



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EFEITO LETAL DOMINANTE DA RADIAÇÃO GAMA DE
 ^{60}Co EM *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)

LENITA DE FREITAS TALLARICO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

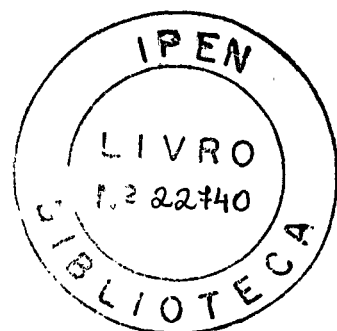
Orientador:
Dra. Kayo Okazaki

São Paulo
2003

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

EFEITO LETAL DOMINANTE DA RADIAÇÃO GAMA DE
 ^{60}Co EM *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)

LENITA DE FREITAS TALLARICO



**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki**

SÃO PAULO
2003

0.001
47e

Aos meus pais,
Décio e Maria Lúcia;
e irmãos Aline e Jônatas,
pelo amor e carinho incondicionais

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Kayo Okazaki pela sua orientação, confiança, apoio e amizade durante a realização deste trabalho;

À Dra Eliana Nakano pelos ensinamentos científicos, pelo estímulo, dedicação, companheirismo e grande amizade;

À Profa Dra Toshie Kawano que me abriu as portas do Laboratório de Malacologia/Parasitologia do Instituto Butantan, e tem me acompanhado durante toda a minha carreira, pela confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira, do Instituto de Matemática da USP, pela análise estatística;

À Cristina A. Chagas, do Instituto Butantan, pela colaboração e amizade;

Aos amigos do Instituto Butantan: Carlos do Nascimento, Conceição A. da Silva, Renata Santos de Oliveira, Ângela N. Passos, Simone K. Cavalheiro, Danilo Horita, e especialmente, Patrícia Aoky Miyasato, Liz Cristina Watanabe, Fernanda Pires Ohweiler e Edson Teixeira;

À Daniella Murakami, que me acompanhou durante todo o período de realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo;

Às amigas do IPEN, Miriam Fussae Suzuki e Márcia Augusta da Silva, que direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho;

Ao IPEN e Instituto Butantan, pelas condições fornecidas para a realização deste trabalho;

Ao Sérgio Ricardo dos S. Alexandrino, pela sua paciência e carinho.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo auxílio financeiro;

A todos aqueles que acreditaram em mim.

A extinção de espécies é uma clara indicação
do impacto destrutivo de nossa civilização na natureza.

U. H. Ehling

EFEITO LETAL DOMINANTE DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co EM

Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)

LENITA DE FREITAS TALLARICO

RESUMO

A indução de mutações em células germinativas é utilizada, em estudos ecotoxicológicos, como biomarcador de efeitos populacionais e indicador de alterações ecológicas. A *Biomphalaria glabrata*, um molusco de água doce, é considerado um bom modelo experimental para estudos de biomonitoramento devido às características biológicas e a importância ecológica desse grupo de invertebrados. O teste do letal dominante foi estabelecido em *B. glabrata* para a detecção de mutações germinativas. Na padronização do teste, ficou demonstrado que o sistema é eficiente, específico e sensível para a avaliação de mutações induzidas em células germinativas por mutagênicos químicos de referência. Neste trabalho, foram estudados os efeitos letais dominantes da radiação gama de ^{60}Co . Um experimento preliminar foi feito para estabelecer as doses e estimar a cronologia da espermatogênese em *B. glabrata*. Essa estimativa é possível graças à uniformidade de resposta de células em estádios homólogos da espermatogênese em espécies muito diferentes. Em geral, células nos estádios pré-meióticos são menos sensíveis à indução de mutações letais dominantes que as células nos estádios pós-meióticos. Esse efeito é atribuído a dois fatores: i) as células gametogênicas jovens – mitoticamente ativas – têm maior capacidade de reparo dos danos subletais ao DNA e ii) ocorre eliminação seletiva das células danificadas – esse é o chamado efeito citotóxico da radiação. No nosso sistema: i) a indução de mutações letais nas células germinativas leva a um aumento na taxa de malformações e, ii) o efeito citotóxico se manifesta pela redução nas taxas de cruzamento. A duração total da espermatogênese em *B. glabrata* foi estimada em aproximadamente 36 dias, com as fases assim distribuídas: dia 1 a 13 – espermatogônias; de 14 a 20 dias – espermatócitos e de 21 a 36 dias – espermátides e espermatozóides. A partir dessa cronologia, caramujos selvagens irradiados com 2,5; 10 e 20Gy foram cruzados com caramujos albinos não irradiados após 7, 17, 23, 30 e 36 dias. No cruzamento feito 7 dias após a irradiação, houve aumento na frequência de malformações com as três doses testadas; nos cruzamentos feitos após 17 e 23 dias, o efeito foi detectado com as duas doses mais altas. O aumento nas taxas de malformações

foi diretamente proporcional à dose de radiação. O efeito mais pronunciado foi detectado no primeiro cruzamento, sofrendo uma redução nos seguintes até o cruzamento feito após 30 dias. Foi observada uma redução nas taxas de cruzamento com a dose mais alta a partir de 23 dias após a irradiação. Após 36 dias, as taxas de malformações retomaram os valores basais. Com base na cronologia estimada da espermatogênese, pudemos concluir que as células no estágio de espermátides e espermatozóides foram as que mais sofreram o efeito letal dominante da radiação, seguido dos espermatócitos e espermatogônias secundárias. As espermatogônias primárias foram as que mais sofreram o efeito citotóxico da radiação. A resposta da espermatogênese em *B. glabrata* à radiação ionizante seguiu, assim, o padrão observado em outros sistemas. A partir da estimativa da cronologia em *B. glabrata* feita neste trabalho, será possível a determinação dos cruzamentos pós-exposição no teste do letal dominante. Esses dados são necessários, também, na interpretação de resultados obtidos da análise de amostras ambientais, geralmente, misturas complexas de muitas substâncias químicas.

**DOMINANT LETHAL EFFECT OF GAMMA RADIATION OF ^{60}Co IN
Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)**

LENITA DE FREITAS TALLARICO

ABSTRACT

Germ cell mutations are used in ecotoxicological studies as biomarkers of population effects and indicators of ecological changes. *Biomphalaria glabrata*, a freshwater mollusk, is a good experimental model for biomonitoring studies due to its biological characteristics and the ecological importance of this invertebrate group. The dominant lethal test was established in *B. glabrata* for the detection of germ cell mutations. Results with chemical mutagens showed that this system is efficient, specific and sensitive in the evaluation of germ cell mutations induced by reference mutagens. In this work, the dominant lethal effects of gamma radiation of ^{60}Co were studied. A preliminary experiment was done to establish the dose range and to estimate the chronology of spermatogenesis in *B. glabrata*. This estimate is possible because of the uniformity in response to ionizing radiation between germ cells at homologous stages of spermatogenesis in widely different species. In general, pre-meiotic germ cells are less sensitive to the induction of lethal dominant mutations than post-meiotic cells. This effect can be attributed to: i) young gametogenic cells – mitotically active – have greater repair ability from sub-lethal DNA damage and ii) there is a selective elimination of the damaged cells. In our system: i) induction of lethal dominant mutations causes an increase in the frequency of malformations and, ii) cytotoxic effect is displayed as a reduction in the crossing rates. Total duration of spermatogenesis was estimated in approximately 36 days, with the following distribution of stages: 1 to 13 days – spermatogonia, 14 to 20 days – spermatocytes, 21 to 36 days – spermatids and spermatozoa. Based on this chronology, irradiated wild-type snails with 2,5; 10 and 20Gy and crossed with non-irradiated albino snails after 7, 17, 23, 30 and 36 days. The frequencies of malformations in the heterozygous wild-type offspring of the non-irradiated albino snails were used as indicator of germ cell mutations. Dose range and post-irradiation crossings were defined in a preliminary experiment. In the crossing made 7 days after irradiation, there was an increase in the frequency of malformations with the three doses; in the crossings made 17 and 23 days after irradiation, the effect was

detected with the two higher doses. The increase in the frequencies of malformations was directly proportional to the radiation dose. The stronger effect was detected in the first crossing and there was a decrease in the following ones until the crossing made after 30 days. After 23 days, a reduction in the crossing rates was observed with the higher dose. After 36 days, the frequencies of malformation decreased up to background levels. Based on the estimated chronology of spermatogenesis, we could conclude that cells at spermatids and spermatozoa stages were the most sensitive to the dominant lethal effect of radiation, followed by spermatocytes and secondary spermatogonia. Primary spermatogonia were the most sensitive to the cytotoxic effect of radiation. The response of spermatogenesis in *B. glabrata* to ionizing radiation followed, thus, the pattern observed in other systems. With the estimate of the cronology of spermatogenesis in *B. glabrata* made in this study, it will be possible to determine post-exposure crossings in the dominant lethal test. These data are also necessary in the interpretation of results obtained from the analysis of environmental samples, usually complex mixtures of many chemicals.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	11
Considerações iniciais.....	11
1. 1 Poluentes mutagênicos no ambiente aquático.....	12
1. 2 Utilização de invertebrados como indicadores de poluição.....	15
1. 3 Teste do Letal Dominante em <i>Biomphalaria glabrata</i>	19
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3. 1 Criação e manutenção dos caramujos.....	26
3. 2 Seleção dos animais.....	26
3. 3 Coleta de desovas.....	29
3. 4 Exposição à radiação ionizante.....	29
3. 5 Determinação da faixa de dose e do intervalo de tempo para os cruzamentos após a exposição.....	30
3. 6 Estudo do efeito letal dominante da radiação.....	30
3. 7 Análise dos efeitos da radiação sobre o desenvolvimento embrionário.....	30
3. 8 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS	37
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

Considerações iniciais

A liberação de substâncias químicas no ambiente tem sido um grande problema principalmente pelo processo de industrialização, já que quantidades apreciáveis de resíduos são formados na confecção da maioria dos seus produtos.

A contaminação do ambiente pode provocar danos tanto à saúde humana quanto ambiental, e ambos devem ser considerados nas análises de risco ambiental de poluentes químicos.

A exposição dos ecossistemas à poluição pode trazer conseqüências para sua sustentabilidade e conservação da biodiversidade. Poluentes químicos podem atingir o material genético dos organismos e causar mutações. A maior parte dos efeitos da indução de mutações em populações naturais só serão evidentes muito tempo após a exposição, quando o equilíbrio entre as espécies do ecossistema já pode estar afetado.

Por isso, é necessário o desenvolvimento de sistemas capazes de detectar a presença de agentes mutagênicos no ambiente e de avaliar seus efeitos em populações naturais. Com isso, será possível estabelecer normas de liberação dessas substâncias no meio ambiente para a proteção dos ecossistemas. Este é o enfoque da Ecotoxicologia moderna que visa, através da detecção de alterações iniciais em organismos indicadores, prever um possível desequilíbrio em um determinado ecossistema.

1. 1 Poluentes mutagênicos no ambiente aquático

Os corpos de água doce naturais são os recipientes finais da maioria das substâncias tóxicas geradas pelas atividades industriais, agrícolas e domésticas e liberadas no ambiente. (Cooney, 1995).

Efluentes urbanos e industriais podem ser lançados diretamente na água e são considerados fontes pontuais de poluição. Frequentemente, entretanto, as águas superficiais podem ser atingidas de forma indireta, como por lixiviação de resíduos agrícolas e urbanos – de escapamentos de veículos, por exemplo – ou a partir de fontes difusas, como poluentes da atmosfera depositados na água, tornando difícil a identificação das fontes e seu controle (Doust et al., 1994).

Os ecossistemas aquáticos são os mais suscetíveis à presença de substâncias químicas, pois a água é o meio em que as substâncias podem se dispersar mais fácil e rapidamente, afetando um grande número de organismos (Burger, 1997). Além disso, compostos solúveis em água podem manter suas características físicas e químicas enquanto são transportados e distribuídos pelo ambiente (Rand e Petrocelli, 1985).

Águas poluídas são, geralmente, misturas complexas de muitas substâncias químicas, mas, de modo geral, agentes mutagênicos estão presentes em muitas delas (Claxton et al., 1998). Os efluentes industriais são a principal fonte de poluentes mutagênicos. Os efluentes urbanos têm, em geral, um potencial mutagênico menor, mas como as taxas de emissão são muito maiores, eles podem contribuir, no final, com uma carga equivalente de compostos mutagênicos (White e Rasmussen, 1998).

Agentes mutagênicos podem atingir o homem por meio da cadeia alimentar ou do consumo da própria água. Em populações naturais essa exposição poderá ter implicações significantes a curto e longo prazos.

A curto prazo, a indução de mutações em células somáticas pode levar ao surgimento de doenças neoplásicas ou outras doenças degenerativas, que levarão à perda de alguns indivíduos. Isso não representa um grande risco para a manutenção das populações naturais expostas (Wurgler e Kramers, 1992). Já, a longo prazo, a indução de mutações nas células germinativas é a que traz conseqüências mais graves para os ecossistemas, porque afeta diretamente o potencial reprodutivo das populações. Frequências muito elevadas de mutações em células germinativas podem levar à perda de gametas; frequências mais

moderadas, bem como a indução de mutações letais pode não afetar a viabilidade dos gametas, mas podem levar à morte do embrião; ainda, mutações germinativas podem levar a malformações. Todos esses efeitos vão afetar diretamente o potencial reprodutivo, causando declínio nas populações expostas (Depledge, 1998).

Mutações germinativas são transmitidas e podem também se manifestar mais tarde sob a forma de doenças como câncer. Nesse caso, a perda de alguns indivíduos portadores de mutações deletérias não representaria um risco para populações com bom potencial reprodutivo, mas para populações que não tem um excedente reprodutivo como estratégia, mesmo a perda de poucos indivíduos pode representar uma ameaça de extinção da espécie (Bickham et al., 2000). Mesmo que as mutações induzidas confirmam alguma vantagem seletiva para determinada população, isto pode significar desvantagem para outras, e é possível que a estabilidade do ecossistema seja afetada, como por exemplo, na indução de resistência a pesticidas ou no aumento da virulência de organismos patogênicos (Wurgler e Kramers, 1992). Além disso, deve-se ter em mente que mutações ocorrem ao acaso, e é esperado que a ocorrência de alterações ao acaso em sistemas altamente complexos seja prejudicial, assim, a maioria das mutações induzidas é deletéria ou neutra, sendo na prática, descartada (Ramel, 1983). Caracteres associados ao potencial adaptativo, por exemplo, são geralmente, determinados por sistemas poligênicos, com uma longa história evolutiva, e são considerados otimizados, isto é, com pouco espaço para variabilidade adicional (Roff e Mousseau, 1987); assim, mutações nesses sistemas serão, provavelmente deletérias (Ramel, 1983).

Avaliar os efeitos de uma exposição a um agente mutagênico sobre o ecossistema é tarefa complexa devido, principalmente, ao longo período de latência entre a exposição e a manifestação do efeito. Ainda, apesar de serem os indicadores mais relevantes de efeitos ecológicos, as alterações populacionais, como ocorrência, abundância e reprodução não fornecem uma indicação da sua causa (Shugart et al., 1992). Para isso, é necessário utilizar outros indicadores, que permitam a detecção precoce desses agentes no ambiente.

A avaliação da mutagenicidade de poluentes aquáticos tem sido feita pelos métodos comumente utilizados no estabelecimento do potencial mutagênico de qualquer agente. Os testes com bactérias – particularmente o teste de Ames (Ames et al., 1975) – têm sido os

mais utilizados na detecção de poluentes mutagênicos em amostras de água (Stahl, 1991; Houk, 1992; Claxton et al., 1998).

O teste de Ames foi um dos primeiros testes de mutagenicidade validados para a previsão do potencial carcinogênico de substâncias químicas e tem sido amplamente empregado. Nos protocolos da avaliação de mutagenicidade, é um dos testes recomendados para compor a bateria de testes *in vitro* (Rabello-Gay et al., 1991).

Apesar de ser um sistema validado e o único recomendado nos protocolos para avaliação de mutagenicidade em águas poluídas, algumas limitações do teste devem ser consideradas antes de propor o teste de Ames como o único indicador dos compostos mutagênicos em águas poluídas. Detecta apenas mutações de ponto; compostos que agem apenas em nível cromossômico – asbestos, benzeno, pesticidas organoclorados e alguns metais, especialmente os derivados de cromo hexavalente – não são detectados pela *Salmonella*. Além disso, o teste é muito sensível para determinadas categorias de substâncias químicas; os compostos detectados são geralmente eletrofílicos ou originam intermediários eletrofílicos, requerem ativação metabólica simples, são bem absorvidos pela *Salmonella* e não são tóxicos para ela (Legator e Harper, 1988). Com relação ao emprego do teste na avaliação de amostras de água, deve-se lembrar que a maioria dos poluentes está presente em baixas concentrações, assim é necessário o uso de métodos de extração ou concentração, processos que podem alterar as propriedades da amostra original (Stahl, 1991).

A necessidade de detecção e avaliação do impacto ambiental de poluentes mutagênicos – particularmente em baixas concentrações em misturas complexas – levou ao desenvolvimento de sistemas mais realistas quanto à previsão de efeitos. Testes com animais têm maior relevância ecotoxicológica: os dados obtidos podem ser considerados uma resposta complexa que inclui a atividade mutagênica e a eficiência dos mecanismos fisiológicos de defesa como excreção, metabolismo e eliminação das células danificadas biológicas (López-Barea e Pueyo, 1998).

Os estudos ecotoxicológicos usam bioindicadores, que são organismos sentinelas, para detectar a presença de poluentes em estudos *in situ*. Com o uso de bioindicadores é possível avaliar uma situação ambiental única, resultado de uma interação de fatores numerosos e complexos agindo simultaneamente (Doust, et al., 1994).

Bioindicadores devem ter ampla distribuição geográfica, ser facilmente coletados e se manter em um território relativamente restrito. Moluscos como o mexilhão, outros invertebrados e peixes tem sido usados no monitoramento da poluição aquática (López-Barea e Pueyo, 1998).

1. 2 Utilização de invertebrados como indicadores de poluição

Grande parte dos estudos de biomonitoramento de poluentes mutagênicos tem sido feita em espécies marinhas, e quase exclusivamente em peixes (Nakano, 2000). As espécies aquáticas são representadas por mais de 90% de invertebrados (Barnes, 1990), o que é significativo quando se quer prever o impacto de poluentes em ecossistemas aquáticos. Há, portanto, uma carência de dados sobre o efeito de poluentes mutagênicos em invertebrados de água doce.

Os moluscos podem ser utilizados no monitoramento de poluentes mutagênicos químicos (Nacci, et al., 1992; Burgeot, et al., 1995; Steinert, et al., 1998) e físicos (Carvalho, 1987; Riccardi e Ravera, 1989; Franstsevich, 1995). Os bivalves – principalmente mexilhões – têm sido muito utilizados nesses estudos por acumular e responder a muitos poluentes (López-Barea e Pueyo, 1998).

Dentre os moluscos, os gastrópodes representam o grupo mais diversificado de todas as classes pertencentes ao filo - compreende mais de 80% dos moluscos vivos (Seed, 1984, Barnes, et al., 1995).

Os caramujos de água doce pertencem à família Planorbidae (Souza e Lima, 1997). Eles são encontrados em diversos tipos de coleções de água doce, naturais ou artificiais, com exceção de águas profundas (raramente abaixo de 1,5 a 2,0m de profundidade) ou correnteza muito forte. Vivem preferencialmente em águas rasas, perto de margens, tendo como substrato o leito lodoso ou rochoso e a vegetação enraizada ou flutuante. Encontram-se em lagos, represas, pântanos, brejos, alagadiços, rios (nas margens ou em locais de pouca correnteza), canais de irrigação, valas, barreiros, associados a certos tipos de cultura (Pimentel e White, 1959; Andrade e Freitas, 1961).

O sistema reprodutivo dos planorbídeos apresenta uma estrutura bem elaborada, constituído de uma gônada bissexual e dutos masculinos e femininos com diversas glândulas acessórias (FIG. 1). Os gametas femininos e masculinos são produzidos simultaneamente em

um ovotestis (FIG. 2), e conduzidos por um ducto hermafrodita até às vias feminina e masculina. Essa complexidade está associada ao fato de que são hermafroditas simultâneos, cuja atividade reprodutora se processa sob duas formas distintas: a autofecundação e a fecundação cruzada. A constituição do aparelho reprodutor permite que esses animais realizem fecundação interna, armazenagem do seu próprio esperma ou do esperma recebido através da cópula (Tomé, 1995).

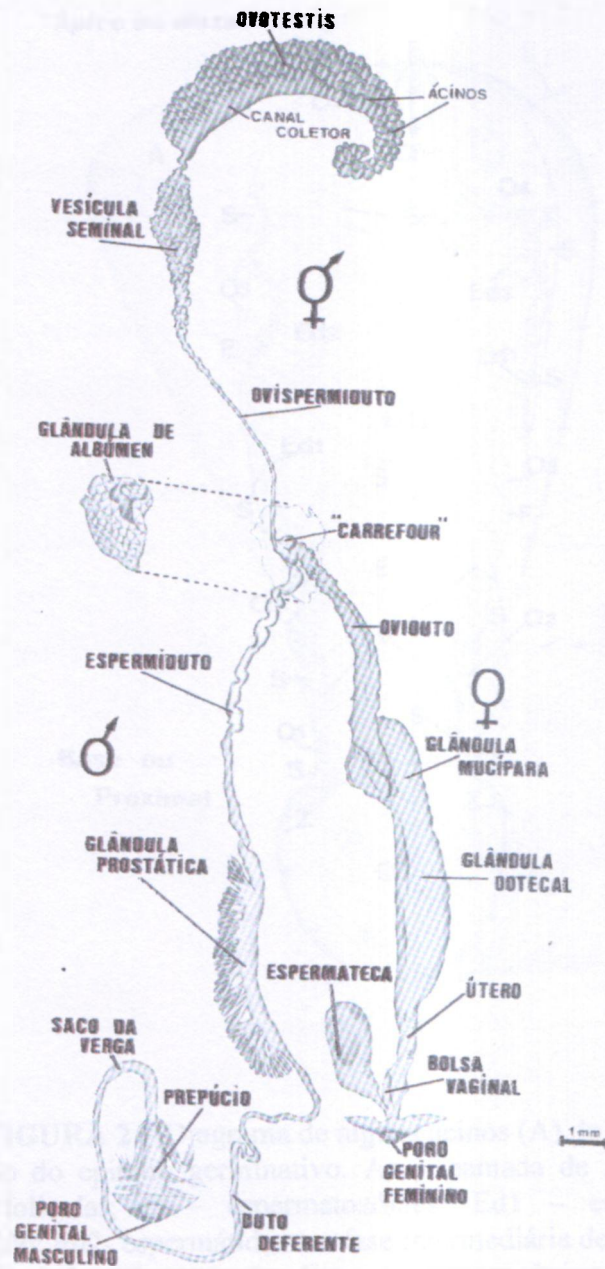
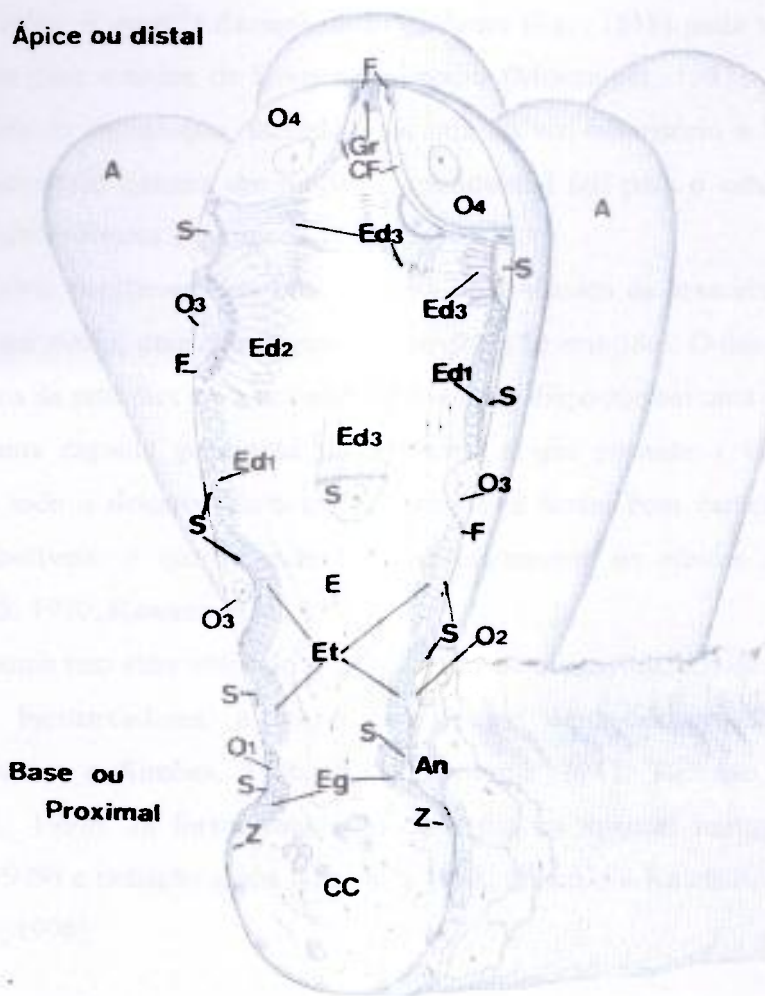


FIGURA 1 – Aparelho reprodutor de *Biomphalaria*.

Fonte: Tomé, 1995

Ápice ou distal



Base ou
Proximal

FIGURA 2 – Diagrama de alguns ácinos (A) do ovotestis mostrando, em detalhe, a organização do epitélio germinativo. An – camada de Ancel; CC – canal coletor; CF – cavidade folicular; E – espermatozóides; Ed1 – espermatídios em fase inicial de diferenciação; Ed2- espermatídios em fase intermediária de diferenciação; Ed3 – espermatídios em fase final de diferenciação; Eg – espermatogônias; Et – espermatócitos; F – célula folicular; Gr – grânulo de degeneração; O – ovócitos (estádios de diferenciação 1 a 4); S – célula de Sertoli; Z – zona de transição.

Fonte: Tomé, 1995

Nessa família, a espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) pode ser considerada um bom indicador para estudos de biomonitoramento (Münzinger, 1987). Características como curto período de reprodução, facilidade de criação em laboratório e baixo custo de manutenção, fazem desse sistema um modelo experimental útil para o estudo dos efeitos mutagênicos de agentes físicos e químicos.

Os embriões constituem um bom sistema para estudos de toxicidade. Caramujos adultos colocam, em média, uma desova por dia com 20 a 50 embriões. O desenvolvimento é externo e leva cerca de sete dias até a eclosão. Os ovos são dispostos em uma única camada e envolvidos por uma cápsula gelatinosa transparente, o que permite a visualização dos embriões durante todo o desenvolvimento. Os estádios já foram bem caracterizados e são facilmente reconhecíveis, o que permite detectar claramente os efeitos morfogenéticos (Camey e Verdonk, 1970; Kawano et al., 1992).

Esse sistema tem sido utilizado para o estudo de efeitos tóxicos de vários agentes, utilizando como biomarcadores, a mortalidade e as alterações no desenvolvimento embrionário (Kawano e Simões, 1986; Ré e Kawano, 1987; Kawano, et al., 1992; Yamamoto, et al., 1996). Já foram estudados, também, os agentes mutagênicos cafeína (Kawano, et al., 1979) e radiação gama (Okazaki, 1988; Okazaki e Kawano, 1991; Okazaki, et al., 1996; Melo, 1998).

1.3 Teste do Letal Dominante em *Biomphalaria glabrata*

As mutações letais dominantes em mamíferos foram descritas, pela primeira vez, por Brenneke (1937). Seu uso como indicador de dano induzido por radiação se deve a Kaplan e Lyon (1953) e Russel et al. (1954), mas foi Bateman (1966) quem propôs o método para o monitoramento de agentes mutagênicos.

No teste do letal dominante (Bateman, 1966), ratos ou camundongos machos são expostos à substância-teste e cruzados com fêmeas não tratadas, que são sacrificadas a meio termo da prenhez, quando são contados os embriões mortos. No teste em roedores, são realizados cruzamentos em diferentes tempos após a exposição para a detecção dos efeitos mutagênicos nas células nos diferentes estádios da espermatogênese (FIG. 3). As mutações letais dominantes resultam de aberrações cromossômicas que, embora não afetem a viabilidade dos gametas, são letais para o embrião (Bateman e Epstein, 1971).

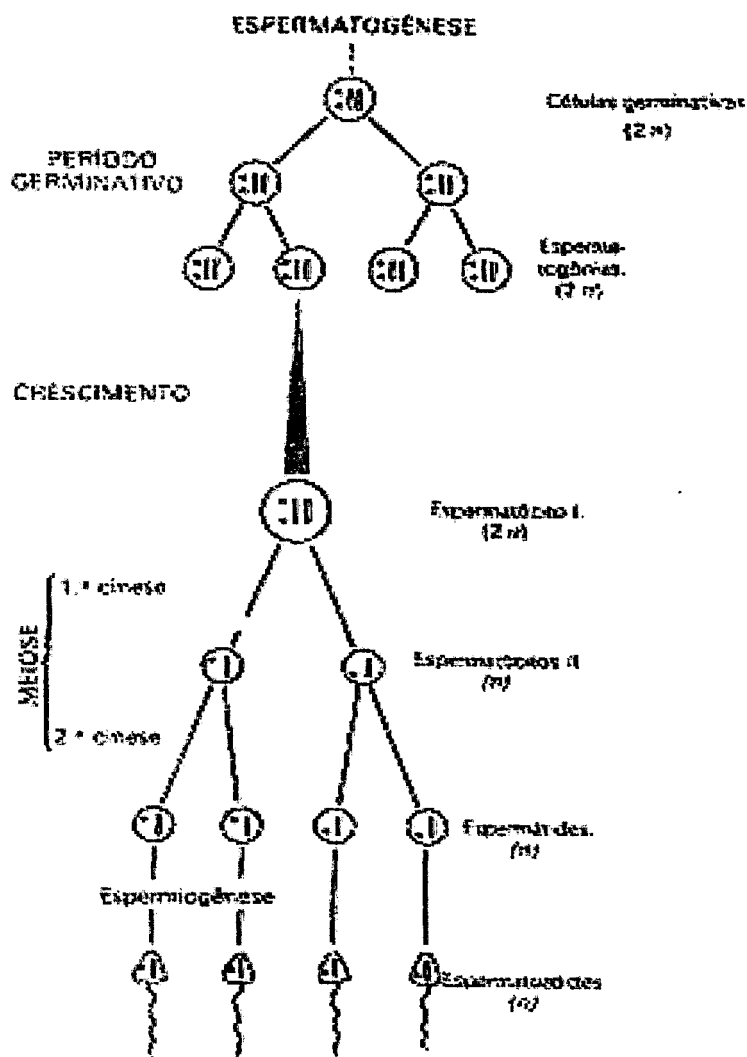


FIGURA 3 – Esquema de células nos diferentes estádios da espermatogénese.

Por ser um dos testes mais utilizados e bem caracterizados, o teste do letal dominante é atualmente, um dos métodos empregados para estimar o risco mutagênico de compostos químicos e tem sido recomendado nos manuais internacionais para avaliação do potencial mutagênico de um agente em células germinativas em animais superiores (Asbhy, et al., 1996, Witt e Bishop, 1996).

Outros sistemas podem ser empregados no teste do letal dominante. A taxa de eclosão de ovos em *Drosophila* já havia sido usada como medida de letalidade dominante dos raios X por Muller (1927). Em peixes, Solberg (1938) foi quem primeiro estudou os efeitos da irradiação de células germinativas na fertilidade e na produção de embriões mortos. O efeito dominante letal produzido pelos raios X em peixes foi descrito por Newcombe e McGregor (1967) em trutas e por Schröder (1969) em *Lebistes reticulares*. O teste do letal dominante em *Oryzias latipes* foi proposto por Shimada e Egami (1984), para o monitoramento de mutagênicos ambientais, já que as reduções nas taxas de eclosão de ovos apresentaram boa correlação com a exposição dos peixes a mutagênicos físicos (Egami et al., 1983) e químicos (Shimada e Egami, 1984).

A adaptação dessa técnica para a *Biomphalaria glabrata*, usa, basicamente, a mesma estratégia empregada em roedores com algumas adaptações (Nakano et al., 2003). Malformações embrionárias inespecíficas, onde múltiplas estruturas estão afetadas, levam à morte do embrião, assim, mutações que causam esse tipo de malformação são mutações letais; esse foi o indicador usado no teste do letal dominante em *Biomphalaria*. Foi necessário, também, empregar um marcador genético, o albinismo, para identificar os embriões resultantes de fecundação cruzada, já que esses animais são hermafroditas que se reproduzem tanto por autofecundação como por fecundação cruzada (Paraense, 1955).

Para identificar os resultantes de fecundação cruzada, caramujos selvagens (homozigotos) tratados são cruzados com albinos (homozigotos recessivos) não tratados. Os efeitos observados nos embriões heterozigotos da progênie dos albinos resultam, certamente, de mutações induzidas nos espermatozoides dos selvagens expostos.

A detecção de malformados heterozigotos é possível graças a algumas características do sistema. A *Biomphalaria glabrata* apresenta aspectos favoráveis específicos de animais ovíparos. Em algumas espécies de anfíbios, peixes e moluscos, os

embriões podem ser observados antes da eclosão por causa da transparência das cápsulas dos ovos. Além disso, perdas devido a abortos e falhas na implantação não ocorrem e, durante todo o desenvolvimento, os embriões estão próximos dos suprimentos alimentares. Assim, embriões potencialmente malformados podem se desenvolver, o que favorece a sobrevivência até um estágio onde as malformações podem se expressar (Newcombe e McGregor, 1967). Desse modo, é possível a identificação de malformados heterozigotos na progênie de albinos, que é feita pela presença de pigmentação nos olhos, visível a partir do quarto dia de desenvolvimento.

No estabelecimento do teste do letal dominante em *Biomphalaria glabrata*, foram empregadas duas substâncias químicas. A mitomicina C foi usada como mutagênico de ação direta e a ciclofosfamida, de ação indireta. Esses dois compostos foram escolhidos por serem solúveis em água e terem seus efeitos letais dominantes já descritos. Foram obtidas respostas positivas com os dois compostos e, apesar do tratamento ter induzido aumentos nas frequências de todos os tipos de malformações, a análise somente das malformações inespecíficas nos embriões resultantes de fecundação cruzada foi suficiente para detectar o efeito dos dois agentes (Nakano, 2000).

A validação de um teste de mutagenicidade requer a avaliação do desempenho do sistema quando submetido a vários agentes mutagênicos de referência. Nesses estudos, a radiação ionizante tem sido empregada como modelo de agente direto. Sua atividade genotóxica não sofre interferência de fatores farmacocinéticos, já que não requer absorção, distribuição ou metabolismo; assim, pode-se considerar que a radiação age direta e instantaneamente no DNA. A partir daí, as respostas obtidas da exposição à radiação podem ser usadas para inferir alguns parâmetros cinéticos de mutagênicos químicos, como o período de latência e meia-vida da atividade mutagênica efetiva. No caso de certos compostos, como aqueles que requerem ativação metabólica, com mecanismo de ação desconhecido, ou com tempo de ação muito curto ou muito longo, essas informações podem complementar aquelas obtidas dos estudos farmacocinéticos, muitas vezes limitados pela dificuldade de interpretação dos resultados e pela complexidade da correlação entre a farmacocinética do composto e a sua atividade genotóxica (Morales-Ramírez et al., 1997).

Quando se trata dos efeitos causados pela radiação ionizante, alguns fatores são levados em consideração por influenciarem na sensibilidade das células germinativas. São

exemplos os fatores físicos, como o tipo de radiação, dose, taxa de dose, fracionamento de dose, os fatores químicos, como o teor hídrico, a tensão do oxigênio e temperatura e os fatores biológicos, como o estágio de desenvolvimento celular, estado fisiológico ou metabólico, constituição genética e idade do organismo (Mandl, 1964).

A radiação pode induzir mutações gênicas, aberrações cromossômicas e morte celular. As células irradiadas apresentam ainda uma tendência ao aumento ou diminuição do número de cromossomos. Os efeitos da radiação em nível celular são decorrentes de mudanças ocorridas durante a duplicação ou no reparo de danos do DNA, causando instabilidade cromossômica transmissível, resultando em efeitos variados mesmo depois de vários ciclos mitóticos (Sabatier et al., 1995).

Estudos de radiosensibilidade de células germinativas mostram que o efeito mutagênico da radiação ionizante sobre a gametogênese é inespecífico. Como consequência, a radiação é capaz de induzir mutações letais dominantes em células gametogênicas em todos os estádios (Mandl, 1964; Ehling, 1971; Egami, et al., 1983). Em contraste com a radiação ionizante, mutagênicos químicos têm perfis diferentes de indução de mutações germinativas (Witt e Bishop, 1996). Um estudo comparativo com vários agentes em roedores mostrou que, enquanto que o efeito da radiação ionizante é inespecífico, mutagênicos químicos interferem em diferentes processos bioquímicos da gametogênese. Assim, em contraste com a radiação ionizante, que é capaz de induzir mutações letais dominantes em todos os estádios da gametogênese, os mutagênicos químicos o fazem de forma estágio-específica (Ehling, 1971).

A eficiência da indução de mutações letais dominantes pela radiação ionizante depende do estágio da gametogênese. Essa sensibilidade diferencial é atribuída às características do processo: o desenvolvimento das células germinativas se caracteriza por alterações bioquímicas correlacionadas com a diferenciação morfológica; assim, as células nos diferentes estádios constituem populações distintas (Ehling, 1971).

Em geral, células nos estádios pré-meióticos são menos sensíveis à indução de mutações letais que as células nos estádios pós-meióticos. Esse efeito é atribuído à maior capacidade de reparo das células gametogênicas jovens de danos ao DNA em doses subletais e à eliminação seletiva das células danificadas. Por outro lado, gônias mitoticamente ativas são mais sensíveis ao efeito de morte celular da radiação (Mandl, 1964; Egami e Hyodo-Taguchi, 1965; Konno e Egami, 1966).

Esse padrão de resposta à radiação ionizante é altamente conservado desde fungos, plantas até os animais superiores (Mandl, 1964), e pode, portanto, ser usado para estimar alguns parâmetros da espermatogênese em sistemas em que esses não estão determinados, como a *Biomphalaria*.

Alguns trabalhos em diversos sistemas biológicos, como por exemplo, insetos, peixes e mamíferos, foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos das radiações no processo da gametogênese, na capacidade reprodutiva e na indução de mutações sobre as células germinativas (Mandl, 1964).

No estabelecimento do teste do letal dominante em *Biomphalaria*, foi possível concluir que esse organismo é capaz de absorver e de ativar metabolicamente compostos mutagênicos presentes no ambiente aquático. O cruzamento único pós-exposição serviu para confirmar a natureza genética das malformações induzidas; cruzamentos adicionais para a determinação dos estádios afetados não foram realizados pela falta de dados sobre a cronologia da gametogênese em *Biomphalaria* (Nakano et al., 2003); o único parâmetro conhecido é a duração da espermiogênese (Vianey-Liaud, 1972).

2 OBJETIVOS

O conhecimento da cronologia da espermatogênese é essencial para a determinação dos cruzamentos pós-exposição no teste do letal dominante. Esses dados são necessários, também, na interpretação de resultados obtidos da análise de amostras ambientais, geralmente, misturas complexas de muitas substâncias químicas. Considerando, por fim, a importância da radiação ionizante como modelo de agente direto, com valores nulos de tempo de latência e meia-vida, os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar o efeito mutagênico da radiação ionizante em células germinativas de *Biomphalaria glabrata*;
- Estimar, a partir do estudo do efeito do letal dominante da radiação ionizante de ^{60}Co , a duração total da espermatogênese e dos estádios pré e pós-meióticos em *Biomphalaria glabrata*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Criação e manutenção dos caramujos

Foram utilizados espécimes de *Biomphalaria glabrata* selvagens (pigmentadas) (FIG.4A) coletados em Barreiro (Belo Horizonte, Minas Gerais) e albinos (não pigmentadas) (FIG.4B) provenientes de Amaralina (BA) e Campinas (SP), mantidos em laboratório durante várias gerações.

Os caramujos foram mantidos em aquários plásticos (medindo 50 x 23 x 17 cm), com água filtrada e aeradores (FIG.5A). A alimentação foi diária com alface fresca *ad libitum* e a troca de água foi realizada a cada 15 dias.

3.2 Seleção dos animais

Foram utilizados animais adultos sexualmente maduros, o que foi constatado pela produção de desovas, diâmetro superior a 10 mm e idade mínima de 2 meses. Os animais foram isolados em copos de vidro individuais, medindo 6 cm de diâmetro e com capacidade de aproximadamente 180 ml de água filtrada e declorada (em repouso por 24 horas) (FIG.5B). Os animais ficaram isolados, no mínimo, por três semanas antes do início dos experimentos.

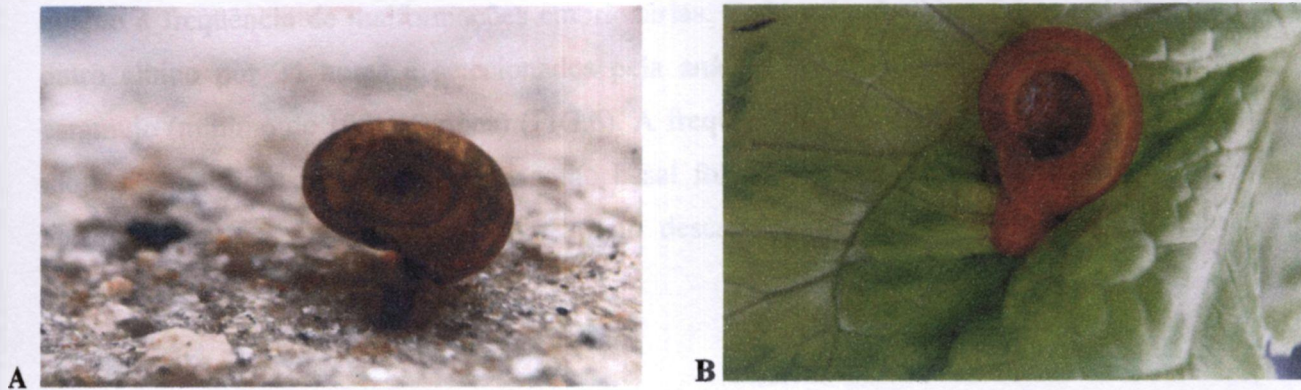


FIGURA 4 – Espécimes adultos de *Biomphalaria glabrata* - (A) Selvagem e (B) Albino.



FIGURA 5 – *Biomphalaria glabrata* mantida em laboratório (A) e Animais em isolamento para os cruzamentos (B).

Todos os caramujos utilizados nos experimentos foram analisados previamente quanto à frequência de malformações embrionárias. Cada animal albino foi acasalado com outro albino por 24 horas e selecionados pela análise de, no mínimo, três desovas por caramujo (mínimo de 100 embriões) (FIG.6). A frequência de embriões inviáveis (embriões mortos e malformados) estabelecida como basal foi de 5%; desta forma, os animais que apresentaram taxas acima desse valor foram descartados. Para cada cruzamento, foram selecionados novos animais albinos.

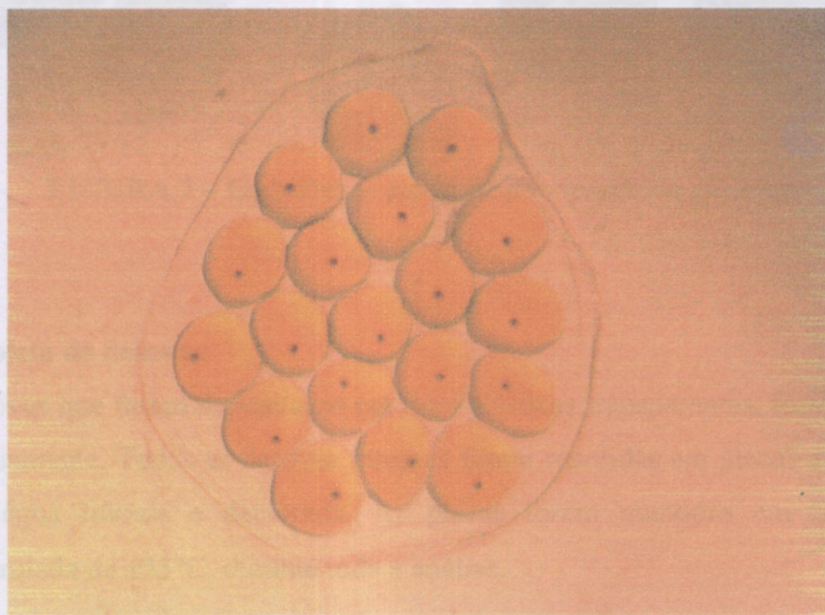


FIGURA 6 – Desova íntegra de *Biomphalaria glabrata*

O grupo selvagem foi selecionado após o cruzamento com albinos antes da exposição. Para isso foram analisados no mínimo, 50 embriões selvagens na progênie dos caramujos albinos: a frequência basal de embriões inviáveis foi estabelecida em 3%. Os embriões podem ser distingüíveis dos albinos a partir do quarto dia de desenvolvimento embrionário pela presença de pigmentação dos olhos (FIG.7).

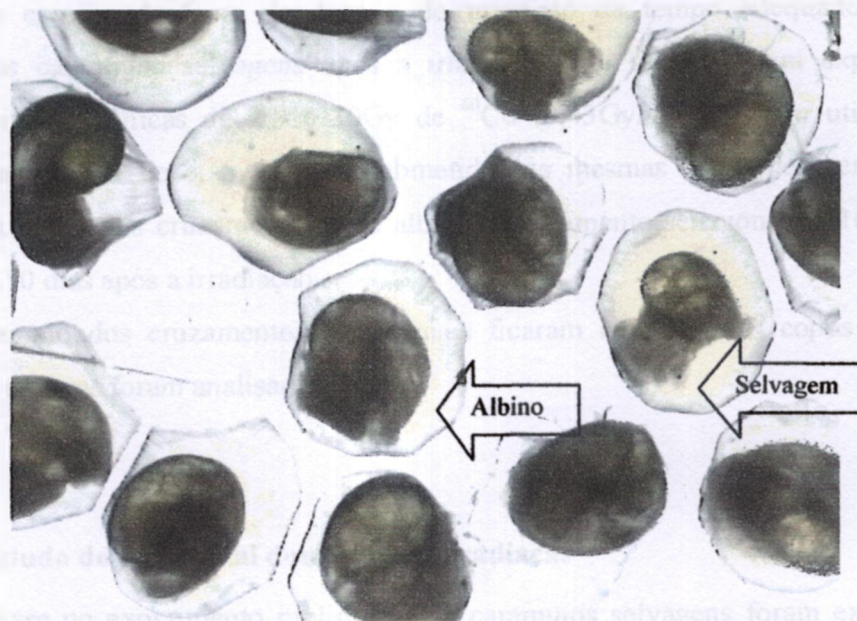


FIGURA 7 – Embriões normais de *Biomphalaria glabrata*

3.3 Coleta de desovas

As desovas que foram depositadas em tiras plásticas transparentes, foram coletadas e analisadas diariamente. Todas as desovas íntegras foram mantidas em placas de cultura de 24 poços com água filtrada e dechlorada. As placas foram mantidas em B.O.D. com temperatura controlada de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, durante toda a análise.

3.4 Exposição à radiação ionizante

Para a exposição à radiação, somente os animais selvagens foram colocados em tubos plásticos, separados individualmente por algodão. Foram irradiados em uma fonte de ^{60}Co - Gamma-Cell Atomic Energy of Canadá LTD, modelo GC-220 do IPEN/CNEN, na presença de oxigênio molecular e à temperatura ambiente. O grupo controle foi submetido às mesmas condições do grupo irradiado.

3. 5 Determinação da faixa de dose e do intervalo de tempo para os cruzamentos após a exposição

Para a escolha da faixa de dose e do intervalo de tempo adequado para os cruzamentos dos caramujos selvagens após a irradiação, foi realizado um experimento preliminar, com doses únicas de 2,5 e 30Gy de ^{60}Co (0,43Gy/min). Foram utilizados 5 caramujos selvagens por dose; 5 animais submetidos às mesmas condições serviram de controle. Foram realizados cruzamentos com albinos previamente selecionados 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias após a irradiação.

Ao término dos cruzamentos, os animais ficaram isolados nos copos de vidro novamente e as desovas foram analisadas.

3. 6 Estudo do efeito letal dominante da radiação

Com base no experimento preliminar, os caramujos selvagens foram expostos às doses únicas de 2,5; 10 e 20Gy de radiação gama de ^{60}Co (0,40Gy/min). Foram utilizados 13 caramujos por dose; 13 animais submetidos às mesmas condições serviram de controle. Foram realizados cinco cruzamentos com albinos previamente selecionados: 7, 17, 23, 30 e 36 dias após a irradiação.

Ao término dos cruzamentos, os animais ficaram isolados novamente e as desovas foram analisadas.

3. 7 Análise dos efeitos da radiação sobre o desenvolvimento embrionário

A *Biomphalaria* é hermafrodita simultânea e se reproduz tanto por auto-fecundação como por fecundação cruzada. Assim, caramujos selvagens homozigotos cruzados com caramujos albinos (homozigotos recessivos) (FIG.8) produzem:

- Dos selvagens expostos:
 - embriões selvagens heterozigotos (Aa) produzidos por fecundação cruzada com os albinos;

- embriões selvagens homozigotos (AA) produzidos por auto-fecundação, ou por fecundação cruzada com outros selvagens antes do início dos experimentos.
- Dos albinos cruzados com os selvagens expostos:
 - embriões selvagens heterozigotos (Aa) produzidos por fecundação cruzada;
 - embriões albinos (aa) produzidos por auto-fecundação ou por fecundação cruzada com outros albinos antes do início do experimento.

Dessa progênie, foram analisados os embriões selvagens, que se originaram dos espermatozóides dos animais expostos.

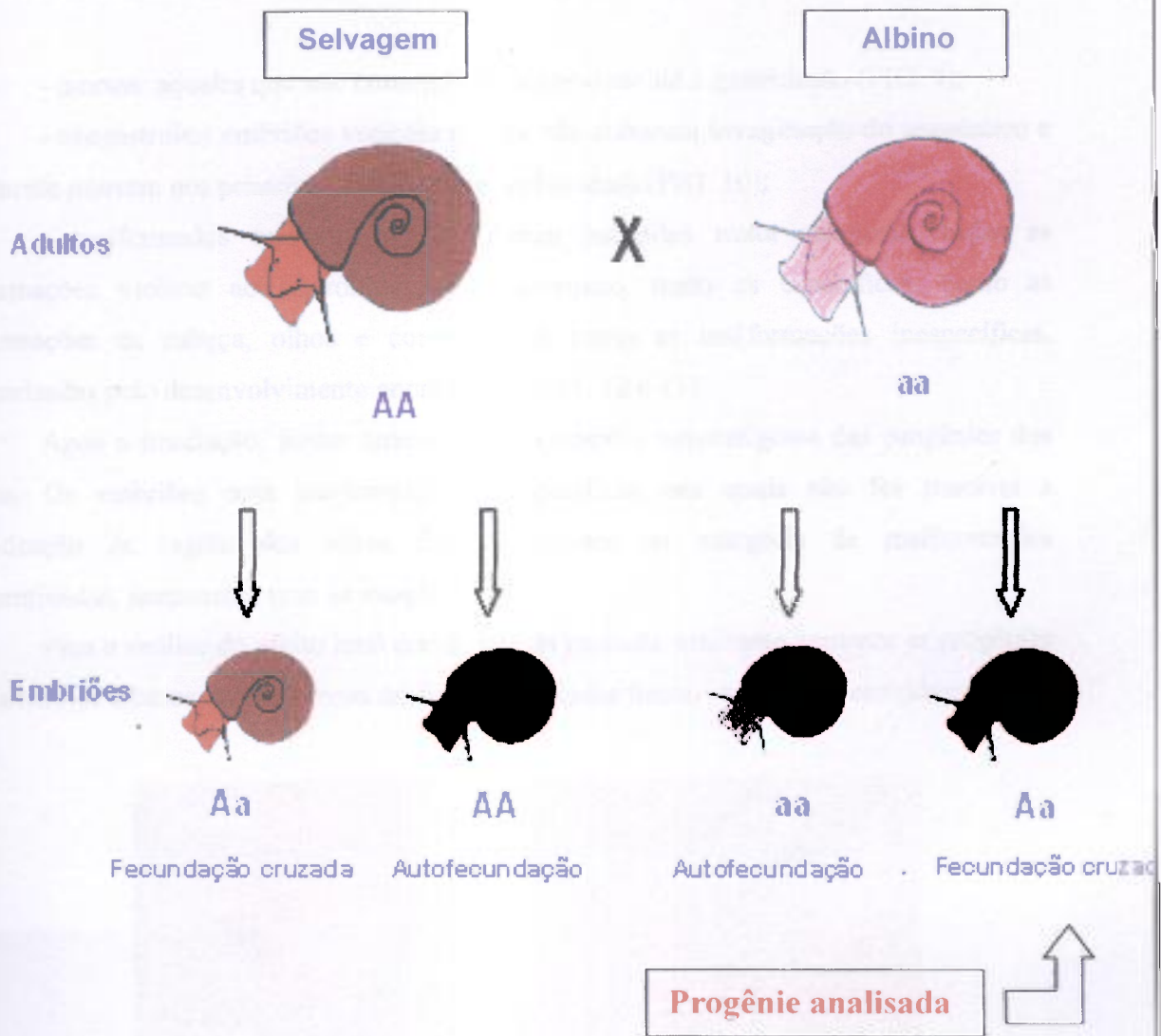


FIGURA 8 – Tipos de embriões produzidos após o cruzamento entre caramujos homocigotos selvagens e albinos. AA, Aa e aa são os genótipos correspondentes aos fenótipos selvagem, selvagem e albino, respectivamente.

Os embriões foram observados ao microscópio estereoscópico, diariamente, desde o início do desenvolvimento, por um período de 8 dias. A análise dos efeitos da radiação ionizante sobre o desenvolvimento embrionário dos caramujos irradiados foi feita com base nos critérios adotados por Geilenkirchen (1966). Os embriões foram classificados em:

- mortos: aqueles que não conseguiram sobreviver até a gastrulação (FIG. 9);
- exogástrulas: embriões vesiculares, que não sofreram invaginação do arquêntero e geralmente morrem nos primeiros dias do desenvolvimento (FIG. 10);
- malformados ou teratomorfos: foram incluídas nesta categoria, todas as malformações visíveis ao microscópio estereoscópico, tanto as específicas, como as malformações de cabeça, olhos e concha, bem como as malformações inespecíficas, caracterizadas pelo desenvolvimento anormal (FIG. 11, 12 e 13).

Após a irradiação, foram analisados os embriões heterozigotos das progênes dos albinos. Os embriões com malformações inespecíficas nos quais não foi possível a identificação da região dos olhos foram incluídos na categoria de malformações indeterminadas, juntamente com as exogástrulas.

Para a análise do efeito letal dominante da radiação ionizante somente as progênes dos caramujos albinos cruzados com selvagens irradiados foram levadas em consideração.

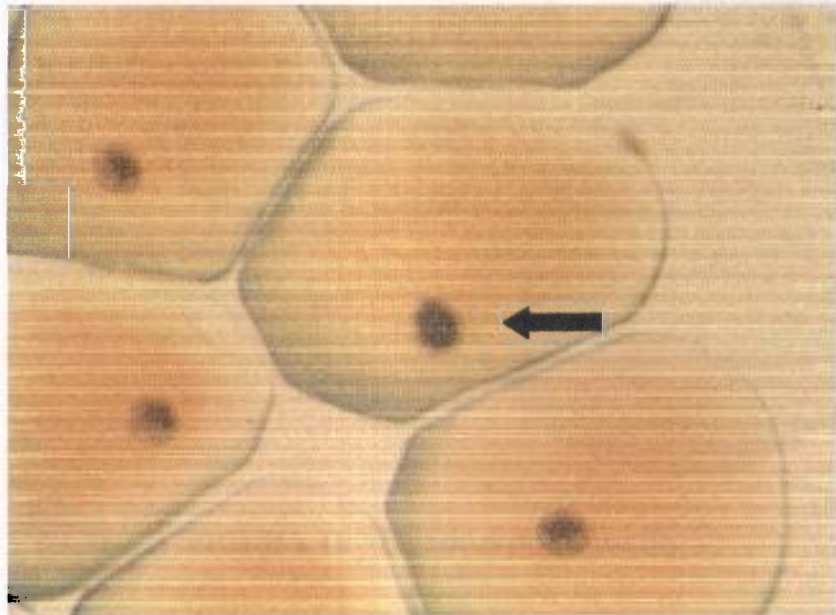


FIGURA 9 – Desova contendo um embrião morto

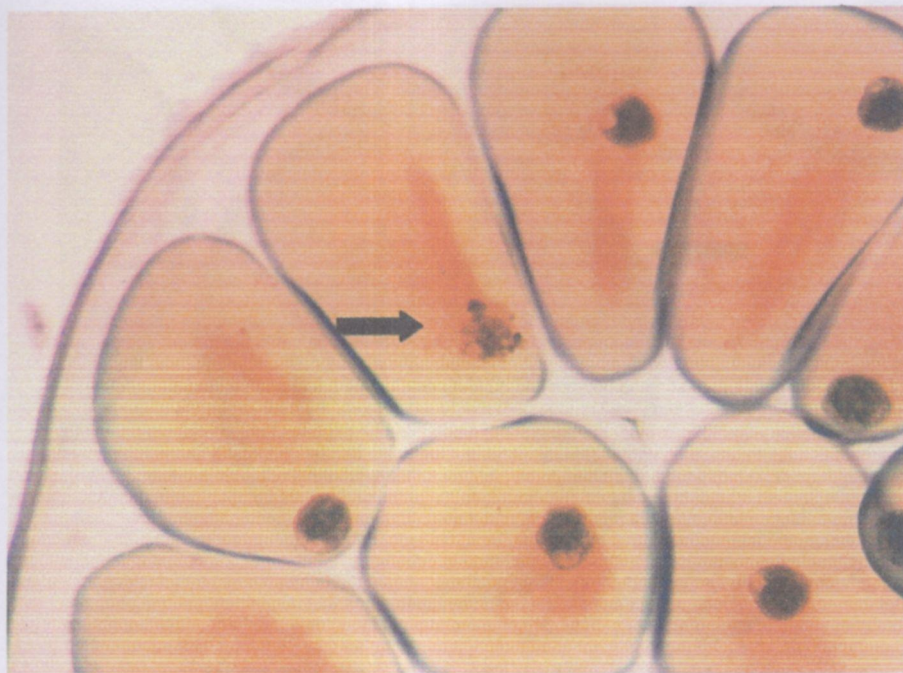


FIGURA 10 – Exogástrula

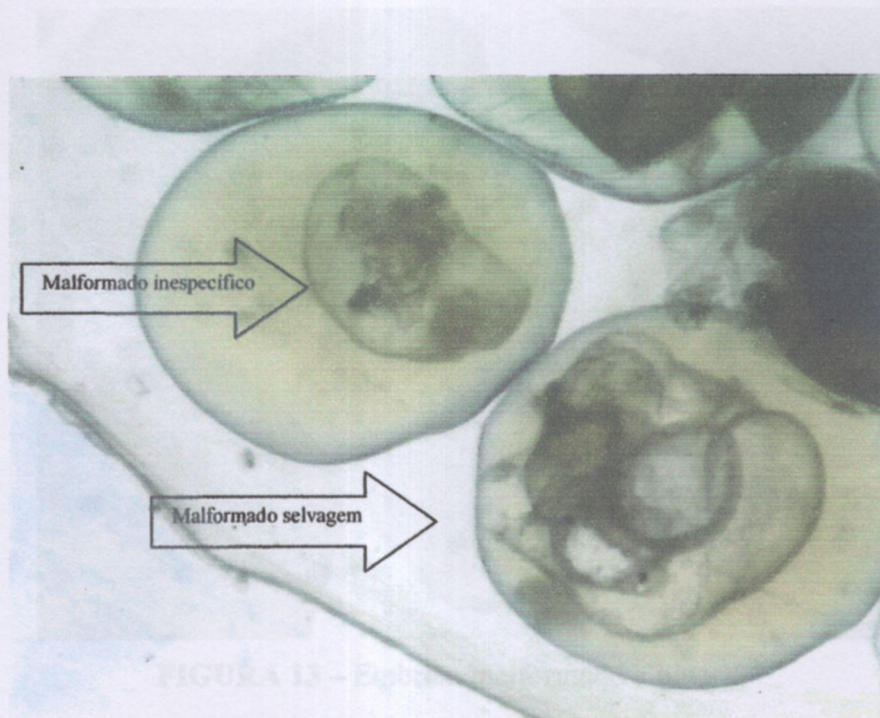


FIGURA 11 – Embriões malformados

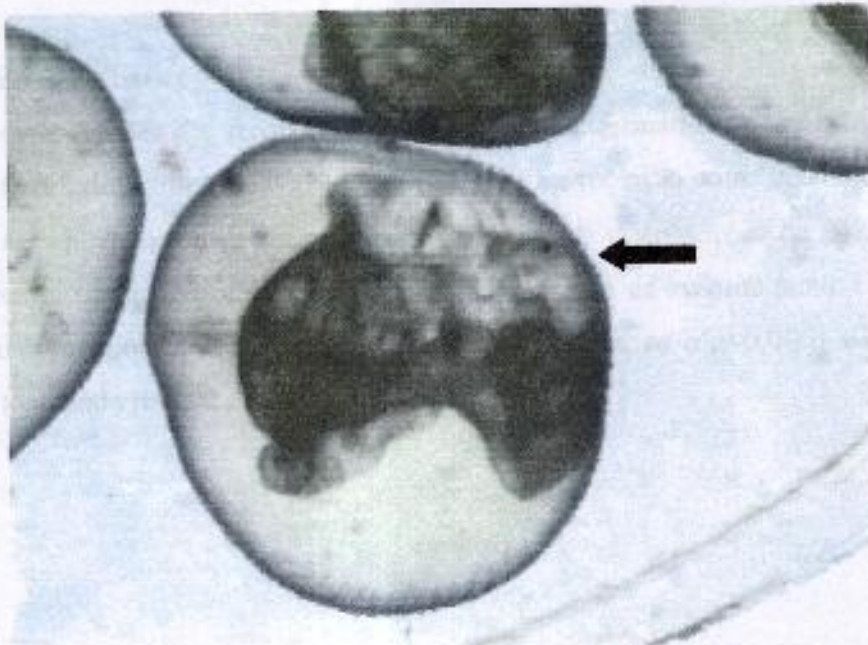


FIGURA 12 – Embrião malformado selvagem

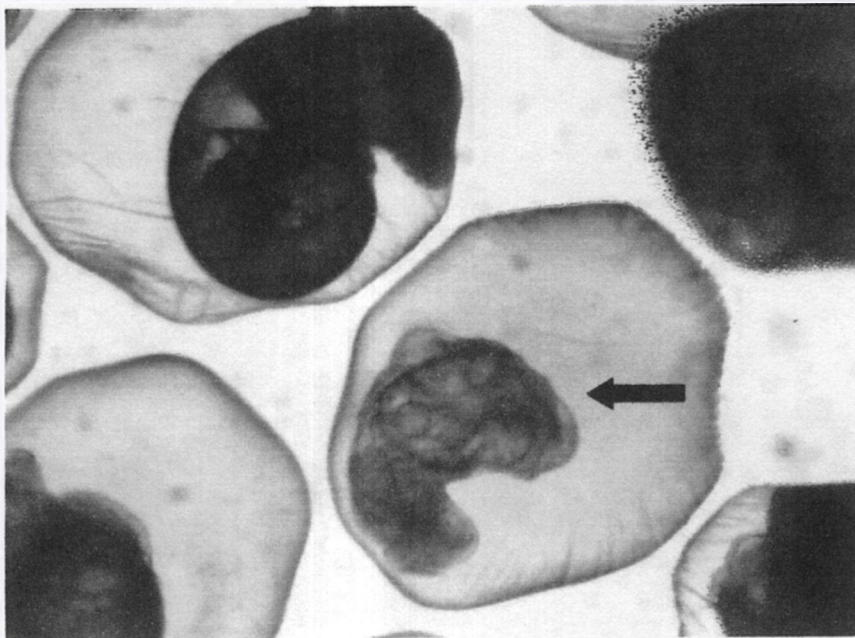


FIGURA 13 – Embrião malformado albino

Ilustrações 8;10 -13 cedidas por Nakano, E.

3.8 Análise estatística

Para as comparações das frequências de embriões malformados nas progênes dos caramujos albinos cruzados com os selvagens antes e após a exposição com ^{60}Co e entre as diferentes doses, foi utilizado o teste do χ^2 para comparação de distribuições de Poisson. O modelo de Poisson foi utilizado por ser adequado para contagens de eventos raros. O efeito sobre a taxa de malformações só foi considerado significativo quando o $p < 0,0001$ e sobre a taxa de cruzamento quando $p < 0,02$.

4 RESULTADOS

Nos grupos controle, tanto dos caramujos selvagens, como dos albinos cruzados com os selvagens antes da exposição, as freqüências de embriões inviáveis – total de embriões mortos e malformados – se mantiveram abaixo de 5%, nível estabelecido como basal para experimentos com embriões.

Na determinação da faixa de dose e do intervalo de tempo para os cruzamentos pós-irradiação, as freqüências de mortes e malformações embrionárias nas progênies dos caramujos albinos cruzados com os selvagens após a exposição foram comparadas com aquelas obtidas antes da exposição; assim, cada grupo serviu como seu próprio controle negativo.

Na TAB. 1 estão apresentados os resultados da análise das progênies dos albinos cruzados com os selvagens antes e em vários tempos após a irradiação. Na FIG.14 estão expressas as freqüências de embriões malformados das progênies dos caramujos albinos acasalados com os selvagens, em função do tempo.

A análise estatística mostrou um efeito da radiação sobre as freqüências de malformações nas progênies dos albinos cruzados com os selvagens irradiados com as duas doses. Com 2,5Gy, as freqüências de embriões selvagens heterozigotos com malformações inespecíficas só foram significativamente maiores no 1º cruzamento ($p < 0,0001$), feito 10 (5,9%) dias após a irradiação. Com 30Gy, esse efeito foi observado 10 (62%) e 20 (52,5%) dias após a irradiação ($p < 0,0001$ para os dois cruzamentos). Nos cruzamentos subsequentes, não se observou efeito sobre a taxa de malformações embrionárias.

Em relação à taxa de cruzamento foi observada uma redução de 20 até 30 dias após a irradiação com 30Gy; com 2,5Gy, esse efeito não foi observado.

TABELA 1 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens irradiados antes e em vários tempos após a exposição com ^{60}Co . Experimento para determinação da faixa de dose e do intervalo de tempo para os cruzamentos pós-exposição à radiação.

Dose (Gy)	Cruzamentos (Dias após a irradiação)	Nº de cruzamentos / Nº de pareamentos	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões selvagens (Aa)		Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)	
				Total de embriões	Malf. Inesp(%)	Exog.	Malf Ines.
0,0	Pré-irradiação	5/5	792	348	1 (0,3)	3	36
	10	5/5	1385	1335	11 (0,8)	8	34
	20	4/5	1691	1423	11 (0,8)	2	38
	25	5/5	1804	1379	14 (1,0)	1	24
	30	5/5	1622	1459	11 (0,8)	0	10
	35	4/4	1180	787	8 (1,0)	0	7
	40	4/5	1018	906	3 (0,3)	5	44
	45	3/5	967	582	5 (0,9)	0	11
	50	3/5	740	432	0 (0,0)	1	13
2,5	Pré-irradiação	5/5	625	368	0 (0,0)	2	8
	10	4/5	994	814	48 (5,9)*	7	68
	20	5/5	1730	1114	8 (0,7)	2	10
	25	3/5	1351	1199	7 (0,6)	1	13
	30	5/5	1494	1206	2 (0,2)	0	14
	35	4/5	1604	1321	11 (0,8)	0	66
	40	3/4	673	477	1 (0,2)	0	23
	45	4/4	1232	1079	1 (0,1)	0	17
	50	4/4	826	752	9 (1,2)	1	33
30	Pré-irradiação	5/5	1029	792	2 (0,6)	6	26
	10	4/4	1238	237	147 (62,0)*	5	858
	20	2/4	554	80	42 (52,5)*	5	296
	25	1/4	219	93	1 (1,1)	0	5
	30	0/4	-	-	-	-	-
	35	3/4	925	814	23 (2,8)	0	9
	40	4/4	1308	1078	14 (1,3)	0	36
	45	4/4	1276	1029	16 (1,6)	0	25
	50	3/4	618	588	5 (0,9)	0	5

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico

nº de cruzamentos = número de animais albinos com embriões selvagens na progênie

nº de pareamentos = número de animais albinos e selvagens acasalados

Obs: Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

* $p < 0,0001$

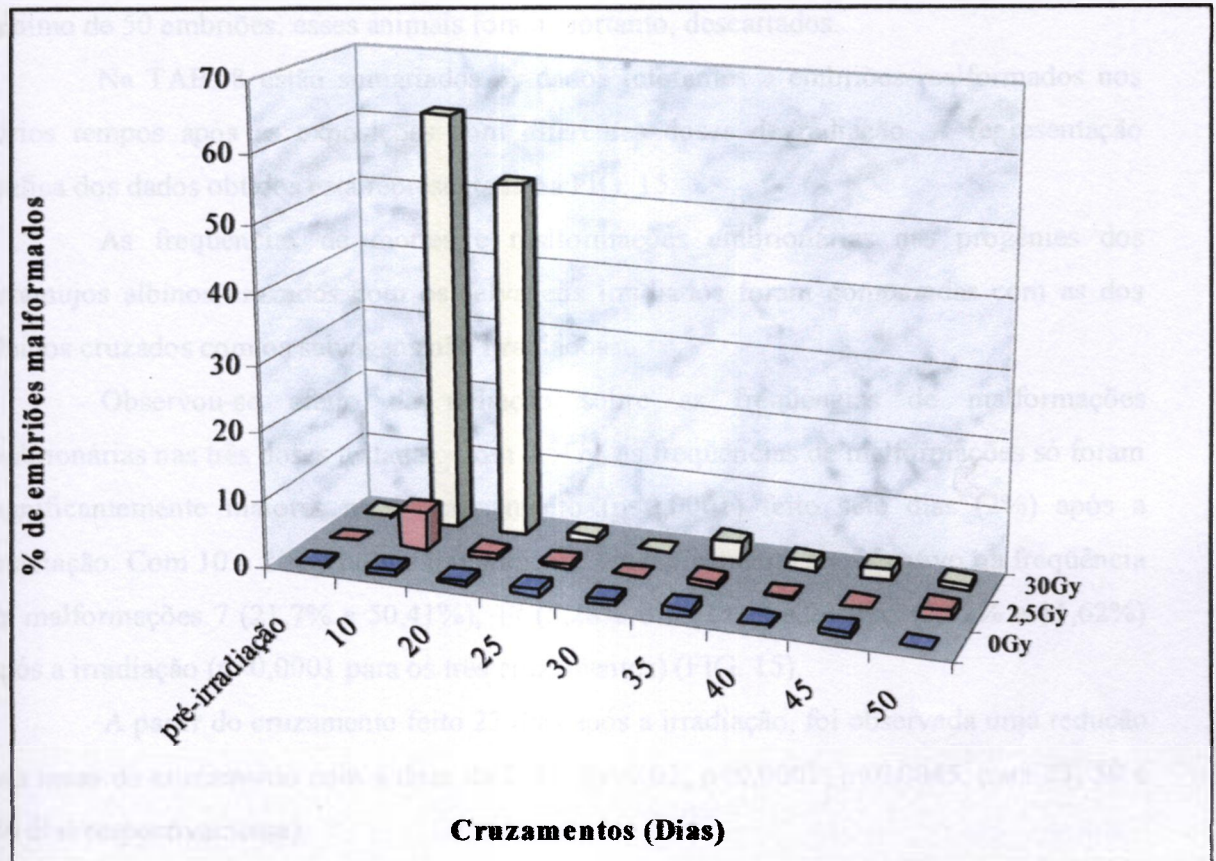


FIGURA 14 – Frequências de embriões malformados das progênes de caramujos albinos acasalados com caramujos selvagens (*B. glabrata*) em função do tempo após a irradiação com ^{60}Co . Experimento preliminar.

As TAB. 2 a 7 mostram os dados individuais da análise das progênes dos albinos cruzados com os selvagens antes e nos vários dias dos cruzamentos após a irradiação com ^{60}Co .

A freqüência de embriões selvagens nas progênes de alguns albinos não atingiu o mínimo de 50 embriões; esses animais foram, portanto, descartados.

Na TAB. 8 estão sumariados os dados referentes a embriões malformados nos vários tempos após as exposições com diferentes doses de radiação. A representação gráfica dos dados obtidos está representada na FIG. 15.

As freqüências de mortes e malformações embrionárias nas progênes dos caramujos albinos cruzados com os selvagens irradiados foram comparadas com as dos albinos cruzados com os selvagens não irradiados.

Observou-se efeito da radiação sobre as freqüências de malformações embrionárias nas três doses testadas. Com 2,5Gy, as freqüências de malformações só foram significativamente maiores no 1º cruzamento ($p < 0,0001$) feito sete dias (2%) após a irradiação. Com 10 e 20Gy houve um aumento estatisticamente significativo na freqüência de malformações 7 (21,7% e 50,41%), 17 (5,28% e 15,15%) e 23 dias (2,92% e 11,62%) após a irradiação ($p < 0,0001$ para os três cruzamentos) (FIG. 15).

A partir do cruzamento feito 23 dias após a irradiação, foi observada uma redução nas taxas de cruzamento com a dose de 20Gy ($p = 0,02$; $p < 0,0001$; $p = 0,0045$, para 23, 30 e 36 dias respectivamente).

Após o 5º cruzamento (36 dias), observaram-se que as taxas de malformações retomaram os valores controles (TAB. 8).

TABELA 2 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens antes da exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		total de embriões	Embriões selvagens (Aa)
			exog.	malf. inesp.		malf. inesp. (%)
0,0	1	130	0	0	128	1 (0,78)
	2	188	0	3	180	2 (1,11)
	3	158	0	1	157	1 (0,64)
	4	212	0	1	212	1 (0,47)
	5	148	0	4	132	0 (0,00)
	6	119	0	1	115	0 (0,00)
	7	146	0	1	140	0 (0,00)
	8	146	0	0	141	0 (0,00)
	9	153	1	4	148	0 (0,00)
	10	163	0	0	157	0 (0,00)
	11	199	0	7	192	0 (0,00)
	12	138	0	0	138	0 (0,00)
	13	104	0	0	103	0 (0,00)
2,5	14	187	0	0	185	1 (0,54)
	15	138	0	1	116	1 (0,86)
	16	167	0	0	142	1 (0,70)
	17	216	0	1	124	1 (0,81)
	18	136	0	1	130	0 (0,00)
	19	133	1	1	118	0 (0,00)
	20	130	0	3	126	0 (0,00)
	21	127	0	3	124	0 (0,00)
	22	148	0	1	147	0 (0,00)
	23	166	1	1	161	0 (0,00)
	24	188	0	1	178	0 (0,00)
	25	147	2	0	145	0 (0,00)
	26	133	0	1	132	0 (0,00)

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 2 (continuação) – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens antes da exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		total de embriões	Embriões selvagens (Aa)
			exog.	malf.inesp.		malf.inesp. (%)
10	27	160	0	1	134	1 (0,75)
	28	197	0	1	182	1 (0,55)
	29	162	1	0	161	1 (0,62)
	30	150	0	0	150	1 (0,67)
	31	143	0	2	141	0 (0,00)
	32	131	0	2	115	0 (0,00)
	33	150	0	1	149	0 (0,00)
	34	173	2	1	169	0 (0,00)
	35	181	0	0	181	0 (0,00)
	36	138	0	4	131	0 (0,00)
	37	137	1	3	132	0 (0,00)
	38	152	0	2	149	0 (0,00)
	39	207	0	2	183	0 (0,00)
20	40	255	0	2	224	2 (0,89)
	41	261	0	1	260	3 (1,15)
	42	232	0	2	229	1 (0,44)
	43	317	0	4	190	1 (0,53)
	44	136	0	1	128	0 (0,00)
	45	170	0	0	163	0 (0,00)
	46	182	1	4	153	0 (0,00)
	47	140	0	2	106	0 (0,00)
	48	153	0	0	116	0 (0,00)
	49	168	0	3	122	0 (0,00)
	50	130	0	4	102	0 (0,00)
	51	185	0	1	167	0 (0,00)
	52	166	0	0	151	0 (0,00)

Abreviações: exog. = exogástrula; malf.inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 3 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 7 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)			Embriões selvagens (Aa)	
			exog.	malf.	Inesp.	total de embriões	malf. inesp. (%)
0,0	2	263	0	1	257	5 (1,95)	
	4	135	0	0	135	0 (0,00)	
	5	287	0	0	279	0 (0,00)	
	6	365	0	1	321	2 (0,62)	
	7	226	0	0	196	0 (0,00)	
	8	198	0	0	188	1 (0,53)	
	9	368	0	1	314	2 (0,64)	
	10	398	0	0	237	2 (0,84)	
	12	231	0	2	213	0 (0,00)	
	13	340	1	0	176	0 (0,00)	
2,5	14	133	0	2	131	4 (3,05)	
	15	139	0	1	137	2 (1,46)	
	16	203	0	0	159	2 (1,26)	
	17	267	0	0	221	5 (2,26)	
	18	267	1	2	255	4 (1,57)	
	21	326	0	1	314	4 (1,27)	
	23	342	1	9	247	7 (2,83)	
	24	264	0	3	187	5 (2,67)	
	25	169	0	0	169	2 (1,18)	
	26	331	0	4	288	7 (2,43)	

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 3 (continuação) – Análise das progênies de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 7 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)	
			exog.	malf. Inesp.	total de embriões	malf. inesp. (%)
10	27	282	0	11	188	43 (22,87)
	28	169	2	15	150	33 (22,00)
	29	192	0	22	146	36 (24,66)
	30	353	1	13	238	35 (14,71)
	31	255	1	28	222	56 (25,23)
	32	247	1	14	129	18 (13,95)
	33	237	2	21	213	54 (25,35)
	34	157	1	14	133	27 (20,30)
	35	184	1	7	130	24 (18,46)
	37	57	1	3	53	12 (22,64)
39	242	1	9	135	39 (28,89)	
20	40	232	1	72	103	49 (47,57)
	41	317	9	96	138	69 (50,00)
	42	334	10	133	150	71 (47,33)
	43	187	8	56	92	48 (52,17)
	44	324	17	123	177	87 (49,15)
	45	379	1	26	77	31 (40,26)
	46	435	3	188	207	132 (63,77)
	47	237	1	84	142	71 (50,00)
	48	305	2	108	152	69 (45,39)
	49	374	1	89	273	130 (47,62)
	50	390	7	87	180	89 (49,44)
	51	300	3	104	134	74 (55,22)

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 4 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 17 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)		
			exog.	malf. inesp.	total de embriões	malf. inesp. (%)	
0,0	1	215	0	1	159	0 (0,00)	
	2	248	0	6	190	0 (0,00)	
	3	302	2	3	146	0 (0,00)	
	4	382	0	1	372	2 (0,54)	
	5	288	1	0	287	0 (0,00)	
	6	215	0	0	206	0 (0,00)	
	7	281	0	0	176	0 (0,00)	
	8	401	0	1	214	0 (0,00)	
	9	277	1	0	220	0 (0,00)	
	12	320	3	1	306	0 (0,00)	
	2,5	14	348	0	3	315	3 (0,95)
		15	281	3	6	180	0 (0,00)
17		224	0	0	189	0 (0,00)	
18		391	0	0	334	1 (0,30)	
19		205	2	0	180	0 (0,00)	
20		280	0	1	234	1 (0,43)	
21		198	1	2	148	1(0,68)	
23		253	0	3	230	1 (0,43)	
25		277	1	1	198	1(0,51)	
26		203	0	1	199	0 (0,00)	

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 4 (continuação) – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 17 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)	
			exog.	malf. inesp.	total de embriões	malf. inesp. (%)
10	27	316	0	2	146	5 (3,42)
	28	385	1	41	310	32 (10,32)
	29	316	4	10	252	10 (3,97)
	30	489	2	47	213	17 (7,98)
	32	257	1	9	237	10 (4,22)
	33	413	1	11	351	12 (3,42)
	34	227	2	8	177	4 (2,26)
	35	210	0	10	186	13 (6,99)
	37	321	3	2	117	1 (0,85)
	39	381	1	20	187	11 (5,88)
20	40	215	1	61	123	33 (26,83)
	42	262	2	55	169	21 (12,43)
	43	598	3	169	77	32 (41,56)
	44	191	1	4	95	6 (6,32)
	45	363	1	84	226	19 (8,41)
	46	314	0	99	174	47 (27,01)
	47	369	2	148	174	40 (22,99)
	48	272	2	30	190	11 (5,79)
	49	286	3	20	160	6 (3,75)
	50	497	1	92	123	18 (14,63)
	51	351	0	82	242	36 (14,88)
	52	260	4	45	121	15 (12,40)

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 5 – Análise das progênies de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 23 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)	
			exog.	malf. indet.	total de embriões	malf. inesp. (%)
0,0	1	641	2	0	224	0 (0,00)
	2	763	1	18	71	0 (0,00)
	3	455	0	4	315	1 (0,32)
	4	299	1	1	225	0 (0,00)
	5	351	1	3	194	2 (0,93)
	7	435	0	4	321	3 (0,93)
	8	469	1	3	370	3 (0,81)
	9	793	1	0	103	3 (2,91)
	10	583	2	10	204	1 (0,49)
	11	435	0	1	240	0 (0,00)
	2,5	14	457	2	0	146
15		139	0	0	53	2 (3,77)
17		424	0	1	235	1 (0,43)
18		322	0	0	126	0 (0,00)
19		96	1	1	64	0 (0,00)
20		480	1	2	147	2 (1,36)
21		388	1	4	229	4 (1,75)
23		472	2	2	336	1 (0,30)
24		424	0	0	226	11 (4,87)
25		353	2	0	179	0 (0,00)
26	430	1	0	275	0 (0,00)	

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 5 (continuação) – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 23 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co .
Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)	
			exog.	malf. indet.	total de embriões	malf. inesp. (%)
10	27	76	2	1	65	3 (4,62)
	28	378	1	7	105	3 (2,86)
	29	483	0	5	257	4 (1,56)
	30	189	3	8	112	4 (3,57)
	31	403	0	6	185	17 (0,76)
	34	532	2	11	219	3 (1,04)
	37	182	0	1	132	1 (0,76)
	39	752	2	9	192	2 (1,04)
20	40	459	4	45	191	34 (17,8)
	42	568	4	39	125	13 (10,4)
	44	691	1	10	178	7 (3,93)
	45	1494	4	146	86	4 (4,65)
	47	759	5	100	161	33 (20,50)
	52	304	0	4	68	3 (4,41)

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 6 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 30 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)		
			exog.	malf. indet.	total de embriões	malf. inesp. (%)	
0,0	1	224	0	3	126	0 (0,00)	
	2	303	2	2	132	1(0,76)	
	3	290	0	0	161	1 (0,62)	
	4	200	0	5	152	0 (0,00)	
	5	248	0	2	203	0 (0,00)	
	6	365	0	3	267	1 (0,37)	
	7	94	0	0	91	1(1,10)	
	8	374	0	1	179	0 (0,00)	
	9	261	0	0	247	0 (0,00)	
	10	292	0	2	186	1 (0,54)	
	11	250	0	3	232	0 (0,00)	
	12	604	2	5	108	0 (0,00)	
	13	379	3	50	67	0 (0,00)	
2,5	15	297	1	2	272	1 (0,37)	
	16	504	1	9	476	3 (0,63)	
	17	349	0	2	229	0 (0,00)	
	18	340	1	1	190	0 (0,00)	
	19	224	0	3	152	0 (0,00)	
	20	651	2	1	34	0 (0,00)	
	21	381	0	0	225	1(0,44)	
	23	380	3	8	167	0 (0,00)	
	24	506	3	1	166	0 (0,00)	
	25	354	0	2	215	0 (0,00)	
	26	433	1	9	306	0 (0,00)	
	10	28	460	1	7	172	0 (0,00)
		29	367	1	2	178	0 (0,00)
30		247	0	2	132	1 (0,76)	
32		559	1	15	38	0 (0,00)	
34		378	1	3	120	0 (0,00)	
35		270	0	6	85	0 (0,00)	
37		444	0	3	17	0 (0,00)	
39		396	1	2	135	0 (0,00)	

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 7 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens 36 dias após a exposição à radiação gama de ^{60}Co . Dados individuais

Dose (Gy)	Número do animal	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)		Embriões selvagens (Aa)		
			exog.	malf. inesp.	total de embriões	malf. inesp. (%)	
0,0	1	319	1	0	157	0 (0,00)	
	2	533	2	5	166	0 (0,00)	
	4	348	1	1	202	0 (0,00)	
	5	269	0	0	167	0 (0,00)	
	6	367	0	3	161	0 (0,00)	
	7	374	0	8	282	1 (0,35)	
	8	382	1	2	194	1 (0,52)	
	10	675	1	82	94	1 (1,06)	
	11	264	1	1	237	1 (0,42)	
	12	311	0	11	119	0 (0,00)	
	2,5	14	557	0	6	74	0 (0,00)
		15	241	0	5	225	0 (0,00)
17		278	1	3	215	1 (0,47)	
18		337	0	1	118	0 (0,00)	
19		408	0	5	191	0 (0,00)	
20		301	0	3	243	1 (0,41)	
21		322	1	4	244	1 (0,41)	
23		928	1	9	80	0 (0,00)	
24		331	0	1	208	0 (0,00)	
25		722	2	25	110	0 (0,00)	
26		390	1	8	130	0 (0,00)	
10	27	266	0	2	168	0 (0,00)	
	28	150	0	1	112	0 (0,00)	
	29	396	0	2	309	3 (0,97)	
	34	342	0	2	227	0 (0,00)	
	37	268	0	7	219	0 (0,00)	
	39	682	1	44	267	0 (0,00)	
20	44	202	0	1	134	0 (0,00)	
	48	347	1	10	313	0 (0,00)	
	50	305	0	5	131	1 (0,76)	

Abreviações: exog. = exogástrula; malf. inesp. = malformado inespecífico.

Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

Observação: o número do animal se refere ao selvagem com o qual o albino foi cruzado

TABELA 8 – Análise das progênes de caramujos (*B. glabrata*) albinos cruzados com selvagens antes e em vários tempos após a exposição à radiação gama de ^{60}Co .

Cruzamentos (Dias após a irradiação)	Dose (Gy)	Nº de cruzamentos / Nº de pareamentos	Nº total de embriões (selvagens e albinos)	Embriões selvagens (Aa)		Embriões com malformações indeterminadas (Aa ou aa)	
				Total de embriões	Malf. Inesp(%)	Exog.	Malf Inesp.
Pré-irradiação	0	13/13	2008	1943	5 (0,26)	1	22
	2,5	13/13	2021	1828	4 (0,22)	4	14
	10	13/13	2090	1977	4 (0,20)	4	19
	20	13/13	2502	2111	7 (0,33)	1	24
7	0	10/11	2824	2316	12 (0,52)	1	5
	2,5	11/11	2453	2108	42 (1,99)**	2	22
	10	11/11	2385	1737	377 (21,70)**	11	157
	20	12/13	3827	1825	920 (50,41)**	63	1166
17	0	10/11	2938	2276	2 (0,09)	7	13
	2,5	11/12	2670	2207	8 (0,36)	7	17
	10	10/10	3318	2176	115 (5,28)**	15	160
	20	12/12	4052	1874	284 (15,15)**	20	889
23	0	10/10	5241	2267	13 (0,57)	9	44
	2,5	12/12	3998	2016	21 (1,04)	10	10
	10	11/11	3009	1267	37 (2,92)**	10	48
	20	7/12*	4300	809	94 (11,62)**	18	344
30	0	13/13	3898	2151	5 (0,23)	7	76
	2,5	11/12	4434	2432	5 (0,21)	12	38
	10	8/9	3129	877	1 (0,11)	5	40
	20	0/11**	-	-	-	-	-
36	0	12/13	3847	1779	4 (0,22)	7	113
	2,5	12/12	4833	1838	3 (0,16)	6	70
	10	8/11	2109	1302	3 (0,23)	1	58
	20	4/12*	856	578	1 (0,12)	1	16

Abreviações: exog. = exogástrulas; malf = malformações e malf. inesp. = malformados inespecíficos
 nº de cruzamentos = número de animais albinos com embriões selvagens na progênie
 nº de pareamentos = número de animais albinos e selvagens acasalados

Obs: Malformações indeterminadas – aquelas em que não foi possível a identificação dos olhos.

* $p < 0,02$; ** $p < 0,0001$

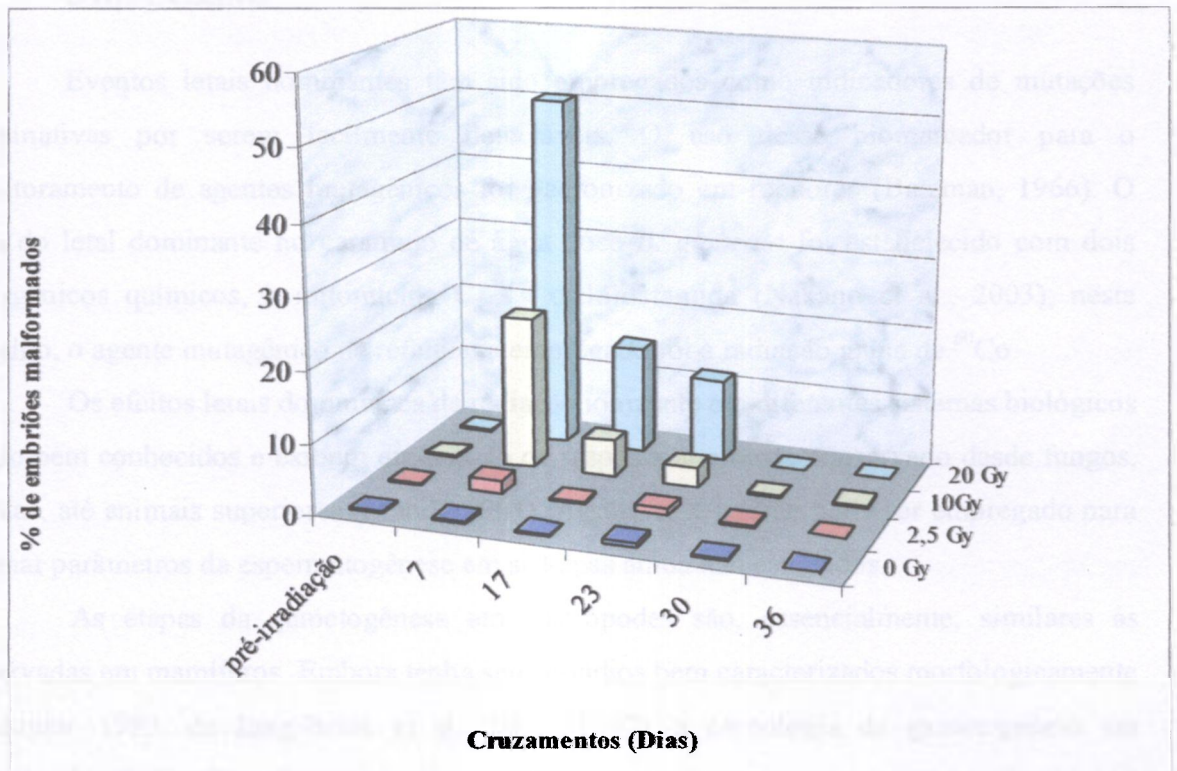


FIGURA 15 – Frequências de embriões malformados das progênes de caramujos albinos acasalados com caramujos selvagens (*B. glabrata*) em função do tempo após a irradiação com ^{60}Co .

5 DISCUSSÃO

Eventos letais dominantes têm sido empregados como indicadores de mutações germinativas por serem facilmente detectáveis. O uso desse biomarcador para o monitoramento de agentes mutagênicos foi padronizado em roedores (Bateman, 1966). O teste do letal dominante no caramujo de água doce *B. glabrata* foi estabelecido com dois mutagênicos químicos, a mitomicina C e a ciclofosfamida (Nakano et al., 2003); neste trabalho, o agente mutagênico de referência empregado foi a radiação gama de ^{60}Co .

Os efeitos letais dominantes da radiação ionizante em diferentes sistemas biológicos já são bem conhecidos e exibem um padrão de resposta altamente conservado desde fungos, plantas, até animais superiores (Mandl, 1964). Assim, esse padrão pode ser empregado para estimar parâmetros da espermatogênese em sistemas ainda não estudados.

As etapas da gametogênese em gastrópodes são, essencialmente, similares às observadas em mamíferos. Embora tenha seus estádios bem caracterizados morfológicamente (Dohmen, 1983; de Jong-Brink et al., 1976; 1977), a cronologia da gametogênese em gastrópodes ainda não está estabelecida.

As informações obtidas do teste do letal dominante são limitadas pela ausência de dados sobre a cronologia da espermatogênese. No teste em roedores, são realizados cruzamentos em diferentes tempos após a exposição para a detecção dos efeitos mutagênicos nas células nos diferentes estádios da espermatogênese. No estabelecimento do teste em *Biomphalaria* foram feitos somente dois cruzamentos após a exposição à ciclofosfamida e um cruzamento após a exposição à mitomicina C com o único objetivo de confirmar a natureza genética das malformações induzidas (Nakano et al., 2003). Não foi possível realizar cruzamentos para determinação dos estádios afetados pela falta de dados sobre a cronologia da espermatogênese. Os efeitos letais dominantes foram estimados a partir das curvas tempo-resposta da ovogênese obtidas da análise da progênie dos caramujos selvagens expostos. Assumiu-se que os efeitos na ovogênese são similares aos que ocorrem na espermatogênese, já que as fases pré-meióticas da gametogênese feminina estão presentes no caramujo adulto (Dohmen, 1983).

Se considerarmos que, em um caramujo adulto, óvulos e espermatozóides são produzidos de maneira contínua e simultânea a partir de um único grupo de células indiferenciadas (Dohmen, 1983), as análises das progênes dos caramujos selvagens e as dos albinos servem de indicadores de efeitos mutagênicos nas duas linhagens germinativas.

Na progênie dos albinos só foram computados os embriões heterozigotos, portanto, os aumentos nas freqüências de malformações nessa progênie indicaram a presença de mutações nos espermatozóides dos caramujos selvagens expostos.

Com relação à progênie dos caramujos selvagens expostos, considerou-se que os aumentos nas freqüências totais de malformações resultam, predominantemente, da indução de mutações na linhagem germinativa feminina. Sabe-se que, apesar de ser capaz de se reproduzir por autofecundação, a *Biomphalaria* tem preferência pela fecundação cruzada (Paraense, 1955), e que, em um pareamento entre dois caramujos, ambos agem como macho e fêmea, sem preferência por nenhum dos dois papéis (Vernon e Taylor, 1996). Assim, considerando que as taxas de fecundação cruzada nos selvagens tenham sido da mesma ordem que as altas taxas observadas nas progênes dos albinos, assumiu-se – mesmo não sendo possível a identificação dos heterozigotos na progênie dos selvagens – que foi produzida uma minoria de embriões por autofecundação, ou seja, a partir do óvulo e do espermatozóide do animal exposto.

Neste trabalho, foram realizados, no experimento preliminar, cruzamentos 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias após a irradiação. Com base na duração de duas semanas da espermiogênese em *B. glabrata* (Vianey-Liaud, 1972), o primeiro cruzamento foi estabelecido em 10 dias após a irradiação, para detectar efeitos sobre espermatídes e espermatozóides; a partir de 20 dias, foram feitos cruzamentos com intervalos de 5 dias. Estudos realizados em *B. tenagophila* mostraram que a fertilidade é recuperada cerca de 8 semanas após exposição à radiação gama de ^{60}Co , assim, foram feitos cruzamentos até 50 dias para abranger um ciclo espermatogênico completo (Tallarico et al., 1998). Devido à abrangência dos cruzamentos, não foi considerada necessária a análise da progênie dos caramujos selvagens expostos, empregada no trabalho anterior (Nakano et al., 2003) para estimar os efeitos na espermatogênese.

Foram escolhidas duas doses para o experimento preliminar, procurando incluir uma dose baixa, próxima da mínima efetiva para a indução de mutações letais dominantes e

uma dose já tóxica. A dose de 2,5Gy foi escolhida como o limite inferior por ser a dose mínima efetiva para a indução de efeitos sobre o potencial reprodutivo em caramujos do gênero *Biomphalaria* (Melo, 1994). Como limite superior, foi estabelecida a dose de 30Gy, aproximadamente metade da DL_{50} (Michelson e Du Bois, 1981; Carvalho et al., 1999).

No primeiro cruzamento, 10 dias após a irradiação, as frequências de malformações inespecíficas nos embriões heterozigotos apresentaram um aumento significativo com as duas doses. Sabendo-se que a espermiogênese em *B. glabrata* leva cerca de 2 semanas (Vianey-Liaud, 1972), podemos afirmar que esse cruzamento detectou, provavelmente, o efeito letal dominante em espermátides e espermatozóides. No cruzamento feito 20 dias após a irradiação, o efeito sobre as taxas de malformações foi detectado somente com a dose de 30Gy. A partir desse resultado, não foi possível definir o estágio afetado só com base na duração da espermiogênese. Nos cruzamentos subseqüentes, não se observou efeito sobre a taxa de malformações embrionárias.

Nos cruzamentos feitos de 20 até 30 dias após a irradiação, foi observada uma redução nas taxas de cruzamento após a irradiação com 30Gy; com 2,5Gy, esse efeito não foi observado.

Sabe-se que, em geral, células nos estádios pré-meióticos são menos sensíveis à indução de mutações letais dominantes que as células nos estádios pós-meióticos. Esse efeito é atribuído a dois fatores: i) as células gametogênicas jovens –mitoticamente ativas – têm maior capacidade de reparo do dano ao DNA em doses subletais e ii) ocorre eliminação seletiva das células danificadas – esse é o chamado efeito citotóxico da radiação (Mandl, 1964).

No nosso sistema: i) a indução de mutações letais nas células germinativas leva a um aumento na taxa de malformações e, ii) o efeito citotóxico se manifesta pela redução nas taxas de cruzamento, isto é, a produção de espermatozóides selvagens é reduzida pelo efeito seletivo contra as células afetadas.

Desses resultados, portanto, pode-se inferir que, nos cruzamentos feitos de 20 até 30 dias após a irradiação, foi detectado o efeito citotóxico da radiação sobre espermatogônias de *B. glabrata*.

A proporção de gônias que sobrevive ao efeito citotóxico da radiação para originar gametas diferenciados pode carregar uma variedade de mutações, incluindo as letais

dominantes (Mandl, 1964; Ehling, 1971). Assim, com 30Gy, uma dose alta, era esperado que se observasse tanto o efeito citotóxico como o efeito letal dominante da radiação. A ausência de efeitos da dose de 2,5Gy sobre as espermatogônias pode ser atribuída a uma combinação dos processos de reparo de danos ao DNA com a eliminação seletiva das células danificadas (Mandl, 1964). É sabido, também, que espermátides e espermatozóides são deficientes no reparo de danos subletais ao DNA induzidos pela radiação e resistentes ao efeito citotóxico (Mandl, 1964; Ehling, 1971). Isso explica o efeito letal dominante com a dose sub-letal de 2,5Gy no cruzamento feito 10 dias após a exposição e a ausência de efeito citotóxico com as duas doses nesse primeiro cruzamento.

Após 35 dias, tanto as taxas de cruzamento como as de malformações retomaram os valores controles, o que sugere que esses gametas se originaram de um novo "pool" de células espermatogênicas, não afetadas pela radiação.

De acordo com Bretschneider and Raven (1951), o molusco hermafrodita *Lymnaea stagnalis*, pelo menos 31 dias são necessários entre o fim do estágio de mitose da oogonia e a oviposição. Isto foi corroborado pelos dados de Joosse et al. (1968), que expôs *Lymnaea* à radiação gama. Esse tratamento induziu danos em células em todos estádios da gametogênese e causou esterilidade temporária – o ácido vazio foi repovoado com novos ovos e espermatozóides em cerca de 30 dias.

A partir dos resultados do experimento preliminar, a duração total da espermatogênese em *B. glabrata* foi estimada em cerca de 35 dias com as fases distribuídas do seguinte modo:

- dia 1 a 15 – espermatogônia
- dia 16 a 20 – espermátócito
- dia 21 a 35 – espermátide/espermatozóide.

Com as informações obtidas no experimento preliminar, foram escolhidas as três doses para a avaliação dos efeitos letais dominantes da radiação gama de ^{60}Co . A dose de 2,5Gy foi mantida como o nível inferior, uma vez que não induziu aumento acentuado nas frequências de malformações inespecíficas nos embriões heterozigotos. Os efeitos da dose de 30Gy foram detectados não só como aumentos drásticos nas frequências de malformações inespecíficas nos embriões heterozigotos, mas também nas malformações inespecíficas indeterminadas e como redução nas taxas de cruzamento. Assim, o nível superior foi

reduzido para 20Gy; uma dose intermediária de 10Gy serviu para se avaliar a existência de efeito dose-resposta.

No molusco *Physa acuta* a dose de 20Gy reduziu a fertilidade e a fecundidade, enquanto 1.000Gy eliminou sua capacidade reprodutiva. Em peixes doses agudas maiores que 10Gy causam esterilidade e mudanças irreversíveis nas gônadas (NCRP, 1991).

Para o estudo do efeito letal dominante da radiação, foram feitos cinco cruzamentos, que abrangeram um período de 36 dias. O primeiro cruzamento, 7 dias após a irradiação, foi feito com o objetivo de detectar o efeito sobre espermatídes e espermatozóides; o segundo, após 17 dias, sobre espermátócitos; o terceiro e o quarto cruzamentos, após 23 e 30 dias, para detectar, respectivamente, os efeitos sobre as espermatogônias secundárias e espermatogônias primárias em divisão mitótica. O último cruzamento, feito 36 dias após a irradiação, teve como objetivo confirmar a duração total da espermatogênese.

No cruzamento feito 7 dias após a irradiação, houve aumento na frequência de malformações com as três doses testadas; nos cruzamentos feitos após 17 e 23 dias, o efeito foi detectado com as duas doses mais altas. Nesses três cruzamentos, o aumento nas taxas de malformações foi diretamente proporcional à dose de radiação. O efeito mais pronunciado foi detectado no primeiro cruzamento, sofrendo uma redução nos seguintes até o cruzamento feito após 30 dias (FIG. 15). A partir daí, o efeito sobre a taxa de malformações não foi mais detectado. Foi observada uma redução nas taxas de cruzamento com a dose mais alta a partir de 23 dias após a irradiação (FIG. 16).

As espermatídes mais jovens parecem ser mais sensíveis ao efeito letal dominante (Mandl, 1964). No nosso trabalho, isso pode ser observado comparando as taxas de malformações nos animais irradiados com 2,5Gy. O efeito detectado na progênie dos albinos cruzados com os selvagens irradiados após 10 dias foi maior que o efeito detectado após 7 dias.

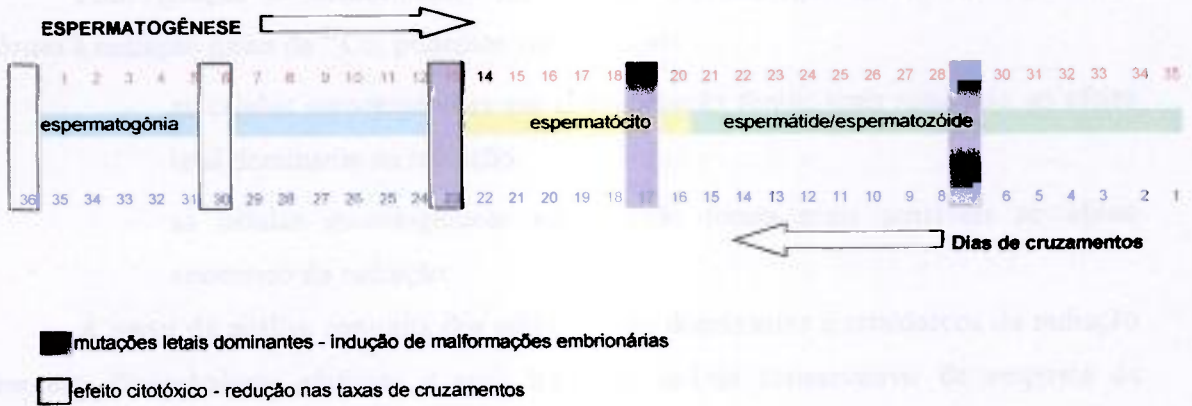


FIGURA 16 – Cronologia dos estádios da espermatogênese e dos dias de cruzamentos em *Biomphalaria glabrata*.

Com base na cronologia estimada da espermatogênese, foi possível concluir que as células espermatogênicas no estágio de espermatídes e espermatozoides foram as que mais sofreram o efeito letal dominante da radiação, seguidas dos espermatócitos e espermatogônias secundárias. Nas espermatogônias primárias, foi detectado o efeito citotóxico mais acentuado da radiação. Esta resposta da espermatogênese em *B. glabrata* à radiação ionizante seguiu, assim, o padrão observado em outros sistemas (Mandl, 1964).

6 CONCLUSÕES

Com relação à sensibilidade das células espermatogênicas de *Biomphalaria glabrata* à radiação gama de ^{60}Co , pudemos concluir que:

- as células gametogênicas em diferenciação foram mais sensíveis ao efeito letal dominante da radiação;
- as células gametogênicas em divisão foram mais sensíveis ao efeito citotóxico da radiação.

A partir da análise conjunta dos efeitos letais dominantes e citotóxicos da radiação gama em *Biomphalaria glabrata* e com base no padrão conservativo de resposta da espermatogênese, foi possível estimar a cronologia da espermatogênese em *B. glabrata*. A duração total da espermatogênese deve ser 36 dias, com as fases assim distribuídas: 1 a 13 dias – espermatogônias, 14 a 20 dias – espermatócitos e 21 a 36 dias – espermátides e espermatozóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMES, B. N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E.; Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, v. 31, p. 347-364, 1975.
2. ANDRADE, R. M.; FREITAS, J. R.; Observações ecológicas sobre o *Australorbis glabratus* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. I. Densidade e vitalidade dos caramujos (Pulmonata, Planorbidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 21, n. 10, p. 419-433, 1961.
3. ASHBY, J.; WATERS, M. D.; PRESTON, J.; ADLER, I-D; DOUGLAS, G. R.; FIELDER, R.; SHELBY, M. D.; ANDERSON, D.; SOFUNI, T.; GOPALAN, H. N. B.; BECKING, G.; SONICH-MULLIN, C.; IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens. *Mutation Res.*, v.352, p. 153-157, 1996.
4. BARNES, R. D.; *Zoologia dos invertebrados*. 4ª Edição, Livraria Rocca, São Paulo, 1990.
5. BARNES, R. S. K.; CALOW, P.; OLIVE J. W.; *Os invertebrados: uma nova síntese*. Ed Atheneu, São Paulo, p. 136-155, 1995.
6. BATEMAN, A. J.; Testing chemicals for mutagenicity in a mammal. *Nature*, v. 5032, p. 205-206, 1966.
7. BATEMAN, A. J.; EPSTEIN, S. S.; Dominant lethal mutations in mammals. In: A HOLLAENDER (ed). *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their detection*, v. 2, p. 541-568, Plenum, New York, 1971.

8. BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HERBERT, P. D. N.; CHIKNI, L.; ATHWAL, R.; Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Res.*, v. 463, p. 33-51, 2000.
9. BRENNEKE H.; Strahlungschädigung von Mäuse- und Rattensperma, beobachtet an der Frühentwicklung der Eier. *Strahlentherapie*, v.60, p.214-238, 1937.
10. BRETSCHEIDER, L. H.; RAVEN, C. P.; Structural and topochemical changes in the egg cells of *Limnaea stagnalis* L. during oogenesis. *Arch. Neerl. Zool.*, v.10; p.1-31, 1951
11. BURGEOT, T.; HIS, E.; GALGANI, F.; The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Res.*, v.342, p. 125-140, 1995.
12. BURGER, J. Methods for and approaches to evaluating susceptibility of ecological systems to hazardous chemicals. *Environ. Health Perspect.*, v.105, suppl. 4, p.843-848, 1997.
13. CAMEY, T.; VERDONK, N. H.; The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Neth. J. Zool.*, v. 20, n.1, p.93-121, 1970.
14. CARVALHO, E. B. da C.; MELO, A. M. M. A.; MOTTA, M. A.; Gamma ^{60}Co DL50/30 of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 41, n.6, p. 371-373, 1999.
15. CARVALHO, F. P.; Comparative uptake from sea water and tissue distribution of ^{60}Co in marine mollusks. *Health Physics*, v. 53, n. 1, p. 73-81, 1987.

16. CLAXTON, L. D; HOUK V. S; HUGLES, T. J.; Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Res.*, v. 410, p. 237-243, 1998.
17. COONEY, J. D.; *Freshwater tests*. In: RAND, G. M. Ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Washington, D. C., Taylor & Francis, p. 71-102, 1995.
18. de JONG-BRINK, M.; BOER, H. H.; HOMMES, T.G.; KODDE, A. Spermatogenesis and the role of Sertoli cells in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tissue Res.*, v.181, p.37-58, 1977.
19. de JONG-BRINK, M.; de WITT, A.; KRAAL, G.; BOER, H. H. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tissue Res.*, v.171, p.195-219, 1976.
20. DEPLEDGE, M. H.; The ecological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation, Res.*, v.39, p.109-122, 1998.
21. DIETER, M. P.; Identification and quantification of pollutants that have the potential to effect evolutionary processes. *Environ. Health Perspect.*, v. 101, p. 278, 1993.
22. DOHMEN, M. R.; Gametogenesis. In: Tompa, A.S.; Verdonk, N. H./ Van der Biggelaar, J. A. M. eds. *The Mollusca*. London, Academic Press Inc., v.3, p.1-47, 1983.
23. DOUST, J.L.; SCHMIDT, M.; DOUST, L.L.; Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol. Rev.*, v.69, p. 147-186, 1994.
24. EGAMI, N.; HYODO-TAGUCHI, Y.; Effects of X-irradiation on the oviposition of the teleost, *Oryzias latipes*. *Ann. Zool. Jpn.*, v.38, p.171-181, 1965.

25. EGAMI, N.; SHIMADA, A.; HAMA-FURUKAWA, A. Dominant lethal mutation rate after γ -irradiation of the fish *Oryzias latipes*. *Mutation Res.*, v. 107, p. 265-277, 1983.
26. EHLING, U. H.; Compararison of radiation- and chemically-induced dominant mutations in male mice. *Mutation Res.*, v. 11, p. 35-44, 1971.
27. FRANSTSEVICH, L. I.; PAN'KOV, I. V.; ERMAKOV, A. A.; KORNYUSHIN, A. V.; ZAKHARCHUK, T. N.; Molluscs as indicator of Environmental Pollution by Radionuclides. *Russ. J. Ecol.*, v. 26, n. 1, p. 47-52, 1995.
28. GEILENKIRCHEN, W.L. M.; Cell division and morphogenesis of *Limnaea* eggs after treatment with heat pulses at sucessive stages in early division cycles. *J. Embriol. Exp. Morphol.*, v. 16, n.2, p. 321-337, 1966.
29. HOUK, V. S.; The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Res.*, v. 277, p. 91-138, 1992.
30. JOOSE, J.; BOER, M. H.; CORNELISSE, C. J.; Gametogenesis and oviposition in *Limnaea stagnalis* as influenced by γ -irradiation and hunger. *Symp. Zool. Soc. London*, v.22, p.213-235, 1968.
31. KAPLAN, W. D.; LYON, M. F.; Failure of mercaptoethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation. II. Experiments with mice. *Science*, v. 118, p. 777-778, 1953.
32. KAWANO, T.; CHAVES, W. R.; SIMÕES, L. C. G.; Effects of caffeine on embryonic development of *Biomphalaria glabrata*. *Ciência e Cultura*, v. 31, n. 11, p. 1266-1273, 1979.

33. KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L.; Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia*, v. 34, n. 1-2, p. 25-32, 1992.
34. KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G.; Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Bras. Biol.*, v. 46, n. 3, p. 555-562, 1986.
35. KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G.; MARQUES, J.; *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): efeitos morfogenéticos do sulfato de nicotina. *Rev. Bras. Biol.*, v. 53, n. 4, p. 539-547, 1992.
36. KONNO, K.; EGAMI, N.; Notes on effects of X-irradiation on the fertility of the male of *Oryzias latipes* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Ann. Zool. Jpn.*, v.39, p.63-70, 1966.
37. LEGATOR, M. S.; HARPER, B.; Mutagenicity screening *in vitro* testing – the end of an era; animal and human studies – the direction for the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.534, p. 833-844, 1988.
38. LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C.; Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Res.*, v. 399, p. 3-15, 1998.
39. MANDL, A. M.; The radiosensitivity of germ cells. *Biol. Rev.*, v. 391, p. 127-134, 1964.
40. MELO, A. M. M. A.; *Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co, sobre a fecundidade, fertilidade, crescimento e sobrevivência de Biomphalaria straminea (Dunker, 1848)*. 1994. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

41. MELO, A. M. M. A.; *Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co sobre larvas de Biomphalaria glabrata (Say, 1818)*. 1998. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo, São Paulo.
42. MICHELSON, E. H.; DU BOIS, L.; Resistance to Schistosome infection in *Biomphalaria glabrata* induced by gamma radiation. *J. Invest. Path.*, v. 38, n. 1, p. 39-44, 1981.
43. MORALES-RAMÍREZ, P.; VALLARINO-KELLY, T.; ANGUIANO-OROZCO, G.; RODRÍGUEZ-REYES, R.; Pharmacokinetic parameters of genotoxic activity inderred from the comparison of the kinetics of MN-PCE induced by chemical agents and ionizing radiation. *Mutation Res.*, v. 391, p. 127-134, 1997.
44. MULLER, H. J.; Artificial transmutation of gene. *Science*, v. 66, p. 84-87, 1927.
45. MÜNZINGER, A.; *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. *Technol. Lett.*, v. 8, p. 141-148, 1987.
46. NACCI, D.; NELSON, S.; NELSON, W.; JACKIM, E.; Application of DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Mar. Environ. Res.*, v. 33, p. 83-100, 1992.
47. NAKANO, E.; *Estabelecimento do Teste do Letal Dominante em Biomphalaria glabrata (Say, 1818)*. 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
48. NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; PEREIRA, C. A. de B.; KAWANO, T.; Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Res.*, v.536, p. 145-154, 2003.

49. NATIONAL COUNCIL ON RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS; *Effects of ionizing radiation on aquatic organisms*. n. 109, Bethesda, MD, U. S., 1991.
50. NEWCOMBE, H.B.; MCGREGOR, J.F. Major congenital malformations from irradiations of sperm and eggs. *Mutation Res.*, v. 4, p. 663-673, 1967.
51. OKAZAKI, K.; *Efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre o desenvolvimento embrionário de Biomphalaria glabrata (Say, 1818)*. 1988. Tese (Doutorado) – Instituto de biociências da Universidade de São Paulo.
52. OKAZAKI, K.; KAWANO, T.; Cytogenetic effects of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. *Caryologia*, v. 44, n. 2, p. 121-136, 1991.
53. OKAZAKI, K.; ANDRADE JR., H. F.; KAWANO, T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Braz. J. Méd. Biol. Res.*, v. 29, n. 8, 1996.
54. PARAENSE, W. L.; Auto-fecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 53, n. 2, 3, 4, p. 277-284, 1955.
55. PIMENTEL, D.; WHITE, P. C.; Biological environmental and habits of *Australorbis glabratus*. *Ecology*, v. 40, n. 4, p. 540-550, 1959.
56. RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. La R.; MONTELEONE-NETO, R.; *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, 1991.
57. RAMEL, C.; Polygenic effects and genetic affecting quantitative traits. ICPENMC Publication N°8. *Mutation Res.*, v. 114, p. 107-116, 1983.

58. RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.; *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Methods and Applications*. Hemischer Publishing Corporation. Washington, USA, 1985.
59. RÉ, L.; KAWANO, T.; Effects of *Laurus nobilis* (Lauraceae) on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 82, suppl. IV, p. 315-320, 1987.
60. RICCARDI, N.; RAVERA, O.; Unionidae (Molluscs, Lamellibranchiata) used as an environmental indicator of radioactive contamination from the Chernobyl accident. *Environ. Technol. Lett.*, v. 10, p. 347-353, 1989.
61. ROFF, D. A.; MOUSSEAU, T. A.; Quantitative genetics and fitness: lessons from *Drosophila*. *Heredity*, v. 58, p. 103-118, 1987.
62. RUSSEL, W. L.; RUSSEL L. B.; KIMBALL, A. W.; The relative effectiveness of neutrons from a nuclear detonation and from a cyclotron in inducing dominant lethals in the mice. *Am. Nat.*, v. 88, p. 269-286, 1954.
63. SABATIER, L.; LEBEAU, J.; DUTRILLAUX, B.; Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 34, n.4, p.293-232, 1995. Review.
64. SCHRÖDER, J. H.; X-Ray-induced mutations in the polyciliid fish, *Lebistes reticulatus* Peters. *Mutation Res.*, v.7, p. 75-90, 1969.
65. SEED, R.; *Structural organization, adaptative radiation, and classification of molluscs*. In: TOMPA, A. S.; VERDONK, N. H.; van der BIGGELAAR, J. A. M. eds. *The Mollusca*, Academic Press, New York, v. 3, p. 1-54, 1984.

66. SHIMADA, A.; EGAMI, N.; Dominant lethal mutations induced by MMS and mitomycin C in the fish *Oryzias latipes*. *Mutation Res.*, v. 125, p. 221-227, 1984.
67. SHUGART, L. R.; McCARTHY, J. F.; HALBROOK, R.S.; Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis*, v. 12, n. 3, p. 353-360, 1992.
68. SOLBERG, A. N.; The susceptibility of the germ cells of *Oryzias latipes* to X-irradiation and recovery after treatment. *J. Expool.*, v. 78, p. 417-440, 1938.
69. SOUZA, C.P; LIMA, L. C.; *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. 2ª ed – Belo Horizonte: FIOCRUZ/CPqRR, pp 79, 1997.
70. STAHL, JR. R. G; The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 22, p. 94-125, 1991.
71. STEINERT, S. A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J. M.; CHADWICK, D. B.; DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Res.*, v. 399, p. 65-85, 1998.
72. TALLARICO, L. F.; KAWANO, T. ; NAKANO, E.; *Efeito da radiação gama de ⁶⁰Co em Biomphalaria tenagophila (D'Orbigny, 1835)*. 1998. Monografia – Faculdade de Ciências Exatas e Experimentais da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
73. TOMÉ, L. A.; *Estudo morfológico do aparelho reprodutor de Biomphalaria tenagophila (Mollusca, Planorbidae)*. 1995. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

74. VERNON, J. G.; TAYLOR, J. K.; Patterns os sexual roles adoted by the schistosome-
vector snail *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *J. Moll. Stud.*, v.62, p.235-241,
1996.
75. VIANEY-LIAUD, M.; Étude deu contrôle de la maturité des tractus génitaux et de la
ponte par castration chirurgicale chez le planorbe *Australorbis glabratus* Say
(Pulmoné, Basommatophora). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, v. 97, p. 675-690, 1972.
76. WHITE, P. A. e RASMUSSEN, J. B.; The genotoxic hazards of domestic wastes in
surface waters. *Mutation Res.*, v. 410, p. 223-236, 1998.
77. WITT, K. L.; BISHOP, J. B.; Mutagenic of anticancer drugs in mammalian germ
cells. *Mutation Res.*, v. 355, p. 209-234, 1996.
78. WURGLER, F. E.; KRAMERS, P. G. N.; Environmental effects of genotoxins (eco-
genotoxicology). *Mutagenesis*, v. 7, p. 321-327, 1992.
79. YAMAMOTO, M. M.; KAWANO, T.; YONG, M. C. M.; CHU, E. P.;
HARAGUCHI, M.; HIROKI, K.; Molluscicidal activity of three Brazilian plant
species. *Fitoterapia*, v. LXVII, n.1, p. 59-62, 1996.