SILVA FERRI, Raissa Negrelli; BOSCHINI FILHO, Júlio. Frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de pacientes anêmicos. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 18, n. 4, p. 214-220, 2016.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. “40 CFR Part 180, [EPA–HQ–OPP–2008– 0877; FRL–9344–1]. 2,4-D; Order Denying NRDC’s Peon To Revoke Tolerances,” Order. Federal Register vol. 77, no. 75, pp. 23135-23158, 2012.

VALENTE, Daniel et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. 2017.