

ALICE PITA BARBOSA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS CAUSADAS PELO ARSÊNIO,
GENOTOXIDADE E IMPORTÂNCIA DO MECANISMO *MISMATCH
REPAIR* NO REPARO DO DNA EM *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

*Aos meus queridos pais, Fernando e Elioni,
por me ensinarem que não há vitória sem batalha, dedico.*

Ao Gui, pelo amor, incentivo e companheirismo, ofereço.

Para alcançar os objetivos da vida, três coisas são necessárias: sonhar, planejar e executar.

Quando se tem um grande sonho, aliado a muito trabalho, persistência e coragem, nada no mundo é capaz de impedir a conquista dos objetivos almejados.

Basta sempre confiar em si mesmo e fazer o melhor possível;
as conquistas vêm naturalmente, como consequência...

...e depois que passamos por todas as dificuldades
reconhecemos o quanto somos capazes!

*“A vida está cheia de um potencial verdadeiramente incompreensível (...)
na maioria dos casos, nossas ditas limitações nada mais são
do que nossa própria decisão de nos limitarmos.”*

Daisaku Ikeda

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado. À FAPEMIG, pelos recursos concedidos para a execução do projeto de tese.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela orientação e confiança. Foi o principal incentivador da mudança profissional em minha vida: fazer doutorado nesse excelente programa de pós-graduação, o qual me permitiu desbravar novos horizontes, ao mesmo tempo ampliando e aprofundando meu ponto de vista em relação a diversos assuntos.

Aos professores conselheiros Adriano Nunes Nesi, Aristéa Alves Azevedo e Luiz Eduardo Dias, sempre muito atenciosos e bem dispostos a ajudar nos momentos necessários.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos em sala de aula e ótimo convívio. Um agradecimento especial ao professor Fábio DaMatta, com quem vivenciei agradáveis momentos de diversão.

Aos colegas de laboratório e do meio acadêmico em geral, pela ótima convivência e amizade. São tantos os amigos e colegas que nos dão força nos momentos de desânimo, dizendo “vai dar tudo certo”, que prefiro nem começar a citar nomes; cada um sabe a importância que tem para mim. Um agradecimento especial à Alyne Lavinsky, Camilo Vital, Danilo Daloso e Thomas Rhys pela preciosa ajuda concedida em algumas análises.

Aos laboratoristas e demais funcionários do DBV: Antônio Cordeiro, Carlos Raimundo, João, Luciene, Maria Mercês, Reginaldo, Rogério Gomide, Sânzio e Zé Antônio.

À(o)s amigo(a)s que fiz durante a minha passagem de seis anos por Viçosa, dos quais sempre lembrarei com muito carinho. Em especial às amigas que foram mais que colegas de curso e se tornaram inesquecíveis: Juliana Lanna, Letícia dos Anjos e, novamente, Alyne Lavinsky. Agradeço também à Francielle Lima, com quem compartilhei grande parte dos meus momentos durante o doutorado, tanto como estagiária, quanto como “irmã de república”.

Aos grandes responsáveis por esta conquista, meus pais, Fernando e Elioni, e ao meu irmão Rômulo, por terem sempre me apoiado e incentivado a seguir este caminho. À minha mãe, pelo amor incondicional, e ao meu pai, por ter sempre me incentivado a querer crescer profissionalmente através dos estudos.

Também aos meus queridos familiares que vieram me prestigiar no seminário de defesa de tese: vó Marluce, tia Fafá e padrinho Ronaldo; agradeço também à Larissa, minha afilhada, e ao meu avô Chiquito (*in memoriam*), que não puderam comparecer, mas sempre torceram para que tudo desse certo!

Por último, mas de importância maior, agradeço ao Guilherme, meu namorado, companheiro, marido, amigo e parceiro de todas as horas. Obrigada por ter enfrentado essa importante e difícil fase da minha vida ao meu lado, com muito amor, paciência e confiança de que tudo daria certo!

BIOGRAFIA

Alice Pita Barbosa, filha de Fernando Luiz Vaula Barbosa e Elioni Domingues Pita Barbosa, natural de Mirai/MG, nasceu em 21 de maio de 1985.

Em março de 2003 ingressou no curso de Ciências Biológicas, no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, em Coronel Fabriciano, onde obteve o título de Bacharel em Biologia da Conservação, em dezembro de 2006.

Em março de 2007 iniciou o Mestrado no programa de pós-graduação em Botânica, com ênfase em Anatomia Vegetal, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Realizou o trabalho de dissertação intitulado “Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)”, submetendo-se à defesa em março de 2009.

Em março de 2009 ingressou no Doutorado, no programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, com ênfase em Fisiologia Molecular de Plantas. No dia 02 de abril de 2013 submeteu-se à defesa de tese.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos químicos do arsênio	02
1.2. Efeitos tóxicos do arsênio ao ser humano	03
1.3. Efeitos tóxicos do arsênio em plantas	04
1.4. Genotoxicidade do arsênio	05
2. JUSTIFICATIVA	06
3. HIPÓTESES	07
4. OBJETIVOS	07
5. MATERIAIS E MÉTODOS	08
5.1. Linhagens de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas e condições de cultivo	08
5.2. Experimento com plantas WT	08
5.2.1. Quantificação de arsênio, macro e micronutrientes nos tecidos vegetais	09
5.2.2. Avaliação dos sintomas macroscópicos	10
5.2.3. Determinação dos teores de antocianinas	10
5.2.4. Análises micromorfológicas foliares	11
5.2.5. Determinação do teor relativo de água nas folhas	12
5.2.6. Avaliações fotossintéticas: trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	12
5.2.7. Quantificação de pigmentos cloroplastídicos	13
5.2.8. Determinação da atividade da enzima anidrase carbônica	13
5.2.9. Avaliação da temperatura superficial das plantas	13
5.2.10. Quantificação de açúcares	14
5.2.11. Quantificação dos teores de aldeído malônico	14
5.2.12. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais	15
5.2.13. Quantificação do extravasamento de eletrólitos	15
5.2.14. Determinação da localização de espécies reativas de oxigênio	16
5.2.15. Determinação dos teores de proteínas totais e carboniladas	16
5.2.16. Determinação da atividade da protease sinalizadora de apoptose caspase-3	17
5.2.17. Análise de expressão gênica	17
5.3. Experimento com mutantes <i>msh2</i> e confirmação dos homocigotos nulos	20
5.3.1. Avaliação da germinação e do crescimento radicular inicial	20
5.3.2. Análise de fenótipos macroscópicos e do estresse oxidativo em plantas adultas mutantes <i>msh2</i>	21
5.4. Experimento com plantas #11, #121, #166.2 e R3L66 para a determinação das taxas de mutações	21
5.5. Determinação da fragmentação do DNA em ápices radiculares de <i>Allium cepa</i>	21
5.5.1. Determinação da formação de micronúcleos e do índice mitótico	22
5.5.2. Eletroforese em gel de célula única	22
5.6. Análises estatísticas	24

6.	RESULTADOS	25
6.1.	Respostas fisiológicas e anatômicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (WT) ao arsênio	25
6.1.1.	Acúmulo e translocação de arsênio nos tecidos	25
6.1.2.	Sintomas macroscópicos da toxidez do arsênio	25
6.1.3.	Teor de antocianinas em folhas jovens e maduras	27
6.1.4.	Alterações micromorfométricas na lâmina foliar	28
6.1.5.	Efeitos do arsênio no teor relativo de água	29
6.1.6.	Efeitos do arsênio sobre as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila <i>a</i>	30
6.1.7.	Efeitos do arsênio sobre os teores de clorofilas e carotenoides	32
6.1.8.	Efeitos do arsênio na atividade da anidrase carbônica	34
6.1.9.	Efeitos do arsênio na temperatura de superfície das plantas	35
6.1.10.	Efeitos do arsênio sobre a produção de biomassa	36
6.1.11.	Efeitos do arsênio sobre os teores de açúcares	37
6.1.12.	Determinação do estresse oxidativo causado pelo arsênio	38
6.1.13.	Efeitos do arsênio sobre os teores de proteínas totais e carboniladas	41
6.1.14.	Efeitos do arsênio nos teores e translocação de macro e micronutrientes	41
6.2.	Efeitos genotóxicos do arsênio	44
6.2.1.	Confirmação da genotoxicidade do arsênio em raízes de <i>Allium cepa</i>	44
6.2.2.	Efeitos do arsênio sobre a expressão gênica	45
6.2.3.	Determinação das taxas de mutação em plantas transgênicas repórteres de diferentes tipos de mutações	48
6.2.4.	Efeitos do arsênio em mutantes <i>msh2</i>	50
6.2.5.	Alterações na atividade da protease caspase-3	54
7.	DISCUSSÃO	55
7.1.	A exposição ao arsênio em sistema hidropônico promoveu acúmulo desse metalóide na raiz e aumento do fator de translocação para a parte aérea	55
7.2.	O arsênio promoveu aumento da síntese de antocianinas, principalmente nas folhas maduras	57
7.3.	Os danos à superfície radicular afetaram o acúmulo de nutrientes na raiz e o status hídrico das plantas, alterando o desenvolvimento foliar	58
7.4.	O arsênio promoveu redução da condutância estomática e danos à etapa fotoquímica e bioquímica da fotossíntese	59
7.5.	A exposição ao arsênio promoveu estresse oxidativo no sistema radicular e na parte aérea e induziu a expressão de genes codificadores de oxidases alternativas	61
7.6.	A exposição ao arsênio promove aumento dos níveis de fragmentação do DNA, da expressão de genes relacionados ao mecanismo “mismatch repair” e das taxas de mutações	62
7.7.	O arsênio inibiu uma protease do tipo caspase, enzima-chave da principal rota sinalizadora de morte celular programada	64
8.	CONCLUSÃO	68
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

BARBOSA, Alice Pita. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Alterações fisiológicas causadas pelo arsênio, genotoxicidade e importância do mecanismo mismatch repair no reparo do DNA em *Arabidopsis thaliana***. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

O arsênio (As) é um elemento não só tóxico, mas também altamente genotóxico aos seres vivos. Muitas lacunas precisam ser preenchidas com relação aos processos causadores de toxicidade do As em plantas, bem como os mecanismos de tolerância e sensibilidade a este metalóide. Para isso, plantas de *Arabidopsis thaliana* (WT, mutantes *msh2* e transgênicas repórteres em mutações) e *Allium cepa* foram expostas a 0, 2, 8 e 16 mg As L⁻¹, durante cinco dias, em sistema hidropônico ou em meio de cultura. As plantas acumularam grandes teores de As nas raízes e apresentaram elevado fator de translocação para a parte aérea, e também alterações no acúmulo de nutrientes. Os sintomas visuais se intensificaram com o aumento da concentração de As na solução nutritiva. As raízes adquiriram coloração escura e aspecto gelatinoso, danificado e aumento no comprimento e densidade dos pêlos; a parte aérea apresentou aumento dos teores de antocianinas e sinais de senescência precoce, bem como alterações na espessura de tecidos. O estresse oxidativo e a redução dos teores de fósforo foram apontados como os principais efeitos do As capazes de causar toxidez, evidenciando os danos indiretos deste elemento no organismo. Foram verificadas importantes alterações fotossintéticas, bem como indícios de danos ao processo de respiração celular devido o aumento da expressão de genes codificantes de oxidases alternativas. Também foram observadas alterações nos teores de açúcares em folhas jovens, maduras e raízes. O As promoveu fragmentação do DNA nos ápices radiculares de *A. cepa* e aumento das taxas de mutação pontual e de recombinação-não homóloga em *A. thaliana*. O significativo aumento da expressão dos genes *msh2* e *msh7*, codificadores de enzimas-chave do processo *mismatch repair*, que realiza o reparo de bases danificadas ou erroneamente inseridas no DNA, sugeriu a importância deste mecanismo no combate à genotoxicidade do As em *A. thaliana*. Isso foi confirmado pela maior sensibilidade observada nas plantas mutantes *msh2* ao As, detectada visualmente via aumento da peroxidação de lipídios. Observou-se inibição da atividade da protease caspase-3, associada ao processo de morte celular programada, reforçando a capacidade de inibição da atividade enzimática pelo As.

ABSTRACT

BARBOSA, Alice Pita. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 2013. **Physiological changes caused by arsenic, genotoxicity and importance of mismatch repair mechanism in DNA repair in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro.

Arsenic (As) is not only a toxic element, but also highly genotoxic to living organisms. Several gaps in our understanding of As toxicity in plants need to be filled, including the mechanisms that result in tolerance and sensitivity to this metalloid. For this reason *Arabidopsis thaliana* plants (WT, *msh2* mutants and transgenic reporters in mutation process) and *Allium cepa* were exposed to 0, 2, 8 e 16 mg As L⁻¹, for five days, in a hydroponic system or in culture medium. The plants accumulated large amounts of As in roots and presented a high translocation factor to the shoot, and also showed changes in nutrient accumulation. The visual symptoms have intensified with the increasing of As concentration in the nutritive solution. Roots showed dark coloration and a damaged and gelatinous aspect, with increased roots hair length and density. The shoots showed accumulation of anthocyanins and signs of early senescence, as well as changes in tissue thickness. Oxidative stress and reduction of phosphorus concentration in tissues have been implicated as the main cause of toxicity, evidencing the indirect damage from this element in the organism. Important changes in photosynthesis were observed, as signs of damage to respiration, due to increased expression of alternative oxidase genes. Thus, changes in the levels of synthesis and utilization of sugars by plants were observed. As promoted DNA fragmentation in *A. cepa* and increased rates of point mutation and nonhomologous recombination. The significant increase in the expression pattern of the *msh2* and *msh7* genes, which encode key enzymes in DNA repair process, suggests the importance of this mechanism in defense against As genotoxicity in *A. thaliana*. This was confirmed by the greater sensitivity observed in *msh2* mutants to As as indicated by visual symptoms and by an increase in lipid peroxidation. Inhibition of the activity of the caspase-3 protease was also observed, evidencing the As capacity of enzyme activity inhibition.

1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metalóide existente em ambientes aquáticos, terrestres e até na atmosfera, e é tóxico para praticamente todos os tipos de vida. Predomina sob as formas de radicais inorgânicos arsenato (AsO_4^{-3}) e arsenito (AsO_3^{-3}) (Tripathi et al. 2007). Mais de duzentos minerais contêm As em sua composição, fazendo com que este elemento seja continuamente disponibilizado no ambiente via intemperismo de rochas (Simon et al. 1999, Mandal e Suzuki 2002, O'Shea et al. 2007).

No Brasil, a mineração é uma das atividades economicamente mais relevantes e a principal responsável pela liberação de quantidades elevadas de As no ambiente, visto que o minério aurífero pode conter até 11% desse elemento em sua composição (Borba et al. 2003). A região do Quadrilátero Ferrífero, situada no estado de Minas Gerais, destaca-se devido o grande número de minas ativas e/ou já desativadas, o que representa um risco ambiental muito significativo (Matschullat et al. 2000, Borba et al. 2004, Daus et al. 2005). Outras atividades antropogênicas responsáveis pela liberação de elevados teores de As no ambiente são a aplicação de pesticidas (Folkes et al. 2001), preservação de madeiras (Hingston et al. 2001), manufatura de vidro (Vuyyuri et al. 2006), fundição de metais (Smith et al. 1998) e fabricação de revestimentos anti-incrustantes (Kopylov et al. 2007).

A contaminação ambiental por As pode resultar em um problema alarmante, como ocorre em algumas regiões da Ásia (principalmente Bangladesh e Bengala Ocidental), onde a ingestão contínua de água contaminada com até $14,2 \text{ mg As L}^{-1}$ (Mazumder 2008) já causou inúmeras patologias cancerígenas e/ou não cancerígenas em milhões de pessoas (Mazumder et al. 1988, WHO 2001, Hopenhayn 2006, Hossain 2006). Ressalta-se que a concentração máxima de As na água recomendável para consumo humano é de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ (WHO 2001) e que valores superiores também já foram detectados na China (Sun 2004), Taiwan (Chen et al. 1994), Chile (Borgoño et al. 1977), México (Armienta e Segovia 2008), Argentina (Bhattacharya et al. 2006) e Estados Unidos (Welch et al. 2000).

O efeito tóxico do As também é observado em plantas e a sua fitotoxicidade depende, principalmente, da sua forma química, concentração, duração da exposição e do estado fisiológico da planta (Singh et al. 2007), além da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie (Gonzaga et al. 2006). A absorção do As ocorre através da raiz e a taxa de translocação deste elemento para a parte aérea geralmente é baixa (Zhao et al. 2009). Por este motivo os danos mais severos acometem o sistema radicular, onde o elemento se acumula

em maiores proporções (Quaghebeur e Rengel 2004), mas a parte aérea também pode ser muito prejudicada (Mylona et al. 1998). O As é comumente associado a alterações no crescimento, à ocorrência de estresse oxidativo e até morte celular. Entretanto, ainda são escassos os relatos acerca dos seus efeitos na fotossíntese, por exemplo. Danos oxidativos e ao genoma são muito citados (Mylona et al. 1998, Yi et al. 2007), mas os mecanismos específicos de ação do As e de defesa das plantas contra esses danos ainda são alvo de inúmeros questionamentos e ainda há muitas perguntas a serem respondidas.

1.1. Aspectos químicos do arsênio

O arsênio (As) é um elemento químico com número atômico 33 e massa atômica 74,92 u. É um metalóide pertencente ao grupo 15 (VA) da Tabela Periódica dos Elementos e ocorre naturalmente em inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos. Mais de duzentos minerais contêm As naturalmente em sua composição, destacando-se o realgar (AsS), ouropigmento (As₂S₃) e arsenopirita (FeAsS) (Simon et al. 1999, Mandal e Suzuki 2002).

O As pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5 (De Sesso et al 1998). O tipo de espécie inorgânica predominante em um certo local depende do potencial hidrogeniônico (pH) e do potencial redox (Eh) do meio (Masscheleyn et al. 1991). No ambiente, o arsenito é facilmente oxidado a arsenato pelo oxigênio atmosférico, fazendo com que esta última seja a forma predominante de As na natureza (Abedin et al. 2002). O arsenito predomina em meios anaeróbicos, onde o arsenato é facilmente reduzido a arsenito (Abedin et al. 2002). A toxicidade das espécies de As decresce na seguinte ordem: compostos de As⁺³ inorgânicos > compostos de As⁺⁵ inorgânicos > compostos de As⁺³ orgânicos > compostos de As⁺⁵ orgânicos. O arsenato (valência +5) é a forma mais comum do As no ambiente pois predomina em ambientes aeróbicos (Masscheleyn et al. 1991, Abedin et al. 2002).

As espécies inorgânicas de As são cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas; o As⁺³ inorgânico é cerca de 60 vezes mais tóxico que o As⁺⁵ inorgânico. Nos seres vivos podem ocorrer processos variados que realizam a conversão de formas extremamente tóxicas de As em formas menos tóxicas e/ou biodisponíveis (De Sesso et al. 1998, Dhankher et al. 2006). Alguns microrganismos são capazes de promover a metilação de oxianions de As, levando à formação de compostos organometálicos como os ácidos metilarsênico e o dimetilarsênico (Cullen e Reimer 1989). Já nas células vegetais pode ocorrer a conversão de

As⁺⁵ em As⁺³, mesmo esta última sendo mais tóxica, como pré-requisito para a captura e imobilização do As no vacúolo celular (Dhankher et al. 2006).

1.2. Efeitos tóxicos do arsênio ao ser humano

A intoxicação por As pode resultar em efeitos agudos ou crônicos. As intoxicações agudas geralmente estão relacionadas à ingestão ou inalação de concentrações elevadas de As por um curto período de tempo, enquanto as crônicas são ocasionadas por concentrações baixas ou até mesmo traço, por um período de tempo prolongado (Jana et al. 2006, Chang et al. 2007). Estudos realizados em humanos mostraram que após exposições prolongadas ao As (mesmo em concentrações baixas), elevados níveis deste poluente podem ser encontrados nos ossos, pele, cabelos e unhas por longos períodos de tempo (Borgoño et al. 1977, Mandal et al. 2003). A contaminação humana por As foi pesquisada por Matschullat et al. (2000), que encontraram concentrações entre 2 e 106 µg/L de As nas amostras de urina de crianças de 7 a 12 anos de idade residentes no Quadrilátero Ferrífero; cerca de 22% das crianças apresentaram urina com concentrações superiores a 40 µg/L, para as quais efeitos adversos não podem ser excluídos.

Os efeitos carcinogênicos da intoxicação por As estão associados à exposição crônica por vários anos. Os tipos de câncer mais comumente associados são os de pele, pulmão, próstata, bexiga, fígado e rim (Waalkes et al. 2003, Modi et al. 2006, Bastrup et al. 2008). A intoxicação aguda e crônica por As pode provocar outras doenças, tais como: hiperpigmentação, hiperqueratose, diarreia, hemorragias gastrointestinais, arritmias cardíacas, hipotensão, falha congestiva no coração, alterações vasculares, gangrena, distúrbios hematológicos, fibrose pulmonar, dores de cabeça, confusão mental, alteração no metabolismo de carboidratos e na respiração celular, abortos espontâneos e geração de fetos com baixo peso (WHO 2001).

Apesar dos efeitos tóxicos do trióxido de arsênio (As₂O₃), este composto tem recebido atenção especial devido seu potencial terapêutico no tratamento de diferentes tipos de tumores (Liu et al. 2006). O trióxido de arsênio foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como agente quimioterápico no tratamento da leucemia promielocítica aguda. Atualmente, encontra-se literatura científica um grande número de trabalhos com triagens clínicas para a avaliação da eficácia do composto de As em questão como agente terapêutico

(Litzow 2008). No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dessa ação paradoxal do As, agindo ora como agente carcinogênico, ora como quimioterápico.

1.3. Efeitos tóxicos do arsênio às plantas

A absorção de arsenato pelas plantas ocorre pela raiz, através de transportadores de fosfato de alta afinidade. Isso ocorre devido à alta similaridade química existente entre esses radicais, o que faz com que o arsenato seja absorvido como um análogo químico não funcional do fosfato, fazendo-os competir fortemente entre si. Assim, a absorção de arsenato pela raiz é influenciada pelo teor de As existente no ambiente ou nos tecidos vegetais; em geral, maiores teores de fosfato no ambiente ou na planta promovem menores taxas de absorção de arsenato pelas raízes (Meharg e Macnair 1994).

A similaridade química entre o arsenato e o macronutriente fosfato resulta na substituição do fosfato pelo arsenato em processos metabólicos vitais. Durante a síntese de adenosina trifosfato (ATP), a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi), pode-se formar um composto do tipo ADP-As, cuja ligação química armazena pouca energia, ao contrário do ATP. Isso faz com que o As seja um desacoplador da síntese de ATP nos processos de transporte de elétrons da respiração celular e da fotossíntese. O arsenato também é um desacoplador da glicólise, pois pode substituir o fosfato inorgânico no passo da glicólise que produz 1,3-bisfosfoglicerato, produzindo antes 1-arseno-3-fosfoglicerato, molécula instável e facilmente hidrolisável, formando o próximo intermediário do processo, o 3-fosfoglicerato. Assim, a glicólise ocorre, mas não há a formação da molécula de ATP que seria gerada a partir do 1,3-bisfosfoglicerato (Byers et al. 1979).

A destoxificação do As é fundamental para a manutenção da homeostase celular nas células vegetais e envolve a participação de glutatona (peptídeos não-protéicos ricos em grupos tióis com estrutura $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$, em que $n = 2$ a 21) e fitoquelatinas (formadas pela união de moléculas de glutatona) (Bleeker et al. 2006). Esse processo baseia-se na conversão do arsenato em arsenito, efetivada pela enzima arsenato redutase (AR), com a posterior captura do arsenito por moléculas de glutatona e fitoquelatina, seguida pelo armazenamento do composto formado, no vacúolo. Este processo de redução é necessário para a captura do As pelas glutatona e fitoquelatinas, as quais apresentam elevada afinidade pelo radical arsenito, mas não pelo arsenato. Durante a redução ocorre a concomitante oxidação de NADPH, o qual doa elétrons ao dímero glutatona oxidada (GSSG) pela enzima

glutationa redutase (GR), formando 2 moléculas de glutaciona reduzida (GSH); a GSH, por sua vez, atua como doadora de elétrons para a AR, que reduz o arsenato a arsenito (Delnomdedieu et al. 1994, Raab et al. 2005, Dhankher et al. 2006, Ellis et al. 2006). Ressalta-se que o arsenito é a forma de As inorgânico mais tóxica para a maior parte dos seres vivos por reagir com o grupo sulfidril (-SH) de enzimas e outras proteínas, levando à inibição das funções celulares vitais e morte celular (Delnomdedieu et al. 1994).

O As que não é complexado e armazenado nos vacúolos das células radiculares pode ser translocado para a parte aérea, mas em geral a taxa de translocação é baixa (Zhao et al. 2009). Mesmo assim, sintomas de toxidez podem ser notados na parte aérea de plantas expostas ao As, como murcha (Pita-Barbosa 2009) e aumento na atividade de enzimas antioxidantes (Felipe et al. 2009). Os efeitos sobre o processo fotossintético são pouco claros, mas sabe-se que danos ocasionados pelo As ao processo fotossintético, processo até hoje pouco estudado, pode promover o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs.) De acordo com Requejo e Tena (2005), o estresse oxidativo causado pelo As pode ser o principal fator responsável pela sua fitotoxicidade. Esses autores identificaram aumento nos níveis de diferentes isoformas de enzimas antioxidativas, através da análise proteômica do efeito da exposição de *Zea mays* (milho) ao As, ilustrando a complexa participação do mecanismo antioxidativo na tolerância ao As (Requejo e Tena 2005). Além das perturbações metabólicas, Pita-Barbosa (2009) e Singh et al. (2007) verificaram modificações estruturais em raízes de plantas expostas ao As, como alterações micromorfométricas, inibição no crescimento/desenvolvimento de raízes laterais e alterações no padrão de divisão celular de células do câmbio e do felogênio, o que pode, possivelmente, ser atribuído a disfunções genéticas nessas células.

1.4. Genotoxicidade do arsênio

Uma questão ainda muito controversa é o potencial genotóxico do As. Vários efeitos deletérios ao DNA já foram observados em células radiculares de plantas expostas a este elemento, tais como aberrações em cromátides, trocas de cromátides irmãs (Grant 1982), aumento nas taxas de micronúcleos (Ma et al. 1995, Pita-Barbosa 2009, Wu et al. 2010), redução do índice mitótico (Yi et al. 2007) e alterações na expressão gênica (Mylona et al. 1998). Entretanto, ainda não está claro se estes efeitos devem-se diretamente ao As, ou se

seriam resultado indireto, por exemplo, do estresse oxidativo gerado (Mylona et al. 1998) ou, ainda, da inibição de enzimas relacionadas ao reparo do DNA (Schaumloffel e Gebel 1998).

Como dito anteriormente, um dos efeitos mais marcantes da toxidez do As é o estresse oxidativo, que leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e dos teores de aldeído malônico (MDA), produto da peroxidação de lipídios de membrana. Quando em grandes quantidades na célula, as EROs e o MDA podem reagir com o DNA, danificando-o e alterando sua funcionalidade, podendo causar até mesmo morte celular (Marnett 1998, Roldán-Arjona e Ariza 2009). As lesões no DNA mais frequentes oriundas dos efeitos de agentes genotóxicos são: inserção incorreta, perda e alteração da composição química de bases nitrogenadas e nucleotídeos; deleção e inserção errônea de trechos de DNA; dímeros de pirimidina; quebras em fita simples ou dupla do DNA (uma única quebra de fita dupla pode causar a morte da célula), recombinação intra/intercromossômica, entre outros. Entretanto, certos danos podem ser revertidos através de mecanismos de reparo do DNA por meio da ação de enzimas de reparo, cuja síntese é regulada em nível transcricional e pós-transcricional. Algumas das principais enzimas de reparo são as do sistema *mismatch repair*, que reparam mutações pontuais (*msh2*, *msh3*, *msh6* e *msh7*), as relacionadas com a recombinação homóloga (*recA*, *rad51*), não-homóloga (*ku70*), além de helicases e outras (Tuteja et al. 2001).

Apesar do conhecimento sobre os danos causados pelo As nas plantas, estudos que inter-relacionem essas alterações são necessários para que biomarcadores da presença do As no ambiente sejam corretamente identificados e aplicados aos estudos de monitoramento ambiental. Em contraste com as análises químicas para a simples quantificação de As acumulado no solo, na água e em tecidos vegetais, os biomarcadores podem fornecer um perfil mais completo e relevante acerca do impacto do As sobre a saúde dos seres vivos (Wong et al. 2000), pois representam uma resposta integrada entre fatores químicos e biológicos, além de levar em consideração os fatores climáticos e edáficos.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de uma planta nativa como bioindicadora de As exige a seleção prévia de biomarcadores fisiológicos, anatômicos e moleculares, e os mecanismos que conferem sensibilidade/tolerância ao As são mais facilmente estudados quando se utiliza uma espécie modelo como objeto de estudo. *Arabidopsis thaliana* é uma das espécies vegetais mais

utilizadas na pesquisa científica. Apesar de não apresentar importância econômica direta, esta espécie vem sendo o foco de importantes pesquisas nas mais diversas áreas da ciência. Assim como a bactéria *Escherichia coli*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o artrópode *Drosophila melanogaster*, *A. thaliana* é considerada uma planta modelo por apresentar as seguintes características: pequeno tamanho, ciclo de vida curto, fácil manipulação, autogamia, produção de grande quantidade de sementes por planta, além do genoma reduzido e bem conservado durante o processo evolutivo. Cerca de 85% do genoma de *A. thaliana* é composto por genes propriamente ditos, enquanto no trigo, por exemplo, mais de 99% do genoma corresponde a regiões não codificantes. Este fato faz com que o seqüenciamento, isolamento e, por conseqüência, o entendimento das funções de cada gene em *A. thaliana* possa ser realizado com maior rapidez e menor custo (Delatorre e Silva 2008).

3. HIPÓTESES

Hipotetiza-se que o arsênio se acumulará nas raízes de *A. thaliana*, apresentando baixo fator de translocação e causando danos diretos ao sistema radicular e indiretos à parte aérea. O processo fotossintético será afetado e haverá aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, o que estimulará a expressão de genes relacionados à defesa das plantas. O As também atuará como um agente genotóxico, promovendo aumento no número de mutações no DNA.

4. OBJETIVOS

- ✓ Investigar e correlacionar os mecanismos mais utilizados por *Arabidopsis thaliana* na defesa contra o As.
- ✓ Identificar os alvos mais sensíveis à ação do arsênio.
- ✓ Elucidar os processos causadores de (geno)toxicidade do arsênio em *A. thaliana*.
- ✓ Avaliar a importância do sistema *mismatch repair* na defesa de *A. thaliana* contra o arsênio.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Linhagens de *Arabidopsis thaliana* utilizadas e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), pertencentes às linhagens *Wild Type* (WT), salk_002708 (mutante *msh2*) (Alonso et al. 2008), #11 (repórter de recombinação homóloga), #121 (repórter de instabilidade de microsátélites), #166.2 (repórter de mutação pontual) (Yao e Kovalchuk 2011) e R3L66 (repórter de recombinação não-homóloga) (Li et al. 2004). As construções para obtenção do mutante e das linhagens transgênicas foram descritas pelos respectivos autores.

Os experimentos foram conduzidos em Viçosa, Minas Gerais (20°45'14"S/42°52'55"O, 650 m de altitude), em sala climatizada portando as condições ideais de cultivo de *Arabidopsis* (fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, temperatura de 20-22 °C e umidade relativa do ar de 70-77%,) localizada na Unidade de Crescimento de Plantas, nas instalações da UFV.

5.2. Experimento com plantas WT

Sementes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo “Columbia” (Col-0) foram germinadas e, após 30 dias, as plantas foram expostas ao As em sistema hidropônico, para obtenção de um sistema radicular mais desenvolvido que o de plantas cultivadas em substrato/solo (Fig. 1f). Para a montagem desse sistema, microtubos com 0,6 mL de capacidade foram preenchidos com ágar (dissolvido em solução nutritiva de Clark 50%, pH 5,8) (Clark 1982) e colocados em caixas para ponteiras do tipo P1000. As sementes foram descontaminadas com etanol 70% (5 min), lavadas três vezes com água autoclavada e, em seguida, depositadas uma a uma na superfície do ágar (Fig. 1a). As caixas foram preenchidas com água, para a manutenção da umidade, fechadas e vedadas com filme plástico. Após dez dias, tempo necessário para que ocorresse a germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas (Fig. 1b), a água foi substituída por solução nutritiva de Clark 100%, pH 5,8, e o ápice de cada tubo foi cortado, permitindo o crescimento das raízes em direção à solução nutritiva. As caixas permaneceram fechadas por mais uma semana e, após este período, as tampas foram abertas aos poucos, até serem totalmente removidas. Passada mais uma semana (Fig. 1c), as plantas foram cuidadosamente transferidas para recipientes com 3 L de capacidade (Fig. 1d-e). A solução nutritiva foi trocada a cada três dias, permitindo a renovação dos nutrientes e da oxigenação.

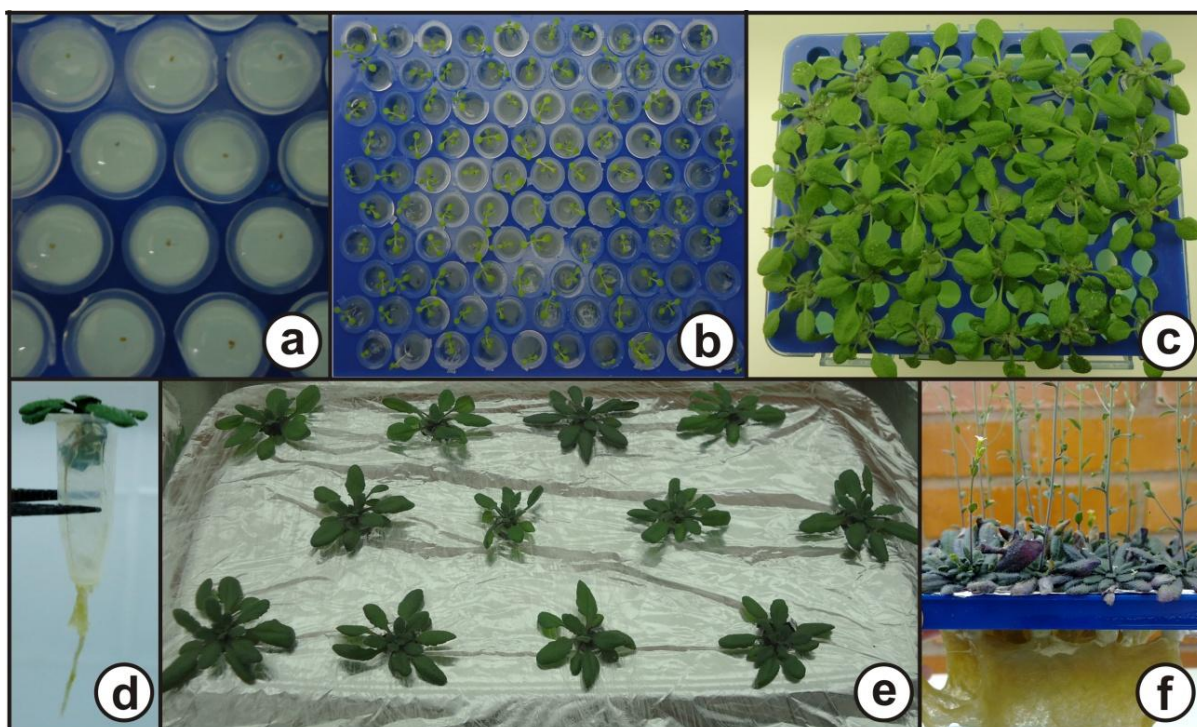


Fig. 1. Sistema hidropônico utilizado para o cultivo e exposição das plantas de *Arabidopsis thaliana* ao arsênio. **a.** Sementes sobre a superfície de agar. **b.** Plântulas com 10 dias de idade. **c.** Plantas com, aproximadamente, três semanas de idade. **d.** Detalhe do tubo em que as plantas foram cultivadas. **e.** Plantas com quatro semanas, antes do início do experimento. **f.** Plantas em fase reprodutiva. Raízes abundantes.

A exposição ao As teve início após 30 dias de cultivo, quando as plantas já apresentavam biomassa suficiente para a realização das análises. Foi adicionado As à solução de Clark, na forma de arsenato de sódio (Na_2HAsO_4), para a obtenção dos tratamentos contendo 2, 8 e 16 mg As L^{-1} , nos quais as plantas permaneceram por cinco dias consecutivos. Para o tratamento controle utilizou-se somente solução de Clark. 100% O pH da solução foi ajustado para 5,8 após a adição do As e a cada dois dias. Após o término da exposição, amostras foram coletadas para a realização de análises diversas, como será descrito a seguir.

5.2.1. Quantificação de arsênio, macro e micronutrientes nos tecidos vegetais

Amostras de 0,3 g de folhas e 0,1 g de raízes ($r = 5$) foram secas em estufa de ventilação (70 °C), por 72 h, e trituradas. Antes da secagem as raízes foram lavadas com água destilada, para a remoção do excesso de solução nutritiva e, conseqüentemente, do As adsorvido na superfície da raiz. As amostras foram pré-digeridas em solução nitroperclórica (ácido nítrico, ácido perclórico, 3:1 v/v) durante 12 h e, em seguida, digeridas em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, que foi sendo elevada gradualmente, até atingir 180

°C, para completar a digestão (Tedesco et al. 1995). A dosagem dos teores de As, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn nos extratos das plantas foi obtida por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) no comprimento de onda de 193 nm. Foi confeccionada uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de todos os elementos analisados, para a obtenção do teor dos mesmos nos tecidos vegetais.

A partir dos teores de As encontrados nas raízes e parte aérea foi possível calcular o fator de translocação (FT), que é definido como a razão entre a concentração do elemento na parte aérea e a concentração no sistema radicular (Huang et al. 2006).

5.2.2. Avaliação dos sintomas macroscópicos

Em cada tratamento foram selecionadas quatro plantas com tamanho e aparência homogêneos, para o acompanhamento dos sintomas de toxidez (por meio de registro fotográfico da raiz e parte aérea, antes e após a exposição ao As) e realização das análises de crescimento.

Após o término da exposição, realizou-se a pesagem da raiz e parte aérea separadamente, para a obtenção da massa fresca. O excesso de água presente na superfície das raízes foi removido com papel absorvente. Em seguida, as amostras foram deixadas para secar em estufa de ventilação (70 °C), por 72 h, para a obtenção da massa seca. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

5.2.3. Determinação dos teores de antocianinas

Um disco foliar com aproximadamente 0,01 g ($r = 5$) foi imerso em 1 mL de metanol acidificado (0,1% HCl, v/v) gelado e mantido a 4 °C no escuro, por 24 h. Realizou-se a leitura das absorvâncias do extrato, utilizando-se somente metanol acidificado como branco. As concentrações de antocianina (AA) foram calculadas de acordo com a seguinte equação de Murray e Hackett (1991), aplicando-se o fator de correção do efeito da clorofila por meio da subtração de 24% da absorvância com comprimento de onda que confere máxima absorção da clorofila: $AA(\mu\text{g mL}^{-1}) = A_{532} - 0,24 A_{653}$. Os valores foram expressos por massa fresca.

5.2.4. Análises micromorfométricas foliares

Porções de regiões aparentemente sadias de folhas jovens e maduras pertencentes aos tratamentos controle e contendo 8 mg As L⁻¹ foram fixadas em solução contendo glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) preparados em tampão cacodilato de sódio (pH 7.2), com adição de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky 1965). Após desidratação em série etílica, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) para a obtenção de cortes transversais (4 µm de espessura) em micrótomo rotativo de avanço automático RM 2155 (Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, EUA). Os cortes foram corados com azul de Toluidina/pH 4.0 (O'Brien and McCully 1981) e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se Permount (Fisher Scientific, New Jersey, NY, USA) como meio de montagem. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (Olympus, modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Visando detectar alterações no crescimento e desenvolvimento das células/tecidos foliares causadas pelo As, realizou-se a análise micromorfométrica em cortes transversais (5 µm) para a detecção de alterações na espessura da folha, das faces adaxial e abaxial da epiderme, do mesofilo e dos parênquimas paliádico e lacunoso. As análises foram realizadas sempre entre a margem e a nervura mediana (Sant'Anna-Santos et al. 2012) da região central das folhas. Para a obtenção da espessura média (E_m) das folhas foi obtida a área, em secção transversal, de cada um dos parâmetros, a qual foi convertida em espessura média pela fórmula: $E_m = \text{área em secção transversal} / 1000$ (comprimento, em micrômetros, da região analisada).

Para cada tratamento foram confeccionados quatro blocos de historresina (cada um proveniente de uma planta diferente), cada qual contendo três fragmentos foliares (provenientes de folhas diferentes de uma mesma planta). Foram obtidas quatro lâminas por bloco, totalizando 48 observações (4 blocos x 3 fragmentos x 4 lâminas); portanto, cada tratamento dispôs de quatro repetições biológicas ($r = 4$), com 12 replicatas cada. Para que não fossem contabilizados cortes provenientes de regiões adjacentes, uma distância de 100 µm foi deixada entre cada corte. As medições foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagens Image Pro Plus versão 5.1.

5.2.5. Determinação do teor relativo de água nas folhas

O teor relativo de água (TRA) foi determinado através do método da submersão de discos foliares. Para cada tratamento, cinco discos foliares ($r = 5$) com $0,6 \text{ cm}^2$ foram coletados e imediatamente pesados, evitando-se perda de água, para a obtenção dos valores de massa fresca (MF). Estas amostras foram colocadas em placas de Petri contendo água destilada, por 4 h. Os discos foram retirados da água, delicadamente secos com papel absorvente (para remoção da água aderida na superfície) e novamente pesados, obtendo-se, assim, a massa túrgida (MT). Por fim, os discos foram levados a estufa de ventilação ($70 \text{ }^\circ\text{C}$), até a obtenção da massa seca (MS) das amostras. O cálculo do teor relativo de água foi feito através da seguinte equação: $\text{TRA}(\%) = (\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MT} - \text{MS}) \times 100$.

5.2.6. Avaliações fotossintéticas: trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As avaliações de fotossintéticas foram realizadas das 8 às 13 h, no quinto e último dia de exposição ao As; utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com o intuito de evitar variações entre os tratamentos decorrentes das diferenças nos horários das avaliações ($r = 5$).

Foram selecionadas folhas totalmente expandidas e não-senescentes e, com auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA, Licor 6400xt, Lincoln, USA), os seguintes parâmetros de trocas gasosas foram obtidos: taxa de assimilação líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). Utilizou-se radiação fotossinteticamente ativa constante (RFA) de $600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) de, aproximadamente, $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Respostas de A em fun\u00e7\u00e3o da irradi\u00e2ncia (curva de luz) foram obtidas a partir de oito n\u00edveis de radiação fotossinteticamente ativa (RFA): 0, 50, 100, 150, 200, 400, 600 e $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, em ordem decrescente, com intervalos de 2-3 minutos entre cada leitura. Foi utilizada a concentra\u00e7\u00e3o de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* foram obtidas com aux\u00edlio de IRGA, nas mesmas folhas em que foram realizadas as medi\u00e7\u00f5es de trocas gasosas. As folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de rea\u00e7\u00e3o estivessem completamente abertos (todos os aceptores prim\u00e1rios oxidados), com perda de calor m\u00ednima. Foram obtidas as vari\u00e1veis fluoresc\u00eancia inicial (F_0) e fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) e, a partir destes valores, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (FSII), em que $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al. 1989). As vari\u00e1veis da fase lenta de indu\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia foram obtidas

seqüencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir destes parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado (F_0'), em que $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0 / F_m) + (F_0 / F_m')]$ (Oxborough e Baker 1997).

5.2.7. Quantificação de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de pigmentos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram determinados utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator, conforme descrito por Wellburn (1994) e adaptado para que houvesse menor gasto de material. Um disco foliar de 0,59 cm de diâmetro ($r = 5$) foi imerso em 2 mL de DMSO saturado com carbonato de cálcio e mantido no escuro, em banho maria (65 °C). Após 2 horas, os frascos foram deixados para resfriar e, em seguida, realizaram-se as leituras em espectrofotômetro a 480, 649,1 e 665,1 nm, utilizando-se como branco o DMSO saturado com carbonato de cálcio submetido ao mesmo processo de aquecimento que as demais amostras.

5.2.8. Determinação da atividade da enzima anidrase carbônica

Amostras foliares frescas (0,1 g) foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido ($r = 5$) e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,3 suplementado com 5 mM de cisteína, 1mM de EDTA e 1,25 g de sacarose. Após centrifugação (4 °C, 20 min, 10000 g), o sobrenadante foi destinado ao ensaio da atividade enzimática da anidrase carbônica (AC). Para tal, utilizou-se uma alíquota de 50 μ L do extrato obtido, com acréscimo de 1,5 mL do meio de reação (similar ao tampão de extração, porém, a 0,05 M) e 1,5 mL de água saturada com CO₂ gelada. Logo após a adição da água saturada com CO₂ observou-se o tempo decorrido para mudança do pH de 8,3 para 7,3 (TA). O branco consistiu do tampão de corrida suplementado com água saturada com CO₂, porém sem o extrato (TB). A atividade da enzima é dada por: $AC = 10 (TB/TA) - 1$.

5.2.9. Avaliação da temperatura superficial das plantas

A temperatura da superfície das plantas foi avaliada com uma câmera termográfica (Flir, T420, USA), em cinco plantas por tratamento, utilizando-se o delineamento em blocos

ao acaso. Para a obtenção das imagens, uma planta de cada tratamento foi posicionada lado a lado às demais sobre um isopor. Foi contabilizada a área correspondente a cada um dos três intervalos de temperatura (azul: 14,7 – 16,2 °C; verde: 16,2 – 17,0 °C; amarelo: 17,0 – 18,5 °C), no sistema radicular e parte aérea, com auxílio do software de análise de imagens Image Pro Plus versão 5.1.

5.2.10. Quantificação de açúcares

A extração dos açúcares foi feita a partir de 0,1 g de raízes, folhas jovens e folhas maduras previamente maceradas com auxílio de N₂ líquido (r = 5). Foi adicionado 1,5 mL de solução de clorofórmio-metanol-água (1:2,5:1; v/v) e 60 µL de ribitol (0,02 mg mL⁻¹), todos com pureza superior a 99,9%. O homogeneizado permaneceu a 4 °C por 30 min, no escuro, e foi centrifugado em seguida (5 min, 20000 g, 4 °C). Transferiu-se o sobrenadante (1 mL) para novos microtubos e a este adicionaram-se 750 µL de água mili-Q. Uma nova centrifugação foi realizada (15 min, 20000 g, 4 °C) e 200 µL do sobrenadante foram coletados em novos tubos e secos a vácuo, em temperatura ambiente, para estocagem a -80 °C (Lisec 2006). Para a quantificação de açúcares solúveis o conteúdo previamente seco foi ressuscitado em 100 µL de água ultrapura e destinados à quantificação de glicose, frutose e sacarose. Ambas as análises foram conduzidas essencialmente como descrito por Threthewey et al. (1998).

5.2.11. Quantificação dos teores de aldeído malônico

A peroxidação de lipídios de membrana oriunda de estresse oxidativo foi quantificada por meio da determinação dos teores de aldeído malônico (MDA), segundo protocolo descrito por Heath e Packer (1968). Aproximadamente 0,15 g de folhas e raízes (r = 5) foram triturados com auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizados com 2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Os extratos obtidos foram centrifugados por 15 min a 12000 g, 4 °C. Coletou-se 0,5 mL do sobrenadante em dois tubos diferentes, sendo um para a reação e outro para o branco da amostra. Aos tubos de reação foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, preparado em TCA 20%. Aos tubos *branco* foram adicionados 1,5 mL de TCA 20%. Os tubos foram levados ao banho-maria (95 °C) por meia hora e as reações foram paralisadas imediatamente, colocando-se os tubos no gelo. Após o resfriamento, o conteúdo foi centrifugado durante 5 min a 12000 g. A concentração de MDA foi determinada através da leitura das absorvâncias do produto final a 440, 532 e 600 nm (Hodges et al. 1999).

Para o cálculo da concentração de MDA descontou-se a diferença entre os valores de 532 e 600 nm dos mesmos valores obtidos pela reação sem adição de TBA, como segue:

$$A = (Abs_{532} + TBA) - (Abs_{600} + TBA) - (Abs_{532} + TBA) - (Abs_{600} + TBA)$$

Posteriormente, foi descontado o interferente de leitura a 440 nm:

$$B = (Abs_{440} + TBA) - (Abs_{600} + TBA) \times 0,0571$$

A partir das estimativas de A e B, a concentração de MDA foi quantificada pela equação:

$$MDA \text{ (nmol mL}^{-1}\text{)} = A - (B/157000) \times 106$$

A concentração de MDA na folha foi expressa em função da massa fresca.

5.2.12. Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais

A concentração de fenóis solúveis totais foi determinada pelo método espectrofotométrico do Folin-Ciocalteu (adaptado de Sánchez-Viveros et al. 2010), utilizando-se os mesmos extratos obtidos pela homogeneização de material vegetal com TCA 0,1% para a quantificação de MDA. Utilizou-se 60 µL do extrato ($r = 5$), ao qual adicionou-se 40 µL de solução aquosa de metanol 80%, 420 µL de água, 1250 µL de solução aquosa de carbonato de sódio 20% e 300 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 250 N. As reações ocorreram durante 30 min sob agitação leve. Em seguida procedeu-se à centrifugação das amostras a 12000 g, por 5 min, e alíquotas do sobrenadante foram coletadas para a leitura das absorvâncias a 765 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se ácido tânico na confecção da curva padrão de referência (0 a 100 µg mL⁻¹), para a quantificação dos fenóis nos tecidos.

5.2.13. Quantificação do extravasamento de eletrólitos

A fim de detectar o grau de rompimento da membrana plasmática, cinco discos foliares ($r = 5$) com 0,6 cm² foram lavados e imersos em 10 mL de água desionizada por 12 h e a condutividade elétrica foi medida com condutivímetro, obtendo-se a condutividade inicial (C_i). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95 °C, em banho-maria, por meia hora e a condutividade foi medida novamente, para a obtenção da condutividade final (C_f). O extravasamento de eletrólitos (EE) foi dado pela fórmula: $EE (\%) = (C_i/C_f) \times 100$ (Garraway 1973).

5.2.14. Determinação da localização de espécies reativas de oxigênio

A análise histoquímica para detecção de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi realizada segundo Ramel et al. (2009). Folhas jovens e maduras, bem como o sistema radicular, foram imersos e infiltrados sob vácuo com o meio de reação contendo $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitroazul de tetrazólio (NBT) em tampão fosfato de sódio 10 mM , com adição de NaN_3 10 mM , durante duas horas. Após a infiltração, as amostras foram clarificadas com solução de ácido acético-glicerol-etanol (1:1:3) (v/v) a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. Em seguida, as amostras foram estocadas em solução de glicerol-etanol (1:4) (v/v) até a obtenção das fotos. O radical $O_2^{\cdot-}$ foi visualizado por meio de uma coloração azul resultante da precipitação do NBT.

Para a determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o reagente 3,3' diaminobenzidina (DAB) foi dissolvido em água destilada e o pH ajustado para 3,8. A solução de DAB foi preparada na hora do uso, para evitar auto-oxidação. Folhas jovens e maduras, assim como o sistema radicular, foram imersas e infiltradas sob vácuo com o meio de reação contendo $1,25 \text{ mg ml}^{-1}$ de DAB, durante 5 h. Em seguida, foram clarificadas, estocadas e fotografadas como descrito para o radical superóxido.

5.2.15. Determinação dos teores de proteínas totais e carboniladas

Para a extração das proteínas totais, aproximadamente $0,8 \text{ g}$ de folhas e raízes ($n = 5$) foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizados com 2 mL de tampão de extração (EDTA 1 mM ; DTT 2 mM ; triton x-100 $0,2\% \text{ v/v}$; PMSF 1 mM , preparados em tampão fosfato de sódio pH $7,4$ 10 mM gelado). Após 30 min no gelo, as amostras foram centrifugadas ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 20000 g , 10 min) e o sobrenadante coletado.

O teste para determinação do teor de proteínas carboniladas foi realizado segundo Romero-Puertas (2002) com adaptações. Inicialmente, 2 mL do sobrenadante foram divididos em dois tubos de microcentrífuga (correspondentes à *reação* e ao *branco*), utilizando-se quatro repetições por tratamento, para cada tipo de amostra. As amostras foram novamente centrifugadas sob as mesmas condições e as proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford (1976). Alíquotas contendo $600 \text{ } \mu\text{g}$ de proteínas foram incubadas (20 min) com sulfato de estreptomicina 1% e Triton x-100 $0,03\%$, e novamente centrifugadas. Foram coletados $200 \text{ } \mu\text{L}$ do sobrenadante e, somente aos tubos de *reação*, adicionaram-se $500 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM e HCl 2 M . Nos tubos correspondentes ao *branco* adicionaram-se somente $500 \text{ } \mu\text{L}$ de HCl 2 M . As amostras foram incubadas durante 1

h, no escuro; a cada 15 min o conteúdo dos tubos foi homogeneizado. As proteínas foram precipitadas com 1 mL de TCA 10% e centrifugadas por 10 min (4 °C, 20000 g). Foram realizadas três lavagens do *pellet* com 1 mL de solução de etanol/acetato de etila (1:1) e centrifugadas por 10 min, como já descrito, após cada lavagem. O sobrenadante foi totalmente removido e o *pellet* ressuscitado em 250 µL de solução de uréia 8 M em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3. A absorvância das amostras foi lida a 370 nm. Os valores das amostras *branco* foi subtraído do valor verificado nas amostras *reação*. O teor de proteínas carboniladas foi expresso por teor de proteína.

5.2.16. Determinação da atividade da protease sinalizadora de apoptose caspase-3

Os níveis de morte celular por apoptose foram avaliados por meio da determinação da fluorescência emitida pela quebra do substrato fluorogênico da enzima caspase-3 (liberando o fluorófilo rodamina) utilizando-se kit específico para o teste (Biotium, Caspase-3 DEVD-R110 Assay Kit, USA).

Para o teste foi utilizado o extrato inicial de proteínas obtido no item 5.2.15. O volume das alíquotas contendo 40 µg e 80 µg de proteínas provenientes do sistema radicular e parte aérea, respectivamente, foi completado para 50 µL (n = 4). A estas alíquotas foi adicionado 50 µL do tampão de detecção de caspase-3 e 5 µL do substrato da enzima (Ac-DEVD)₂-R110, 2 mM). Para o controle negativo adicionou-se, antes do substrato, 1 µL do inibidor da enzima (Ac-DEVD-CHO, 5 mM) e, após 30 min (4 °C) foi adicionado o substrato. As amostras foram incubadas por 1,5 h e a leitura foi realizada em fluorômetro (modelo Victor X5, marca Perkin Elmer) nos comprimentos de onda de 470/520 (ex/em). Ressalta-se que o teste foi feito segundo as recomendações do fabricante do kit, mas foi adaptado para uso com extrato protéico vegetal. A atividade da enzima foi calculada através da subtração do valor de fluorescência observado após 1,5 h pelo valor observado após 25 min de reação. Foi confeccionada uma curva usando-se concentrações conhecidas de rodamina e os valores foram expressos por fluorescência da rodamina por mg de proteína.

5.2.17. Análise de expressão gênica

Esta análise foi realizada com o intuito de identificar alterações na expressão de genes relacionados com o mecanismo antioxidante enzimático, com o sistema glutatona, com a

respiração celular e ao reparo do DNA (Tab. 1). Foram utilizadas quatro réplicas biológicas e três réplicas técnicas ($n = 4$), e as análises foram executadas em um delineamento em blocos ao acaso. Nas folhas, avaliou-se a expressão de plantas pertencentes aos tratamentos controle, 2 e 8 mg As L⁻¹. Nas raízes foram avaliados os tratamentos controle e 2 mg L⁻¹.

Para a extração de RNA total foram utilizados 100 mg de material vegetal congelado (folhas e raízes) triturado com auxílio de nitrogênio líquido. Todos os reagentes foram preparados com água acrescida de dietileno pirocarbonato (DEPC), livre de RNases e estéril. Ao material vegetal adicionou-se 1 mL de tampão de extração (fenol ácido pH 4,5 38%; tiocianato de guanidina 0,8 M; tiocianato de amônio 0,4 M; acetato de sódio pH 5,0 0,1 M; glicerol 5% e H₂O DEPC). O material foi centrifugado (5 min, 4 °C, 18000 g) e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, onde adicionaram-se 150 µL de NaCl 1,2 M e 450 µL de clorofórmio gelados. Realizou-se nova centrifugação e 600 µL da fase superior foram transferidos para um novo tubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol. Uma terceira centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Ao *pellet* adicionou-se 1 mL de etanol absoluto e foi feita a última centrifugação, desta vez, por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em *speed vac* (Eppendorf, modelo 5305, USA) por 10 min. O pellet foi ressuscitado em 30 µL de água DEPC, sob aquecimento (60 °C, 10 min). O RNA total foi quantificado com auxílio do fluorômetro Qubit[®], com kit específico para a quantificação de RNA (Life Technologies, Qubit[®], USA). A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Neste ponto, o RNA foi armazenado a -80 °C para a posterior síntese do cDNA.

Foram utilizados 3 µg de RNA por reação. Foi feita a eliminação do DNA com a enzima DNase I (Invitrogen). Em seguida procedeu-se a síntese da primeira fita de cDNA com o kit Improm (Promega), ambos segundo as recomendações do fabricante. Para a análise de expressão gênica foi utilizado o equipamento para a realização de PCR em tempo real, com sistema de detecção de fluorescência SYBR Green I (Applied Biosystems, StepOnePlus[™] Real-Time PCR System, USA). A reação foi realizada utilizando 200 ng do cDNA obtido na etapa anterior, solução de primers (direto e reverso, 0,12 µM), dNTP (0,25 mM), Platinum Taq Dna Polimerase 10x (0,5 U), MgCl₂ (2,5 mM), SYBR Green I (1:200000), ROX (todos da Invitrogen) e H₂O mili-Q estéril. As condições de amplificação foram: *hot start* (5 min, 95 °C), anelamento (30 s, temperatura de acordo com a T_m do primer) e extensão (30 s, 72 °C). Os valores de Ct foram ajustados pelo programa Real Time PCR Miner v 2.2 (Zhao e Fernald 2005; www.miner.ewindup.info) a partir dos valores de fluorescência e da eficiência das

reações. Para a normalização dos dados utilizou-se os primers que amplificam o gene constitutivo Act2 de *A. thaliana*, selecionado entre outros genes sugeridos por Remans et al. (2008), para experimentos com metais pesados com *A. thaliana* (Tab. 1). Foram utilizados os métodos comparativos propostos por Zhao e Fernald (2005).

Tab. 1. Primers dos genes alvo destinados às análises de expressão gênica

Gene	Primer direto (5' → 3') Primer reverso (5' → 3')	T _m
Genes relacionados ao mecanismo antioxidativo em geral		
Ascorbato peroxidase 2 (Apx2)	TTGCTGTTGAGATCACTGGAGGA TGAGGCAGACGACCTTCAGG	61
L-ascorbato peroxidase (Lapx)	TGCCACAAGGATAGGTCTGG CCTTCCTTCTCTCCGCTCAA	59
Catalase 1 (Cat1)	AAGTGCTTCATCGGGAAGGA CTTCAACAAAACGCTTCACGA	57
Catalase 2 (Cat2)	AACTCCTCCATGACCGTTGGA TCCGTTCCCTGTCGAAATTG	58
Catalase 3	TCTCCAACAACATCTCTCCCTCA GTGAAATTAGCAACCTTCTCGATCA	59
Cu/Zn superóxido desmutase (CuZn-sod)	GAGCCTTTGTGGTTCACGAG CACACCACATGCCAATCTCC	59
Monodehidroascorbato peroxidase (Mdhar)	CCTCTCCATCTGAGTTGGTGC GCGGCGGTTTCTTAGGGC	60
Genes relacionados ao sistema glutationa		
Fitoquelatina sintase 1 (Pcs1)	TGGTGTGAATGCTCTTCTATCG GGTTCGCAGCAATCCAACAT	59
Glutaciona redutase citosólica (Gr1)	CTCAAGTGTGGAGCAACAAAAG ATGGCTCTGGTCACACTGC	59
Glutaciona redutase (Gr2)	GCCCAGATGGATGGAACAGAT TAGGGTTGGAGAATGTTGGCG	59
Glutaciona sintetase 1 (Gsh1)	CCCTGGTGAAGTGCCTTCA CATCAGCACCTCTCATCTCCA	59
Glutaciona sintetase 2 (Gsh2)	GGACTCGTCGTTGGTGACAA TCTGGGAATGCAGTTGGTAGC	60
Glutaciona S-transferase 6 (Gstf8)	GCGAGAGTCAAAGAGCACCT TCTTTAAAGGCATGTTCCGGC	56
Genes relacionados à respiração celular		
Oxidase alternativa 1a (Aox1a)	CTGGACCACGTTTGTTC ACACCCCAATAGCTCG	52
Oxidase alternativa 3 (Aox3)	TACCGCACTCTTCGAC GGCTGGTTATTCCCACT	52
Genes relacionados ao reparo do DNA		
DNA repair protein RAD51-like 1 (Rad51)	TTGATGTAAAGAAGCTTAGGG TACAATCTGTCAACCTTGGC	53
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70 (Ku70)	GAAGAAAGTGACTCAGGGGC TTCTTCCCGCTGACGAGGAG	58
Mismatch repair 7 (Msh7)	GCCTGTTCGAATGATATAC GCACGAAGAAGAGTTGATT	53
Mismatch repair 2 (Msh2)	CGATGGCAGATGCGTTATTG CAGATTGGTGAAGCGGCTAT	57
DNA repair protein recA-like 2 (RecA)	ATCTAACATGCATTTCCCGCACGC TGGACGCAGACATTGAGACCCTT	64
MUTL protein-like protein 1 (Mhl1)	TCATGCGTGTATGTGATGCGGAGA ACTTGACCCTTGCAGTCTTCTT	64
Genes normalizadores		
Actina 2 (Act2)	CTTGACCAAGCAGCATGAA CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	59
F-box (Fbox)	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT GATTCCAAGACGTAAGCAGATCAA	59
Proteína da família SAND (Sand)	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	57
AT5G60390 (EF-1a)	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTCA GTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	61

5.3. Experimento com mutantes *msh2* e confirmação dos homozigotos nulos

As sementes de mutantes *msh2* foram gentilmente cedidas pelo Dr. John Hays, da Universidade do Estado de Oregon (EUA) e cultivadas com o intuito de se obter um grande número de sementes. Após a coleta das sementes, a seleção e confirmação dos mutantes nulos homozigotos *msh2* foi feita utilizando-se amostras de DNA genômico extraído de folhas, através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando-se os seguintes pares de primers: LBb1 (5' GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT3') e salk_002708 reverso (RP(5' AGGAGCTGTCAAAAGGAGCTC 3')). Os heterozigotos e homozigotos WT foram identificados utilizando-se os pares de primers: SALK_002708 direto (5' TCACCACGATGATGTCAAGAG 3'). A programação utilizada para o PCR foi: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 58 °C por 60 s, 72 °C por 60 s e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

5.3.1. Avaliação da germinação e do crescimento radicular inicial

Para a avaliação das taxas de germinação, 20 sementes (WT e *msh2*) foram distribuídas uniformemente em cada placa de Petri contendo concentrações crescentes de As (0, 2 e 8 mg L⁻¹) em meio contendo agar (0,5%) e solução de Clark (50%). Contabilizou-se o número de sementes germinadas, diariamente, durante os dez primeiros dias de cultivo. Cada repetição constou da média do número de plantas germinadas em cada placa (r = 8).

Para a determinação das taxas de crescimento radicular, quatro sementes WT e quatro *msh2* foram posicionadas lado a lado, formando uma linha reta no terço superior da placa de Petri contendo as mesmas concentrações de As descritas acima, em solução de Clark gelificada. As placas foram posicionadas verticalmente na sala de cultivo, permitindo que as raízes crescessem em direção ao centro gravitacional, paralelamente ao fundo da placa. O comprimento radicular foi obtido a cada dois dias com auxílio de paquímetro, durante 10 dias, a partir do oitavo dia após a semeadura. Cada repetição constou da média dos comprimentos radiculares de cada placa (r = 8).

5.3.2. Análise de fenótipos macroscópicos e do estresse oxidativo em plantas adultas mutantes *msh2*

Plantas WT e mutantes *msh2* foram cultivadas e expostas ao As em sistema hidropônico, como descrito no item 5.2. A determinação do estresse oxidativo foi realizada por meio da quantificação dos teores de MDA, como explicado no item 5.2.11.

5.4. Experimento com plantas #11, #121, #166.2 e R3L66 para a determinação das taxas de mutações

Foram utilizadas plantas transgênicas repórteres (β -glucuronidase) de quatro diferentes tipos de dano ao DNA, como descrito no item 5.1. O experimento foi realizado em placa de Petri, contendo concentrações crescentes de As (0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹) em meio contendo agar (0,5%) e solução de Clark (50%), por 20 dias. Nesses repórteres, quando ocorre determinado tipo de mutação no DNA, o processo de reparo ocorre e, concomitantemente, o transgene que codifica a enzima GUS retoma sua funcionalidade, sintetizando-a naquela célula. Ao entrar em contato com o substrato da enzima, exógeno, forma-se um produto insolúvel de cor azul e, assim, o número de pontos azuis existentes na superfície da planta corresponde ao número de reparos/mutações ocorridos em um indivíduo.

Após os 20 dias de cultivo, a parte aérea de vinte plântulas por placa, de cinco placas por tratamento (r = 5), foi coletada e infiltrada, sob vácuo (2 x 10 min), com o tampão de reação (100 mM NaPO₄ pH 7,0; 1 mM X-Gluc; 0,2% Triton X-100; 0,5 mM ferrocianeto de potássio; 0,5 mM ferricianeto de potássio; 10 mM EDTA; 50 µg mL⁻¹ canamicina) a 4 °C, protegidas da luz, por 48 h. Em seguida procedeu-se a clarificação com trocas periódicas de etanol 70%. A parte aérea de 50 plantas de cada linhagem, por tratamento, foi montada entre lâmina e lamínula, utilizando-se gelatina glicerinada (1:1, v/v) como meio de montagem. As lâminas foram observadas em microscópio para a contagem do número de pontos azuis, cada qual correspondente a um reparo realizado.

5.5. Determinação da fragmentação do DNA em ápices radiculares de *Allium cepa*

Com o intuito de confirmar o potencial genotóxico das concentrações de As selecionadas para este trabalho, cinco bulbos de *Allium cepa* (cebola) (r = 5) foram colocados para desenvolver raízes em meio contendo solução de Clark 50%. Após atingirem cerca de 2

cm, as raízes foram expostas às concentrações de 0, 2, 8 e 16 mg As L⁻¹ por 24 e 48 h e destinadas aos testes de detecção de genotoxicidade clássicos, descritos a seguir. Ressalta-se que *A. cepa* é amplamente utilizada em ensaios de genotoxicidade por apresentar características importantes para a realização destes testes, como ápice radicular robusto e núcleos com elevado diâmetro, permitindo fácil visualização ao microscópio. Essas características não são observadas em *A. thaliana*, cujas raízes são extremamente finas e os núcleos muito diminutos.

5.5.1. Determinação da formação de micronúcleos e do índice mitótico

Para a avaliação da formação de micronúcleos (MN), após a exposição ao As, as raízes foram transferidas para água destilada, onde permaneceram por 24 h para a recuperação (tempo necessário para que ocorra divisão celular e formação de MN). Os ápices radiculares foram coletados em fixador Carnoy a 4 °C e após 12 h foram estocados em etanol 70%, para a posterior realização da reação de Feulgen (Gomori, 1952). Os ápices radiculares foram lavados em água destilada, submetidos à hidrólise ácida com HCl 5 M e novamente lavados em água destilada. Em seguida foram corados com reativo de Schiff por 30 minutos na ausência de luz e lavados com água destilada. Para a obtenção do controle do teste foi realizada metodologia semelhante, excluindo-se a hidrólise ácida. Os ápices radiculares foram depositados em lâminas histológicas, sobre as quais gotejou-se ácido acético 45%, e esmagados, com auxílio de lamínula para observação ao microscópio e contagem dos micronúcleos. Foram contabilizadas 300 células por raiz analisada. Cada cebola constou de uma repetição (r = 5), sendo cada raiz uma sub-repetição, para obtenção de média. Os resultados foram expressos em número de células micronucleadas/1000 células.

Para a determinação do índice mitótico (IM) foi contabilizado o número de células em divisão mitótica, utilizando-se o mesmo número de lâminas para a análise de MN. O resultado foi expresso em número de células mitóticas/100 células.

5.5.2. Eletroforese em gel de célula única

A eletroforese em gel de célula única, também conhecido como “ensaio cometa”, foi conduzida como descrito por Navarrete et al. (1997) para tecidos sólidos. Lâminas para microscopia foram pré-cobertas com solução de agarose “*normal melting point*” 1% (Invitrogen) preparada em tampão fosfato salino (PBS). As lâminas foram mantidas horizontalmente sobre superfície com gelo e sobre elas foram depositados 30 µl de tampão

Sörensen gelado (50 mM, pH 6,8, 4 °C). A extração dos núcleos foi realizada mantendo-se as raízes em gelo por pelo menos 2 min (para aumentar a turgidez celular, auxiliando a extração dos núcleos) e, em seguida, as raízes foram cuidadosamente seccionados transversalmente a 1 mm do ápice radicular, com auxílio de lâmina de barbear, e mergulhados várias vezes no tampão Sörensen, permitindo a liberação dos núcleos (no escuro). As lâminas permaneceram em temperatura ambiente por 2 min, para que houvesse a sedimentação dos núcleos na primeira camada de agarose. Sobre a região contendo os núcleos foi depositada uma segunda camada de agarose, que consistiu de 30 µL de agarose “*low melting point*” (LMP) 0,5% (Invitrogen), preparada em PBS. As lâminas foram mantidas a 4 °C, no escuro, até que a agarose LMP se gelificasse.

As lâminas foram posicionadas em cuba horizontal contendo solução de eletroforese (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1mM, 10 °C, pH 13.4). Antes do início da corrida, as lâminas permaneceram no tampão por 15 min, para o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi conduzida a 10 °C, a 300 mA e 21 V (0,7 V cm⁻¹), durante 10 min. Terminada a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas três vezes com tampão neutralizador (0,4 M Tris, pH 7,5) e duas vezes com água destilada. A partir desta etapa não é necessária preocupação com a iluminação, pois todas as quebras existentes no DNA já migraram. As lâminas foram desidratadas com etanol 70% e 96% (5 min cada) e secas a 37 °C em estufa por 2 h.

As lâminas secas foram colocadas em cubeta de Coplin e fixadas com solução contendo 15% TCA, 5% sulfato de zinco e 5% glicerol, por 10 min. As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e deixadas para secar *overnight*, a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente colocadas nas cubetas de Coplin, reidratadas por 5 min e coradas com solução de nitrato de prata (Solução A: 0,1% nitrato de amônio; 0,1% nitrato de prata; 0,25% ácido tungstosilícico; 0,15% formaldeído (37%) + Solução B: 5% carbonato de sódio, recém-preparada), sob agitação leve, a 37 °C, no escuro. Após a coloração, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e imersas em “solução de parada” (ácido acético 1%) e, novamente, lavadas com água destilada. Foram analisados 500 núcleos por cebola (r = 5), os quais eram provenientes de cinco raízes de um mesmo bulbo, e, com o auxílio do programa CometScore (versão 1.5, TriTek Corporation) quantificou-se o percentual de DNA íntegro, correspondente à região da cabeça do cometa.

5.6. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, para a maior parte das análises; o delineamento em blocos ao acaso foi utilizado para as avaliações fotossintéticas, termográficas e de expressão gênica. O número de repetições (r) variou entre as análises/experimentos.

A correlação da concentração de As nas folhas e raízes com as concentrações de macro e micronutrientes nestes órgãos foi realizada através da análise de correlação de Pearson com o auxílio do programa SAS (versão 9.0). A curva de luz e a análise do crescimento radicular (em WT e *msh2*) foram analisadas por meio de análise de regressão não-linear (hipérbole retangular), com o auxílio do programa SigmaPlot (versão 10.0). Os demais dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa Assistat (versão 7.6 beta).

6. RESULTADOS

6.1. Respostas fisiológicas e anatômicas de *Arabidopsis thaliana* (WT) ao arsênio

6.1.1. Acúmulo e translocação de arsênio nos tecidos

Foi verificado aumento no acúmulo de As nos tecidos de *A. thaliana* em todos os tratamentos, em relação ao controle. Na parte aérea houve aumento nas taxas de acúmulo de As com o seu incremento na solução nutritiva. O mesmo não foi observado no sistema radicular, em que os valores não diferiram estatisticamente entre os tratamentos com As, indicando saturação do acúmulo desse metalóide nas raízes (Fig. 2a). Os valores do FT aumentaram com o incremento de As na solução nutritiva (Fig. 2b).

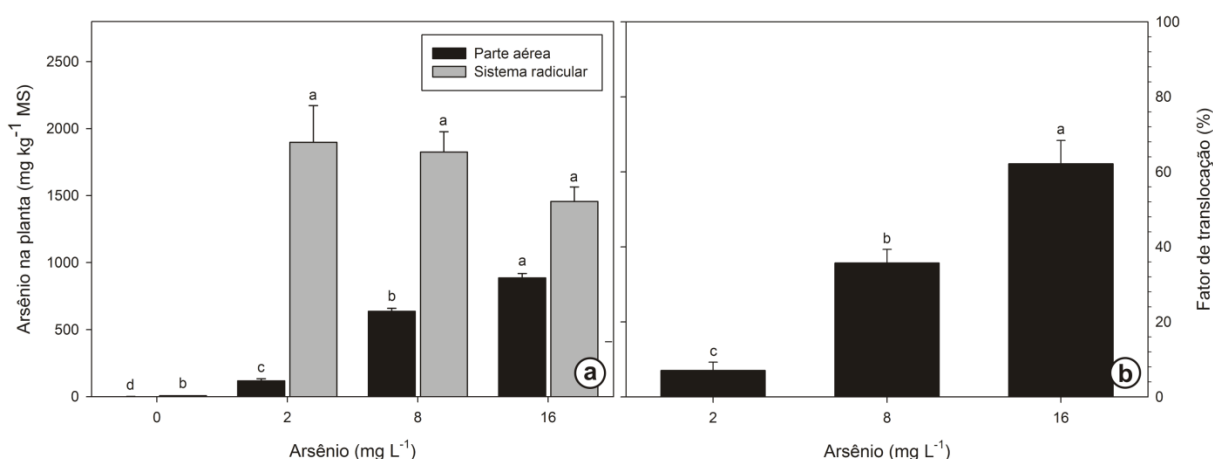


Fig. 2. Acúmulo de arsênio nos tecidos de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ deste elemento, em hidroponia, durante cinco dias. **a.** Teores de arsênio acumulados no sistema radicular e parte aérea. **b.** Fator de translocação de arsênio do sistema radicular para a parte aérea. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

6.1.2. Sintomas macroscópicos da toxidez do arsênio

As plantas apresentaram sintomas visuais tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, na presença do As, tendo esses sintomas agravado-se com o tempo de exposição (Fig. 3a-b) ao poluente. Foi observado escurecimento gradual das folhas e raízes com o aumento da concentração de As na solução (Fig. 3c-d).

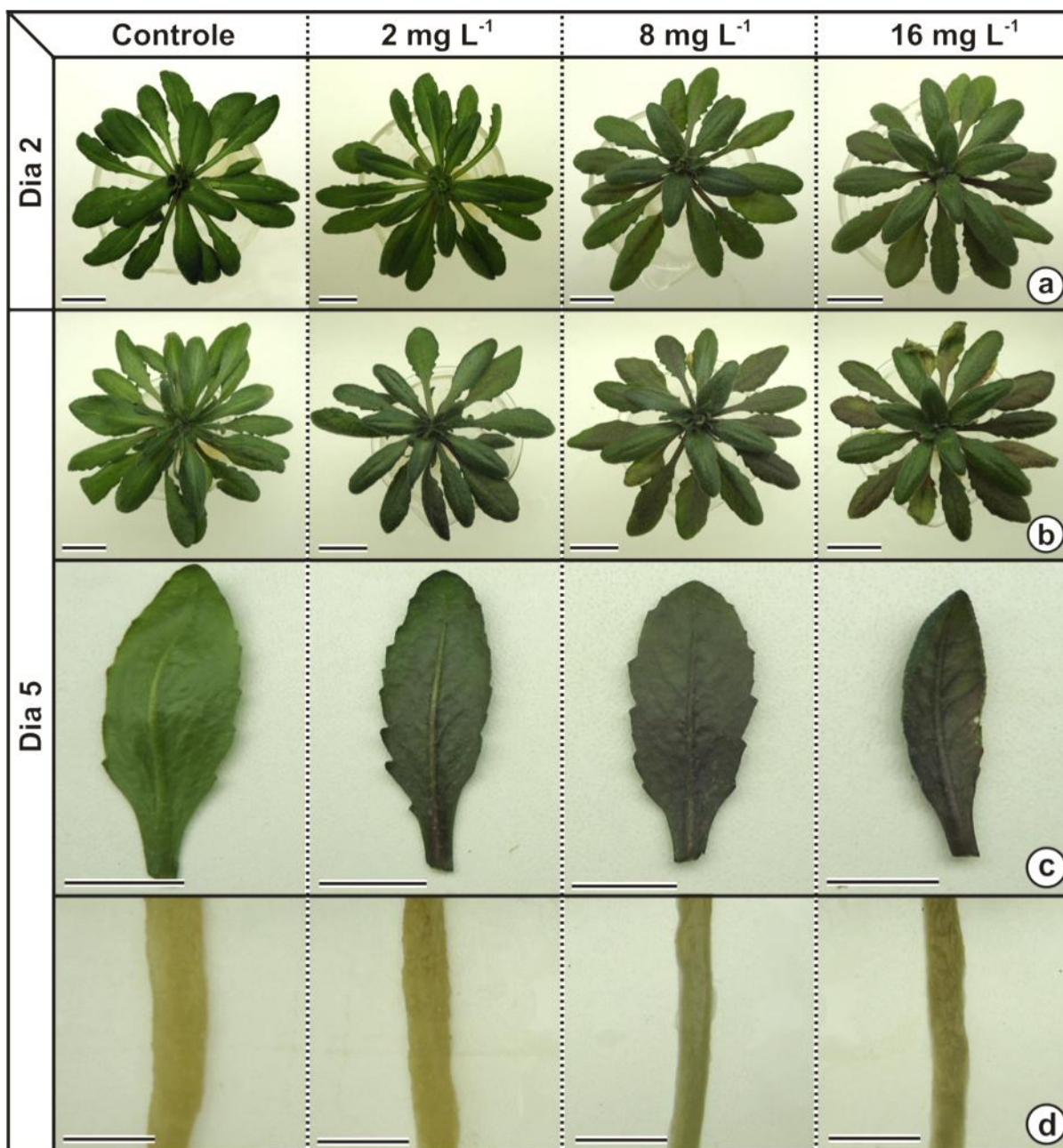


Fig. 3. Sintomas da toxidez do arsênio em plantas de *Arabidopsis thaliana* após 2 e 5 dias de exposição ao elemento em hidroponia (0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹). **a.** Aspecto da parte aérea após dois dias de exposição ao arsênio. **b-d.** Diferentes partes das plantas após cinco dias de exposição ao arsênio. **b.** Parte aérea. **c.** Face abaxial das folhas, evidenciando o escurecimento. **d.** Sistema radicular. Barras = 1 cm.

As folhas adquiriram coloração arroxeada, a qual foi muito mais evidente na face abaxial (Fig. 3c), principalmente nos tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹. Neste último tratamento as folhas apresentaram aspecto senescente. Foi observado escurecimento das raízes, que também se intensificou com o aumento da concentração de As (Fig. 3d). Embora não tenham sido feitas avaliações quantitativas, as raízes de plantas que foram expostas a 8

mg As L⁻¹ apresentaram aumento do comprimento e densidade dos pêlos (Fig. 4) e as expostas a 16 mg L⁻¹ adquiriram aspecto gelatinoso.

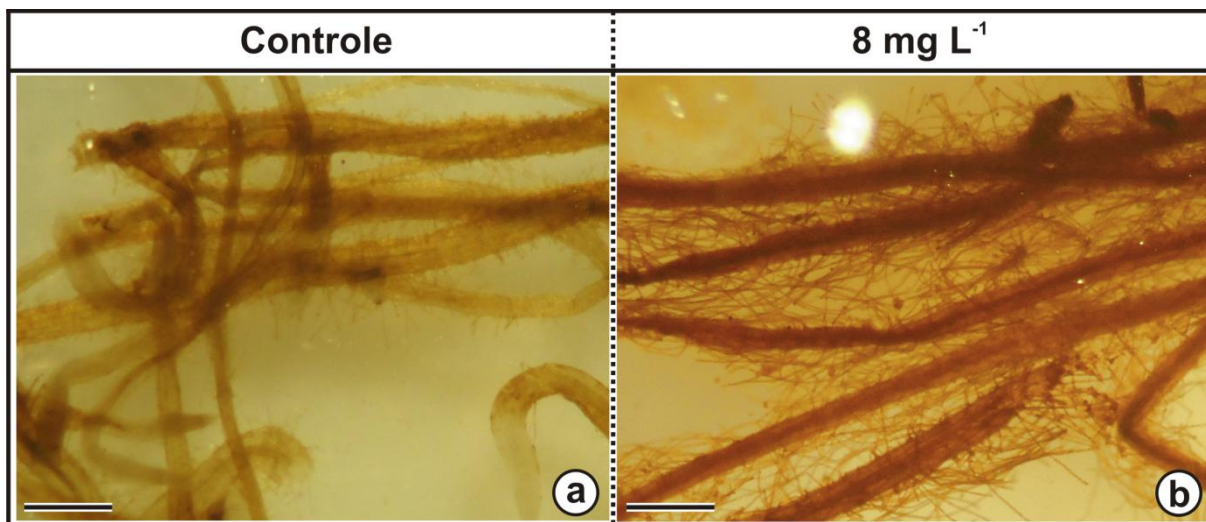


Fig. 4. Comprimento e densidade dos pêlos radiculares nas raízes de *A. thaliana* expostas a 0 e 8 mg As L⁻¹ por cinco dias. **a.** Controle. **b.** 8 mg As L⁻¹. Barras = 100 µm.

6.1.3. Teor de antocianinas em folhas jovens e maduras

O aumento da concentração de As na solução nutritiva ocasionou maiores concentrações de antocianinas nos tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹, tanto nas folhas jovens quanto nas maduras. Nas folhas jovens, esse aumento foi de 145,7 e 285,5% e, nas maduras, de 307,4 e 443,2%, em relação ao controle (Fig. 5).

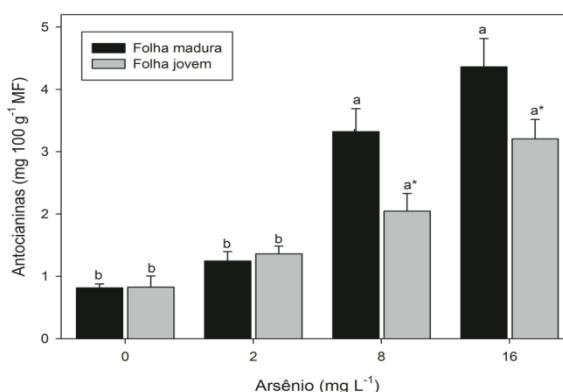


Fig. 5. Teor de antocianinas em folhas jovens e maduras de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ de arsênio, em sistema hidropônico, por cinco dias. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos (entre cores iguais) com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dentro de tratamentos iguais, * indica que folhas jovens diferem das maduras pelo teste t ($p \leq 0,05$).

De forma geral, as folhas maduras apresentaram maior teor de antocianinas que as jovens, com diferença de, aproximadamente, 62 e 36%, nos tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹, em relação ao controle. Nos tratamentos controle e 2 mg L⁻¹ não foi observada diferença significativa entre as folhas jovens e maduras (Fig. 5).

6.1.4. Alterações micromorfométricas na lâmina foliar

A folha de *A. thaliana* é anfiestomática e apresenta epiderme unisseriada. O mesofilo é composto pelo parênquima lacunoso e paliçádico, este último composto por duas a três camadas de células justapostas (Fig. 6).

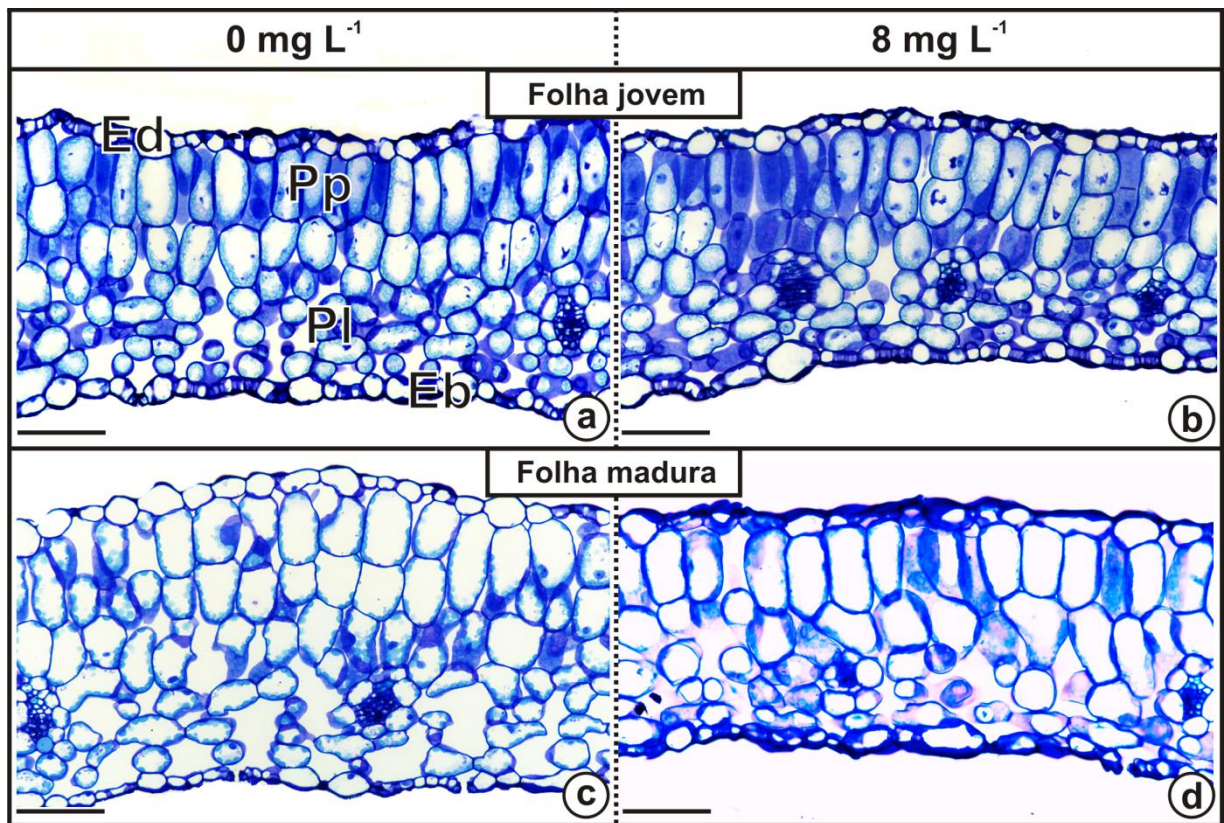


Fig. 6. Lâmina foliar de *Arabidopsis thaliana* (corte transversal, microscopia de luz) após exposição a 0 e 8 mg As L⁻¹ por cinco dias. **a.** Folha jovem (controle). **b.** Folha jovem (8 mg As L⁻¹). **c.** Folha madura (controle). **d.** Folha madura (8 mg As L⁻¹). Abreviaturas: Eb: epiderme da face abaxial; Ed: epiderme da face adaxial; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico. Barras = 100 µm.

Ao microscópio, notou-se a redução da espessura da lâmina foliar das plantas expostas a 8 mg As L⁻¹, em relação ao controle, mesmo antes da realização das análises micromorfométricas. Isso foi observado tanto nas folhas jovens (Fig. 6a-b) quanto nas maduras (Fig. 6c-d). Foi verificada redução significativa da espessura média de todos os tecidos/regiões avaliados nas folhas maduras (Tab. 2). Nas plantas jovens, o parênquima lacunoso foi o único tecido que sofreu redução da espessura média. Em ambos os estádios de desenvolvimento a redução da espessura desse tecido foi de, aproximadamente, 20%. O parênquima paliádico teve sua espessura média diminuída (10,8%) somente nas folhas maduras. Cada uma dessas alterações refletiu-se na espessura da lâmina foliar como um todo, que foi 8,2 e 15,5% menor que no controle, nas folhas jovens e maduras, respectivamente.

Tab. 2. Espessura média de tecidos/regiões foliares de plantas expostas a 0 e 8 mg L⁻¹ de arsênio, em hidroponia, durante cinco dias

		Espessura média (µm)					
		Epiderme (face adaxial)	Epiderme (face abaxial)	Mesofilo	Parênquima paliádico	Parênquima lacunoso	Área total
Folha jovem	Controle	35.14±0.50	27.30±0.71	393.09±6.54	190.02±0.83	203.06±6.84	455.52±6.91
	Arsênio	34.38±0.52 n.s.	27.61±0.55 n.s.	356.11±3.42 **	194.95±2.14 n.s.	161.15±2.78 **	418.10±.39 **
Folha madura	Controle	38.18±0.08	29.02±0.81	435.85±11.71	218.40±2.44	217.45±9.27	503.05±10.85
	Arsênio	33.41±0.05 **	22.73±2.27 *	369.04±9.14 **	194.90±4.67 **	174.14±5.65 **	425.18±10.78 **

Média ± erro padrão. Valores seguidos por * e ** são significativos em nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, entre diferentes tratamentos dentro de um mesmo estágio de desenvolvimento. Valores seguidos por n.s. (não significativo) não diferem entre si.

6.1.5. Efeitos do arsênio no teor relativo de água

A exposição ao As promoveu redução do TRA das folhas das plantas expostas a 8 e 16 mg As L⁻¹ (Fig. 7). Não foi observada diferença significativa, em relação ao controle, no tratamento com 2 mg As L⁻¹.

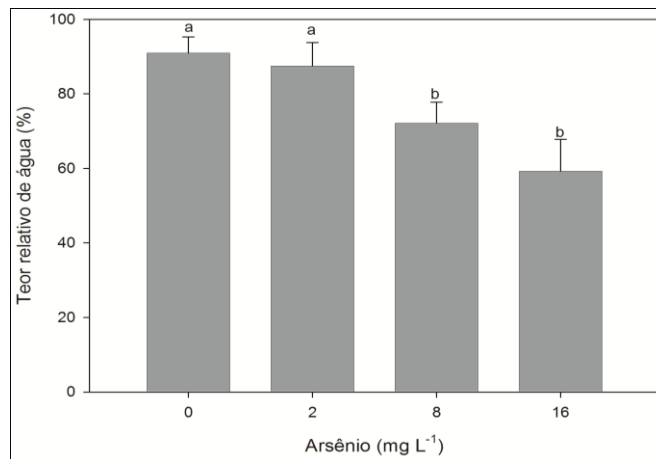


Fig. 7. Teor relativo de água de folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de As por cinco dias. Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos (com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)).

6.1.6. Efeitos do arsênio sobre as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*

O arsênio afetou negativamente a fotossíntese. No quinto dia de exposição foi observada queda na taxa de assimilação de CO₂ (*A*) em todos os tratamentos, em relação ao controle, tendo este efeito se intensificado com o aumento da concentração de As na solução hidropônica (Fig. 8a). Foi observada queda progressiva de *A* de 39,6, 78,0 e 99,6% nos tratamentos com 2, 8 e 16 mg As L⁻¹, respectivamente, em relação ao controle. A redução da taxa fotossintética foi acompanhada pela diminuição drástica da condutância estomática (*g_s*) (Fig. 8b). Todos os tratamentos com As apresentaram redução da *g_s* em torno de 80%, tendo-se observado o menor valor de *g_s* no tratamento com 8 mg As L⁻¹. A razão *C_i/C_a* aumentou 42,6% no tratamento com a concentração máxima de As. Os demais tratamentos apresentaram médias inferiores às do controle para este parâmetro, com redução de 28,0%, aproximadamente (Fig. 8c). Foi observada queda nas taxas transpiratórias (*E*) de, em média, 74,0% em todos os tratamentos contendo As (Fig. 8d).

Nas plantas controle observou-se a maior taxa fotossintética quando a superfície foliar foi irradiada com, aproximadamente, 400 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nos tratamentos com 2 e 8 mg L⁻¹ de As os maiores valores de fotossíntese foram observados com 50% deste valor, isto é, 200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A assimilação de CO₂ sofreu queda gradual com o aumento da concentração de As na solução nutritiva, sendo estes valores cerca de 30% e 80% menores nestes tratamentos, em relação ao controle (Fig. 9).

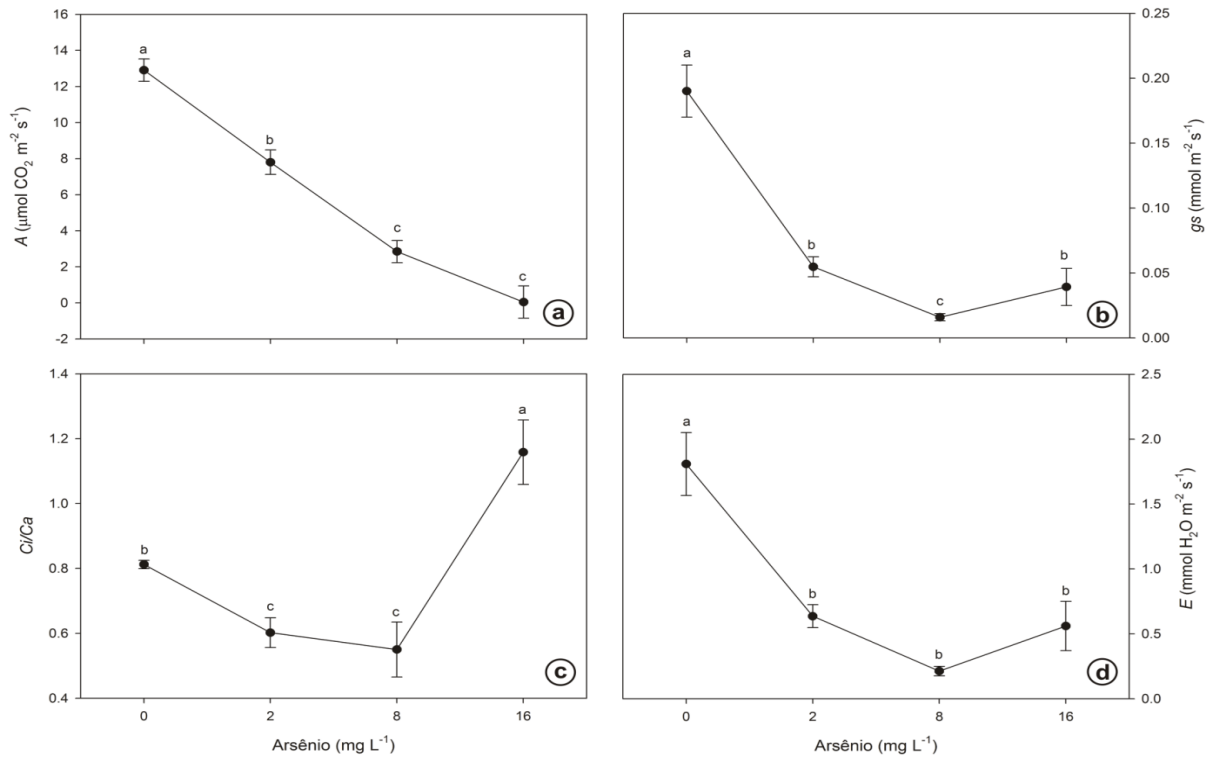


Fig. 8. Efeitos do arsênio sobre as trocas gasosas de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ do poluente em hidroponia, após cinco dias de exposição. **a.** Redução da assimilação de CO₂ (A). **b.** Queda da condutância estomática (*g_s*). **c.** Redução da razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (*C_i/C_a*), seguida pelo aumento na concentração máxima de arsênio no meio externo. **d.** Redução das taxas transpiratórias. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

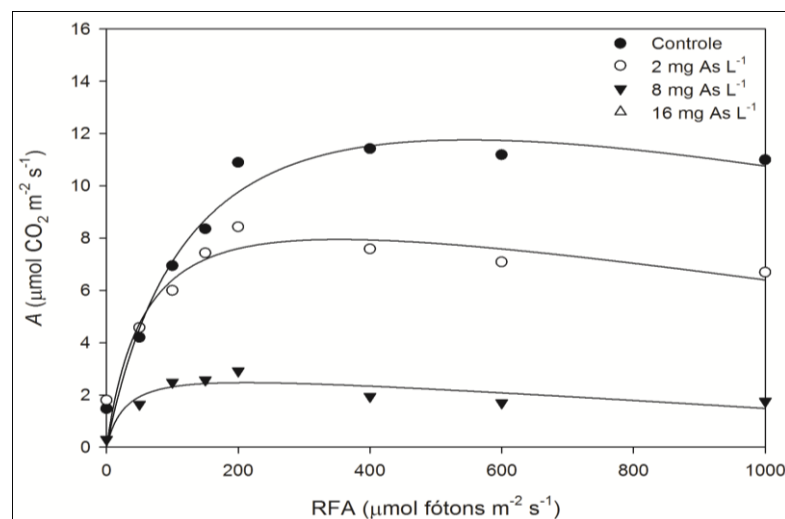


Fig. 9. Efeito da radiação fotoquimicamente ativa (0 a 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sobre a taxa líquida de assimilação do carbono (A) em folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2 e 8 mg As L⁻¹, durante cinco dias. Controle: $R^2 = 0,94$ / $f=1,09+11,85x/(91,25+x)$; 2 mg As L⁻¹: $R^2 = 0,86$ / $f=1,70+6,13x/(33,54+x)$; 8 mg As L⁻¹: $R^2 = 0,82$ / $f=1,62x/(30,00+x)+1,59x/(30,00+x)-0,0016x$.

As plantas expostas ao As não apresentaram alterações significativas na fluorescência mínima (F_0) (Fig. 10a), exceto no tratamento com a concentração máxima do poluente. A fluorescência máxima (F_m) apresentou queda com o incremento de As na solução nutritiva, mas foi significativamente menor que nos demais tratamentos somente na concentração de 16 mg L⁻¹ (Fig. 10b). O rendimento fotoquímico máximo do fotossistema II (razão F_v/F_m) por sua vez decresceu nos tratamentos de 8 e 16 mg L⁻¹ (Fig. 10c).

As diferentes concentrações de As utilizadas neste trabalho promoveram desordens que afetaram a taxa de transporte de elétrons (ETR) de forma negativa e gradual (Fig. 10d), assim como foi observado para o rendimento quântico efetivo de conversão de energia fotoquímica no FSII (Y_{II}) (Fig. 10e). A redução do Y_{II} foi drástica em todos os tratamentos com As, intensificando-se com o aumento das concentrações do poluente. As reduções observadas no Y_{II} apresentaram relação inversa com o rendimento quântico regulado da dissipação térmica de energia no FSII (Y_{NPQ}), cujos valores elevaram-se com o aumento da concentração de As (Fig. 10f). Na presença do As, o rendimento quântico não regulado da dissipação de energia no FSII (Y_{NO}) foi menor que no controle, mas não diferiu entre os tratamentos com o poluente (Fig. 10g). O coeficiente de extinção fotoquímico (qL), o qual estima a proporção de centros de reação do FSII abertos (ou oxidados) não diferiu significativamente entre os tratamentos (Fig. 10h).

6.1.7. Efeitos do arsênio sobre os teores de clorofilas e carotenóides

O teor de clorofila *a* foi maior nas folhas maduras que nas jovens no controle e no tratamento com 2 mg L⁻¹. Foi observada redução da concentração de clorofila *a* nos tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹, tanto nas folhas jovens como nas maduras (Tab. 2).

Não foi observada diferença significativa nos teores de clorofila *b* e carotenóides entre folhas jovens e maduras. Porém, em ambos os estádios de desenvolvimento, o teor de clorofila *b* reduziu nos tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹ e o de carotenóides somente no tratamento com a maior concentração do elemento (Tab. 2).

A razão clorofila *a/b* foi maior nas folhas maduras, nos tratamentos controle, 2 e 8 mg As L⁻¹. Nas folhas jovens foi observado aumento desta razão e, nas maduras, as médias foram estatisticamente iguais, exceto no tratamento com 2 mg L⁻¹ (Tab. 2).

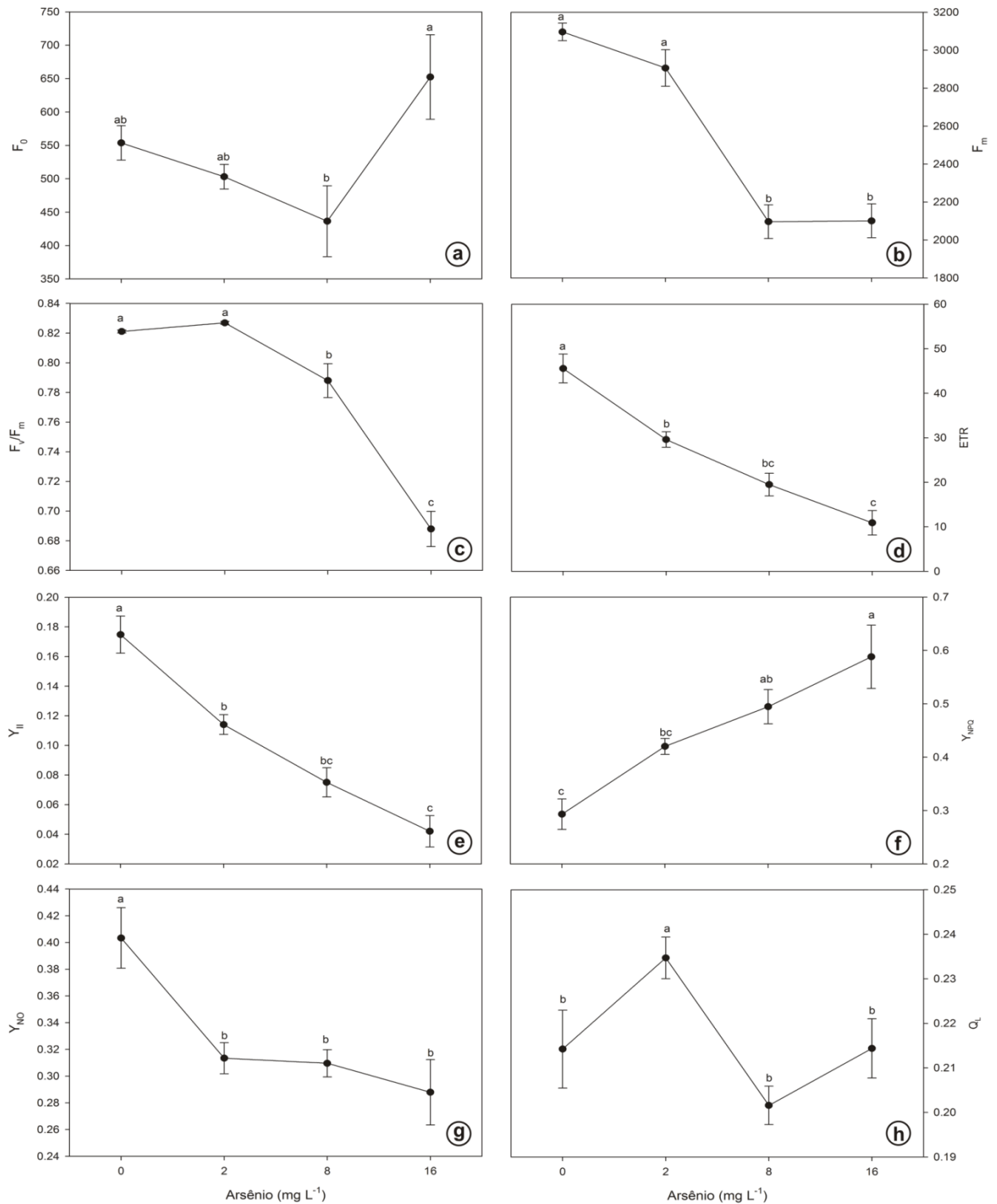


Fig. 10. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Arabidopsis thaliana* após cinco dias de exposição ao arsênio (0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹). **a.** Fluorescência mínima (F_0). **b.** Fluorescência máxima (F_m). **c.** Rendimento quântico máximo potencial do FSII (F_v/F_m). **d.** Taxa de transporte de elétrons (ETR). **e.** Rendimento quântico de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}). **f.** Rendimento quântico regulado da dissipação de energia no FSII (Y_{NPQ}). **g.** Rendimento quântico não-regulado da dissipação de energia no FSII (Y_{NO}). **h.** Coeficiente de extinção fotoquímico (q_L). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tab. 2. Teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides e razão clorofila *a/b* em folhas jovens e maduras de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ de arsênio por cinco dias. Valores correspondentes a média ± erro padrão.

Tratamento	Concentração de pigmentos fotossintéticos (mg g ⁻¹ de massa fresca)							
	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Carotenóides		Razão <i>a/b</i>	
	Jovem	Madura	Jovem	Madura	Jovem	Madura	Jovem	Madura
Controle	0.53 a ±0.016	0.62 a** ±0.009	0.29 a ±0.014	0.26 a ±0.019	0.14 a ±0.002	0.12 a ±0.011	1.84 ab ±0.034	2.50 a** ±0.082
2 mg L⁻¹	0.57 a ±0.013	0.59 a* ±0.017	0.29 a ±0.016	0.30 a ±0.008	0.15 a ±0.0038	0.14 a ±0.009	1.72 b ±0.076	2.06 b* ±0.051
8 mg L⁻¹	0.48 b ±0.010	0.51 b ±0.009	0.20 ab ±0.017	0.23 ab ±0.019	0.12 a ±0.002	0.14 a ±0.012	2.10 a ±0.045	2.42 a* ±0.054
16 mg L⁻¹	0.37 c ±0.011	0.41c ±0.012	0.16 b ±0.017	0.17 b ±0.009	0.08 b ±0.013	0.10 b ±0.006	2.26 a ±0.067	2.49 a ±0.030

Média ± erro padrão. Valores seguidos por letras diferentes, na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores seguidos por * e **, na horizontal, diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

6.1.8. Efeitos do arsênio na atividade da anidrase carbônica

Esta enzima atua na condutância mesofílica do CO₂ e alterações em sua atividade podem afetar a fotossíntese. Houve redução drástica na atividade da enzima anidrase carbônica com o aumento da concentração de As no meio externo. Foi observada redução de 51, 88 e 98.7% na atividade desta enzima nos tratamentos com 2, 8 e 16 mg As L⁻¹, respectivamente (Fig. 11).

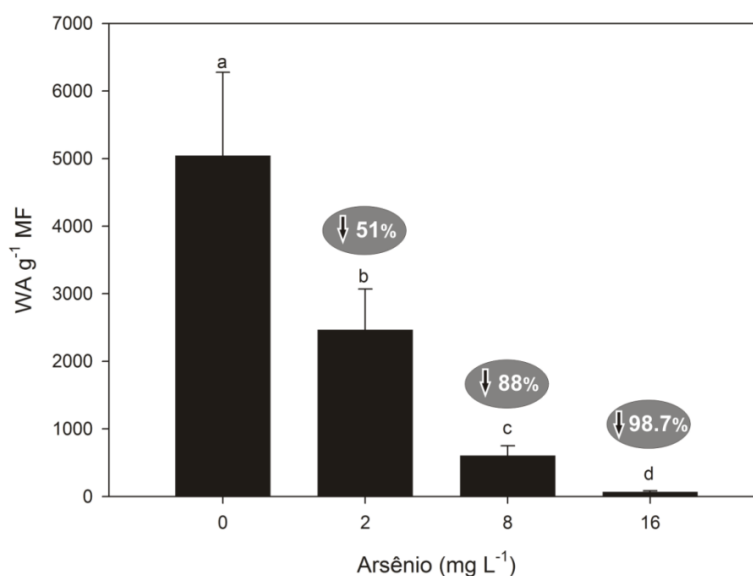


Fig. 11. Atividade da enzima anidrase carbônica de *Arabidopsis thaliana* com o aumento da concentração de arsênio na solução nutritiva. Os valores percentuais representam a redução da atividade enzimática nos tratamentos com arsênio, em relação ao controle. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). WA: unidades *Wilbur-Anderson*.

6.1.9. Efeitos do arsênio na temperatura de superfície das plantas

Em geral, observou-se que a temperatura da parte aérea e do sistema radicular aumentou progressivamente com o incremento de As na solução nutritiva (Fig 12).

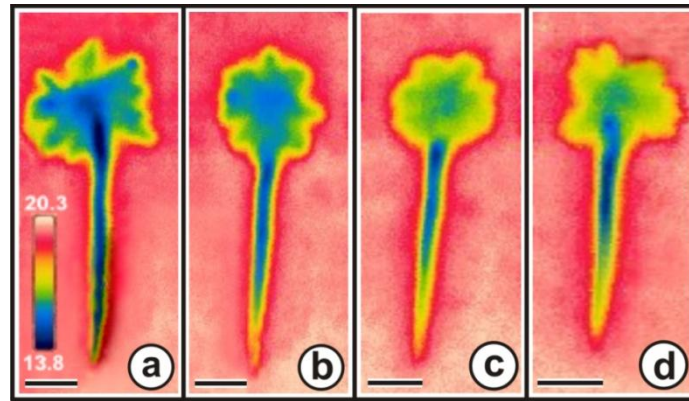


Fig. 12. Plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio em hidroponia, por cinco dias, fotografadas com câmera em infravermelho. **a.** Controle. **b.** 2 mg L⁻¹ de arsênio. **c.** 8 mg L⁻¹ de arsênio. **d.** 16 mg L⁻¹ de arsênio. Notar a redução das áreas mais frias e aumento das mais quentes com o aumento da concentração de arsênio no meio externo. Barras = 1 cm.

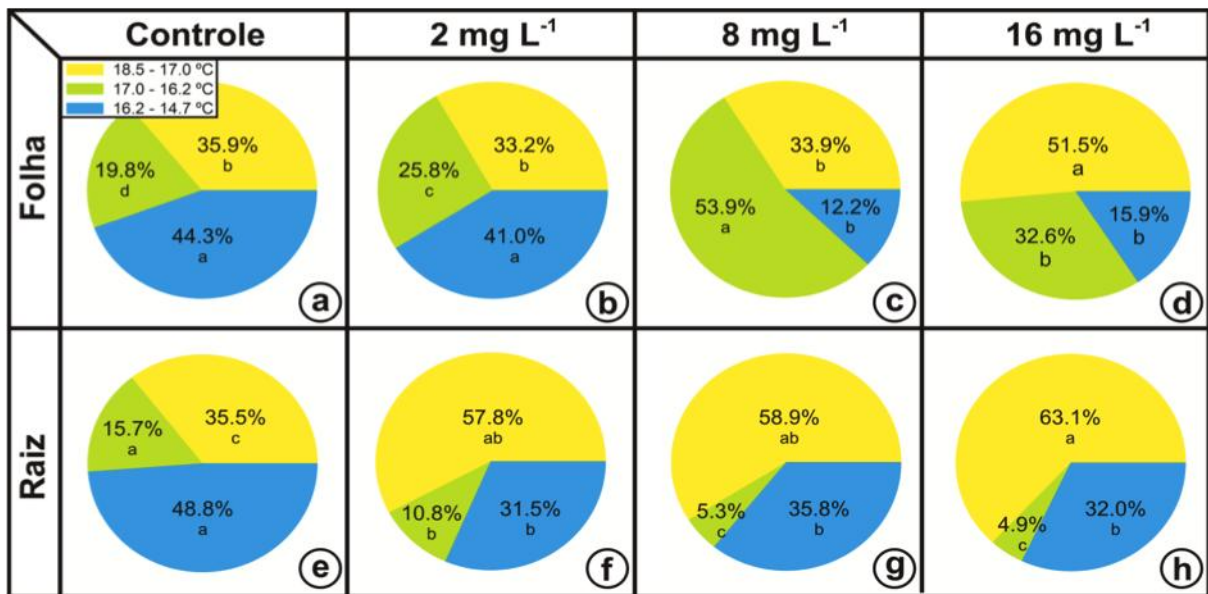


Fig. 13. Quantificação da temperatura de folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio em hidroponia, a partir de imagens obtidas com câmera em infravermelho. **a-d.** Folha. **e-h.** Raiz. **a e e.** Controle. **b e f.** 2 mg L⁻¹ de arsênio. **c e g.** 8 mg L⁻¹ de arsênio. **d e h.** 16 mg L⁻¹ de arsênio. Notar a redução das áreas mais frias e aumento das mais quentes nos tratamentos com arsênio. Legenda: Azul = 14.7 – 16.2 °C; Verde = 16.2 – 17.0 °C; Amarelo = 17.0 – 18.5 °C. Tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A faixa de temperatura mais baixa (14,7 – 16,2 °C) predominou na parte aérea das plantas controle e naquelas expostas a 2 mg As L⁻¹. No tratamento com 8 mg As L⁻¹ predominou a faixa de temperatura intermediária (16,2 – 17,0 °C), enquanto no tratamento com a concentração máxima do poluente a faixa de temperatura máxima (17,0 – 18,5 °C) foi a predominante, evidenciando o aumento gradual da temperatura das plantas com o aumento da concentração de As em solução (Fig 13).

6.1.10. Efeitos do arsênio sobre a produção de biomassa

Os danos provocados pelo As na fotossíntese em *A. thaliana* resultaram em alterações no conteúdo de massa fresca e seca após serem expostas às concentrações crescentes desse poluente por cinco dias consecutivos (Fig. 14). Na parte aérea foi verificada redução significativa da massa fresca de, aproximadamente, 40 e 70% em relação ao controle, nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹ de As, respectivamente. Nas raízes só foi verificada diferença significativa neste parâmetro no tratamento com a concentração máxima de As, sendo a redução de, aproximadamente, 40% (Fig. 14a). O percentual de massa seca apresentaram redução significativa somente no tratamento com 16 mg L⁻¹ (Fig. 14b).

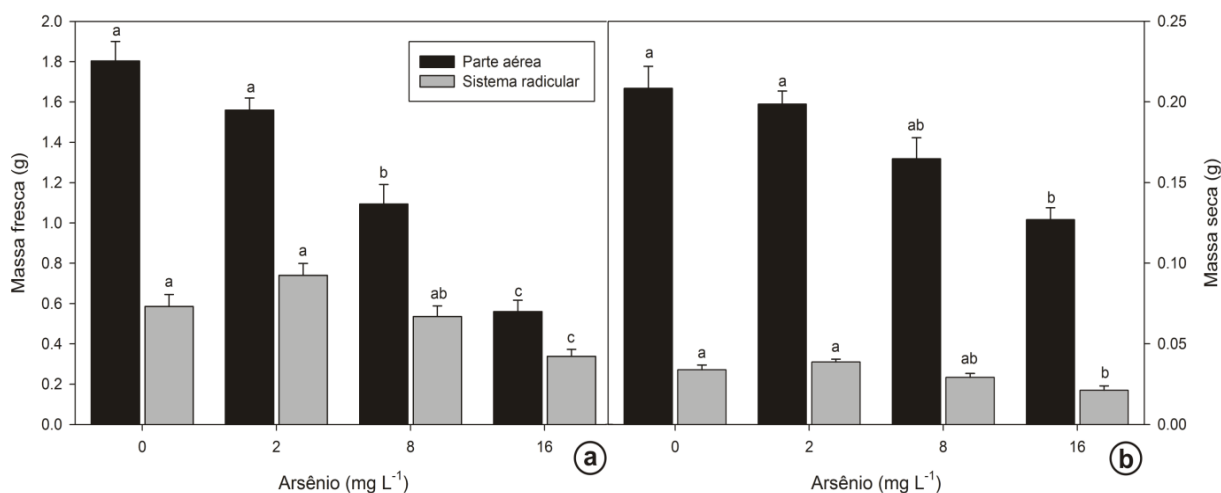


Fig. 14. Efeito de concentrações crescentes de arsênio em sistema hidropônico sobre a produção de biomassa em plantas de *Arabidopsis thaliana* após cinco dias de exposição ao poluente. **a.** Redução da massa fresca da parte aérea e da raiz com o aumento da concentração de arsênio no meio externo. **b.** Redução da massa seca da parte aérea e da raiz com o aumento da concentração de arsênio no meio externo. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.1.11. Efeitos do arsênio sobre os teores de açúcares

A exposição ao As afetou fortemente o metabolismo de açúcares em *A. thaliana*. Os teores de glicose aumentaram nas folhas jovens, em todos os tratamentos, e nas folhas maduras e raízes, nos tratamentos com as duas maiores concentrações do elemento. Não foi observada diferença significativa nos teores de glicose nas diferentes partes da planta analisada, entre os tratamentos. Em geral, foi observado maior teor de glicose nas folhas jovens das plantas tratadas com As (Fig 15a). Os teores de frutose aumentaram com a exposição ao As nas folhas jovens. Nas folhas maduras houve redução da concentração destes açúcares no tratamento com 2 mg L⁻¹, seguido do aumento nos demais tratamentos. Foi observado decréscimo nos teores de frutose somente nas raízes. A única alteração nos teores de frutose nas raízes foi observada no tratamento com 16 mg L⁻¹, os quais foram reduzidos. Entre as diferentes partes da planta analisadas, os teores foram sempre maiores nas folhas e menores nas raízes (Fig. 15b). Com relação à sacarose, foi observado que os teores permaneceram inalterados nas folhas jovens e raízes, após a exposição às diferentes concentrações de As. Foi observado aumento dos teores destes açúcares nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹ nas folhas maduras. Nos tratamentos com 0, 2 e 8 mg L⁻¹ os teores foram similares entre as folhas jovens e maduras, e inferiores nas raízes. No tratamento com 16 mg L⁻¹ a concentração foi maior nas folhas maduras (Fig. 15c).

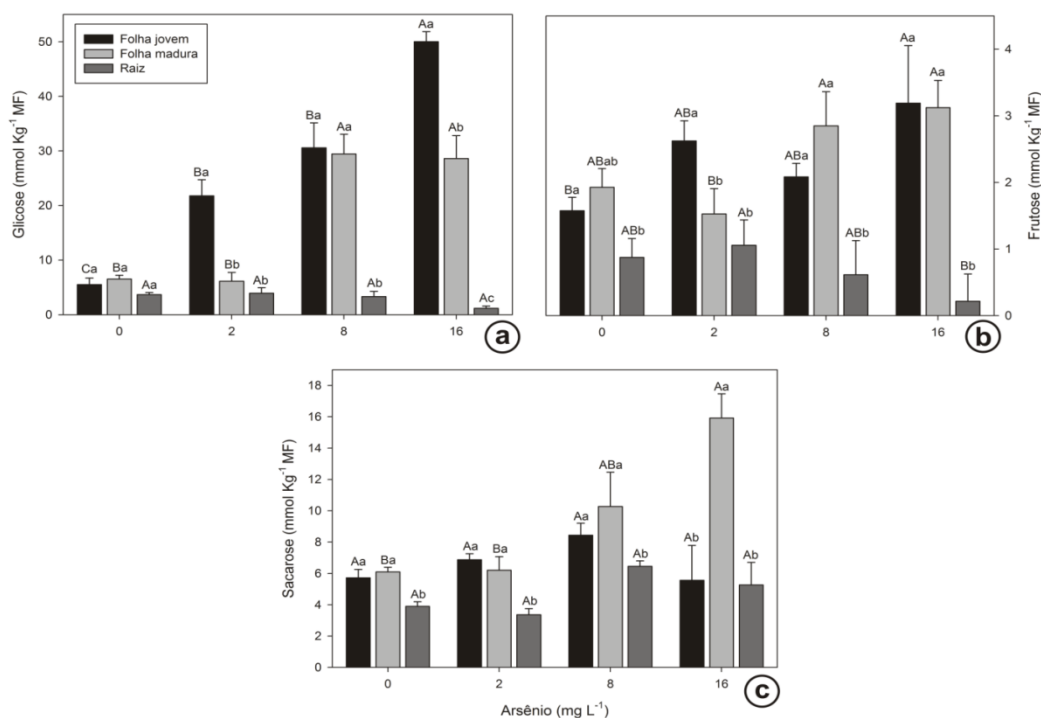


Fig. 15. Teores de açúcares nas folhas jovens, folhas maduras e raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg As L⁻¹ por cinco dias. **a.** Glicose. **b.** Frutose. **c.** Sacarose.

6.1.12. Determinação do estresse oxidativo causado pelo arsênio

Foi detectado aumento significativo dos teores de compostos fenólicos solúveis nas plantas (Fig. 16a). O acúmulo na parte aérea foi de três (no controle) a nove vezes (no tratamento com 16 mg As L⁻¹) maior que no sistema radicular. Na parte aérea foi observado aumento crescente da concentração de fenóis solúveis com o aumento da concentração de As, ao passo que nas raízes os valores aumentaram nas plantas pertencentes aos tratamentos com 2 e 8 mg As L⁻¹, sofrendo queda no tratamento com a concentração máxima. Apesar da redução nos teores desses compostos nas plantas dos tratamentos com 16 mg As L⁻¹, nos demais tratamentos foi observado que o aumento acompanhou o escurecimento das raízes com o aumento da concentração de As (Fig. 3d). O dano oxidativo foi observado em raízes e folhas, já a partir da dose mais baixa de As, 2 mg As L⁻¹. Em raízes, nesta concentração, o teor de MDA foi cerca de três vezes maior que no controle e nos demais tratamentos essa diferença foi maior que dez vezes. Adicionalmente, a produção de MDA nas raízes foi muito maior que nas folhas nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹ (Fig. 16b). Foi verificado que o dano oxidativo atingiu valores máximo e estatisticamente semelhantes nas folhas e raízes, nos tratamentos de 8 e 16 mg L⁻¹. Nestes dois tratamentos, em folhas, a peroxidação de lipídios foi 2,5 vezes maiores (em média) que o teor detectado no tratamento com a concentração mais baixa de As, 2 mg L⁻¹.

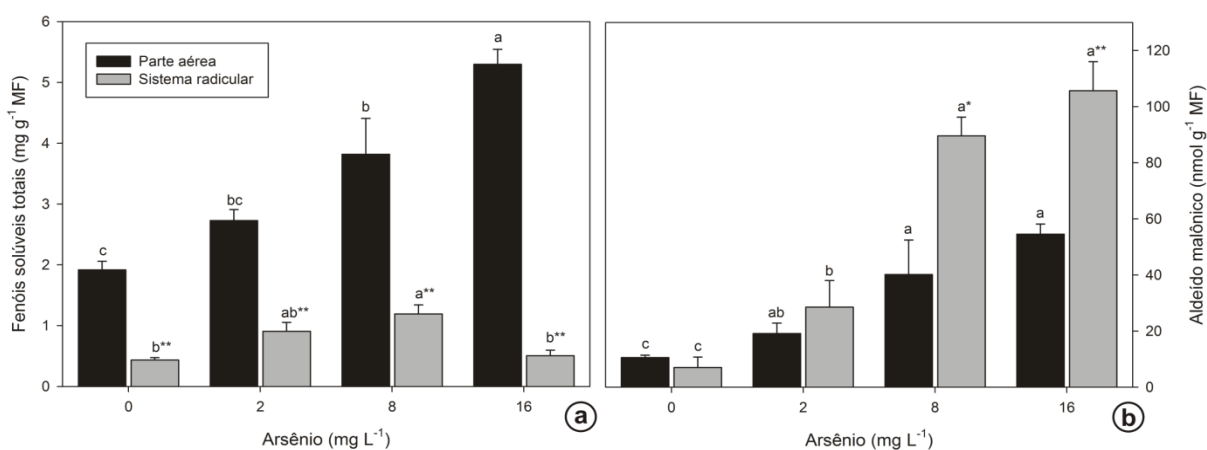


Fig. 16. Teor de compostos fenólicos e aldeído malônico em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ de arsênio, em hidroponia, durante cinco dias. **a.** Teor de fenóis solúveis totais. **b.** Teor de aldeído malônico. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por * e ** são significativas em nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, dentro de um mesmo tratamento.

A integridade da membrana plasmática de folhas de plantas expostas a 8 e 16 mg As L⁻¹ foi muito afetada, visto que foi observado aumento dos níveis de extravasamento de eletrólitos nas plantas expostas a esses tratamentos (Fig. 17).

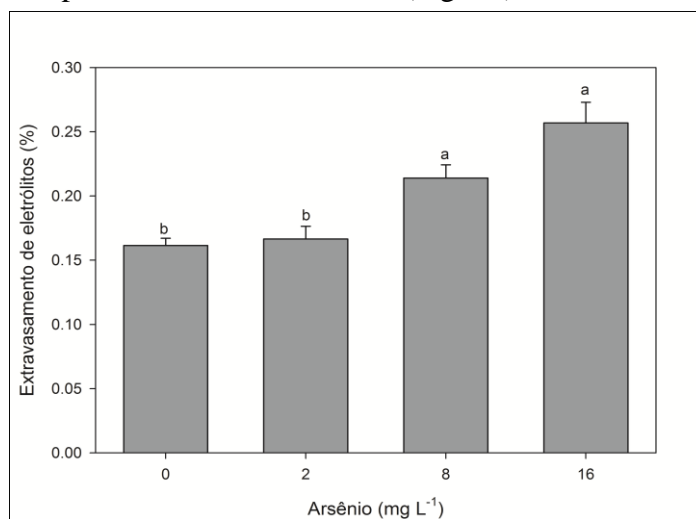


Fig. 17. Taxa de extravasamento de eletrólitos (%) em folhas provenientes de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio em sistema hidropônico. Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Detectou-se, via reação com DAB, aumento nos teores de H₂O₂ em folhas (Fig. 18) e raízes (Fig. 19) de *A. thaliana* após exposição ao As por cinco dias. Em geral, as regiões coradas em marrom, isto é, onde houve maior acúmulo de H₂O₂, localizavam-se nas regiões mais marginais da folha, principalmente nas proximidades do ápice. O aumento da concentração de As na solução nutritiva ocasionou maior acúmulo de H₂O₂ nas folhas, principalmente nas maduras, o que também foi facilmente visualizado nas raízes, principalmente no tratamento com a maior concentração de As (Fig. 19). As manchas azuis, correspondentes à formazana, produto insolúvel resultante da reação do O₂⁻ com o reagente NBT, apresentaram-se distribuídas aleatoriamente em diferentes regiões da lâmina foliar (Fig. 18). As manchas ocorreram em maior quantidade e intensidade da cor com o aumento da concentração de As no meio externo em ambos os estádios de desenvolvimento foliar, mas também apresentaram um padrão de coloração um pouco mais acentuado nas folhas maduras.

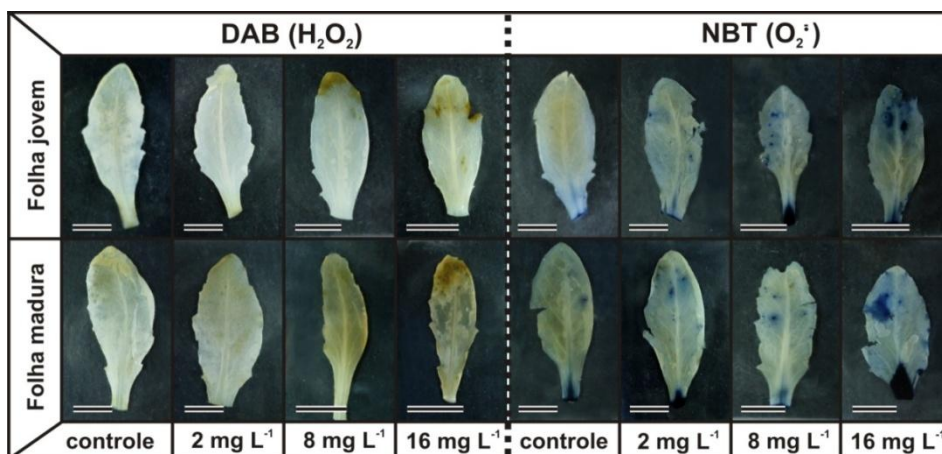


Fig. 18. Visualização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), detectado pela reação com 3,3'diaminobenzidina (DAB), e radical superóxido (O₂^{•-}), detectado pela reação com azul de nitrotetrazólio (NBT), na lâmina foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio (0, 2 8 e 16 mg L⁻¹) por cinco dias. Barras = 2 cm.

Os níveis de H₂O₂ aumentaram gradativamente nas raízes com o incremento de As na solução nutritiva. O teste indica que os maiores teores de O₂^{•-} são encontrados no tratamento com 8 mg As L⁻¹. No tratamento com 2 mg L⁻¹ quase não foi observada coloração, exceto na região mais próxima do coleto. Na maior dose de As observaram-se raízes aparentemente mortas, o que pode ter prejudicado a detecção de EROs neste tratamento (Fig. 19).

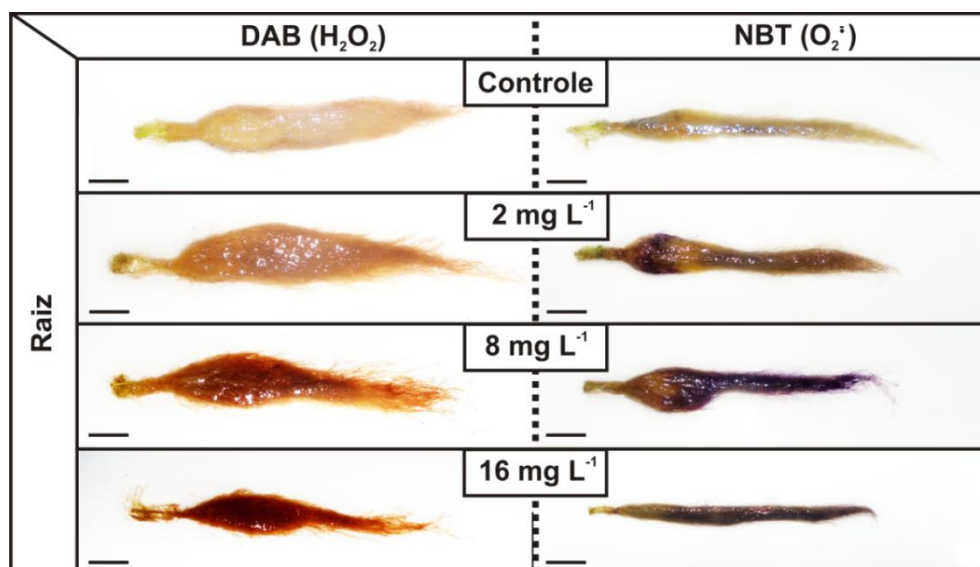


Fig. 19. Visualização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), detectado pela reação com 3,3'diaminobenzidina (DAB), e do radical superóxido (O₂^{•-}), detectado pela reação com azul de nitrotetrazólio (NBT), nas raízes de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio (0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹) por cinco dias. Barras = 2 cm.

6.1.13. Efeitos do arsênio sobre os teores de proteínas totais e carboniladas

O teor de proteínas totais permaneceu constante nas folhas, em todos os tratamentos. Em contraste, nas raízes, a exposição ao As promoveu redução da concentração de proteínas em plantas expostas a 16 mg L⁻¹ do elemento (Fig. 20a). Não foi observada diferença significativa nos teores de proteínas carboniladas entre os tratamentos (Fig. 20b).

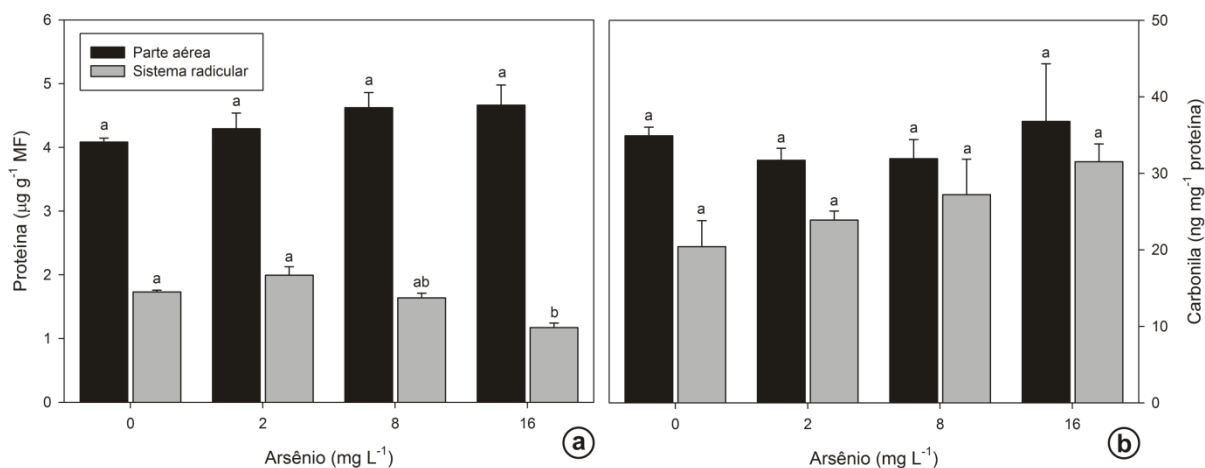


Fig. 20. Determinação dos teores de proteínas totais e carboniladas em folhas e raízes de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio durante cinco dias. **a.** Proteínas totais. **b.** Proteínas carboniladas. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.1.14. Efeitos do arsênio nos teores e translocação de macro e micronutrientes

Foram detectadas alterações nos teores totais de macronutrientes nas plantas com o aumento da concentração de As. Estas alterações devem-se, principalmente, às variações nos teores dos macronutrientes observadas no sistema radicular, visto que a maior parte desses elementos apresentou teores com poucas variações na parte aérea. Foi observado aumento do acúmulo de Ca nas raízes, mas não na parte aérea, resultando na redução do seu FT (Tab. 3).

Os teores de K e Mg foram reduzidos no sistema radicular com o incremento de As na solução nutritiva, mas alterações significativas nos teores desses macronutrientes não foram detectados na parte aérea. O P acumulou-se tanto nas raízes quanto na parte aérea, observando-se redução do FT de P já a partir do tratamento com 2 mg As L⁻¹. O teor de S, bem como seu FT, reduziu-se somente nas plantas expostas às mais altas concentrações de As (Tab. 3).

Tab. 3. Concentração de *macronutrientes* nos tecidos e correlação com o teor de arsênio acumulado no sistema radicular e na parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio por cinco dias

	Trat.	Concentração nos tecidos (g kg ⁻¹)			FT	Correlação com o teor de As acumulado	
		Sistema radicular	Parte aérea	Total acumulado		Sistema radicular	Parte aérea
Ca	0	9,71 bc	29,35 a	39,06 b	3,02 a	0,091	0,313
	2	11,27 c	30,40 a	41,67 ab	2,70 ab		
	8	13,4 b	31,00 a	44,4 a	2,31 b		
	16	14,51 a	30,61 a	45,12 a	2,11 b		
K	0	25,37 a	16,37 a	41,74 a	0,65 b	-0,577*	0,148
	2	16,17 b	14,75 a	30,92 b	0,91 b		
	8	10,52 bc	15,47 a	25,99 bc	1,47 b		
	16	4,99 c	16,59 a	21,58 c	3,32 a		
Mg	0	5,70a	7,28 a	12,28 a	1,28 b	-0,343*	0,557**
	2	5,46 a	7,45 a	12,91 a	1,36 b		
	8	4,26 b	7,59 a	11,85 b	1,78 a		
	16	3,96 b	7,72 a	11,68 b	1,95 a		
P	0	4,32 a	3,37a	7,69 a	0,78 a	-0,207	-0,584*
	2	4,08 a	2,84ab	6,92 ab	0,50b		
	8	3,32b	2,26b	5,58c	0,59b		
	16	3,20 b	2,17b	5,37c	0,78a		
S	0	8,05 ab	6,81 a	14,86 a	0,85 b	0,088	0,111
	2	9,42 a	6,77 a	16,19 a	0,72 b		
	8	6,06 ab	6,81 a	12,87 a	1,12 ab		
	16	5,74 b	7,31 a	13,05 a	1,27 a		

Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores seguidos por *, na horizontal, são significativos em nível de 5% de probabilidade pela análise de correlação de Pearson. Abreviatura: As = arsênio; FT = fator de translocação; Trat. = tratamento.

O teor de micronutrientes, na presença do As, apresentou alterações mais acentuadas que aquelas observadas para os macronutrientes. Como observado na tabela 4, os teores de Cu, Zn e Mo apresentaram grandes reduções nas raízes, já após a exposição a 2 mg As L⁻¹, mas somente o Mo apresentou aumento do FT com o incremento de As no meio externo. Enquanto os teores de Zn e Mo continuaram a diminuir nas raízes com aumento da concentração de As, os teores de Cu não se alteraram. Por outro lado, a exposição ao As ocasionou aumento expressivo dos teores de Fe, nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹, e Mn, nos tratamentos com 2 e 8 mg As L⁻¹. Na parte aérea foram observadas mudanças similares às

das raízes, como aumento nos teores de Fe, nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹ e redução drástica nos teores de Mo e Zn, em todos os tratamentos com As (Tab 4).

Tab. 4. Concentração de *micronutrientes* nos tecidos e correlação de Pearson com o teor de arsênio acumulado no sistema radicular e na parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio por cinco dias

	Trat.	Concentração nos tecidos (mg kg ⁻¹)			FT	Correção com o teor de As acumulado	
		Sistema radicular	Parte aérea	Total absorvido		Sistema radicular	Parte aérea
Cu	0	22,57 a	2,35b	24,92 ab	0,10 a	-0,247	0,767**
	2	16,62 b	2,16c	18,78 c	0,13 a		
	8	19,01 ab	2,47 ab	21,48 bc	0,13 a		
	16	23,27 a	2,58 a	25,85 a	0,11 a		
Fe	0	2283,66 bc	122,26 b	2405,92bc	0,05 a	0,021	0,791**
	2	1859,09 c	122,00 b	1981,09 c	0,07 a		
	8	2498,16 b	139,46 ab	2637,62 b	0,06 a		
	16	3062,55 a	160,89 a	3223,44 a	0,05 a		
Mn	0	97,12 b	91,03 b	188,15 b	0,94 a	0,341	0,508**
	2	113,71 b	96,39 ab	210,10 b	0,85 a		
	8	324,17 a	104,09 a	428,26 a	0,32 b		
	16	87,63 b	98,63 ab	186,26 b	1,13 a		
Mo	0	15,69 a	3,62 a	19,31 a	0,23 b	-0,751**	-0,765**
	2	5,04 b	3,18 ab	8,22 b	0,63 a		
	8	6,10 b	3,15 bc	9,25 b	0,52 a		
	16	5,43 b	2,70 c	8,13 b	0,50 a		
Zn	0	60,53 a	19,07 a	79,60 a	0,32 b	-0,775**	-0,091
	2	21,08 b	12,81 b	33,89 b	0,60 a		
	8	16,49 b	11,33 b	27,82 b	0,68 a		
	16	24,97 b	14,06 b	39,03 b	0,56 a		

Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores seguidos por * e **, na horizontal, são significativos em nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pela análise de correlação de Pearson. Abreviatura: As = arsênio; FT = fator de translocação; Trat. = tratamento.

Nas raízes, foi observada correlação negativa forte para os teores de Mo e Zn, e moderada para os teores de K e Mg, com o aumento da concentração de As no meio externo. Nenhum elemento apresentou correlação positiva com o teor de As na solução nesse órgão. Na parte aérea observou-se correlação negativa forte para os teores de Mo e moderada para o P. O Cu e o Fe apresentaram correlação positiva forte com o teor de As no meio, e o Mg apresentou correlação positiva moderada (Tab. 4).

6.2. Efeitos genotóxicos do arsênio

6.2.1. Confirmação da genotoxicidade do arsênio em raízes de *Allium cepa*

O As promoveu redução do índice mitótico de 18,6 e 62% nos tratamentos com 8 e 16 mg L⁻¹ deste elemento, respectivamente, após 24 h de exposição em solução nutritiva. O aumento do tempo de exposição para 48 h fez com que a concentração de 2 mg As L⁻¹ também passasse a atuar como agente genotóxico, atingindo valor médio estatisticamente similar ao observado nas plantas do tratamento com 8 mg As L⁻¹. Nesses tratamentos, com 48 horas de exposição, a redução média do IM foi de cerca de 30%. No tratamento com a maior concentração de As foi detectada redução de quase 85% (Fig. 21a).

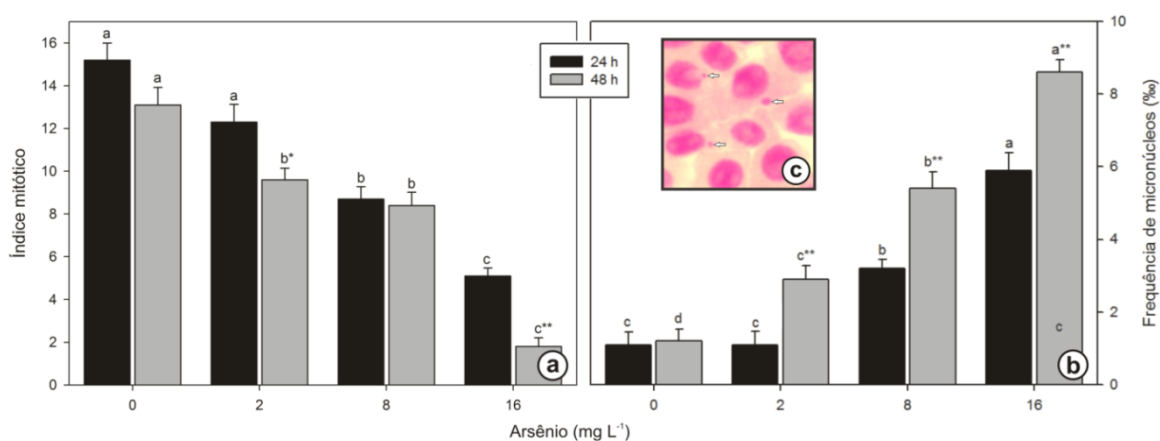


Fig. 21. Determinação do índice mitótico e da frequência de micronúcleos em ápices radiculares de *Allium cepa* (cebola) expostos a concentrações crescentes de arsênio por 24 e 48 horas. **a.** Redução do índice mitótico. **b.** Aumento da frequência de micronúcleos. **c.** Micronúcleos (setas). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), dentro de um mesmo tempo de exposição. Dentro de um mesmo tratamento, médias com * ou ** diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5 e 1% de significância, respectivamente.

A redução do IM acompanhou o aumento da frequência de micronúcleos (MN) detectada nas raízes com o incremento de As no meio (Fig. 20b), a qual também foi afetada pelo tempo de exposição ao poluente. Em geral, cada célula micronucleada continha somente um MN (Fig. 20c). Em alguns raros casos foram observados dois, não mais que isso.

A taxa de fragmentação do DNA, avaliada por meio do ensaio cometa após 48 h de exposição ao As, aumentou 5,5 e 16,5% nas concentrações de 2 e 8 mg L⁻¹ do elemento na

solução nutritiva (Fig. 22). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com 8 e 16 mg As L⁻¹.

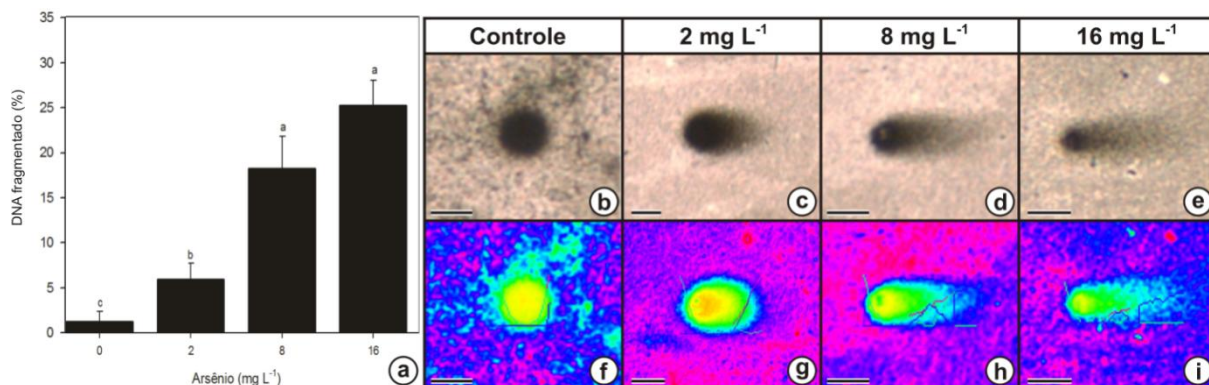


Fig. 22. Fragmentação do DNA, detectada pelo ensaio cometa, em ápices radiculares de *Allium cepa* (cebola) expostos a concentrações crescentes de arsênio por 48 h. **a.** Porcentagem de DNA presente na cauda dos “cometas”, correspondente ao DNA fragmentado. **b – i.** Cometas com danos mais drásticos visualizados em cada tratamento com arsênio. **a – d.** Imagens visualizadas ao microscópio de luz (aumento de 400 vezes) de núcleos corados com nitrato de prata. **e – i.** Imagens fornecidas pelo software *CometScore*, para a obtenção do percentual de DNA fragmentado. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.2.2. Efeitos do arsênio sobre a expressão gênica

A exposição de plantas de *A. thaliana* (WT) ao As, durante cinco dias, promoveu alterações na expressão da maioria dos genes avaliados, relacionados à defesa das plantas contra o As (Fig. 23). Ressalta-se que, nas raízes de plantas expostas a 8 mg L⁻¹, não foi obtido sucesso na análise de expressão gênica, uma vez que não foi possível normalizar os dados com os genes constitutivos. Em todos os genes normalizadores avaliados os valores de *ct* foram muito altos, chegando a ser 80% maiores que os observados nos tratamentos com 0 e 2 mg As L⁻¹.

Os genes relacionados aos mecanismos antioxidativos enzimáticos que apresentaram aumento significativo da expressão nas raízes foram os codificantes das enzimas ascorbato peroxidase 2 (Apx2), catalase 1 (Cat1), catalase 2 (Cat2) e Cu/Zn superóxido desmutase (CuZnSod), com aumento do 5,3; 3,3; 2,5 e 1,9 vezes, respectivamente (Fig. 23 e 24a).

Os genes codificantes de enzimas do sistema glutatona/fitoquelatinas glutatona redutase 1 (Gr1), glutatona-S-transferase 6 (Gstf8) e fitoquetatina sintase 1 (PCS1) apresentaram aumento de 3,4; 4,0 e 2,3 vezes, respectivamente (Fig. 23 e 24b). Outro importante mecanismo de redução da produção de EROs inclui a rota alternativa de evolução

de oxigênio através das oxidases alternativas. Os genes codificantes das proteínas Aox1a e Aox3 tiveram aumento de 2,2 e 4,1 vezes na expressão, respectivamente (Fig. 23 e 24d).

Os genes relacionados aos sistemas de reparo do DNA tiveram um comportamento duplo nas raízes. Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes Mlh1, relacionado ao mecanismo *mismatch repair* (MMR), Rad 51 e RecA, relacionados aos mecanismos de recombinação homóloga. Entretanto, os genes Msh2 e Msh7, ambos também relacionados ao mecanismo MMR, e o Ku70, relacionado ao reparo através de recombinação homóloga, apresentaram aumento de expressão em 2,7; 2,4 e 0,6 vezes na raiz (Fig. 23 e 24c).

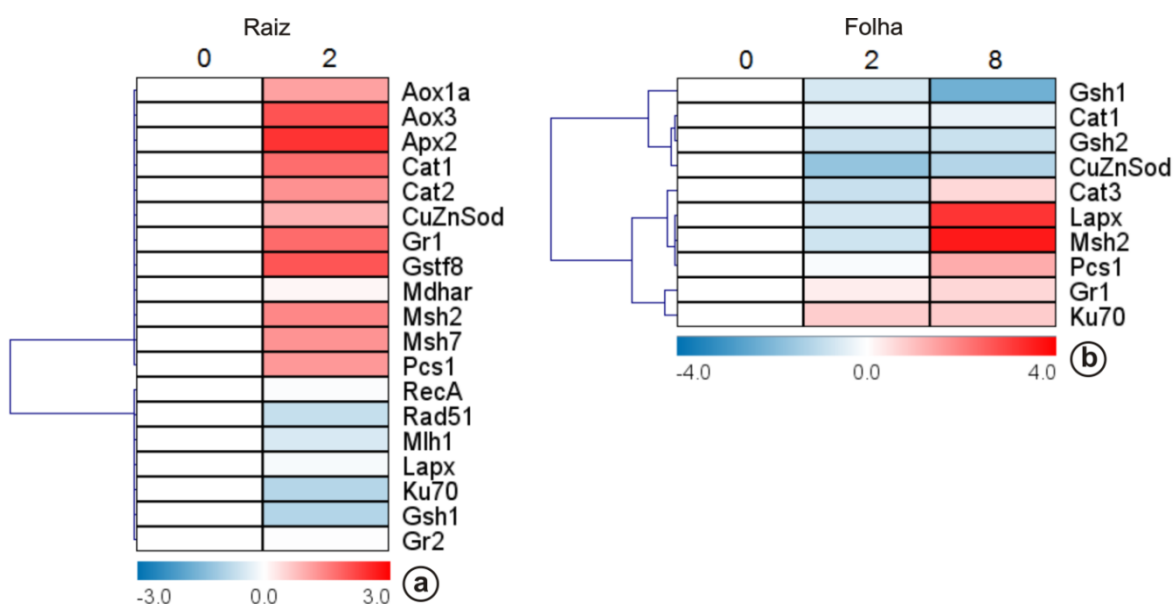


Fig. 23. Representação das alterações na expressão gênica de genes relacionados a mecanismos de defesa contra o arsênio, em plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a este elemento por cinco dias. Tons de vermelho e azul representam diferentes níveis de aumento e redução da expressão, respectivamente, sendo os valores mais expressivos com o aumento da intensidade da cor. **a.** Raiz. Controle (0) e 2 mg L⁻¹ de arsênio (2). **b.** Folha. Controle (0), 2 (2) e 8 mg L⁻¹ de arsênio (8).

A resposta de alguns genes na parte aérea foi diferente daquela observada nas raízes. Foi observado que alguns genes, apesar de apresentarem nenhuma ou pequena alteração na expressão gênica no tratamento com 2 mg As L⁻¹ na parte aérea, possuem um grande aumento da expressão somente quando expostos a concentrações mais tóxicas do poluente. O gene de uma peroxidase do ascorbato, Lapx, relacionado ao mecanismo antioxidativo, por exemplo, não teve sua expressão significativamente alterada no tratamento com a menor concentração de As (ao contrário do que foi observado na raiz), mas apresentou aumento na expressão de

quase dez vezes na presença de 8 mg L⁻¹ do agente tóxico. Os genes codificantes das enzimas catalase 3 (Cat3) e CuZnSod tiveram sua expressão reduzida com a exposição a 2 mg As L⁻¹, mas a exposição a 8 mg L⁻¹ promoveu aumento na expressão de Cat3 (de 1,5 vezes), mas não de CuZnSod (Fig. 23 e 25a), como tinha sido verificado na raiz.

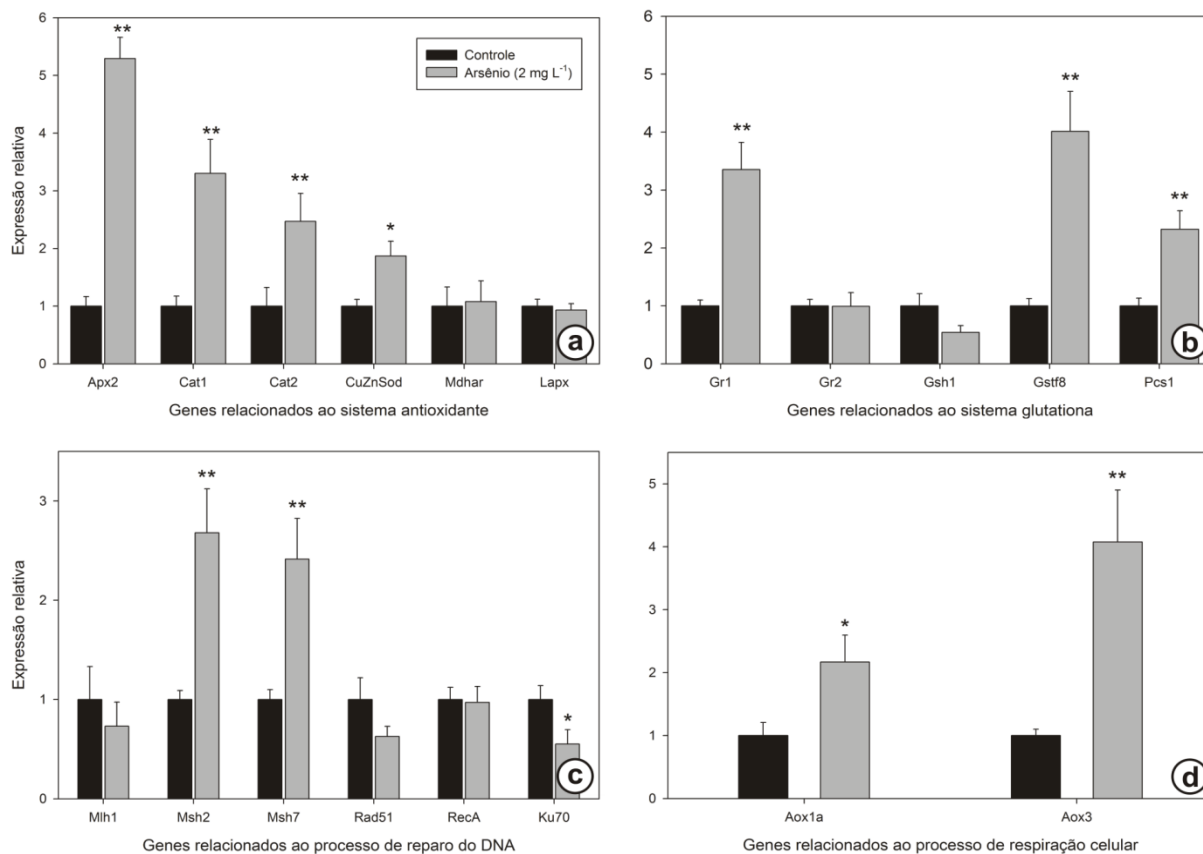


Fig. 24. Expressão relativa de genes relacionados a diferentes processos de defesa à toxidez do arsênio, em raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a 2 mg L⁻¹ do poluente. **a.** Genes relacionados com o sistema antioxidante enzimático. **b.** Genes relacionados ao sistema glutaciona. **c.** Genes relacionados ao processo de reparo do DNA. **d.** Genes relacionados ao processo de respiração celular. Barras representam médias \pm erro padrão. Médias com * ou ** diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5 e 1% de significância, respectivamente.

Os genes relacionados ao mecanismo de destoxificação glutaciona/fitoquelatinas, Gr1 e Pcs1, também apresentaram aumento na expressão na parte aérea com o aumento da concentração de As. O gene Gsh1, na parte aérea, manteve o padrão de redução da expressão na presença do As, que foi observado nas raízes. Da mesma forma, assim como observado nas raízes, os genes codificantes das enzimas glutaciona redutase (Gr1), que cataliza a redução da glutaciona oxidada, e fitoquelatina sintase (Pcs1), relacionado à união de monômeros

glutaciona para a síntese de fitoquelatina, apresentaram aumento na expressão após a exposição ao As (Fig. 23 e 25b).

O padrão de expressão dos genes de reparo do DNA apresentou diferenças entre a parte aérea e o sistema radicular. Contrariamente ao que foi visto nas raízes, o gene Ku70 apresentou aumento na expressão na parte aérea. O gene Msh2, altamente responsivo na parte aérea de plantas expostas a 2 mg L⁻¹, mas apresentou aumento muito expressivo quando as plantas foram expostas a 8 mg L⁻¹ (Fig. 23 e 25c).

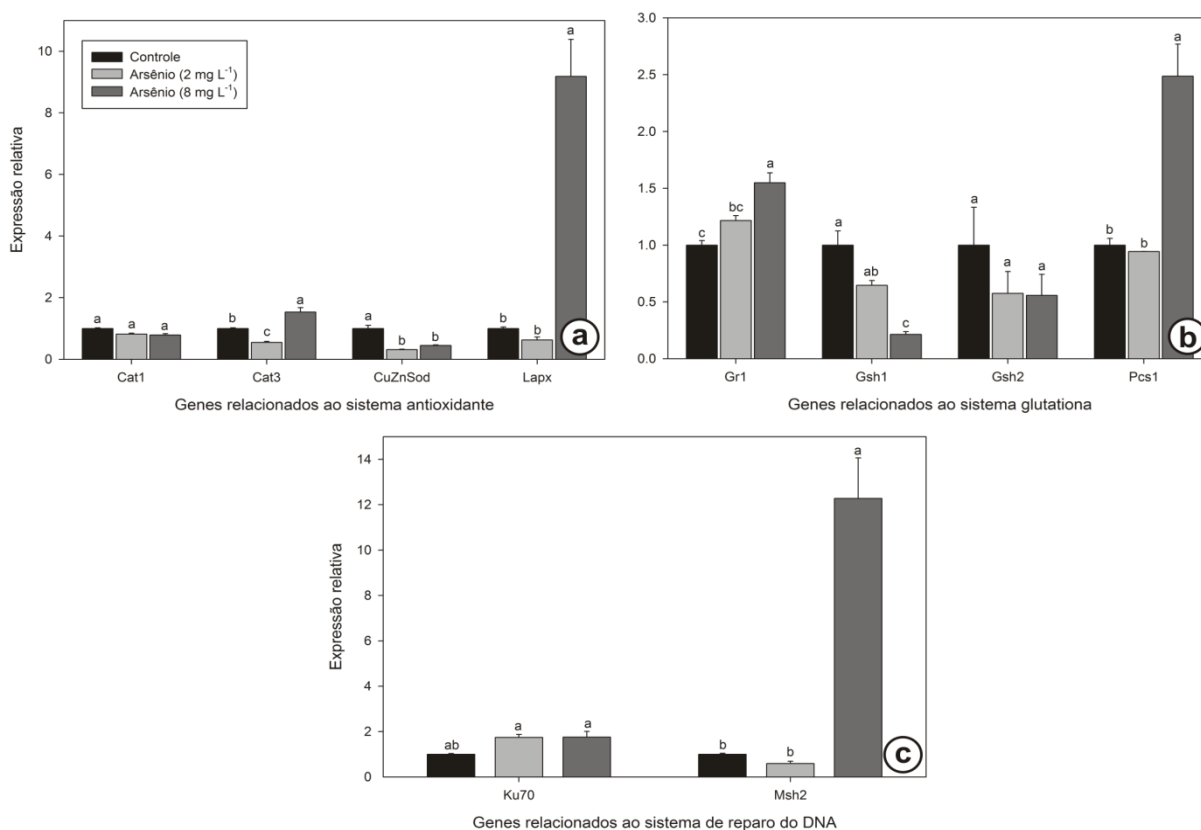


Fig. 25. Expressão relativa de genes relacionados a diferentes processos de defesa ao arsênio, em folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 2 e 8 mg L⁻¹ do poluente. **a.** Genes relacionados com o sistema antioxidante enzimático. **b.** Genes relacionados ao sistema glutaciona. **C.** Genes relacionados ao processo de reparo do DNA. Barras representam médias ± erro padrão. Médias com * ou ** diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5 e 1% de significância, respectivamente.

6.2.3. Determinação das taxas de mutação em plantas transgênicas repórteres de diferentes tipos de mutações

A análise da taxa de mutações em plantas repórteres foi realizada em plântulas cultivadas na presença de 0, 2 e 8 mg As L⁻¹. Não foi analisado o tratamento com 16 mg L⁻¹, visto que este tratamento foi muito agressivo e as plantas não resistiram até o final da

exposição. Essa análise demonstrou que o principal efeito do As, em termos de mutação do DNA, foi o aumento das taxas de mutação pontual, seguida pelo aumento das taxas de recombinação não-homóloga (Fig. 26a). Isso foi evidenciado pelo aumento no número de pontos azuis nas plântulas expostas ao As, em relação ao controle (Fig. 26b).

Os níveis de mutação pontual foram cerca de 3 e 4 vezes maiores nas plantas tratadas com 2 e 8 mg As L⁻¹, respectivamente, em relação ao que foi contabilizado no controle. Os níveis de recombinação não-homóloga foram 1,5 e 2,2 vezes maiores que os do controle nesses tratamentos. Também foi observado um pequeno aumento na instabilidade de microsátélites em plântulas expostas à concentração máxima de As. Não foi observada diferença significativa nas taxas de recombinação homóloga entre os tratamentos (Fig. 26a, Tab. 5).

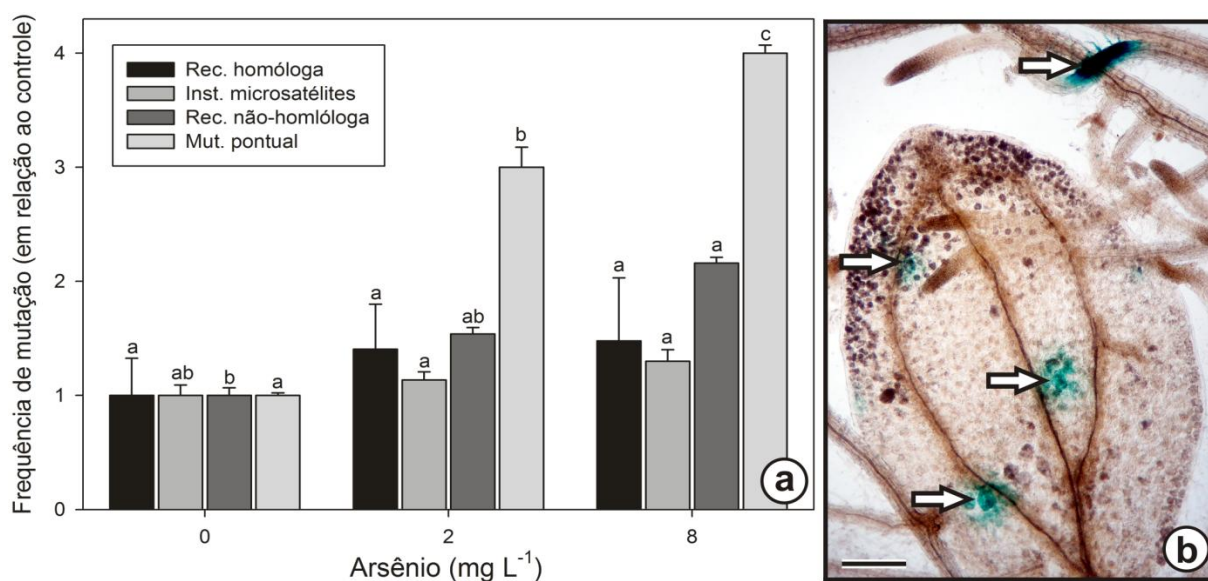


Fig. 26. Frequência de eventos de mutação em plantas repórteres de recombinação homóloga (linhagem #11), instabilidade de microsátélites (linhagem #121), recombinação não-homóloga (linhagem R3L66) e mutação pontual (linhagem #166). **a.** Frequência de recombinação em relação ao controle. **b.** Pontos azuis visualizados na folha e raiz de plantas da linhagem R3L66, repórteres em recombinação não-homóloga (setas). Barras verticais representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Barra horizontal = 100 μm.

Tab. 5. Número de pontos azuis contabilizados em plântulas de *Arabidopsis thaliana* repórteres dos processos de recombinação homóloga, instabilidade de microsátélites, recombinação não-homóloga e mutação pontual, após exposição ao arsênio

Tratamento	Recombinação homóloga (#11)	Instabilidade de microsátélites (#121)	Recombinação não-homóloga (R3L66)	Mutação pontual (#166)
<i>Controle</i>	0,94 ±0,31 a	51,80 ±3,7 b	5,12 ±0,33 b	0,09 ±0,002 c
<i>2 mg L⁻¹</i>	1,32 ±0,52 a	58,92 ±3,1 ab	7,74 ±0,42 ab	0,27 ±0,05 b
<i>8 mg L⁻¹</i>	1,39 ±0,77 a	67,36 ±4,9 a	10,81 ±0,54 a	0,36 ±0,03 a

Médias ± erro padrão. Valores com letras diferentes, na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.2.4. Efeitos do arsênio em mutantes *msh2*

A confirmação dos mutantes homozigotos nulos *msh2* (Hom) é mostrada na figura 27.

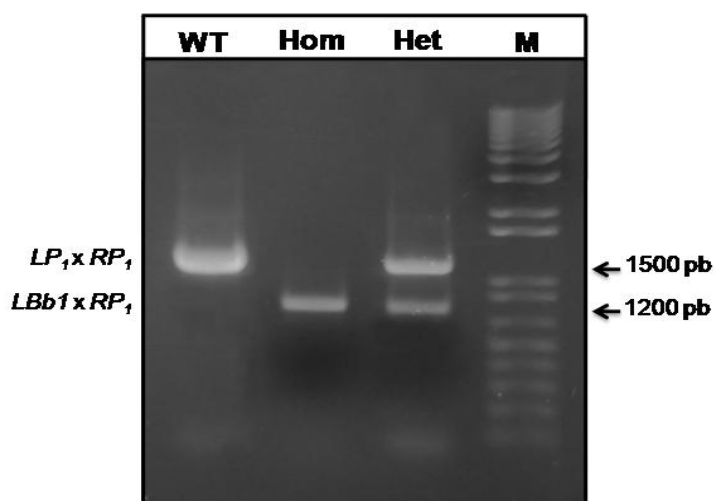


Fig. 27. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR para seleção dos indivíduos mutantes homozigotos nulos *msh2*. Abreviaturas: LP₁: “left primer 1”, RP₁: “right primer 1”, LBB1: “left border primer” (T-dna), WT: *wild type*, Hom: homozigoto, Het: heterozigoto, M: marcador.

Todas as análises foram feitas com plantas homozigotas nulas para o gene *Msh2*. Não foi observada diferença significativa na taxa de germinação de sementes cultivadas em meio contendo as mesmas concentrações de As, pelo teste t, em nível de 5% de significância. Entretanto, verificou-se redução da taxa de germinação das sementes pertencentes ao tratamento com 16 mg As L⁻¹, em ambos os genótipos (Fig. 28).

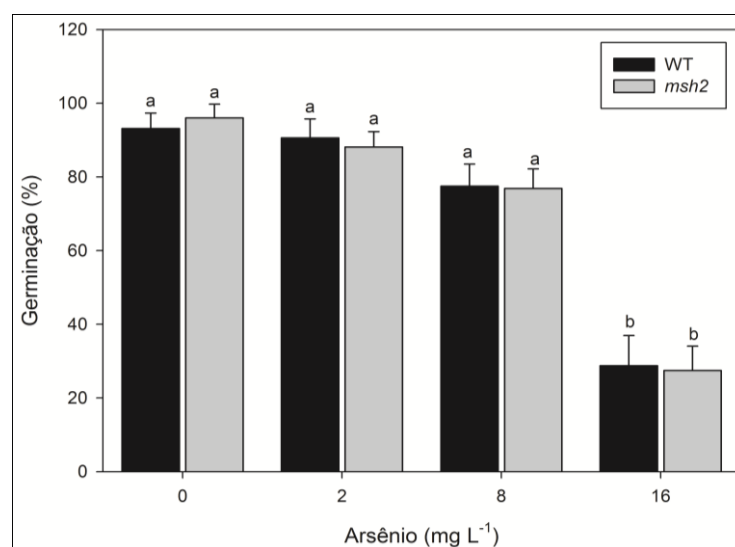


Fig. 28. Taxa de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* (WT e *msh2*) expostas a 0, 2, 8 e 16 mg L⁻¹ de arsênio por dez dias. Barras representam médias ± erro padrão. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi observado que, apesar da germinação das sementes nos tratamentos com 2 e 8 mg L⁻¹ ter apresentado valores elevados (Fig. 28), as sementes foram muito afetadas pelo poluente, resultando na redução do desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle (Fig. 29a-c). Notou-se que após o décimo quarto dia de exposição, as plântulas pertencentes ao tratamento com 8 mg L⁻¹ cessaram completamente seu crescimento e apresentaram sintomas evidentes de toxidez, como tamanho diminuto e folhas arroxeadas. A maior parte das sementes colocadas para germinar em meio contendo 16 mg As L⁻¹ não germinou. Dentre as que germinaram, foi observada a morte prematura da plântula após dois a três dias de germinação, geralmente após a emissão da radícula (Fig. 29d).

O As afetou negativamente o crescimento da raiz durante o desenvolvimento inicial da plântula em todos os tratamentos avaliados. No tratamento com 16 mg L⁻¹ as raízes pararam de crescer logo após a emissão da radícula, quando essas apresentavam somente alguns poucos milímetros de comprimento (Fig. 30).

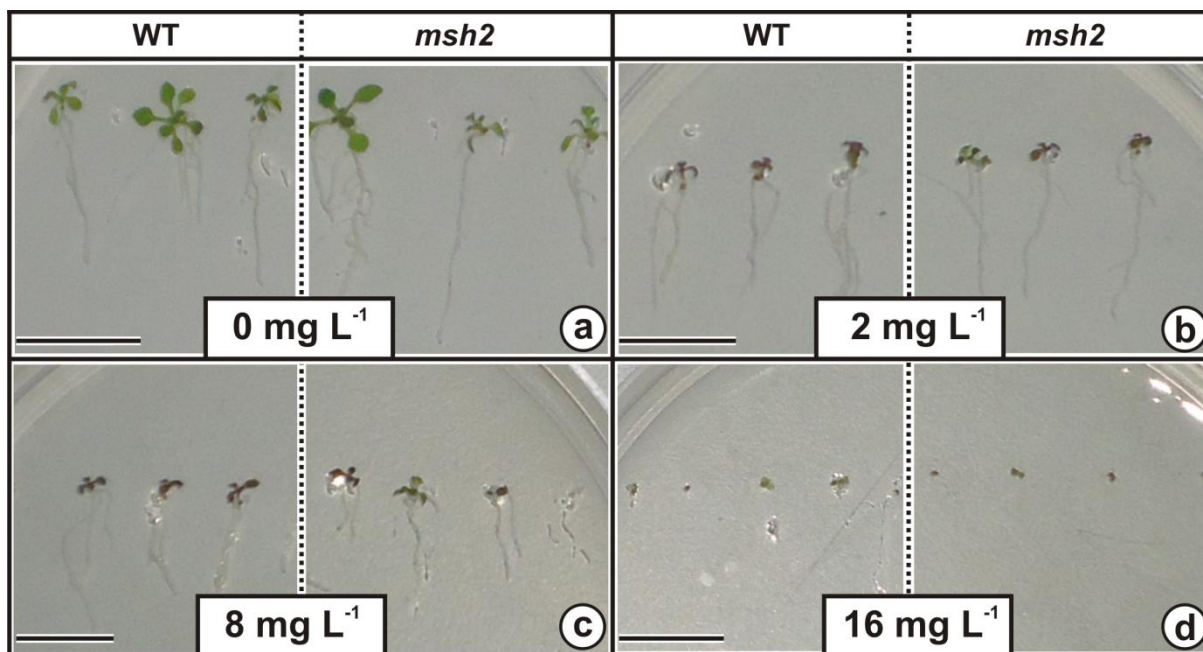


Fig. 29. Crescimento radicular de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (WT e *msh2*) expostas a concentrações crescentes de arsênio por 18 dias. **a.** Controle. **b.** 2 mg As L⁻¹. **c.** 8 mg As L⁻¹. **d.** 16 mg As L⁻¹. Barras = 2 cm.

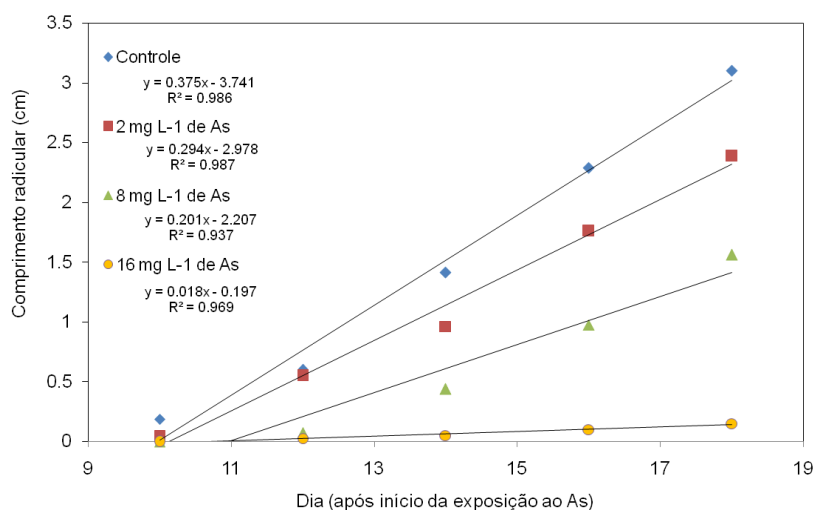


Fig. 30. Crescimento radicular médio, durante dez dias de observação, de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (WT e *msh2*) expostas a 0, 2, 8 e 16 mg As L⁻¹ por 18 dias.

As plantas adultas de mutantes *msh2*, cultivadas e expostas ao As em sistema hidropônico, não apresentaram diferenças fenotípicas expressivas em relação às WT, na ausência do As. Entretanto, após cinco dias de exposição ao poluente as plantas *msh2* apresentaram sintomas de toxidez mais severos que as WT. As folhas das plantas mutantes

msh2 tratadas com apenas 2 mg L⁻¹ adquiriram aspecto comparável ao das WT tratadas com 8 mg As L⁻¹, com forte coloração arroxeadada nas folhas maduras (Fig. 31a). As folhas das plantas *msh2* pertencentes a esse tratamento apresentaram, além da alteração na coloração, aspecto senescente e inúmeras manchas cloróticas e necróticas, como pode ser observado na figura 31b.

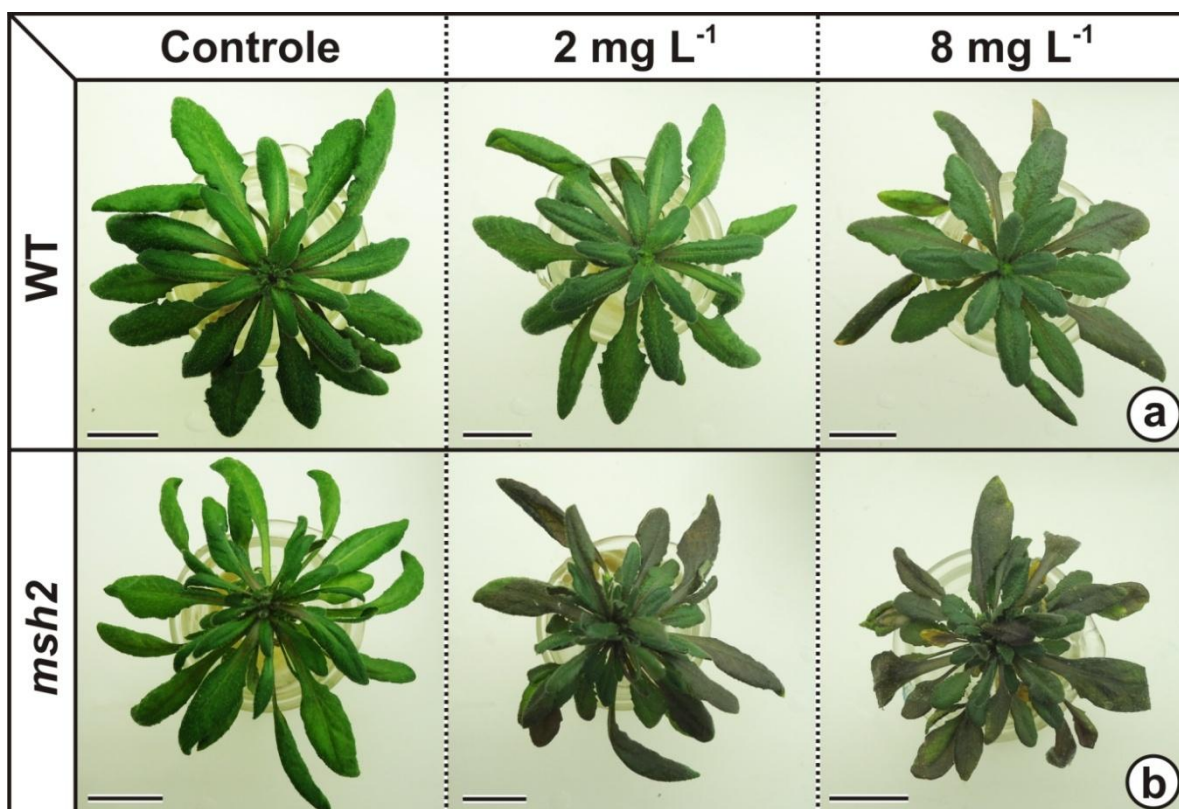


Fig. 31. Parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* após cinco dias de exposição a 0, 2 e 8 mg L⁻¹ de arsênio em solução nutritiva por cinco dias. **a.** WT. **b.** Mutantes *msh2*.

As plantas de *A. thaliana* mutantes *msh2* apresentaram aumento no acúmulo de MDA na parte aérea, em relação ao controle, nos tratamentos com 2 e 8 mg L⁻¹ do poluente. Nas plantas WT só foi observada diferença no tratamento com 8 mg L⁻¹. Os teores de MDA na parte aérea foram significativamente superiores nas plantas *msh2*, o que evidencia o maior potencial do As em gerar estresse oxidativo nesse genótipo (Fig. 32a). Nas raízes, a imposição ao estresse com As promoveu aumento nos teores de MDA, mas não foram observadas diferenças significativas entre os dois genótipos (Fig. 32b).

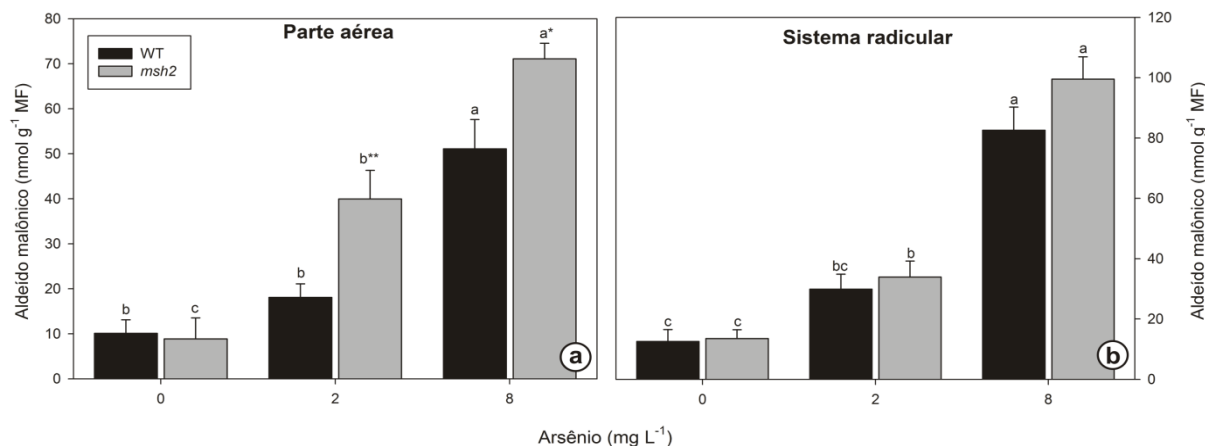


Fig. 32. Teores de aldeído malônico em plantas de *Arabidopsis thaliana* dos genótipos WT e *msh2* após exposição a 0, 2 e 8 mg As L⁻¹. **a.** Parte aérea. **b.** Sistema radicular. Barras representam médias ± erro padrão. Médias com letras diferentes diferem entre si, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por * e ** diferem entre si, entre os genótipos, pelo teste t, em nível de 5 e 1% de significância.

6.2.5. Alterações na atividade da protease caspase-3

A exposição ao As afetou negativamente a atividade da enzima caspase-3 nas raízes de *A. thaliana*. A fluorescência da rodamina gerada em função da degradação do substrato Ac-(DEVD)₂-R110 pela enzima neste órgão foi consideravelmente menor no tratamento com 2 mg As L⁻¹. A emissão de fluorescência não se alterou no tratamento com 8 mg L⁻¹, em relação ao tratamento com 2 mg L⁻¹. No tratamento com 16 mg L⁻¹ foi observada uma pequena redução na emissão de fluorescência em relação aos dois outros tratamentos com As citados. Em contraste com os efeitos observados na raiz, a parte aérea não apresentou nenhuma alteração significativa na atividade da caspase-3 (Fig. 33).

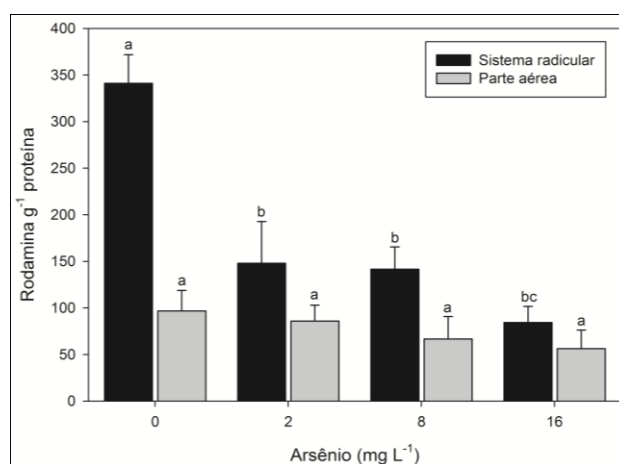


Fig. 33. Concentração de rodamina (corespondente à atividade da enzima caspase-3) em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes de arsênio. Médias de tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

7. DISCUSSÃO

7.1. *A exposição ao As em sistema hidropônico promoveu acúmulo desse metalóide na raiz e aumento do fator de translocação para a parte aérea*

A curta exposição a elevadas concentrações de As causou alterações metabólicas, fisiológicas, moleculares e anatômicas nas raízes e parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana*. O acúmulo de As foi maior no sistema radicular que na parte aérea, como normalmente é observado em espécies não-acumuladoras (Quaghebeur et al. 2004, Catarecha et al. 2007). As diferenças nos teores de As entre a raiz e parte aérea diminuiu com o aumento da concentração do poluente no meio externo, ocasionando aumento significativo do fator de translocação (FT) deste poluente para a parte aérea. Zabloudowska et al. (2009) verificaram que o tipo de sistema de cultivo é um fator diferencial em relação ao FT; a espécie *Calamagrostis arundinacea* apresentou maior FT quando exposta ao As em hidroponia, enquanto outras espécies testadas translocaram mais As para a parte aérea em experimentos conduzidos em solo.

É importante salientar que são raros os estudos sobre os efeitos do As em plantas de *A. thaliana* cultivadas em sistema hidropônico. Comparações entre os mecanismos de defesa contra o As utilizados por plantas cultivadas em sistema hidropônico e em solo/substrato é de difícil estabelecimento, devido à presença de diferentes contaminantes presentes no solo (como outros elementos tóxicos e microorganismos, por exemplo), os quais podem promover a ativação de diferentes mecanismos de defesa nas plantas (Zabloudowska et al. 2009). Isso não ocorre no sistema hidropônico, uma vez que os componentes da solução são facilmente controlados, além de possibilitar a obtenção de plantas com sistema radicular bem desenvolvido, devido à ausência de fatores do ambiente limitantes do crescimento da raiz, e raízes sem partículas de solo/substrato aderidas, o que poderia dificultar a realização de algumas análises. Acredita-se que os teores elevados de As observados nas plantas de *A. thaliana* cultivadas em hidroponia possam ser atribuídos à maior superfície de absorção das raízes, em função do maior desenvolvimento do sistema radicular, bem como à elevada disponibilidade dos elementos neste sistema de cultivo.

Em plantas não-hiperacumuladoras de As, a tolerância é alcançada através de restrição da absorção do elemento pelas raízes ou pela limitação da translocação para a parte aérea, evitando o alastramento da contaminação (Meharg e Macnair 1992). O aumento da

translocação de As para a parte aérea reflete a sensibilidade das plantas de *A. thaliana* ao poluente, visto que as taxas de acúmulo na raiz não foram proporcionais ao aumento dos teores totais deste elemento na planta.

Em geral, para que ocorra a destoxificação do As nas raízes, isto é, sua imobilização no vacúolo, é necessário que haja a redução prévia do arsenato em arsenito pela enzima arsenato redutase, complexação por glutatona e fitoquelatinas e armazenamento do composto complexado no vacúolo, como proposto por Bleeker et al. (2006). Estes autores verificaram, em plantas de *Holcus lanatus*, que a exposição a elevadas concentrações de As ocasiona a absorção de grandes teores do elemento em pouco tempo, fazendo com que os níveis de glutatona e fitoquelatina da raiz não sejam suficientes para destoxificar os teores absorvidos. Assim, grande parte permanece livre no citosol das células radiculares, na forma de arsenito (mais tóxico que o arsenato), causando toxidez na raiz ou na parte aérea, se translocado.

Nas raízes de plantas expostas a 8 mg As L^{-1} foi observado aumento na expressão de genes que codificam as enzimas glutatona redutase 1 (*gr1*, importante para a manutenção do *pool* de glutatona reduzida), glutatona-S-transferase 6 (*gstf8*, promove a complexação da glutatona com o As) e fitoquelatina sintase 1 (*pcs1*, cataliza a síntese de fitoquelatinas à partir de glutatona). Entretanto, para que ocorra aumento na síntese de PCs e consequente destoxificação do As na raiz, é necessário que haja concomitante aumento na expressão dos genes relacionados com a síntese de sua precursora, a glutatona, processo realizado pelas enzimas do tipo Gsh. Um dos genes relacionados com esta função é o γ -glutamyl-cisteinil sintase 1 (*gsh1*), o qual realiza a ligação entre os aminoácidos glutamina e cisteína para a biossíntese da molécula de glutatona (Bleeker et al. 2006). Todavia, não foi observado aumento nos níveis deste transcrito na raiz, sugerindo que a elevada taxa de translocação de As para a parte aérea possa ter sido ocasionada pela síntese insuficiente de fitoquelatinas nas raízes, limitada pela baixa concentração de glutatona, sua molécula precursora. Considerando que o componente mais marcante das glutatona e fitoquelatinas é a presença de grupos tióis, a redução nos teores de S no sistema radicular também corrobora a idéia acima.

Dhankher et al. (2006) verificaram, em plantas de *A. thaliana* com baixos níveis de expressão do gene codificante de AR (*acr2*) na raiz, que as plantas apresentavam baixos níveis de complexação de As neste órgão e que o aumento na translocação deste elemento promoveu maior sensibilidade da parte aérea destas plantas, uma vez que o teor de glutatona presente nas células foliares não foi suficiente para atuar na redução do arsenito, nem na biossíntese de

fitoquelatinas e destoxificação do poluente. Posteriormente, a superexpressão heteróloga do gene *gsh1* de *E. coli* na parte aérea dessas plantas promoveu aumento da taxa de biossíntese de glutathione, resultando em maior acúmulo nos vacúolos das células foliares e aumento da tolerância. Na parte aérea das plantas testadas no presente estudo, apesar de ter sido evidenciado aumento na expressão do gene *pcs1*, verificou-se que esse aumento foi acompanhado da inibição da expressão do gene *gsh1*. Assim, é possível que na parte aérea das plantas tratadas com 8 mg As L⁻¹ tenha ocorrido uma tentativa em aumentar a síntese de fitoquelatinas através do aumento da expressão dos gene *pcs1*, a qual não foi bem sucedida devido a redução da expressão do gene *gsh1*, da mesma forma que foi sugerido para as raízes.

7.2. O As promoveu aumento na síntese de antocianinas, principalmente nas folhas maduras

O aumento do FT observado nas plantas expostas a 8 e 16 mg L⁻¹ e o conseqüente aumento dos teores de As na parte aérea foram acompanhados dos sintomas macroscópicos de toxidez de As nas folhas, como escurecimento e aspecto senescente. Apesar da redução nos teores de clorofila observados nas folhas jovens e maduras, as folhas das plantas expostas a 8 e 16 mg As L⁻¹ apresentaram coloração mais escura que as do controle. Isso ocorreu porque a coloração verde das folhas foi “mascarada” pela forte coloração arroxeada proporcionada pelo aumento do acúmulo de antocianinas, mais expressivo nas folhas maduras. Catarecha et al. (2007) verificaram aumento de seis vezes nos teores de antocianinas em plantas de *A. thaliana* cultivadas por oito dias na presença de 2,25 mg As L⁻¹ e correlaciona isso com a ocorrência de deficiência nutricional.

O aumento dos teores de antocianinas em folhas é um sintoma típico da deficiência de P, elemento altamente móvel na planta. A redução dos seus teores na planta, por sua vez, é associada à exposição ao As na forma de arsenato, devido a alta similaridade química entre o arsenato e o fosfato, o que os leva a competir fortemente entre si durante a absorção e nos processos metabólicos, como a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Meharg e Macnair 1994, Pickering et al. 2000). O aumento da síntese de antocianinas em função da deficiência de P normalmente é acompanhada pelo aumento nos teores de açúcares nas folhas em função da redução da quebra dos açúcares pelas reações oxidativas do processo de respiração celular, altamente alterado pelo As.

Dentre os três principais açúcares encontrados nas plantas (glicose, frutose e sacarose), a sacarose é a mais importante na sinalização da síntese de antocianinas, pois o aumento de seus teores nas folhas atua como um sinalizador positivo para o direcionamento dos açúcares acumulados para a rota dos fenilpropanóis (Teng et al. 2005, Solfanelli et al. 2006). No presente trabalho foi observado aumento significativo nos teores de sacarose nas folhas maduras das plantas expostas a 8 e 16 mg L⁻¹, coincidindo com os resultados obtidos para o acúmulo de antocianinas.

7.3. Os danos à superfície radicular afetaram o acúmulo de nutrientes na raiz e o status hídrico das plantas, alterando o desenvolvimento foliar

Os danos observados na superfície das raízes podem ter afetado negativamente a absorção de água por este órgão, promovendo redução do TRA da parte aérea, visto que a absorção eficiente de água é dependente do acúmulo de íons na raiz, os quais são fundamentais para a redução do potencial hídrico no interior do órgão em relação ao do meio externo (Morgan 1984). Apesar de não se ter quantificado o teor de osmólitos no estelo, a redução drástica dos teores de K na raiz demonstra problemas no acúmulo deste íon na raiz e sugere que o mesmo pode ter ocorrido no estelo, o que pode ter afetado a absorção de água pelas raízes.

Considerando que as raízes tenham realmente apresentado problemas na absorção e acúmulo de íons/osmólitos após a exposição ao As, sugere-se que isso possa ter sido o principal motivo para a redução da espessura dos tecidos/regiões foliares. De forma simplificada, o crescimento das células vegetais resulta de dois processos simultâneos e inter-relacionados: absorção de água e deformação da parede. A absorção de água produz pressão hidrostática, a qual estressa a parede, o que leva à sua deformação e expansão celular (Ortega 2010). É provável que a redução do TRA tenha afetado a expansão de células foliares, como evidenciado pela redução da espessura da lâmina foliar e de alguns tecidos, como demonstrado pelas análises micromorfométricas em folhas de *A. thaliana* tratadas com 8 mg As L⁻¹. A redução da espessura foliar foi mais pronunciada nas folhas maduras e, dentre os tecidos/regiões mensurados, o que mais contribuiu para que isso acontecesse foi a redução do parênquima lacunoso, que foi significativa tanto nas folhas jovens quanto nas maduras. Bandaru et al. (2010) também detectaram redução da espessura foliar e do percentual de espaços intercelulares no mesofilo de *S. oleracea* após exposição ao As. Resumidamente, os

dados sugerem que os danos causados pelo As na superfície das raízes causaram redução das taxas de acúmulo de íons e, conseqüentemente, de absorção de água neste órgão. Isso acarretou redução do TRA da parte aérea e, por conseqüência, da expansão das células foliares, resultando em redução da espessura foliar e/ou tecidual.

7.4. O arsênio promoveu redução da condutância estomática e danos à etapa fotoquímica e bioquímica da fotossíntese

Foram detectados efeitos severos no processo fotossintético nas plantas de *A. thaliana* expostas a todos os tratamentos com As. Nos tratamentos com 2 e 8 mg As L⁻¹ foi observada redução da concentração interna de CO₂, sugerindo problemas na etapa fotoquímica, mas não na bioquímica da fotossíntese. No tratamento com 16 mg As L⁻¹, entretanto, a razão C_i/C_a foi muito elevada, o que significa que houve problemas no consumo do CO₂ pelo aparato fotossintético, com a possibilidade de danos à etapa bioquímica da fotossíntese. A condutância estomática sofreu queda drástica em todos os tratamentos com As, evidenciando a ocorrência de fechamento estomático e conseqüente redução da transpiração.

A transpiração é um processo fundamental na regulação da temperatura foliar. Devido aos altos valores de calor específico e latente de vaporização da água, a planta é capaz de dissipar grandes quantidades de energia calorífica promovendo o arrefecimento e mantendo a temperatura dos tecidos em valores apropriados para o metabolismo (Collatz et al. 1991). Além de ter promovido redução das taxas fotossintéticas, o fechamento estomático ocasionou aumento da temperatura superficial das plantas em função da queda das taxas transpiratórias (Inoue et al. 1990, Oerke et al. 2011), como observado na parte aérea através da análise termográfica. Dessa forma, o fechamento estomático induzido pela exposição ao As exclui a possibilidade do TRA ter diminuído em função de perdas transpiratórias excessivas. Por outro lado, o fechamento estomático pode ter causado redução das forças de tensão transpiratória, reduzindo o fluxo de água para a parte aérea (O'Toole e Cruz 1980) e reduzindo o TRA, nos tratamentos com As.

A exposição ao As promoveu redução drástica da atividade da enzima anidrase carbônica. Entretanto, essa enzima não exerce um papel de grande importância no processo fotossintético de *A. thaliana*, cujo metabolismo fotossintético é do tipo C3. Ao contrário das plantas C4, cujo processo de assimilação de CO₂ é altamente dependente da eficiência desta

enzima em capturar o CO₂, a maior atividade da anidrase carbônica em *A. thaliana* está mais restrita aos cloroplastos, na manutenção de concentração ótima de CO₂ nas proximidades da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), maximizando sua atividade como carboxilase (Kavroulakis et al. 2003). Majeau et al. (1994) promoveram a expressão do gene codificante da enzima anidrase carbônica de *Nicotiana tabacum* no sentido antissenso, promovendo queda de 99% de sua atividade, e verificaram que não houve impacto significativo na assimilação de CO₂, fato compensado pelo aumento da condutância estomática nessas plantas. O dano fotossintético foi evidente nas plantas de *A. thaliana* expostas a 2 e 8 mg As L⁻¹, uma vez que não foi observada nenhuma medida que compensasse a baixa condutância estomática, ficando clara a sua importância na manutenção dos níveis fotossintéticos normais nessas plantas quando expostas ao As. O decréscimo da concentração de Zn nas folhas de plantas expostas ao As pode ter sido um fator adicional para a queda da atividade da anidrase carbônica observada, pois esta enzima utiliza o Zn como cofator. Foi observado que a deficiência de Zn promoveu decréscimo na atividade da anidrase carbônica em folhas de *Phaseolus vulgaris* (Edwards e Mohammed 1973), *S. oleracea* (Randall e Bouma 1973) e *O. sativa* (Sasaki et al. 1998). Apesar dos efeitos do As sobre a atividade da enzima anidrase carbônica em *A. thaliana* não serem de grande significância para esta espécie, por apresentar metabolismo C₃, estudos similares em espécies com metabolismo C₄ são necessários, uma vez que nessas plantas a anidrase carbônica apresenta grande importância para a fotossíntese.

O aumento nos teores de MDA e nas taxas de extravasamento de eletrólitos nas plantas tratadas com As indica a ocorrência de danos oxidativos nas plantas expostas ao As. A diminuição da concentração de clorofilas devido ao efeito tóxico do As, observada em *A. thaliana*, provavelmente não está relacionada à deficiência de Fe e Mg, visto que o As não promoveu redução dos teores desses elementos na parte aérea. Diferentes fatores podem ter desencadeado a redução dos teores de clorofilas, como a peroxidação das membranas do cloroplasto (Li et al. 2006) e interação do As com grupos tióis de enzimas envolvidas na síntese de clorofila (Tewari et al. 2008). Li et al. (2006) verificaram que plantas da espécie hiperacumuladora *Pteris vittata* expostas 300 mg As kg⁻¹ de solo apresentaram danos ultraestruturais às membranas dos cloroplastos, apesar da ausência de sintomas macroscópicos na superfície da pina. Ao serem cultivadas em solo contendo quase o triplo do teor de As, foram observados sintomas macroscópicos, como pinas contendo bordas amarronzadas e cloroplastos com formato arredondado (ao invés de elíptico, como normalmente observado),

além de sistemas de membranas severamente danificados ou até mesmo inexistentes, efeitos estes decorrentes de estresse oxidativo.

A clorofila *a* é o principal pigmento envolvido na coleta de luz no PSI; no PSII, tanto a clorofila *a* quanto a *b* são importantes. O aumento na razão clorofila *a/b* nas plantas expostas ao As indica possíveis mudanças na razão FSI/FSII, em função de mecanismos de adaptação dos cloroplastos ao estresse (Takabayashi et al. 2005). Aumentos na proporção de FSI incrementam o transporte cíclico de elétrons, o qual está envolvido na dissipação do excesso de energia, evitando assim a ocorrência de danos adicionais ao FSII (Li et al. 2006). Além disso, a curva de luz possibilitou confirmar a forte limitação das reações fotossintéticas que respondem ao aumento da intensidade da luz, fato corroborado pela redução da taxa de transporte de elétrons (ETR). O excesso de energia absorvida foi dissipado através de mecanismos de dissipação de energia regulados (Y_{npq}), isto é, pelo ciclo das xantofilas (Müller et al. 2001), uma vez que houve inibição dos mecanismos não-regulados (Y_{no}). Tem-se demonstrado que o mecanismo de dissipação de energia através do ciclo das xantofilas pode ser efetivo na defesa contra diferentes tipos de estresse (Baroli e Niyoji 2000).

O aumento em F_0 , observado somente no tratamento com 16 mg As L^{-1} , pode estar relacionado a danos no centro de reação do FSII ou no LHCII (Demmig-Adams e Adams 1992). A redução da razão F_v/F_m em todos os tratamentos sugere a ocorrência de fotoinibição ao aparato fotoquímico (Maxwell e Johnson 2000, Müller et al. 2001). Os aumentos na produção de EROs desencadeados pelo As podem ser os responsáveis pela fotoinibição observada, uma vez que estas EROs podem interagir diretamente com o centro de reação do FSII e causar a clivagem de fragmentos específicos da proteína D1 (Tyystjärvi 2008). Entretanto, a capacidade das EROs de danificar essa proteína é motivo de controvérsia, pois alguns estudos indicam que EROs agem primariamente de forma indireta, inibindo os mecanismos de reparo de fotodanos no FSII, mas não causando danos diretos ao FSII (Murata et al. 2007).

7.5. A exposição ao arsênio promoveu estresse oxidativo no sistema radicular e na parte aérea e induziu a expressão de genes codificadores de oxidases alternativas

As plantas de *A. thaliana* apresentaram sintomas em decorrência do estresse oxidativo após exposição ao As. Não foram detectados danos muito severos à fotossíntese nas plantas submetidas ao tratamento com 2 mg L^{-1} , sugerindo que nessa concentração de As os

mecanismos antioxidativos foram devidamente ativados e eficientes na remoção do excesso de EROs. Nas plantas pertencentes a esse tratamento, apesar de os teores de MDA no sistema radicular e na parte aérea terem sido ligeiramente maiores que no tratamento controle, não foram detectadas alterações no extravasamento de eletrólitos na parte aérea, o que indica que a integridade da membrana plasmática foi mantida nessas plantas. Nas plantas expostas a 8 e 16 mg As L⁻¹, o nível de extravasamento de eletrólitos da parte aérea aumentou significativamente, indicando a ocorrência de danos à membrana plasmática.

O acúmulo de H₂O₂ foi detectado sempre próximo às regiões marginais das folhas. O H₂O₂ atua como molécula sinalizadora em diferentes situações de estresse, afetando importantes processos como a divisão celular e a expressão gênica. Ao contrário das outras EROs, sua estrutura química é estável e apolar, facilitando sua livre passagem através de membranas. Seu transporte para locais mais distantes do ponto de origem ocorre via xilema (Slesak et al. 2007), o que explica sua localização marginal e apical nas folhas e facilita que esta ERO se esquive facilmente dos processos antioxidativos. Isso pode fazer com que ela deixe de ser a ERO menos reativa e se torne a mais perigosa para os sistemas biológicos, a partir da sua conversão em radical hidroxil (OH[•]) por meio da interação com metais de transição (Briat 2002). A análise de expressão gênica evidenciou aumento na expressão de genes relacionados à síntese de catalases e peroxidases, enzimas relacionadas com a destoxificação de H₂O₂, o que sugere que essa ERO possa ser a que mais contribui para a ocorrência de estresse oxidativo.

Em geral, a raiz é o órgão mais afetado pelo As, uma vez que permanece em contato direto com este elemento durante a exposição, absorvendo-o e acumulando-o em maiores proporções que na parte aérea. As raízes das plantas tratadas com 8 e 16 mg As L⁻¹ apresentaram danos visuais mais severos que as folhas, assim como maiores teores de MDA. O teste histoquímico para detecção visual de H₂O₂ e O₂^{•-} também sugere a maior sensibilidade das raízes devido o aumento significativo da intensidade da coloração com o aumento da concentração de As, ao longo de quase toda a extensão do órgão. O teor de compostos fenólicos aumentou muito pouco e até sofreu queda no tratamento com 16 mg As L⁻¹. Apesar do expressivo aumento nos teores de compostos fenólicos nas folhas (mas não nas raízes) de plantas de *A. thaliana* expostas ao As, não é possível dizer qual é a real contribuição dos compostos fenólicos para a destoxificação das EROs.

Cao et al. (2004) verificaram que as respostas antioxidativas têm um importante papel na destoxificação e acumulação de As em *P. vittata* e ressaltam que, durante a exposição a

baixos níveis de As, os antioxidantes enzimáticos são mais eficientes, enquanto a exposição a concentrações elevadas de As, os antioxidantes não enzimáticos são mais importantes. Mylona et al. (1998) mostraram que enzimas de *Zea mays* envolvidas na remoção de EROs, como a catalase e a superóxido dismutase, apresentaram atividade aumentada, e também verificaram aumento na expressão dos genes que codificam cada uma dessas enzimas após exposição ao As. Requejo e Tena (2005), estudando o perfil proteômico de *Z. mays*, após exposição ao As, verificaram que 10% das proteínas detectáveis nas raízes foram reguladas (positiva ou negativamente) pelo As, e que sete das 11 proteínas identificadas estão envolvidas na manutenção da homeostase celular contra alterações redox. Estes resultados exemplificam a queda na eficiência de remoção de EROs, as quais podem interagir com as membranas celulares e causar morte celular. Entretanto, as respostas antioxidativas das plantas ao As variam entre as espécies: em geral, em espécies sensíveis observam-se elevados níveis de EROs, devido à ineficiência da planta em realizar a destoxificação. Em espécies tolerantes observa-se que a exposição ao As não acarreta efeitos deletérios à planta, devido à eficiente remoção dessas EROs do meio intracelular (Geng et al. 2006; Singh et al. 2007).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças visuais significativas no acúmulo de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ entre as folhas com diferentes estádios de desenvolvimento, a maior sensibilidade das folhas maduras ao As foi evidenciada através das análises micromorfométricas, dos teores de antocianinas e dos sintomas visuais. A maior sensibilidade das folhas maduras pode ser explicada pelo seu maior acúmulo de As, como verificado em *Sorghum bicolor* (Shaibur et al. 2008) e *Camellia sinensis* (Shi et al. 2008). Nestas espécies, os sintomas de toxidez foram mais severos nas folhas maduras que nas jovens. Até mesmo na espécie tolerante ao As, *P. vittata*, as folhas maduras apresentaram sintomas de toxidez após exposição a concentrações muito elevadas do poluente, enquanto as jovens permaneceram com aspecto saudável (Li et al. 2006).

A análise termográfica evidenciou elevação da temperatura das raízes, cujo efeito possivelmente deve-se ao aumento dos mecanismos dissipadores de energia da mitocôndria. De fato, foi observado aumento da expressão gênica de duas oxidases alternativas na raiz: Aox1a (oxidase alternativa 1a) e Aox3 (oxidase alternativa 3), o que indica a ocorrência de prejuízos ao processo de respiração celular nas plantas expostas ao As. Ressalta-se que o As promove redução da produção de energia na célula, visto que a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato livre é altamente prejudicada (Byers et al. 1979). O aumento da expressão dos genes codificantes de oxidases alternativas sugere a ocorrência da rota alternativa de

transporte de elétrons na mitocôndria, em um processo que promove a dissipação do excesso de energia através da transferência direta de elétrons para o oxigênio, sem que esses sejam transportados ao longo de toda a cadeia transportadora, promovendo uma espécie de “descongestionamento” de elétrons. Neste processo não há a ocorrência de restrição em função do baixo status energético da célula, evitando a formação de EROs a partir do *pool* de ubiquinona reduzida. Esta rota respiratória alternativa é comum em plantas submetidas vários tipos de estresses (Clifton et al. 2005) e, provavelmente, muito relacionada com o estresse causado pelo As.

Além dos efeitos relatados do arsenato sobre a geração de energia nas células, outras alterações relacionadas ao processo de respiração celular, apesar de não avaliados, não podem ser descartadas, como alterações ultraestruturais em mitocôndrias (causada pelas EROs) e aumento da resistência da difusão de O₂ nas raízes. O As promoveu alterações ultraestruturais nas mitocôndrias de tubérculos de *Raphanus sativus*, como rompimento da membrana mitocondrial, perda da densidade da matriz e até mesmo completa desintegração das organelas após um curto período de exposição ao As, tendo sido estes danos detectados antes mesmo da ocorrência de sintomas macroscópicos (Simon et al. 2000). Em plantas de *Cajanus cajan*, a exposição a 1,5 mg As L⁻¹ promoveu aumento do adensamento das células do córtex radicular e redução do percentual de espaços intercelulares (Pita-Barbosa 2009). Vale lembrar que o O₂ utilizado na respiração celular nas células radiculares é oriundo da parte aérea e se difunde via apoplasto até atingir os tecidos radiculares. Com os espaços intercelulares reduzidos, há uma maior resistência à difusão de O₂ na raiz, o que pode causar redução nas taxas respiratórias (Heerden et al. 2008), podendo ser este um efeito secundário do As sobre a respiração.

Apesar dos danos fotossintéticos e possíveis danos à respiração, a redução da produção de biomassa foi pequena após cinco dias de exposição ao As. Isso é explicado pelo fato de as plantas já apresentarem sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos no início da curta exposição ao poluente, não dando tempo de ocorrer mudanças significativas neste na produção de biomassa.

7.6. A exposição ao arsênio promove aumento dos níveis de fragmentação do DNA, da expressão de genes relacionados ao mecanismo “mismatch repair” e das taxas de mutações

Pouco ainda se sabe sobre o potencial do As como agente genotóxico em plantas. Neste trabalho, as raízes de *Allium cepa*, espécie amplamente utilizada para avaliações de genotoxicidade, foram utilizadas com o intuito de confirmar o potencial genotóxico das concentrações de As utilizadas nos experimentos com *A. thaliana*. A confirmação foi feita pela detecção do aumento na frequência de micronúcleos (MN) e fragmentação do DNA em geral, bem como da redução do índice mitótico (IM). Ressalta-se que esses testes para a determinação do potencial genotóxico do As foram realizados em ápices de *A. cepa* devido ao tamanho minúsculo dos ápices radiculares e do diâmetro dos núcleos das células de *A. thaliana*, o que inviabilizou as análises microscópicas para determinação dos parâmetros acima.

A exposição ao As promoveu aumento das taxas de fragmentação do DNA e da frequência de MN, além de queda do IM, sendo estas respostas dependentes da concentração e do tempo de exposição ao poluente. Além disso, a análise com as plantas repórteres de recombinação não-homóloga (R3L66) evidenciou um aumento nas taxas desse tipo de reparo, que está muito relacionado com quebras na fita dupla do DNA, as quais podem ser ocasionadas por diferentes fatores, inclusive oxidação por radicais livres (Lieber 1999). Os MN resultam de fragmentos cromossômicos que não são incorporados aos núcleos das células-filhas durante a fase de telófase da célula em mitose e o aumento de sua frequência também foi verificada por Wu et al. (2010) nos ápices radiculares de plantas de *V. faba* expostas ao As. Estes autores sugerem que apesar do As afetar as taxas de divisão celular, as células radiculares são capazes de entrar em mitose mesmo havendo danos no DNA, o que pode dever-se a disfunções da checagem e regulação do ciclo celular após a exposição ao agente genotóxico. Dho et al. (2010) sugerem que o As também pode afetar a polimerização da tubulina, processo importante durante a divisão celular.

Plantas de *Vicia faba* expostas ao chumbo também apresentaram aumento nas taxas de quebras no DNA. O tratamento com compostos antioxidantes foi capaz de reverter os efeitos genotóxicos observados, demonstrando que estes danos devem-se não à ação direta do chumbo, mas ao estresse oxidativo gerado pelo metal pesado (Pourrut et al. 2011). De maneira semelhante, o pré-tratamento de camundongos com extrato do fruto de *Trichosanthes dioica*, rico em compostos antioxidantes, impediu que ratos expostos ao arsenito apresentassem sintomas de (geno)toxicidade, apresentando redução das taxas de fragmentação

do DNA e funções fisiológicas pouco afetadas. Os indivíduos que não foram pré-tratados com o extrato, ao contrário, apresentaram inúmeros sintomas de toxidez, incluindo aumento das taxas de fragmentação do DNA (Bhattacharya e Haldar 2012).

Considerando o elevado potencial do As em gerar estresse oxidativo, como observado em *A. thaliana*, além do baixo poder oxidante deste elemento, é muito provável que a maior parte dos efeitos do As no DNA dessa espécie sejam indiretos e que os efetivos causadores de danos sejam as moléculas com forte poder oxidante produzidas durante a exposição ao poluente. Há evidências de que os processos causadores de genotoxicidade, assim como os mecanismos de reparo dos danos, sejam muito similares dentre os diversos organismos (Soto-Reyes et al. 2005, Ziech et al. 2010). Os danos oxidativos das EROs e até do produto da peroxidação de lipídios, o MDA, sobre o DNA já foram confirmados (Marnett 1999, Brierley e Martin 2012) e, além do efeito direto das EROs sobre o DNA, é provável que o As também possa causar genotoxicidade em *A. thaliana* através da interação com grupos tióis de proteínas envolvidas no reparo do DNA, inativando-as (Ramadan et al. 2009).

A análise da expressão de genes relacionados com o reparo do DNA em *A. thaliana* demonstrou aumento maior que 12 vezes na expressão do gene *msh2*, que codifica a principal proteína que compõe o sistema de reparo do DNA denominando *mismatch repair* (MMR). Este mecanismo de reparo é capaz de reconhecer bases, nucleotídeos ou regiões do DNA danificadas, realizando a excisão e o reparo com o auxílio das demais enzimas envolvidas na replicação do DNA. Um dos principais danos causados pelas EROs é a oxidação de bases nitrogenadas, originando estruturas químicas do tipo 8-oxo-guanina (oxidação de purina) e de timina-glicol (oxidação de pirimidina) (Brierley e Martin 2012). O mecanismo MMR é de grande importância no reparo e na prevenção da mutagênese que pode ser ocasionada por essas lesões (Macpherson et al 2005, Wyrzykowski e Volkert 2003), considerando que a falta de reparo pode ocasionar alterações na sequência de leitura dos nucleotídeos, afetando a síntese de RNAm e a síntese protéica (Macpherson et al 2005).

As análises realizadas com os repórteres de diferentes tipos de mutação revelaram duplicação nas taxas de mutações pontuais, em comparação com os processos de recombinação homóloga, não homóloga e instabilidade de microsatélites. A oxidação do DNA e formação de 8-oxo-guanina pode acarretar mutações pontuais através da substituição da guanina pela adenina ou timina, e estas alterações são corrigidas pelo MMR em plantas saudáveis (Esteller et al. 2000).

Como dito anteriormente, a exposição das plantas WT ao As promoveu a ocorrência de sintomas visuais nas raízes, como escurecimento e gelatinização, e na parte aérea, como acúmulo de antocianinas e aspecto senescente, além de aumento nos teores de MDA em ambas as regiões do vegetal. Estes sintomas também foram observados nas plantas mutantes *msh2*, porém, com maior intensidade. Os mutantes *msh2* apresentaram maiores níveis de danos oxidativos, confirmando a extrema importância do mecanismo de reparo MMR em plantas expostas a concentrações tóxicas de As. Sugere-se a realização de análises complementares em mutantes *msh2* para a melhor caracterização de seu fenótipo sensível, e melhor compreensão da importância do sistema MMR em *A. thaliana*.

7.7. O arsênio inibiu uma protease do tipo caspase, enzima-chave da principal rota sinalizadora de morte celular programada

As quebras no DNA podem ocasionar danos irreparáveis na célula lesionada, o que leva à sinalização da rota de morte celular programada (MCP), ou apoptose. Isso ocorre durante diversos processos do desenvolvimento normal do vegetal e também em situações de estresse (Beers 1997). Durante a apoptose ocorrem algumas modificações celulares comuns entre células vegetais e animais e, apesar de algumas diferenças marcantes, acredita-se que existam muitas similaridades entre a MCP de animais e vegetais, incluindo a participação da enzima caspase-3 na etapa inicial de sinalização de MCP (Del Pozo e Lam 1998).

As caspases são proteinases pertencentes a um conjunto de proteínas que contêm um domínio cisteinil-aspartato bem conservado o qual realiza a clivagem específica de peptídios na região adjacente do aminoácido aspartato. Em células animais o processo apoptótico é sinalizado pela redução nas taxas glicolíticas e produção de ATP (Plas e Thompson 2002), efeitos típicos da exposição ao As (Hughes 2002), mas pouco se sabe sobre o envolvimento direto das caspases em processo de MCP em plantas. Apesar disso, neste trabalho foi verificado que o aumento da concentração do As no meio externo e nos tecidos vegetais de *A. thaliana*, como consequência, causou inibição da atividade da caspase-3, sendo esta uma resposta dose-dependente. A presença do aminoácido cisteína como principal componente do sítio ativo das caspases sugere que agentes com grande afinidade por grupos tióis, como o arsenito, podem interagir com este aminoácido, causando oxidação e inativação da enzima (Nicholson et al. 1995), o que pode explicar os resultados obtidos. Além disso, altas concentrações de EROs promovem inibição da atividade dessas enzimas em células animais

(Hampton e Orrenius 1997). Assim, considerando que a absorção e acúmulo de As nas raízes foi bastante elevada na presença de todos os tratamentos contendo este elemento, sugere-se que a redução da atividade das caspases deve-se a uma combinação de efeitos inibitórios, gerados diretamente, pelo arsenito (produzido nos tecidos a partir do arsenato absorvido), e indiretamente, pela geração de EROs. Entretanto, recomenda-se a realização de estudos futuros que confirmem essa hipótese.

8. CONCLUSÃO

As plantas de *A. thaliana* expostas ao As em sistema hidropônico acumularam elevados teores de As nas raízes. O fator de translocação de As para a parte aérea aumentou com o incremento de As na solução nutritiva, resultando em sintomas de toxidez na parte aérea, como folhas com aspecto senescente e de coloração escura. Este fato foi atribuído ao aumento da síntese de antocianinas, principalmente nas folhas maduras.

Foi detectada redução da espessura foliar nas plantas expostas a 8 mg As L⁻¹, principalmente nas folhas maduras. Essa redução foi possivelmente ocasionada por problemas na absorção de água pela raiz e/ou no transporte até a parte aérea, o que pode ter afetado o crescimento das células foliares, fato corroborado pelo menor teor relativo de água nos tratamentos com As. O tecido que sofreu maior redução na espessura foi o parênquima lacunoso. Danos ao processo fotossintético também foram observados, como redução da condutância estomática e do processo transporte de elétrons pela cadeia transportadora, prejudicando a assimilação líquida de CO₂. Em concentrações mais baixas de As, somente a etapa fotoquímica foi afetada, mas em concentrações mais elevadas também foram observados indícios de danos à etapa bioquímica da fotossíntese. Os danos à fotossíntese resultaram em estresse oxidativo, como observado pelo aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, principalmente no peróxido de hidrogênio, e de aldeído malônico.

O potencial genotóxico do As em *A. thaliana* foi constatado através do aumento nas taxas de mutações. Acredita-se que os principais danos ao DNA resultaram da ação de EROs, e não do efeito direto do As. Foi observado aumento na expressão de genes relacionados ao mecanismo de reparo do DNA *mismatch repair*, o qual se revelou extremamente importante no combate aos efeitos danosos do As, visto que as plantas mutantes *msh2* foram mais sensíveis ao As que as WT. A enzima do tipo caspase-3, relacionada ao mecanismo de morte celular programada, foi inibida pelas concentrações de As utilizadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol* 128: 1120-1128.
- Armienta MA, Segovia N. 2008. Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environ Geochem Hlth* 30: 345-353.
- Baastrop R, Sorensen M, Balstrom T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. 2008. Arsenic in drinking water risk for cancer in Denmark. *Environ Health Persp* 116: 231-237.
- Bandaru V, Hansen DJ, Codling EE, Daughtry CS, White-Hansen S, Green CE. 2010. Quantifying arsenic-induced morphological changes in spinach leaves: implications for remote sensing. *Int J Remote Sens* 31: 4163-4177.
- Baroli I, Niyogi KK. 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philos Trans R So. Lond B* 355: 1385-1394.
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* 44: 399-415.
- Bhattacharya P, Claesson M, Bundschuh J, Sracek O, Fagerberg J, Jacks G, Martin RA, Storniolo ADR, Thir JM. 2006. *Sci Total Environ* 358: 97-120.
- Bhattacharya S, Haldar PK. 2012. Ameliorative effect *Trichosanthes dioica* root against experimentally induced arsenic toxicity in male albino rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 33: 394-402.
- Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Blik M, Souer E, Schat H. 2006. Enhanced arsenate reduction by CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelation accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J* 45: 917-929.
- Blum R, Meyer KC, Wünschmann J, Iendzian KJ, Grill E. 2010. Cytosolic action of phytochelatase synthase. *Plant Physiol* 153: 159-169.
- Borba RP, Figueiredo BR, Cavalcanti JA. 2004. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Revista da Escola de Minas* 57: 45-51.
- Borgoño JM, Vicent P, Venturino H, Infante A. 1977. Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. *Environ Health Persp* 19: 103-105.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Briat JF. 2002. Metal ion-activated oxidative stress and its control, pp. 171-179. *In.*: Inze D, Montagu MV (eds), *Oxidative Stress in Plants*. New York, Taylor & Francis.
- Brierley DJ, Martin SA. 2012. Oxidative Stress and the DNA Mismatch Repair Pathway. *Antioxid Redox Sign (in press)*
- Byers LD, She HS, Alayoff A. 1979. Interaction of phosphate analogues with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem* 18: 2471-2480.
- Cao X, Ma LQ, Tu C. 2004. Antioxidative responses to arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Envir Pollut* 128: 317-325.

- Catarecha P, Segura MD, Franco-Zorrilla JM, García-Ponde B, Lanza M, Solano R, Paz-Ares J, Leyva A. 2007. A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* 19: 1123-1133.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Changbo P, Park JD, Ryu DY. 2007. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 218: 196-203.
- Chen SL, Dzeng SR, Yang MH, Chiu KH, Shieh GM, Wai CM. 1994. Arsenic species in groundwaters of the blackfoot disease area, Taiwan. *Environ Sci Technol* 28: 877-881.
- Clark RB. 1982. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. *J Plant Nutr* 5: 1039-1057.
- Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, Day DA, Whelan J. 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58: 193-212.
- Collatz GJ, Ball JT, Grivet C, Berry JA. 1991. Physiological and environmental regulation of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration: a model that includes a laminar boundary layer. *Agr Forest Meteorol* 54: 107-136.
- Cullen WR, Reimer KJ. 1989. Arsenic in the environment. *Chem Rev* 98: 713-764.
- Daus B, Wennrich R, Morgenstern P, Weib H, Palmieri HEL, Nalini HA, Leonel LV, Monteiro RPG, Moreira RM. 2005. Arsenic speciation in plant samples from the iron quadrangle, Minas Gerais, Brazil. *Microchim Acta* 151: 175-180.
- Delatorre, C.A; Silva, A.A. 2008. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta, um grande papel. *Rev Ciênc Agrár* 31: 58-67.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ. 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione – a magnetic resonance study. *Chem Biol Interact* 90: 139–155.
- Demming-Adams B, Adams WW. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599–626
- DeSesso JM. 1998. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol Rev* 12: 385-433.
- Dhankher OP, Rosen BP, McKinney, EC, Meagher RB. 2006. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5413-5418.
- Dhoa S, Camussoa W, Mucciarellib M, Fusconia A. 2010. Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. *Environ Exp Bot* 69: 17-23.
- Edwards GE, Mohamed AK. 1973. Reduction in carbonic anhydrase activity in zinc deficient leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci* 13: 351-354.
- Ellis DR, Gumaelius L, Indriolo E, Pickering IJ, Banks JA, Salt DE. 2006. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiol* 141: 1544-1554.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New Engl J Med* 343: 1350-1354.

- Felipe RTA, Oliveira JA, Leão GA. 2009. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. *Rev Árvore* 33: 245-254.
- Folkes DJ, Kuehster TE, Litle RA. 2001. Contributions of pesticide use to urban background concentrations of arsenic in Denver, Colorado, U.S.A. *Environ Forensics* 2: 127-139.
- Geng CN, Zhu YG, Williams P, Meharg AA. 2006. Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotype of rice seedling (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 279: 297-306.
- Gonzaga MIS, Santos JAG, Ma LQ. 2006. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. *Environ Pollut* 143: 254-260.
- Grant WF. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res* 99: 273-291.
- Hampton MB, Orrenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414: 552-6.
- Heerden PDR, Kiddle G, Pellny TK, Mokwala PW, Jordaan A, Strauss AJ, Beer M, Schlüter U, Kunert KJ, Foyer CH. 2008. Regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean protect symbiotic nitrogen fixation from chilling-induced inhibition and shoots from premature senescence. *Plant Physiol* 148: 316-327.
- Hingston JA, Collins CD, Murphy RJ, Lester JN. 2001. Leaching of chromate copper arsenate wood preservatives: a review. *Environ Pollut* 111: 53-66.
- Hopenhayn C. 2006. Arsenic in drinking water: Impact on human health. *Elements* 2: 103-107.
- Hossain MF. 2006. Arsenic contamination in Bangladesh – an overview. *Agric Ecosyst Environ* 113: 1-16.
- Hughes MF. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133: 1-16.
- Inoue A, Zhang T, Masumoto T. 1990. Zr-Al-Ni amorphous alloys with high glass transition temperature and significant supercooled liquid region. *Mat Trans* 31: 177-183.
- Jana K, Jana S, Samanta K. 2006. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 1-13.
- Kaldenhoff R, Ribas-Carbo M, Sans JF, Lovisolo C, Heckwolf M, Uehlein N. 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ* 31: 658-666.
- Kavroulakis N, Fliemetakis E, Aivalakis G, Dahiya P, Brewin NJ, Fasseas K, Hatzopoulos P, Katinakis P. 2003. Tissue distribution and subcellular localization of carbonic anhydrase in mature soybean root nodules indicates a role in CO₂ diffusion. *Plant Physiol Biochem* 41: 479-484.
- Kopylov NI, Kaplin YM, Litvinov VP, Kaminskii YD. 2007. Large-scale use of arsenic in the production of antifouling coatings. *Theor Found Chem Eng* 41: 780-785.
- Krajewski MP, Kanawati B, Fekete A, Kowalski N, Schmitt-Kopplin P, Grill E. 2012. Analysis of *Arabidopsis* glutathione-transferases in yeast. *Phytochemistry (in press)*
- Li L, Santerre-Ayotte S, Boivin EB, Jean M, BELZILE F. 2004. A novel reporter for intrachromosomal homoeologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 40: 1007-1015.

- Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY. 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Chemosphere* 62 : 803-809.
- Lieber MR. 1999. The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* 4: 77-85.
- Litzow MR. 2008. Arsenic trioxide. *Expert Opin Pharmacother* 9: 1773-1785.
- Liu B, Pan S, Dong X, Qiao H, Jiang H, Krissansen GW, Sun X. 2006. Opposing effects of arsenic trioxide on hepatocellular carcinomas in mice. *Cancer Sci* 97: 675-681.
- Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 334: 185-195.
- Macpherson P, Barone F, Maga G, Mazzei F, Karran P, Bignami M. 2005. 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutS α . *Nucleic Acids Res* 33: 5094-105.
- Majeau N, Arnoldo M, Coleman JR. 1994. Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 25: 377-385.
- Mandal BK, Suzuki KT. 2002. Arsenic round the world.: a review. *Talanta* 58: 201-235.
- Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. 2003. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol Appl Pharmacol* 189: 73-83.
- Marnett LJ. 1998. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95.
- Masscheleyn PH, Dlaune RD, Patrick WH. 1991. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environ Sci Technol* 25: 1414-1418.
- Matschullat J, Borba RP, Deschamps E, Figueiredo BR, Gabrio T, Schwenk M. 2000. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Appl Geochem* 15: 181-190.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668.
- Mazumder DNG, Chakraborty AK, Ghose A, Gupta JD, Chakraborty DP, Dey SB, Chattopadhyay N. 1988. Chronic arsenic toxicity from drinking water in rural West Bengal. *Bull World Health Org* 66: 499-506.
- Mazumder DNG. 2008. Chronic arsenic toxicity & human health. *Indian J Med Res* 128: 436-447.
- Meharg AA, Jardine L. 2003. Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytol* 157: 39-44.
- Meharg AA, Macnair MR. 1994. Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance of arsenate. *Plant Soil* 162: 99-106.
- Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJS. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol* 20: 197-204.

- Morgan JM. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 35: 299-319.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev S. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *BBA-Bioenergetics* 1767: 414-421.
- Mylona PV, Polidoros NA, Scandalios JG. 1998. Modulation of antioxidant responses in maize. *Free Radic Biol Med* 25: 576-585.
- Navarrete MH, Carrera P, Miguel M, Torre C. 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat Res* 389: 271-277.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376: 37-43.
- Oerke EC, Steiner U, Dehne HW, Lindenthal M. 2006. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J Exp Bot* 57: 2121–2132.
- Ortega JKE. 1985. Augmented growth equation for cell wall expansion. *Plant Physiol* 79: 318-320.
- O'Shea B, Jankowski J, Sammut J. 2007. The source of naturally occurring arsenic in a coastal sand aquifer of eastern Australia. *Sci Tot Environ* 379: 151-166.
- O'Toole JC, Cruz RT. 1980. Response of leaf water potential, stomatal resistance and leaf rolling to water stress. *Plant Physiol* 65: 428-432.
- Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiol* 122: 1171-1177.
- Pita-Barbosa A. 2009. Efeitos do arsênio em plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae). Dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, MG. 50 pp.
- Plas DR, Thompson CB. 2002. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 13: 75-78.
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 213: 113-136.
- Pozo O, Lam E. 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 8: 1129-1132.
- Quaghebeur M, Rengel Z. 2004. Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 120: 280-286.
- Raab A, Schat H, Meharg AA, Feldmann J. 2005. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complex during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol* 168: 551-558.
- Ramadan D, Rancy PC, Nagarkar RP, Schneider JP, Thorpe C. 2009. Arsenic(III) species inhibit oxidative protein folding in vitro. *Biochemistry* 48: 424-432.
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G. 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol* 9: 28-46.

- Randall PJ, Bouma D. 1973. Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol* 52: 229-232.
- Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijsen D, Vangronsveld DJ, Cuypers A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227: 1343-1349.
- Requejo R, Tena M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* 66: 1519-1528.
- Roldán-Arjona T, Ariza RR. 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* 681: 169-179.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C.; Oliva, M.A. 2012. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae). *An Acad Bras Ciênc* 84: 689-702.
- Sasaki H, Hirose T, Watanabe Y, Ohsuki R. 1998. Carbonic anhydrase activity and CO₂-transfer resistance in Zn-deficient rice leaves. *Plant Physiol* 118: 929-934.
- Schaumloffel N, Gebel T. 1998. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis* 13: 281-286.
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Alam S, Huq SMI, Kawai S. 2008. Critical Toxicity Level of Arsenic and Elemental Composition of Arsenic-Induced Chlorosis in Hydroponic Sorghum. *Water Air Soil Pollut* 191: 279-292.
- Shi Y, Ruan J, Ma I, Han W, Wang F. 2008. Accumulation and distribution of arsenic and cadmium by tea plants. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 265-270.
- Simon T, Eberhard A, Rohr R. 2000. Effect of Ni and As on radish tuber cultivated on artificially polluted soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36: 73-80.
- Simon G, Huang H, Penner-Hahn JE, Kesler SE, Kao LS. 1999. Oxidation state of gold and arsenic in gold-bearing arsenic pyrite. *Am Mineral* 84: 1071-1079.
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* 53: 65-73.
- Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* 54: 39-50.
- Smith E, Naidu R, Alston AM. 1998. Arsenic in the soil environment: a review. *Adv Agron* 64: 149-195.
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140, 637-646.
- Soto-Reyes E, Del Razo LM, Valverde M, Rajos OE. 2005. Role of alkali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic. *Biometals* 18:493-506.
- Sun G. 2004. Arsenic contamination and arsenicosis in China. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 268-271.
- Takabayashi A, Kishine M, Asada K, Endo T, Sato F. 2005. Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO₂-concentration mechanism in C4 photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16898-16903.

- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, UFRGS, 174 p.
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S. 2005. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol* 139, 1840-1852.
- Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY. 2008. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 27: 171-181.
- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* 25: 158-165.
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R. 2001. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36: 337-397.
- Tyystjärvi E. 2008. Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coord Chem Rev* 252: 631-376.
- Vuyyuri SB, Ishaq M, Kuppala D, Grover P, Ahuja YR. 2006. Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environ Mol Mut* 47: 562-570.
- Waalkes MP, Ward JM, Liu J, Diwan BA. 2003. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary and adrenal tumor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 186: 7-17.
- Welch AH, Westjohn DB, Helsel DR, Wanty RB. 2000. Arsenic in ground water of the United States: occurrence and geochemistry. *Ground Water* 38: 589-604.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144: 307-313.
- WHO - World Health Organization. 2001. Arsenic and arsenic compounds. 2.ed. Environmental Health Criteria Series. n. 224. 187p. Disponível em: [http://www.inchem.org /documents/ehc/ehc/ehc224.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm). Acessado em: 19 de janeiro de 2013.
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 875-882.
- Wong CKC, Yeung HY, Cheung RYH. 2000. Ecotoxicological assessment of persistent organic and heavy metal contamination in Hong Kong coastal sediment. *Arch Environ Con Tox* 38: 486-493.
- Wu L, Yi H, Yi M. 2010. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. *J Hazard M* 176: 952-956.
- Wyrzykowski J, Volkert MR. 2003. The Escherichia coli methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol* 185: 1701-1704.
- Yi H, Wu L, Jiang L. 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. *Sci Tot Environ* 383: 232-236.

- Zabludowska E, Kowalska J, Jedynak L, Wojas S, Sklodowska A, Antosiewicz DM. 2009. Search for a plant phytoremediation – what can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere* 77: 301-107.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* 181: 777-794.
- Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, Pappa A, Panayiotidis MI. 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact* 188: 334-339.