



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co
SOBRE LARVAS DE “*Biomphalaria glabrata* (SAY,1818)”**

ANA MARIA MENDONÇA DE ALBUQUERQUE MELO

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

Orientadora:
Dra. Toshie Kawano

São Paulo

1998

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**“Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre
larvas de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)”.**

ANA MARIA MENDONÇA DE ALBUQUERQUE MELO.



**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear- Aplicações.**

Orientadora: Dra. Toshie Kawano.

Coorientadora: Dra. Kayo Okazaki.

SÃO PAULO

1998

Aos meus pais,
Alcides & Zuila,
pelo amor, carinho e confiança.

Aos meus irmãos,
Ariana, André e Marcos
pela alegria de viver

AGRADECIMENTOS

- A Profa. Dra. Toshie Kawano pelos ensinamentos científicos, principalmente por sua orientação, confiança, apoio e amizade durante a realização deste trabalho;
- A Dra. Kayo Okazaki, pelo apoio científico, confiança e amizade;
- Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, pela oportunidade e condições fornecidas para a realização deste trabalho;
- A Comissão de Pós- Graduação do IPEN, na pessoa da Dra. Linda Caldas; pelo constante apoio;
- A Dra. Barbára M. Rzyski, do Laboratório de Dosimetria (TEP) do IPEN, pela padronização da dosimetria da fonte de ^{60}Co tipo panorâmica;
- A Elizabeth S. R. Somessari & Carlos G. da Silveira da Coordenadoria de Aplicações na Engenharia e Indústria do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pelo auxílio na irradiação das amostras;
- Ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, na pessoa do Dr. Prof. Heitor Franco de Andrade Júnior, pelo apoio científico e disponibilidade das instalações laboratoriais;
- Ao Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro e funcionários, Márcio e Valdir, do Centro de Microscópia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pelo apoio técnico.
- A Dra. Nancy Oguiura, Pesquisadora do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan, pelo apoio científico e condições fornecidas na realização deste trabalho;
- A Francisco F. Amancio, pelo companheirismo e carinho em todas as etapas deste trabalho;
- A Pesquisadora e amiga Dra. Eliana Nakano do Laboratório de Biologia Celular e Malacologia do Instituto Butantan, por sua leitura crítica e principalmente pelo companheirismo, carinho e amizade.
- Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Malacologia do Instituto Butantan, Márcio Massao, Liz Cristina, Fernanda Ohlweiler, Patrícia, Edson, Cristina, Anita pelo apoio e amizade na realização deste trabalho;
- A Secretária de Educação da Prefeitura de Olinda/Pernambuco, pelo apoio financeiro;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ;
- As conterrâneas e amigas Ana Paula, Vlaudía e Valdênia, pelo aconchego;

Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre larvas de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818).

Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

RESUMO

Biomphalaria glabrata é um bom modelo para o estudo dos efeitos da radiação ionizante em sistemas biológicos. Apresenta curto período de reprodução, desovas transparentes; é de fácil manutenção em instalações de baixo custo, além de apresentar desenvolvimento embrionário completamente estudado. Desovas foram obtidas de uma população de *B. glabrata* mantida em laboratório, em aquários com água filtrada e alimentados com alface fresca. Larvas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger foram irradiadas com 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co (311 Gy/h). A radiosensibilidade foi avaliada pelos parâmetros mortalidade, malformação e eclosão. Os estádios de trocófora jovem e trocófora foram os mais radiosensíveis quanto à mortalidade e malformações, respectivamente. As larvas irradiadas no estágio de véliger jovem apresentaram maior frequência de não eclosão (larvas aparentemente normais); o estágio de véliger foi o mais radorresistente para todos os parâmetros. As larvas nos estádios de trocófora e véliger jovem que não eclodiram foram analisadas quanto ao mecanismo de bloqueio da eclosão induzido pela radiação ionizante, por meio da análise da rádula em microscopia eletrônica de varredura, proteínas totais, enzimas (proteínases) e DNA genômico por eletroforese. Alterações morfológicas foram observadas nas rádulas. Não foram visualizadas modificações significantes no perfil eletroforético das proteínas totais. A quantidade de proteinase e o dano ao DNA aumentou com o aumento da dose de radiação. As modificações morfológicas da rádula induzidas pela radiação pode ser a causa da inibição da eclosão das larvas de *B. glabrata*. O aumento da atividade da proteinases pode estar envolvidos na eliminação de células danificadas pela ação da radiação. O dano ao DNA genômico de larvas irradiadas foi dose-dependente.

v

**Effects of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata*
(SAY, 1818) larvae**

ABSTRACT

Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Biomphalaria glabrata is a suitable system for radiosensitivity testing. It is easily reared and handled with low costs. Its fully known and rapid embryonic development allows the use of these stages as more sensitive bioindicators. Moreover, their flat and transparent egg capsules are easy to control. Egg masses were obtained from a laboratory *B. glabrata* population which was kept in plastic containers with filtered water and fed with fresh lettuce leaves. Larvae in the early trocophore, trocophore, early veliger and veliger were submitted to gamma radiation doses of 20, 25, 30 and 35 Gy (311Gy/h). Radiosensitivity was evaluated by mortality, malformation and hatching. Early trocophore and trocophore were the most sensitive stages in relation to mortality and malformation respectively. Irradiated larvae in the early veliger stage showed the highest frequency of unhatched apparently normal larvae. Veliger stage was the most resistant for all parameters. Unhatched larvae irradiated in the trocophore and early veliger stages were analyzed in relation to the blockage of the hatching mechanism induced by ionizing radiation under scanning electron microscope and by eletrophoresis for total proteins, enzymes (proteinases) and genomic DNA. Radula showed morphological alterations. Proteins did not showed any change. Morphological modifications in the radula induced by ionizing radiation can be the cause of inhibition of hatching. The increase on proteinase activity of irradiated larvae can be involved in the elimination of damaged cells produced by radiation action. The DNA damage was dose-dependent.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	
1.1. Aspectos da biologia de <i>Biomphalaria glabrata</i>	2
1.2. Aspectos gerais da ação da radiação ionizante em sistemas biológicos.....	4
2 OBJETIVOS	
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos.....	10
3 METODOLOGIA	
3.1 Criação dos moluscos.....	11
3.2 Coleta das desovas.....	11
3.3 Estádios larvais utilizados.....	12
3.4 Condições de irradiação.....	15
3.5 Análise da radiosensibilidade.....	16
3.5.1 larvas mortas.....	16
3.5.2 larvas malformadas.....	16
3.5.3 larvas normais	16
3.5.4 larvas eclodidas.....	17
3.6 Preparação da rádula para análise ao microscópio eletrônico de varredura.....	17
3.7 Eletroforese das proteínas e detecção da atividade de proteinase das larvas de <i>B. glabrata</i>	18
3.7.1 Homogeneização.....	18
3.7.2 Dosagem das proteínas.....	18

3.7.3	Preparação dos géis de poliacrilamida.....	19
3.7.4	Preparação das amostras.....	19
3.7.5	Condições de corrida.....	19
3.8	Análise do DNA genômico de larvas no estágio de véliger jovem de <i>B. glabrata</i>	20
3.9	Análise estatística.....	21

4 RESULTADOS

4.1	Análise da radiosensibilidade de larvas de <i>B. glabrata</i>	22
4.1.1	Mortalidade.....	23
4.1.1.1	Estimativa da DL ₅₀ 8 dias.....	24
4.1.2	Malformações.....	25
4.1.3	Eclosão.....	27
4.2	Análise da rádula.....	28
4.3	Análise eletroforética das proteínas e detecção de atividade da proteinase das larvas de <i>B. glabrata</i> no estágio de véliger jovem.....	33
4.3.1	Gel de poliacrilamida em presença de SDS.....	33
4.3.2	Gel de detecção da atividade de proteinase em SDS-PAGE.....	34
4.4	Análise do DNA genômico de larvas de <i>B. glabrata</i>	35

5 DISCUSSÃO..... 36

6 CONCLUSÕES 53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

1 - INTRODUÇÃO

Os organismos vivos estão expostos à ação das radiações, sejam provenientes de fontes naturais ou artificiais; porém são desprovidos de sensores especializados na detecção da grande maioria dessas energias.

Os efeitos da radiação sobre os seres vivos depende da interação com a matéria viva, da intensidade, distribuição e absorção da energia, bem como do tempo de exposição. A cadeia de eventos físico-químicos ocorre em frações de segundos, porém os danos biológicos poderão ser notados em poucos minutos, horas, meses ou até mesmo anos. A radiação pode induzir modificações estruturais das moléculas dos seres vivos. Estas modificações, por sua vez, podem se traduzir em morte, mutações ou malformações identificáveis por diferentes metodologias (BUTLER et al. 1984).

A sensibilidade à radiação varia entre diferentes organismos, tecidos, células, e estádios do desenvolvimento embrionário (TUBIANA & BERTIN, 1989). Em face desse potencial, podemos dispor de modelos biológicos adequados que funcionem como biossensores no monitoramento da radiação ambiental.

Moluscos, peixes e anfíbios nos primeiros estádios do desenvolvimento embrionário são sensíveis à radiação ionizante, e as modificações radioinduzidas podem ser facilmente detectadas (WOLSKY, 1982). Em função do seu "habitat" esses animais são de grande valia na monitoração dos níveis de radiação em grandes reservatórios aquáticos. Níveis de radioatividade desses ambientes podem ser monitorados por biossensores adequados. Moluscos do gênero *Biomphalaria* habitam e se desenvolvem com intensidade em diversas regiões do país. Reproduzindo-se por autofecundação ou fecundação cruzada, estes moluscos de água doce também se proliferam intensamente em condições laboratoriais.

Além de ser um dos principais hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica, doença endêmica que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo (World Health Organization, 1985), o uso destes animais é particularmente atraente pela facilidade na manutenção em instalações de baixo custo, apresentando o seu desenvolvimento embrionário amplamente estudado (CAMEY & VERDONK, 1970).

1.1 - Aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata*

Biomphalaria glabrata apresenta uma concha espiralada, cuja função é proteger as partes moles do molusco, formada por numerosos órgãos. O corpo, por sua vez, é constituído pela cabeça com tentáculos finos, olhos, boca, sola plantar ou pé revestida por cílios que auxiliam no movimento do moluscos e pela massa viseral, constituída pelos sistemas respiratório, circulatório, excretor, digestivo, nervoso e reprodutor. A reprodução é realizada por autofecundação e preferencialmente por fecundação cruzada (PARAENSE & DESLANDES 1955; PARAENSE, 1955), com produção de uma placa de desova contendo dezenas de ovos. Os ovos fertilizados são envolvidos por uma substância perivitelínica, rica em proteínas, lipídios e glicogênio, cercada por uma membrana (COLLIER, 1997). Esses ovos são agrupados dentro de uma massa gelatinosa que possui a função de proteger o desenvolvimento embrionário de condições adversas do meio ambiente (REY, 1972).

As desovas são depositadas em substratos firmes como galhos de árvores, folhas, raízes de plantas aquáticas, pedras e conchas de outros planorbídeos. As massas gelatinosas externas das desovas vão se enrijecendo em contato com a água, apresentando aspecto elíptico transparente, firme e flexível podendo ser destacadas da superfície do substrato (PARAENSE, 1970). Estas características facilita o estudo da embriologia, bem como da ação de agentes físicos ou químicos sobre o desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*. À temperatura de 25 °C, o período do desenvolvimento deste molusco é de aproximadamente seis a nove dias (PARAENSE, 1970; REY, 1972; KAWANO et. al 1992) passando por estádios embrionários e larvais, eclodindo completamente formados.

Apesar de extensos estudos sobre a biologia desses moluscos, o mecanismo de eclosão necessita de maiores esclarecimentos. REY(1956) sugere que a eclosão ocorre devido aos movimentos da larva dentro da membrana previtelínica e da ação raspadora da rádula sobre a mesma. A rádula, por sua vez, é uma estrutura pertencente ao sistema digestivo de *B. glabrata*, e possui a função de raspar os alimentos necessários à sobrevivência do molusco. Localiza-se no interior da massa bucal sobre uma estrutura cartilaginosa denominada odontóforo. A superfície dorsal da rádula é constituída de pequenos dentes em forma de gancho com as pontas voltadas para trás (PESSOA & MARTINS, 1977). A rádula é uma fita quitinosa de aspecto vítreo, secretada continuamente pelo epitélio da matriz radular; normalmente apresenta perfeita simetria bilateral e cada fileira transversal apresenta um dente central, bicúspide, ladeado por dentes laterais, intermediários e marginais. As três cúspides que caracterizam os dentes laterais, são denominadas de endocone a interna, mesocone a central e ectocone a externa. Os dentes intermediários apresentam a endocone subdividida em cúspides menores. Os dentes marginais apresentam-se bem serrilhados devido às subdivisões da endocone e ectocone. A forma dos dentes tem um importante valor taxonômico, principalmente na diferenciação dos gêneros (PARAENSE, 1970).

A rádula movimenta-se para diante e para baixo, e para cima e para trás devido à atuação alternada dos músculos protatores e retratores, que fazem com que os alimentos sejam ralados e ao mesmo tempo arrastados em direção ao esôfago. À medida que os dentes anteriores vão se desgastando, na matriz radular vão sendo produzidos novos dentes para substituí-los (REY, 1972).

Outra suposição sobre o mecanismo de eclosão de planorbídeos é apresentada por BRAHMACHARY (1983), que sugere a existência de uma enzima com função de liquefazer a membrana do ovo, assim como ocorre com peixes e helmintos.

Diante da importância médico sanitária, estes planorbídeos foram estudados sob diferentes aspectos: citogenético (OKAZAKI, 1988), epidemiológico (PARAENSE & DESLANDES, 1955 e PARAENSE, 1986) e reprodutivo (ROZEMBERG, 1989; MOTTA & MELO, 1997 b).

BANDONI et al. (1995) estudaram as diferenças genéticas de 11 espécies de *Biomphalaria* originárias da África e Regiões Neotropicais, por meio de

análises eletroforéticas de sistemas enzimáticos, objetivando padronizar a classificação taxonômica deste gênero. Verificaram uma clara separação entre as espécies africanas e neotropicais.

Estudos realizados por JELNES (1982), IWANAGA (1992) e MASCARA & MORGANTE (1995) desvendaram a constituição protéica de adultos de *B. glabrata*, com o intuito de definir as estruturas moleculares existentes nestes moluscos, auxiliando na sua classificação taxonômica e no entendimento da relação parasita-hospedeiro.

HANELT et al. (1997) usando a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) verificaram que caramujos são detectáveis quanto a presença de esporocistos, 24 horas após a exposição ao *S. mansoni*. Auxiliando na determinação da susceptibilidade ou resistência do caramujo à infecção.

Agentes químicos ou físicos podem alterar o funcionamento biológico dos moluscos e algumas dessas alterações podem ser facilmente detectadas, tornando-os interessantes como bioindicadores ambientais. RICCARDI & RAVERA (1989) verificaram que espécies de Unionidae (Mollusca, Lamellibranchia) podem ser utilizadas como indicadores de contaminação por radiocésio e manganês em ecossistemas de água doce.

Dos agentes físicos, o estudo dos efeitos das radiações ionizantes sobre moluscos têm recebido especial ênfase, pois através de seus efeitos pode-se avaliar a ação da radiação nos sistemas biológicos (FARVAR & CEMBER, 1969; MOTTA & MELO, 1997 b).

1.2 - Aspectos gerais da ação da radiação ionizante em sistemas biológicos

As radiações são ionizantes quando a sua energia é capaz de provocar a ionização de átomos do meio ambiente. Existem dois tipos de radiação ionizante: as radiações não carregadas, eletromagnéticas (Raios γ (gama) e X) e as corpusculares (α , β^+ , β^-). As radiações podem ser naturais, como as emitidas pelos corpos radioativos naturais do ambiente terrestre ou provenientes do espaço interestelar (raios cósmicos); e artificiais, quando emitidas por geradores de radiação ou pelos corpos radioativos artificiais, fabricados pelo homem (TUBIANA & BERTIN, 1989).

A ação da radiação sobre os seres vivos ocorre em parte pela ação direta, onde a energia é transferida diretamente à molécula alvo, causando sua ionização ou excitação; ou em sua grande maioria, pela ação indireta, que consiste na interação da radiação com moléculas do meio, principalmente a água, constituinte mais abundante dos sistemas biológicos. Essa forma de interação promove a formação de compostos altamente reativos que interagem com as moléculas orgânicas (BUTLER et al. 1984).

Sabe-se que o primeiro fenômeno que ocorre na interação da radiação com o ser vivo é físico e consiste na ionização e excitação dos átomos, resultante da troca de energia entre a radiação e a matéria. Este fenômeno se processa num intervalo de tempo muito curto, da ordem de 10^{-14} de segundos. Seguindo este fenômeno, inicia-se o efeito físico-químico, onde ocorre quebra das ligações SH, CH, NH, OH, transferência de íons, radiólise da água com formação de radicais livres, emissão de luz das moléculas excitadas e formação de H_2O_2 . Este fenômeno ocorre num intervalo de tempo que varia entre 10^{-14} a 10^{-12} segundos. Na seqüência, iniciam-se os danos químicos que consistem na reação dos radicais livres com as biomoléculas ocorrendo quebra das ligações C-C e C-N com surgimento de radicais secundários, começando o dano ao DNA e ao RNA num lapso de tempo de 10^{-12} a 10^{-7} segundos. O fenômeno químico biológico tem lugar a seguir, com a duração de 10^{-3} a 10 segundos, onde se verifica a ação dos radicais secundários, peróxidos orgânicos, hidroperóxido, e H_2O_2 . Reações bioquímicas são interrompidas e mecanismos de reparo do DNA são ativados. Finalmente, temos o efeito biológico, que pode ser imediato ou tardio, o primeiro ocorrendo entre 10 segundos a 10 horas e o segundo refletindo-se ao longo dos anos ou de gerações (McNALLY, 1982).

No entanto, a natureza dos efeitos da radiação ionizante ao penetrar na matéria depende de algumas variáveis significativas como: tipo de radiação, ou seja, a densidade de íons produzidos ao longo do percurso de uma radiação ionizante é influenciada pela sua velocidade e massa. Quanto mais lenta, maior será o número de íons produzidos por milímetro do percurso. Um outro aspecto observado é a quantidade de energia liberada no percurso da radiação (LET= transferência linear de energia): o dano biológico é maior e a recuperação pós-irradiação é mais lenta, para radiações de alta-LET, do que para as de baixa LET. Uma outra variável é a dose aplicada: de modo geral o dano biológico produzido

por radiação ionizante aumenta com o aumento da dose, ou seja, com a quantidade da energia de radiação absorvida. A dose absorvida mede a quantidade de energia dada por unidade de massa do material irradiado. A unidade antiga de dose absorvida era o rad (dose absorvida de radiação) que foi substituída pelo Gray (Gy), que equivale a um joule por quilograma de massa.

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J. Kg}^{-1}$$

Modificadores das respostas biológicas às radiações ionizantes devem ser incluídos na lista de variáveis que governam a natureza do dano da radiação. Tanto os sensibilizadores (oxigênio), quanto os protetores (tióis) podem estar presentes e os efeitos desses modificadores podem ser determinados, entre outras variáveis, por suas concentrações e eficácias relativas (BARISH, 1982).

Analisando os aspectos de interação da radiação com a matéria, os moluscos podem servir como um sistema de estudos das radiações ionizantes, por meio da análise das alterações biológicas ocorridas. A radiosensibilidade em moluscos pode ser observada por meio de parâmetros tais como mortalidade, malformações e eclosão.

- Mortalidade - o critério prático utilizado para avaliar a letalidade de uma população exposta a radiação ionizante é a DL_{50} , ou seja, a dose de radiação capaz de matar 50% da população irradiada.
- Malformações - As radiações ionizantes são indutoras de malformações em organismos vivos. Sabe-se que, durante a embriogênese, pode ocorrer uma série de eventos anormais resultando no desvio do desenvolvimento normal dos embriões (WOLSKY, 1982). Os moluscos de modo geral, apresentam diferentes regiões do ovo já pré-destinadas à formação dos futuros órgãos logo após a fertilização, antes da primeira clivagem; por esta razão são bastante utilizados em experimentos com agentes físicos e químicos. As principais malformações observadas em moluscos, segundo critérios de GEILENKIRCHEN (1961) e KAWANO et al. (1993) são:

⇒ Exogástrula - os embriões apresentam aspecto vesicular sem a invaginação dos endômeros durante a gastrulação. Embriões com este tipo de anormalidade morrem usualmente em poucos dias.

- ⇒ Malformações na concha - alteração na forma e tamanho da concha.
- ⇒ Malformação cefálica - as principais malformações de cabeça são: monoftalmia, ausência de um dos olhos; microftalmia- olhos pequenos; sinoftalmia- convergência dos olhos na região mediana da cabeça; trioftalmia - um olho extra na região mediana; ciclopia - um único olho central; anoftalmia- ausência completa dos olhos; duplicação sinistra ou destra do olho.
- ⇒ Eversão do estomodeu - malformação da região bucal e da faringe.
- ⇒ Malformação inespecífica- embriões que apresentam desenvolvimento anormal, porém não pertencem às classes de malformações acima citadas.
- Eclosão - embriões de moluscos irradiados apresentam inibição parcial ou total da eclosão, dependendo da dose aplicada e da idade dos embriões (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & BERRY, 1964; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1966).

Espécimes de *Biomphalaria* adultos pós-irradiados podem apresentar atraso e diminuição na oviposição, bem como inibição da eclosão, dependendo da dose de radiação aplicada (MELO, 1994).

A radiação ionizante e outros clastógenos podem causar dano ao DNA e por conseguinte induzir aberrações cromossômicas, morte celular e câncer. Os resíduos das cadeias duplas de DNA são utilizados como biossensores da ação da radiação em células de mamíferos. Técnicas de eletroforese têm sido desenvolvidas e aplicadas com o intuito de identificar o dano ao DNA causado pela ação da radiação ionizante (AGER et al., 1990; FORAY & MALAISE, 1995; ZHOU et al., 1997). Na literatura não foi encontrado nenhum dado sobre eletroforese de DNA de larvas de *B. glabrata* submetidas à radiação ionizante.

Outros aspectos da ação da radiação sobre moluscos foram analisados. Um dos primeiros trabalhos sobre a ação da radiação em *Biomphalaria glabrata* foi desenvolvido por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & BERRY (1964) com a finalidade de combater o hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Estes estudos com populações de *Biomphalaria glabrata*, demonstraram que após a exposição aos raios X, a dose que mata 50% dos moluscos em 30 dias ($DL_{50(30)}$) foi diretamente proporcional à idade dos moluscos. Outros estudos demonstraram

que os efeitos dos raios X sobre os ovos de *Biomphalaria glabrata* impediram o desenvolvimento normal dos embriões, sendo a radiosensibilidade máxima nos estádios de mórula, blástula e gástrula. Os raios X também retardaram o crescimento e interferiram na atividade reprodutora, de uma forma dose-dependente.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1966) irradiando ovos de *B. glabrata* com doses de 2000 a 4000 R de raios X, observou que caramujos nascidos de ovos irradiados apresentaram potencial reprodutivo muito reduzido na idade de 5 e 11 meses, desaparecendo por completo no 14º mês de idade. Com esta série de trabalhos, a autora demonstrou que a radiação diminui o potencial reprodutivo dos moluscos por um determinado tempo, mas não impede o restabelecimento da população em gerações subseqüentes.

LIARD et al. (1968) irradiando grupos de *B. glabrata* com raios gama de ^{60}Co , com doses de 40, 80, 160, 320 e 640 Gy, observaram que, após a exposição à radiação de 40 Gy, os moluscos permaneceram com sua capacidade reprodutora. No entanto, o grupo que fora exposto à irradiação de 80 Gy, apresentou um retardo no desenvolvimento e uma baixa taxa de eclosão dos embriões. Os caramujos irradiados com 320 e 640 Gy morreram após 60 dias.

FARVAR & CEMBER (1969) utilizaram 100 espécimes de *B. glabrata* de diâmetros semelhantes com idades entre 3 a 5 meses. Os caramujos foram irradiados com 750, 1000, 1500, 2000 e 2500 Gy, e observados quanto a mortalidade. Verificaram que doses de 1500 a 2500 Gy, eram capazes de destruir completamente todos os indivíduos da amostra.

FRANTSEVICH et al. (1995) utilizaram uma grande variedade de moluscos de água doce (*Lymnaea stagnalis*, *L. fragilis*, *Helix* e outros) como bioindicadores de poluição por radionuclídeos após o acidente da usina nuclear de Chernobyl. Os autores demonstraram que a dosimetria realizada nas conchas desses moluscos foi um método eficiente e rápido para detectar poluição ambiental causada por ^{90}Sr .

MÜNZINGER (1987), comparando adultos e quatro estádios embrionários de *B. glabrata* expostos ao sulfato de cobre, enumerou algumas vantagens do uso dos embriões como bioindicadores. Estes são mais sensíveis, fisiologicamente homogêneos, não necessitam de alimentação e ocupam espaço reduzido. As

desovas são colocadas em cápsulas gelatinosas transparentes, em uma única camada. Isto permite a observação dos indivíduos durante todo o desenvolvimento embrionário; os estádios bem definidos e facilmente reconhecíveis, mostrando claramente efeitos tóxicos e garantindo a reprodução dos resultados. Além disso, um grande número de ovos pode ser examinado, o que permite uma melhor análise estatística.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

- Avaliar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre larvas de *Biomphalaria glabrata*.

2.2 - ESPECÍFICOS

- Analisar a radiosensibilidade de larvas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger submetidos às doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co , por meio dos seguintes parâmetros: mortalidade, malformação e eclosão.
- Investigar o mecanismo de bloqueio da eclosão induzido pela radiação ionizante, estudando alterações estruturais da rádula ;
- Detectar alterações no perfil proteico e nas enzimas proteolíticas das larvas irradiadas, por meio de eletroforese.
- Avaliar a ação da radiação sobre o DNA genômico das larvas irradiadas e não irradiadas;
- Interligar estes parâmetros, visando utilizar este modelo experimental como bioindicador de radiação.

3 - METODOLOGIA

3.1 - Criação dos moluscos

Biomphalaria glabrata (SAY,1818) - melânicos (Figura 1), originários de Barreiro, Belo Horizonte- MG, Brasil (latitude 19° 55'15" / longitude 43° 56'16"), obtidas por intermédio do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan (São Paulo), foram mantidos em cubas de plástico de 25cm X 55cm X 17cm, com água declorada, continuamente aerada, alimentados com folhas de alface fresca (*Lactuca sativa crispa*). Os moluscos foram mantidos à temperatura de 25 ± 2 °C com pH da água em torno de 7,0, seguindo a técnica de ANDRADE (1954); BRUMPT (1941); ROZEMBERG (1989).



Figura 1- Molusco da espécie *Biomphalaria glabrata* (SAY,1818).
Aumento de 2,5 X .

3.2 - Coleta das desovas

Foram colocadas tiras de plástico polietileno (21cm X 5cm) na superfície da água do aquário onde os moluscos depositaram suas desovas (Figura 2). Para a identificação dos estádios larvais, foram utilizados os critérios adotados por KAWANO et al. (1992), nos quais as idades dos embriões foram

determinadas escolhendo-se a primeira clivagem do ovo como o estágio inicial (estádio 1). Devido à assincronia da divisão dos ovos na mesma desova, foi considerado o tempo zero, o momento em que 50 % dos ovos da mesma desova atingem o estágio 1.

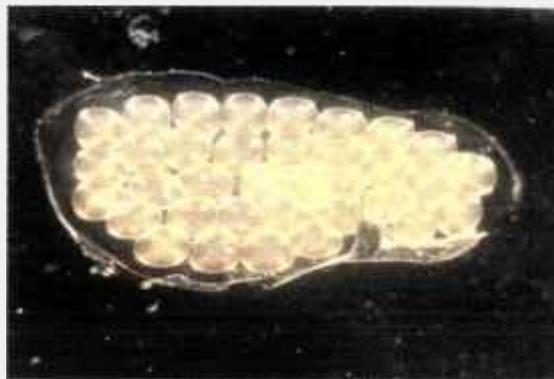


Figura 2- Desova de *B. glabrata* contendo vários ovos envolvidos por uma cápsula gelatinosa. Aumento 92 X.

3.3 - Estádios larvais utilizados

Foram utilizadas larvas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger (Figura 3, Tabela I). O estágio de trocófora jovem ocorreu aproximadamente 40 a 65 horas após a primeira clivagem, caracterizando-se por apresentar células ciliadas do prototroco e os primeiros movimentos larvais (Figura 3.1). Larvas no estágio de trocófora (65 a 80 horas após a primeira clivagem) apresentavam-se mais alongadas, assemelhando-se a um rim (Figura 3.2). Nesta fase, as células responsáveis pela formação da cabeça e pé foram vistas na região anterior, e na região dorsal visualizou-se a glândula da concha. O intervalo de tempo entre 80 a 100 horas após a primeira clivagem correspondeu ao estágio de véliger jovem. Neste estágio a concha e o pé apresentaram-se mais desenvolvidos (Figura 3.3). O estágio de véliger ocorreu aproximadamente 120 horas após a primeira clivagem do ovo. Neste estágio os olhos, a boca, o pé e a concha foram bem visualizados (Figura 3.4). O estágio de Hipo (144 horas após a primeira clivagem) caracterizou-se por apresentar olhos, tentáculos e pés bem desenvolvidos (Figura 3.5). Todas as características acima descritas seguiram os critérios estabelecidos por KAWANO et al. (1992).

TABELA I - Estádios do desenvolvimento larval de *B. glabrata* . (KAWANO et al)

Estádio de desenvolvimento	Tempo (horas) após a primeira clivagem	Figuras
Trocófora jovem	43	3 (1)
Trocófora	66	3 (2)
Véliger jovem	96	3 (3)
Véliger	120	3 (4)
Estádio de Hipo	144	3 (5)*

*o estágio de hipo foi utilizado nos experimentos de eletroforese e análise da rádula

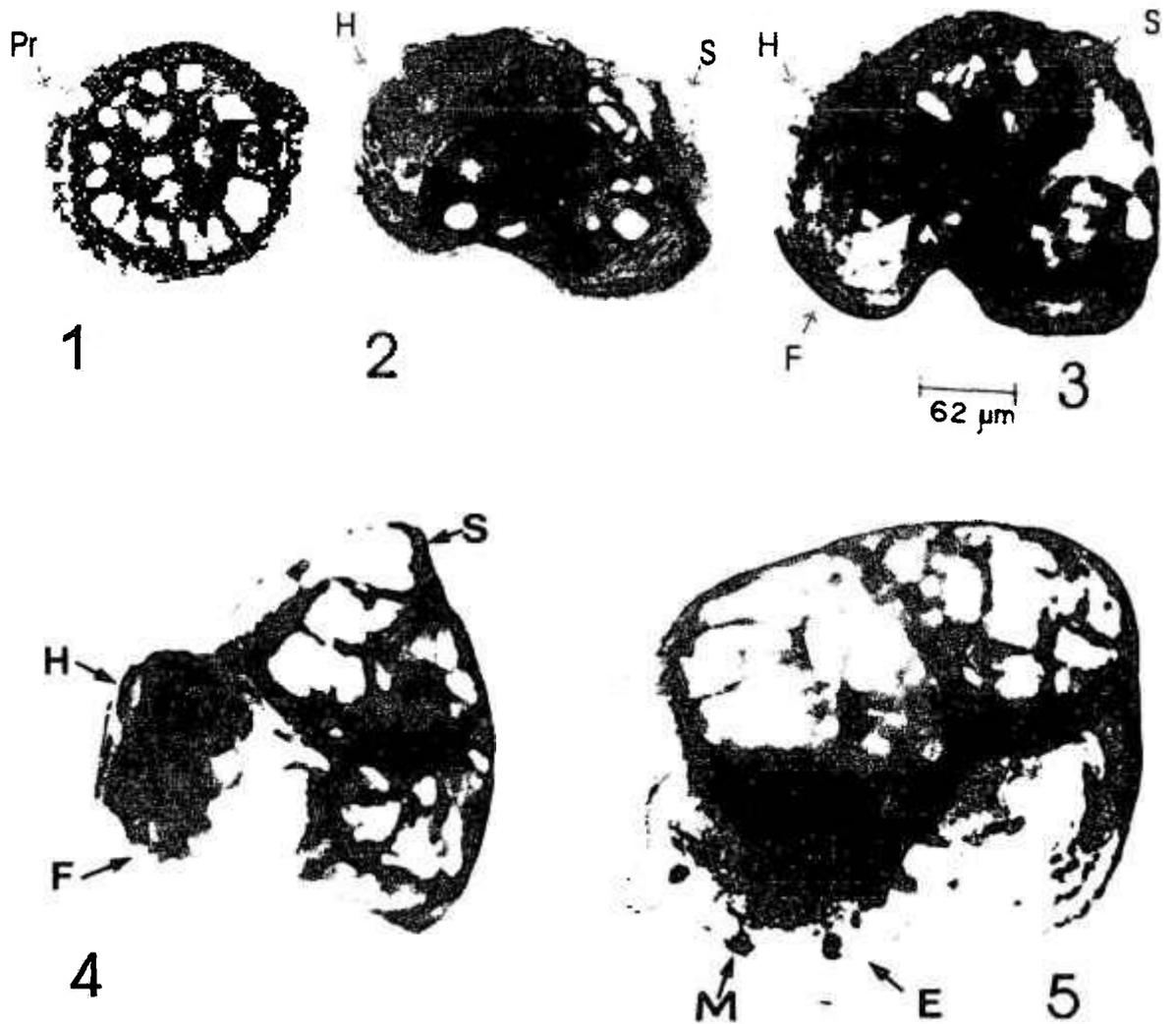


Figura 3- Principais estádios do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata*. (Foto gentilmente cedida por KAWANO et al., 1992).

1. Trocófora jovem, 55 horas após a 1ª clivagem.
2. Trocófora, 66 horas após a 1ª clivagem
3. Véliger jovem, 96 horas após a 1ª clivagem.
4. Véliger, 120 horas após a 1ª clivagem.
5. Estádio de Hipo, 144 horas após a 1ª clivagem

E = olhos; F = pé; H = cabeça; M = boca; S = concha; Pr. = prototroco

3.4 - Condições de irradiação

As larvas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger foram submetidas às doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama, com taxa de dose em torno de 311 Gy/h, em irradiador de ^{60}Co do tipo panorâmico da Yoshizawa Kiko Company - LTD, do Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN/CNEN-SP). As doses foram selecionadas com base em experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, e dados encontrados na literatura (OKAZAKI et al., 1996). As desovas no mesmo estágio larval foram dispostas no centro de placas de Petri de vidro (9 cm X 1,5 cm) com um mínimo de água, o suficiente para evitar a dessecação. A irradiação procedeu-se na parte frontal da fonte a uma distância de 25 cm, sem utilização de barreiras. A dosimetria da fonte foi estabelecida pelo método Fricke. Cada lote de larvas no mesmo estágio foi irradiado separadamente (Figura 4). Para cada grupo realizaram-se 3 réplicas. Em seguida, as larvas foram mantidas em estufa incubadora B.O.D.(Modelo 347F/FANEM) a 25 ± 1 °C e observadas por oito dias consecutivos com o auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus - SZH-ILLD), para proceder a análise da mortalidade, malformação e eclosão .



Figura 4 - Larvas de *B. glabrata* sendo submetidas a irradiação na posição frontal, a 25 cm de distância da fonte ^{60}Co do tipo panorâmica. F = fonte de ^{60}Co S= suporte de madeira com placa de Petri contendo desovas de *B. glabrata*.

3.5 - Análise da radiosensibilidade

Para a análise da radiosensibilidade em larvas de *B. glabrata* foram utilizados os seguintes critérios:

3.5.1 - Larvas mortas

Foram consideradas mortas, todas as larvas que apresentaram aspecto intumescido ou deformado. Neste grupo, foram incluídos os malformados que morreram e os demais com aspecto similar (Figura 5).



Figura 5 - Larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas com 25 Gy. m = larva morta.

3.5.2 - Larvas malformadas

Foram assim consideradas todas as larvas sobreviventes a radiação que apresentaram malformações visíveis ao microscópio estereoscópico (Figura 6).

3.5.3 - Larvas Normais

Nesta categoria foram incluídas todas as larvas sobreviventes à radiação, mesmo as de tamanho reduzido ou com atraso no desenvolvimento, desde que não apresentasse qualquer malformação visível ao microscópio estereoscópico (Figura 6).

3.5.4 - Larvas eclodidas

As larvas que conseguiram sair da cápsula do ovo foram consideradas larvas eclodidas. Em média, as larvas não irradiadas de *Biomphalaria glabrata* eclodem entre o sexto e nono dia após a primeira clivagem, à temperatura de 25 °C (KAWANO et al., 1992).

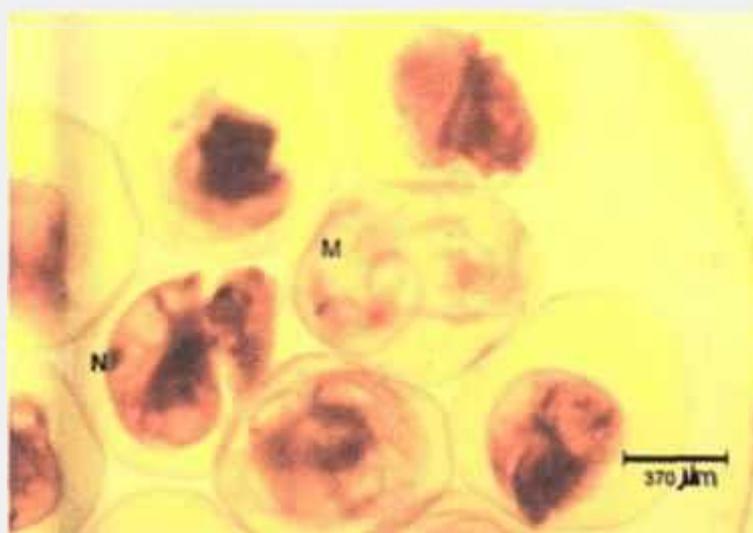


Figura 6 - Larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas com 25 Gy. M = larva malformada; N = larva aparentemente normal.

3.6 - Preparação da rádula para análise ao Microscópio Eletrônico de Varredura

As larvas irradiadas nos estádios de trocófora e véliger jovem, foram analisadas quanto à morfologia da rádula em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss DMS- 940, do Instituto de Biociências-USP). Esses estádios larvais foram selecionados em decorrência das frequências de larvas aparentemente normais que não conseguiram eclodir, após a irradiação. As larvas foram observadas por oito dias consecutivos. Após este período, aquelas com aparência normal e que não conseguiram eclodir, foram selecionadas e decapsuladas com auxílio de dois estiletos de extremidades finas, em recipiente contendo solução de NaCl a 0,2%, concentração ideal para conservar o embrião durante todo o período de decapsulamento. Em seguida a massa bucal da larva foi separada e transferida para uma lamínula onde a rádula foi isolada por dissecação, e corada com alizarina vermelha (Alizarin Red Standard Fluka for Microscopy) para facilitar sua

visualização. Em razão do acúmulo de substância mucosa em torno da rádula, utilizou-se solução de hipoclorito de sódio a 50%, pelo tempo necessário para a eliminação dessa substância, antes da fixação com etanol absoluto. Todas estas etapas foram realizadas sob microscópio estereoscópico no aumento de 40 x. Na última etapa, a lamínula foi fixada sobre o cepo (Stub) com auxílio da cola de prata; em seguida o cepo foi levado para o evaporador a vácuo da Balzers (Sputtering, modelo SCD 050), onde recebeu também um banho de ouro, para posterior análise sob Microscópio Eletrônico de Varredura. O registro foi realizado em filmes Plus-X-pan da Kodak, asa 125 e as fotos copiadas por ScanJet 6100 C da Hewlett Packard.

3.7 - Eletroforese das proteínas e detecção de atividade da proteinase das larvas de *B. glabrata*

O perfil eletroforético de proteínas das larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas e não irradiadas, que não eclodiram em oito dias de observação, foi determinado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE).

3.7.1 - Homogeneização

As desovas foram lavadas com água deionizada e os ovos imersos em solução de NaCl a 0,2%, foram decapsulados com auxílio de dois estiletos. O líquido vitelínico e as larvas foram separadas e acondicionadas em tubos de microcentrifuga (tipo Eppendorf). Em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, contendo 0,4 ml de solução salina a 0,2 %, as larvas foram maceradas com um bastão rígido de polietileno. O material assim preparado foi estocado a 4 °C.

3.7.2 - Dosagem de proteínas

A concentração protéica foi estimada pelo método de Bradford, utilizando soro albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976). As determinações foram realizadas em espectrofotômetro Beckman (DU-640).

3.7.3 - Preparação dos géis de poliacrilamida

Os géis de resolução foram preparados em sistema Mini-Protean da BIO-RAD, utilizando espaçadores de 0,75 mm. A concentração da acrilamida utilizada no gel foi de 12,5 %. O gel de empacotamento foi preparado com 4,5% de acrilamida. Para detecção da atividade proteinase em gel de poliacrilamida em presença de SDS foi utilizada gelatina copolimerizada incorporada em gel de acrilamida a 12,5 % numa concentração final de 500 µg/ml.

3.7.4 - Preparação das amostras

Amostras homogeneizadas preparadas com larvas irradiadas, larvas não irradiadas e com o líquido perivitelínico foram diluídas na proporção de 1:1 em solução tampão segundo LAEMMLI (1970) (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 25 % glicerol; 0,1% azul de bromofenol; 14,4 mM de 2-mercaptoetanol). Para a eletroforese em presença de SDS, as proteínas misturadas com tampão de amostra, foram colocadas em água a 100 °C por 7 minutos. Para a detecção da atividade da proteinase, as amostras foram aplicadas diretamente no gel, sem prévio aquecimento na proporção de 3:1 em tampão de amostra.

3.7.5 - Condições de corrida

Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-protean, acoplado a uma fonte Power/Pac 300 da BIO-RAD, com voltagem constante de 150 V, contendo 25 mM Tris, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS como tampão de corrida. Após a corrida, as proteínas foram fixadas e coradas com azul de coomassie (BOLLAG & EDELSTEIN, 1990) ou pelo nitrato de prata (HARLOW & LANE, 1988).

Para detecção de proteinase após a corrida eletroforética a 4 °C, o gel foi incubado uma vez por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante em 2,5 % Triton X-100 em 0,1M de tampão de acetato pH 5,0 e em seguida incubado em tampão acetato por aproximadamente 16 horas. Após este período, o gel foi corado com azul de coomassie, para que as proteinases fossem visualizadas como bandas claras contra o fundo azul.

3.8 - Análise do DNA genômico de larvas no estágio de véliger jovem de *B. glabrata*

Alterações no DNA genômico de larvas de *B. glabrata* submetidas a radiação ionizante foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Para isso as larvas no estágio de véliger jovem foram irradiadas com 20 e 25 Gy e analisadas por oito dias consecutivos; as não eclodidas foram decapsuladas e preparadas para a análise do DNA. As larvas decapsuladas foram colocadas em tampão de extração (10 mM de tris HCl pH 8,0; 0,1 M de EDTA pH 8,0; 0,5% de SDS) e aquecidas a 65 °C por 30 minutos. Foi adicionado 20µg/µl de Rnase A e de proteinase K, deixando-as agir por 14 horas a 50 °C em suave agitação. Após este período foi acrescentado formol-clorofórmio com suave agitação e posteriormente centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C em microcentrifuga refrigerada (Eppendorf). A fase aquosa foi recolhida com pipeta Pasteur de ponta larga e colocada em tubo de microcentrifuga do tipo "Eppendorf", no qual foi adicionado acetato de sódio (3M, pH 5,2) e etanol gelado. As amostras foram então colocadas em freezer por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm, para separação de DNA. O DNA foi lavado com etanol a 70% gelado e em seguida seco a vácuo no Speevac (Savant) e ressuspendido em tampão de extração. A concentração do DNA foi medida através de leitura direta da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman), para posterior aplicação no gel de agarose a 0,8%. A corrida foi realizada em sistema horizontal de eletroforese (GIBICO) por 2,5 horas, à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, por aproximadamente 15 minutos e fotografado sobre um transiluminador com câmera e filme tipo polaroide.

3.9 - Análise estatística

A DL_{50} foi estimada após oito dias de observação para cada estágio larval considerado. O valor foi obtido com auxílio do Graphpad Prism (versão 2.0) através da análise estatística da curva sigmoidal dose-resposta.

A análise do nível de significância dos parâmetros mortalidade, malformação e eclosão foi realizada pelo teste do qui-quadrado (X^2) segundo BEIGUELMAN (1988).

4 - RESULTADOS

4.1 - Análise da radiosensibilidade de larvas de *B. glabrata*

A radiosensibilidade das larvas de *B. glabrata* foi verificada por meio dos parâmetros mortalidade, malformação e eclosão. A Tabela I mostra as porcentagens de larvas de *B. glabrata* mortas, malformadas, eclodidas e as aparentemente normais não eclodidas, irradiadas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger, obtidas no oitavo dia após a irradiação.

TABELA I - Larvas de *B. glabrata* nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger irradiadas com 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co e observadas quanto à frequência de mortas, malformadas, eclodidas e não eclodidas no oitavo dia após a irradiação.

Estádios larvais	Dose (Gy)	total de larvas	Mortalidade (%)	Sobreviventes (%)		
				Malformados	Eclodidos	não eclodidos
Trocófora jovem	0	107	0,00	0,00	100,00	0,00
	20	124	55,65	44,35	0,00	0,00
	25	121	76,03	23,97	0,00	0,00
	30	130	96,90	3,10	0,00	0,00
	35	122	100,00	0,00	0,00	0,00
Trocófora	0	697	0,43	0,57	91,10	7,89
	20	704	40,48	40,48	0,14	18,90
	25	707	64,21	31,25	0,00	4,52
	30	733	81,44	11,32	0,00	7,23
	35	777	89,83	4,72	0,00	5,92
Véliger jovem	0	278	1,08	0,00	97,12	1,80
	20	501	1,00	1,60	23,75	73,65
	25	560	8,04	4,46	0,71	86,79
	30	614	12,38	3,26	0,00	84,36
	35	321	14,64	7,48	0,93	76,95
Véliger	0	619	0,00	0,16	98,30	1,45
	20	586	4,61	1,19	58,87	37,37
	25	569	6,15	4,75	53,25	35,85
	30	686	2,62	1,31	26,68	69,39
	35	511	0,20	1,96	44,81	53,03

4.1.1 - Mortalidade

A Figura 7 mostra a mortalidade de larvas de *B. glabrata* submetidas a radiação gama de ^{60}Co nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger.

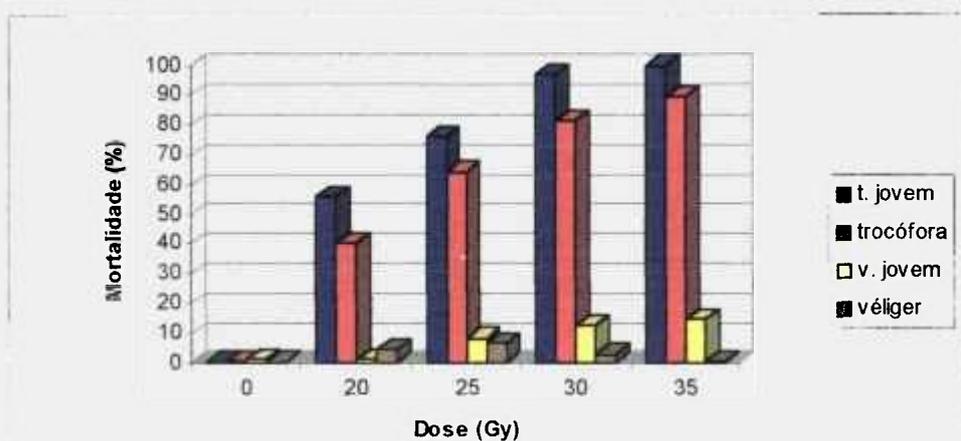


Figura 7 - Frequências de mortalidade encontradas em larvas de *B. glabrata* irradiadas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de ^{60}Co , obtidas no oitavo dia após as irradiações, mantidas a 25 °C.

No estágio de trocófora jovem, houve um aumento da freqüência de mortalidade atingindo 96,9 % para a dose de 30 Gy e 100 % na dose de 35 Gy no oitavo dia após a irradiação.

No estágio de trocófora, ocorreu um aumento da mortalidade com o aumento da dose de radiação, chegando a 89,83 % de mortalidade para a dose de 35 Gy.

A análise estatística mostrou que as taxas de mortalidade dos grupos irradiados diferiram significativamente do grupo controle, tanto no estágio de trocófora jovem ($\chi^2 = 110,62$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, com 4 graus de liberdade) como de trocófora ($\chi^2 = 660,97$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, 4 graus de liberdade).

Pode-se verificar que as taxas de mortalidade das larvas nos estádios de trocófora jovem e trocófora são diretamente proporcionais à dose de radiação.

As larvas no estágio de véliger jovem apresentaram 8,04; 12,38 e 14,64 % de mortalidade com as doses de 25, 30 e 35 Gy, respectivamente. A análise estatística mostrou que estas doses diferiram significativamente do grupo controle ($\chi^2 = 80,81$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, 4 graus de liberdade).

O estágio de véliger apresentou baixas taxas de mortalidade 4,61; 6,15; 2,62; e 0,20% para as doses de 20, 25, 30 e 35 Gy. A análise estatística mostrou que as doses de 20, 25 e 30 diferiram significativamente entre si ($\chi^2 = 8,96$, χ^2 crítico = 5,99 para $p = 5\%$, 2 graus de liberdade).

De modo geral, a mortalidade é inversamente proporcional ao estágio do desenvolvimento larval.

4.1.1.1. - Estimativas da DL₅₀ (8 dias)

As estimativas da DL₅₀ no oitavo dia após a irradiação para cada estágio larval encontram-se na Tabela II. Os valores estimados da DL_{50(8 dias)} foram obtidos pelo programa GraphPad Prism 2.0. Pode-se verificar que a DL_{50(8 dias)} dos estádios de trocófora jovem e trocófora são aproximadas, bem como as do estádios de véliger jovem e véliger. Observa-se que os estádios mais jovens são mais radiosensíveis que os estádios mais desenvolvidos.

TABELA II - Estimativa da DL₅₀ no oitavo dia após a irradiação para os estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger de larvas de *B. glabrata*. Mantidas a 25 °C.

Estádio larval	DL_{50(oito dias)} Gy
Trocófora jovem	20,3
Trocófora	21,2
Véliger jovem	153,6
Véliger	148,7

4.1.2 - MALFORMAÇÕES

A figura 8 mostra as porcentagens de larvas malformadas obtidas no oitavo dia de observação em função da dose de radiação.

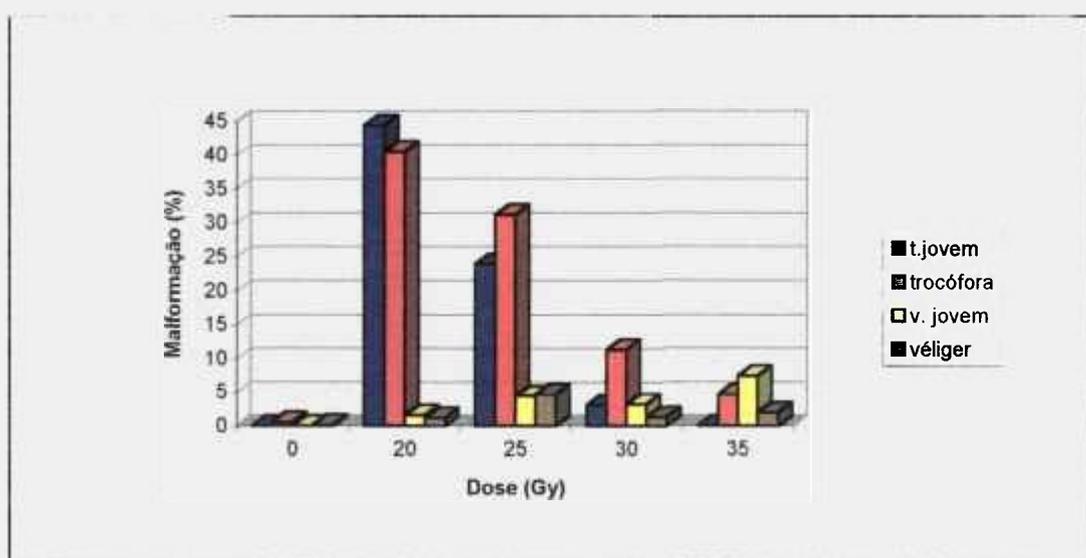


Figura 8 - Frequências de malformações encontradas em larvas de *B. glabrata* irradiadas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de ^{60}Co , obtidas no oitavo dia após as irradiações.

Malformações foram observadas desde os primeiros dias após a irradiação, e as frequências dessas malformações aumentaram nos dias posteriores. A maioria das larvas malformadas morreu sem conseguir eclodir. Na figura 8, observa-se que a frequência de malformações depende do estágio do desenvolvimento larval e da dose de radiação aplicada.

Os estádios de trocófora jovem e trocófora foram os mais radiosensíveis quanto à indução de malformações, apresentando frequências máximas de sobreviventes malformados de 44,35 e 40,48%, respectivamente, com a dose de 20 Gy. Com o aumento da dose de radiação observa-se um aumento da taxa de mortalidade. Todos os sobreviventes das larvas irradiadas no estágio de trocófora

jovem estavam malformados. No estágio de trocófora observou-se o surgimento de larvas que não eclodiram mesmo assemelhando-se com o controle.

A análise estatística mostrou que as frequências de malformações dos grupos irradiados diferem significativamente dos grupos controle, tanto no estágio de trocófora jovem ($\chi^2 = 127,61$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, com 4 graus de liberdade) como no estágio de trocófora ($\chi^2 = 491$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, 4 graus de liberdade).

As taxas de malformações das larvas no estágio de véliger jovem irradiadas foram significativamente maiores que as do grupo controle ($\chi^2 = 19,44$, χ^2 crítico = 13,28 para $p = 1\%$, 4 graus de liberdade). Comparando-se as frequências de malformações entre os grupos submetidos às doses de 25 e 30 Gy não se observou diferença significativa ($\chi^2 = 1,43$; χ^2 crítico = 3,84 para $p = 5\%$ com 1 grau de liberdade).

As frequências de malformações das larvas no estágio de véliger irradiadas foram significativamente maiores que o grupo controle ($\chi^2 = 11,15$, χ^2 crítico = 9,49 para $p = 5\%$, 4 graus de liberdade). As larvas irradiadas com 25 Gy mostraram maior radiosensibilidade com relação às demais doses ($\chi^2 = 13,35$, χ^2 crítico = 6,64 para $p = 1\%$, 1 grau de liberdade). Comparando-se as frequências de malformações dos grupos irradiados com 20, 30 e 35 Gy entre si, não se observou diferença significativa ($\chi^2 = 1,82$, χ^2 crítico = 4,60 para $p = 10\%$, 2 graus de liberdade).

A análise "in vivo" de desovas irradiadas mostrou que as malformações inespecíficas estavam presentes em todos os estádios embrionários e em todas as doses analisadas. Outros tipos de malformações encontradas foram: malformação cefálica do tipo monoftalmia e duplicação dos olhos, malformação da concha e eversão do estomodéo.

4.1.3 - ECLOSÃO

A figura 9 mostra a ação da radiação sobre a eclosão de *B. glabrata* nos diferentes estádios do desenvolvimento.

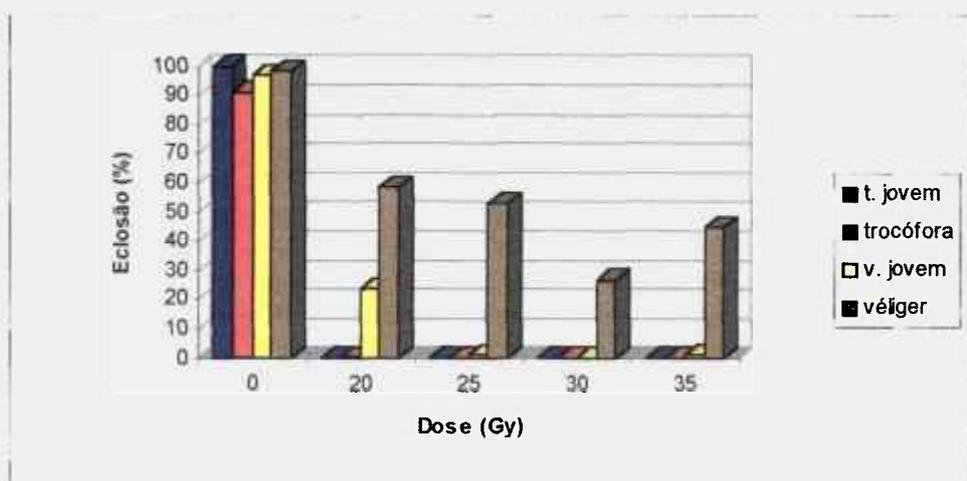


Figura 9 - Frequências de eclosões encontradas em larvas de *B. glabrata* irradiadas nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger, com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de ^{60}Co , obtidas no oitavo dia após as irradiações

Pode-se verificar que as taxas de eclosão do grupo controle variou de 91,1 a 100 %. Já as larvas irradiadas nos estádios de trocófora jovem e trocófora, nenhuma eclosão foi observada. Observa-se que a taxa de eclosão nos estádios de véliger jovem e véliger decresceu com o aumento da dose de radiação. As larvas no estágio de véliger jovem irradiadas com 20, 25, 30 e 35 Gy apresentaram taxas de eclosão de 23,75 / 0,71 / 0,00 e 0,93% respectivamente. As diferenças nas taxas de eclosão de larvas irradiadas no estágio de véliger jovem com as doses 25, 30 e 35 Gy, não foram altamente significantes ($\chi^2 = 7,33$; χ^2 crítico = 5,99 para $p = 5\%$ com 2 graus de liberdade).

As larvas irradiadas no estágio de véliger apresentaram as maiores taxas de eclosão. Portanto pode-se constatar que a frequência de eclosão de larvas irradiadas com raios γ (gama) aumentou com o aumento da idade do embrião.

A partir de observações ao microscópio estereoscópico, foi possível verificar a ocorrência de larvas irradiadas que não conseguiram eclodir até o oitavo dia de observação, que entretanto, apresentaram aspecto aparentemente normal, indistinguível do grupo controle. O grupo irradiado no estágio de véliger jovem apresentou a maior frequência de larvas aparentemente normais, não eclodidas, sendo que na dose de 25 Gy obteve-se a taxa mais alta de eclosão (86,79 %).

4.2 - Análise da rádula

Alterações morfológicas na rádula foram analisadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura. A eletromicrografia da rádula inteira de larva não irradiada de *B. glabrata*, mostra que as rádulas dessas larvas são constituídas por nove fileiras de dentículos, com perfeita simetria bilateral (Figura 10).

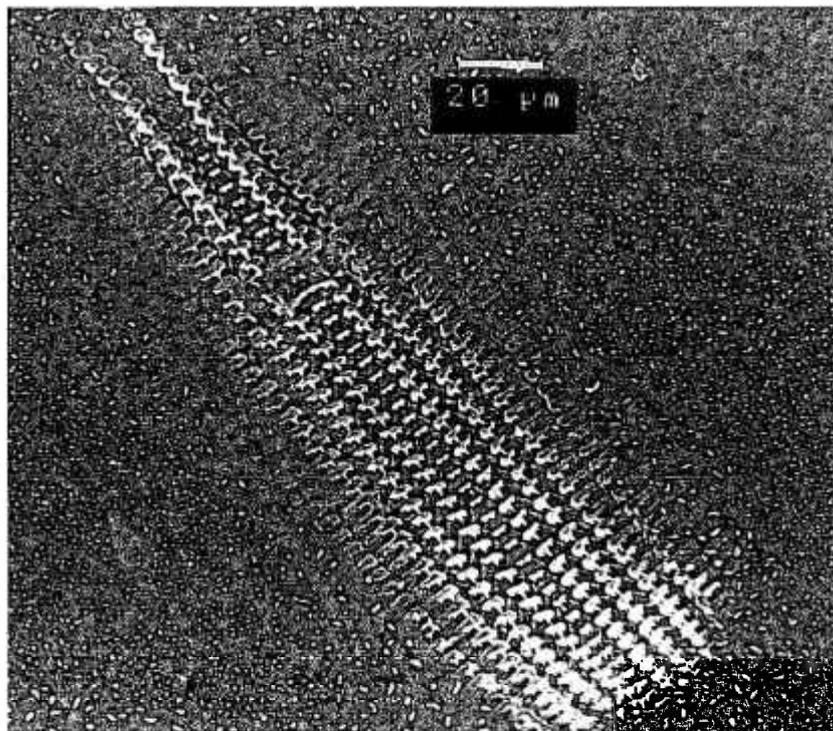


Figura 10 - Eletromicrografia da rádula de larva de *B. glabrata* não irradiada.

As Figuras 11, 12 e 13 mostram eletromicrografias de rádulas de larvas de *B. glabrata* nos estádios de trocófora e véliger jovem irradiadas (25 Gy) e não irradiadas (controle). As eletromicrografias presentes nas figuras 11 e 12, mostram que os

As Figuras 11, 12 e 13 mostram eletromicrografias de rádulas de larvas de *B. glabrata* nos estádios de trocófora e véliger jovem irradiadas (25 Gy) e não irradiadas (controle). As eletromicrografias presentes nas figuras 11 e 12, mostram que os dentes radulares das larvas irradiadas nos estádios de trocófora e véliger jovem apresentam alterações morfológicas com relação ao grupo controle. Os dentes das rádulas de larvas irradiadas apresentaram-se com as cúspides menos pontiagudas e os dentes centrais com diminuição de tamanho, quando comparados ao controle. Nota-se que as larvas irradiadas no estágio de trocófora apresentam modificações estruturais na rádula mais pronunciadas, quando comparadas com a rádula da larva irradiada no estágio de véliger jovem.

As eletromicrografias apresentadas na figura 13, mostram dentes radulares de larvas no estágio de véliger jovem irradiadas com a dose de 25 Gy e não irradiadas. Notam-se que os dentes das larvas irradiadas que conseguiram eclodir (figura 13 C) mostram alterações mais discretas do que os dentes de larvas que não conseguiram eclodir (figura 13 B); assemelhando-se aos dentes das larvas do grupo controle (figura 13 A).

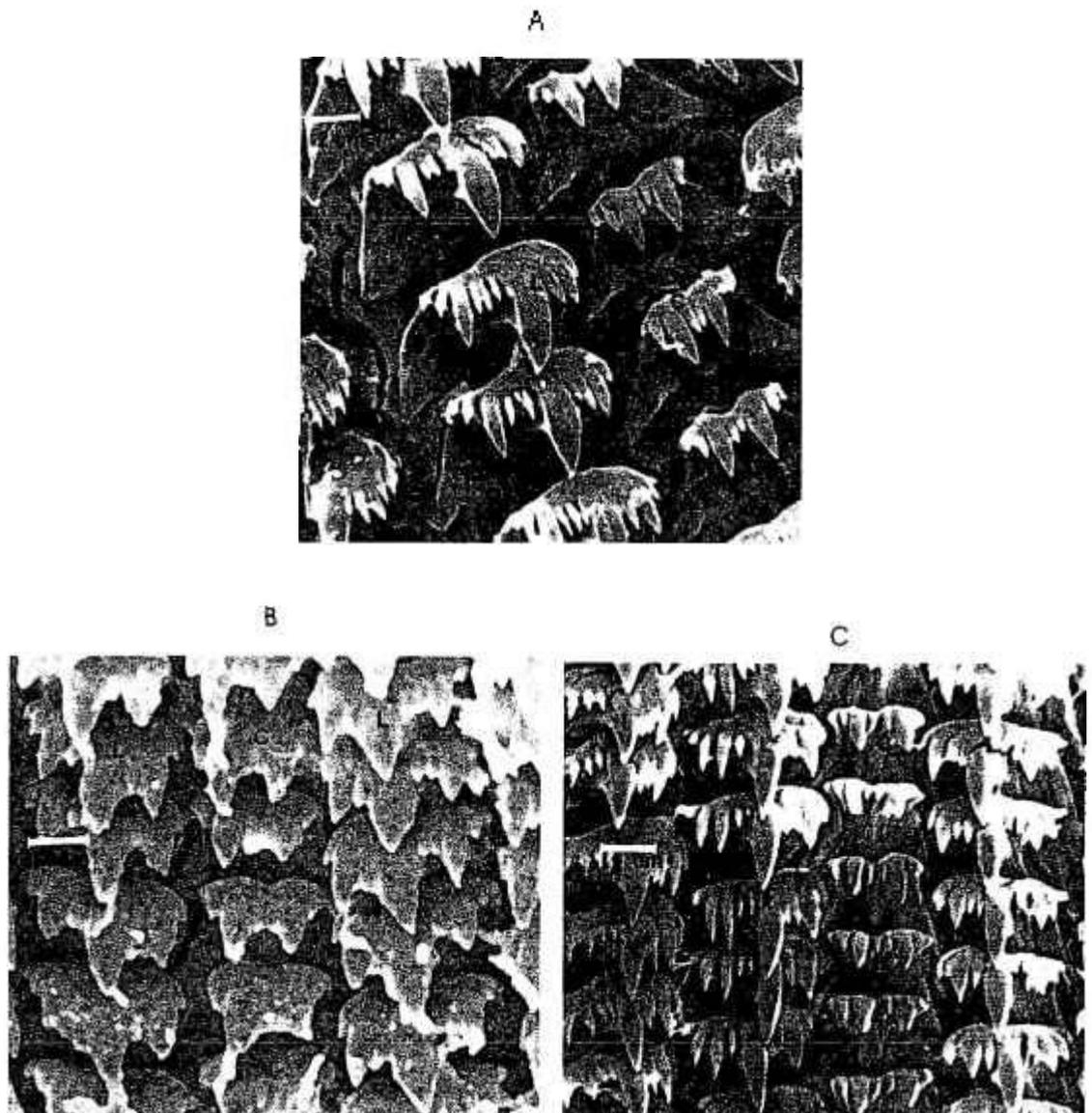


Figura 11- Eletromicrografias de rádulas de larvas de *B. glabrata*. A = larva não irradiada (controle); B=estádio de trocófora irradiada com 25 Gy; C = véliger jovem irradiada com 25 Gy; c = dente central; L = dente lateral; I = dente intermediário.

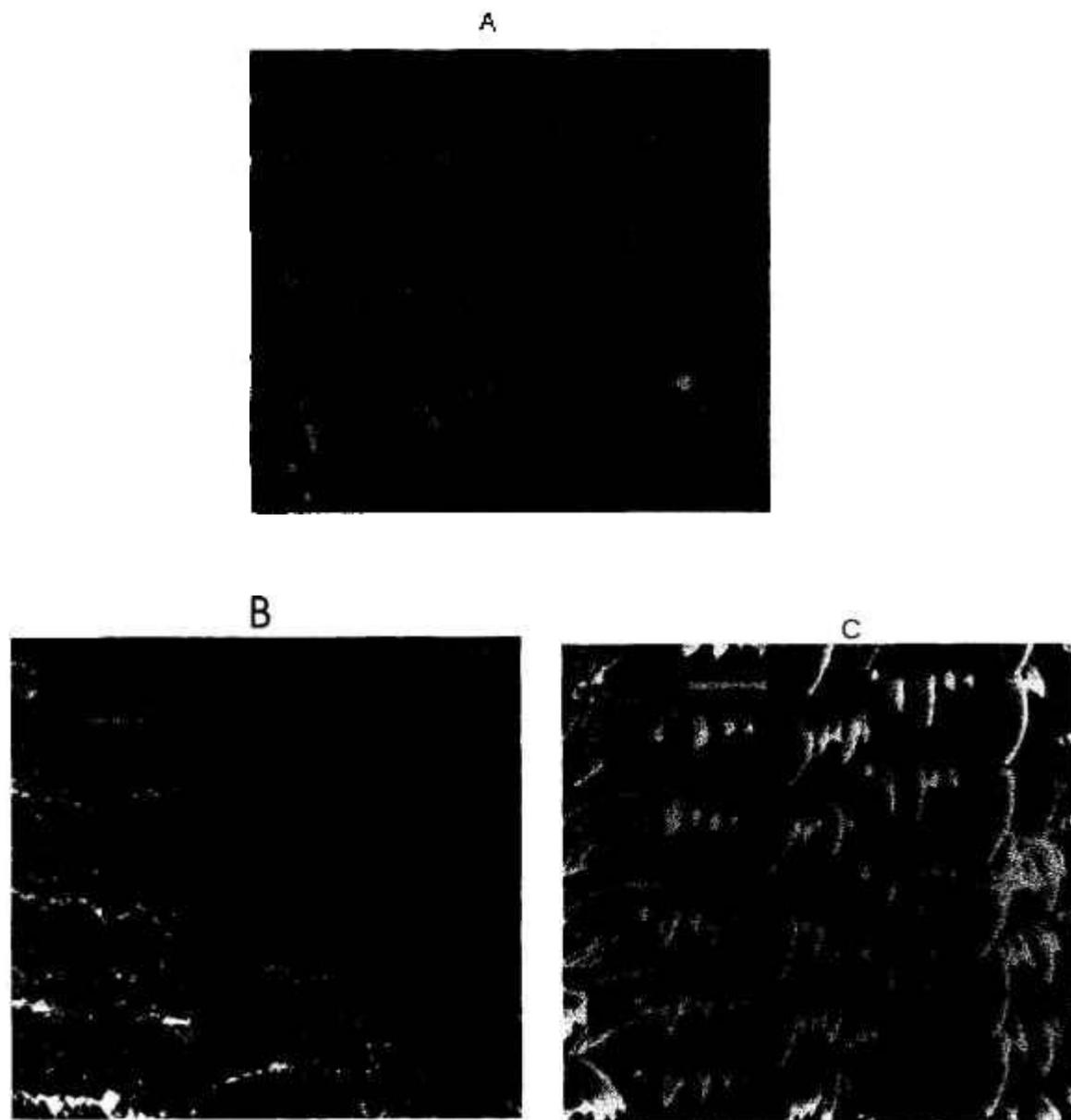


Figura 12- Eletromicrografias de rádulas de larvas de *B. glabrata*. A = não irradiada (controle); B=estádio de trocófora irradiada com 25 Gy; C = véliger jovem irradiada com 25 Gy; I = dente intermediário; M = dente marginal.

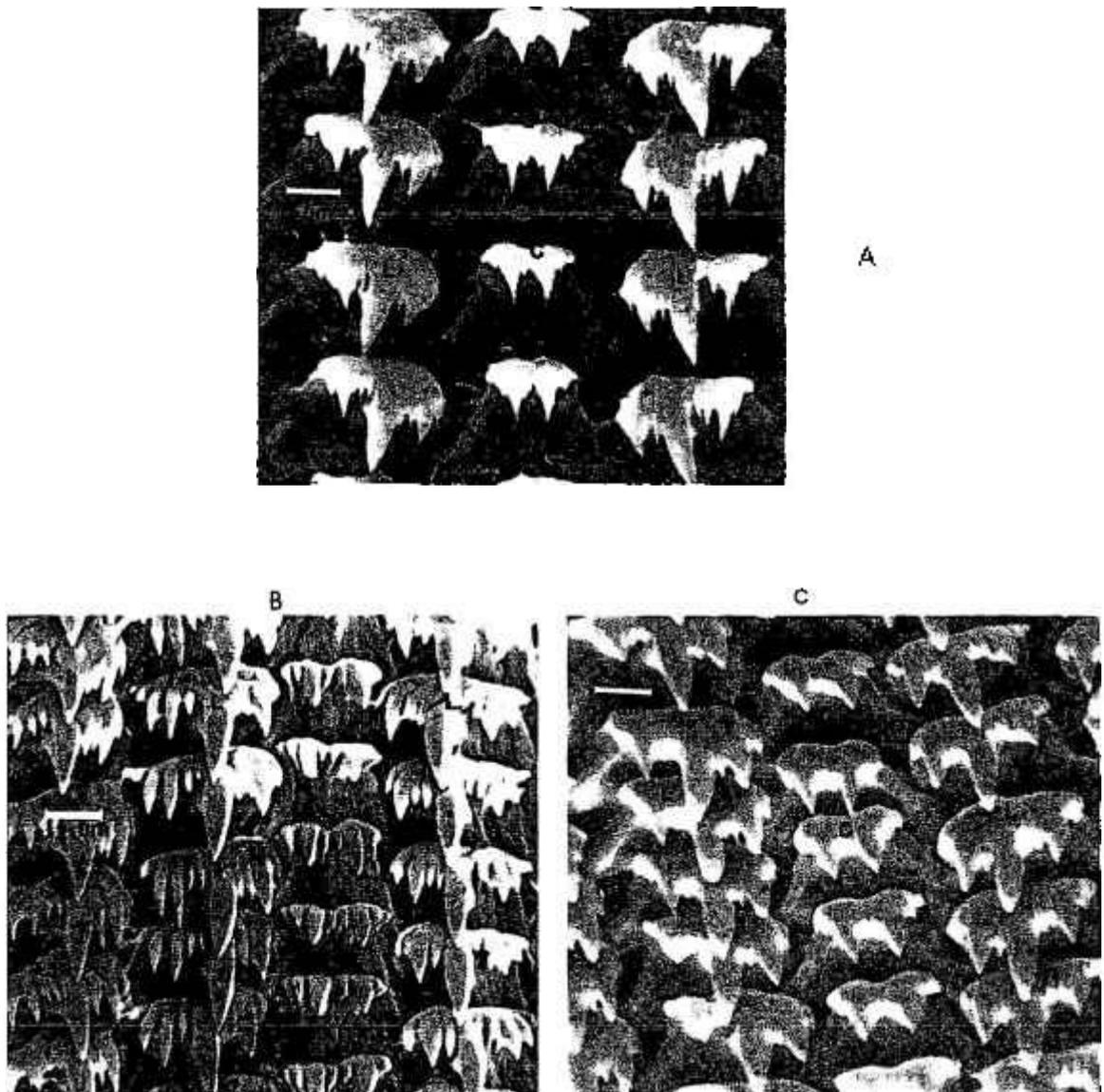


Figura 13- Eletromicrografias de rádulas larvais de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem. A = não irradiada (controle); B = irradiada com 25 Gy não eclodida; C = véliger jovem irradiada com 25 Gy eclodida; c = dente central; L = dente lateral; I = dente intermediário.

4.3 - Análise eletroforética das proteínas e detecção de atividade da proteinase das larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem

4.3.1 - Gel de poliacrilamida em presença de SDS

Na figura 14, podem-se verificar padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida-SDS de homogeneizado de larvas e do líquido perivitelínico de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas e não irradiadas.

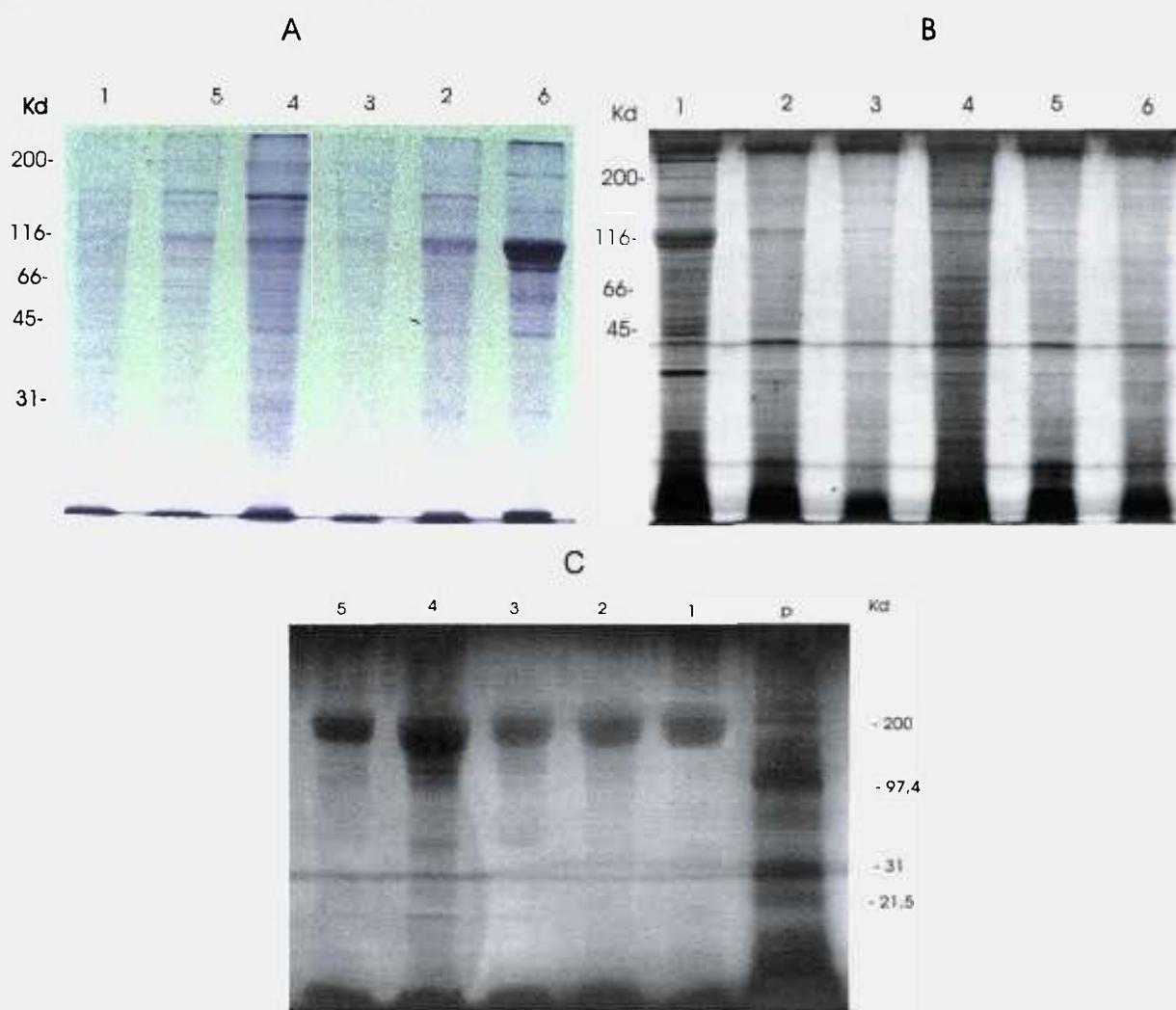


Figura 14 - Padrão eletroforético de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem não irradiado (controle) e irradiado com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy. 1 = véliger jovem (controle); 2 = véliger jovem irradiado com 20 Gy; 3 = véliger jovem irradiado com 25 Gy; 4 = véliger jovem irradiado com 30 Gy; 5 = véliger jovem irradiado com 35 Gy; 6 = estágio de hipo (controle). A = gel corado por azul de Coomassie; B = gel corado por nitrato de prata; C = gel de líquido vitelínico corado com nitrato de prata e escaneado. Kd = quilo dalton.

Evidencia-se a presença de proteínas com diferentes pesos moleculares: 200; 116; 97,5; 66,0; 45 e 21,5 Kd. Não foi observado formação de agregados, nem qualquer alteração nas bandas características, tanto no gel de proteínas totais quanto no líquido vitelínico.

4.3.2 - Gel de detecção da atividade de proteinase em SDS-PAGE

Na figura 15 pode-se visualizar a atividade da proteinase em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de gelatina copolimerizada, através da presença das bandas brancas sobre o fundo azul.

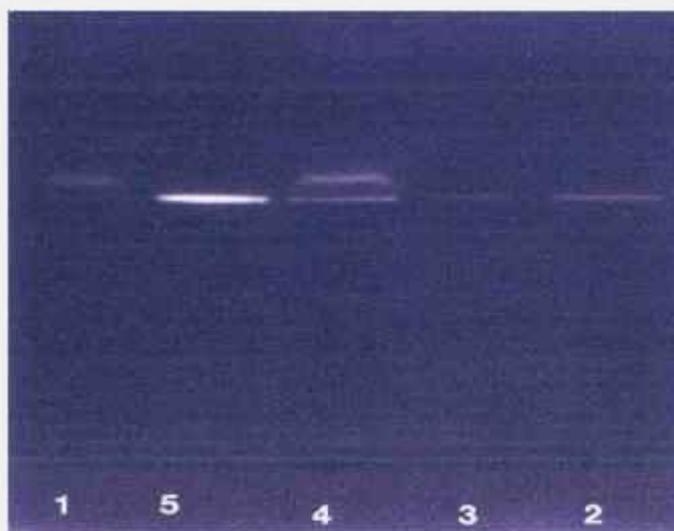


Figura 15- Gel de atividade da proteinase de larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem não irradiado (controle), e irradiado com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy. **1** = véliger jovem (controle); **2** = véliger jovem irradiado com 20 Gy; **3** = véliger jovem irradiado com 25 Gy; **4** = véliger jovem irradiado com 30 Gy; **5** = véliger jovem irradiado com 35 Gy. Gel corado por azul de Coomassie.

Nota-se um aumento quantitativo na atividade da proteinase à medida que a dose de radiação aumenta, ou seja, as bandas representativas das doses de 30 e 35 Gy apresentam-se mais intensas quando comparadas com as representativas das

doses de 20 e 25 Gy de radiação gama de ^{60}Co . A proteinase evidenciada possui peso molecular em torno de 20 Kd, similar ao peso da tripsina.

4.4- Análise do DNA genômico de larvas de *Biomphalaria glabrata*

Os DNAs de larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas com raios de ^{60}Co foram purificados e fracionados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %. Observou-se uma mancha continua (smear) com peso molecular inferior a 20 Kpb (quilos pares de bases), o que caracteriza uma grande quebra do DNA genômico (Figura 16).

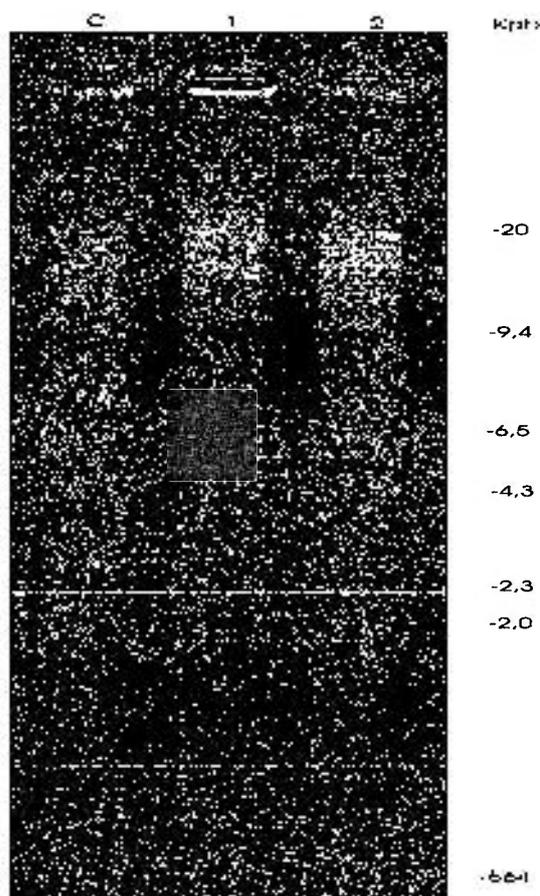


Figura 16 - Gel de agarose a 0,8% para detecção de alterações no DNA genômico de larvas de *B. glabrata* no estágio de véliger jovem irradiadas com 20 e 25 Gy de radiação gama de ^{60}Co . C= controle (não irradiado); 1 = larvas véliger jovem irradiadas com 20 Gy; 2 = larvas véliger jovem irradiadas com 25 Gy.

5 - DISCUSSÃO

Os estádios embrionários e larvais de peixes e moluscos, têm sido referidos pela sua elevada radiosensibilidade (SHIMA & SHIMADA, 1991; FRANTSEVICH et al., 1995; OKAZAKI et al., 1996). Essa característica torna esses organismos potencialmente atraentes como modelos experimentais para biomonitoração da radiação e de outros agentes mutagênicos em ambientes aquáticos. Moluscos da espécie *B. glabrata* são abundantes em diversas regiões do Brasil, reproduzindo-se intensamente em coleções de água doce, seu "habitat" natural, ou em condições laboratoriais. De interesse epidemiológico, esses moluscos integram o ciclo da esquistossomose mansônica como principais hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, assim, ampliar o conhecimento da sua biologia nas diferentes fases do seu desenvolvimento é de grande valia.

Esse trabalho, propôs-se a avaliar a radiosensibilidade das larvas de *B. glabrata* por meio dos parâmetros mortalidade, malformação e eclosão, visando a utilização deste molusco como indicador de contaminação por radiação em ecossistemas de água doce. Analisou-se também, os danos causados pela radiação na formação da rádula, das proteínas totais e proteinases das larvas de *B. glabrata* irradiadas com 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co , para verificar-se a influência destes parâmetros no bloqueio da eclosão.

Os resultados sugerem que *B. glabrata* é suficientemente sensível à radiação ionizante, e as alterações provocadas na formação da rádula podem estar envolvidas diretamente no bloqueio da eclosão das larvas irradiadas.

O parâmetro mortalidade tem sido sistematicamente utilizado na identificação do dano causado pela ação da radiação em moluscos, peixes, anfíbios e células de mamíferos (WOLSKY, 1982; OKAZAKI & KAWANO, 1989).

OKAZAKI et al. (1996) realizaram estudos com embriões de *B. glabrata* nos estádios de clivagem, gástrula, blástula, trocófora jovem e trocófora submetidos as doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama de ^{60}Co , e verificaram que o estágio de clivagem mostrou-se mais radiosensível, enquanto o estágio de trocófora apresentou-se mais resistente à radiação.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1966) verificou que as doses de raios X de 2000 até 4000 R causaram mortalidade total de embriões com 1 até 5 dias de idade, mostrando que os estádios de blástula, gástrula, trocófora jovem, trocófora e véliger jovem são radiosensíveis a doses altas de raios X. Estes experimentos levam a crer que a radiosensibilidade é diretamente ligada à idade do embrião e à dose de radiação aplicada.

No presente estudo, observou-se que o estágio de trocófora jovem foi o mais radiosensível, chegando a 100 % de mortes com a dose de 35 Gy. Seguido pelo estágio de trocófora com taxa de mortalidade de 40, 48% com a dose de 20 Gy e aproximadamente 90 % com a dose de 35 Gy ; véliger jovem apresentou uma frequência de mortos de 14,64% com a dose de 35 Gy. As larvas no estágio de véliger, de modo geral, apresentaram a maior radiorresistência, quando comparadas às larvas mais jovens. As diferenças observadas nas taxas de mortalidade com as doses de 20, 25 e 30 não foram altamente significantes. Provavelmente essas doses foram subletais para as larvas irradiadas no estágio de véliger jovem, já que apresentaram aumento na frequência de larvas aparentemente normais que não conseguiram eclodir. Portanto, os danos causados por estas doses de radiação podem estar diretamente ligados ao bloqueio da eclosão.

Estudos realizados por RAVEN (1958), MOOR (1983) e BATTENFELD et al. (1993) relatam que nos estádios de trocófora jovem e trocófora ocorre o início da organogênese com a separação dos três folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. O estágio de véliger apresenta concha, cabeça, coração e pé, bem desenvolvidos. De acordo com esses dados, sugere-se que paralelo ao desenvolvimento larval, ou seja, ao aumento progressivo na diferenciação celular

com a formação de tecidos e órgãos, ocorre um aumento da radiorresistência das larvas. Estes resultados corroboram os de BERGONIE & TRIBONDEAU (1906), que observaram que a radiosensibilidade das células e tecidos de mamíferos é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação. Algumas exceções a esta regra são conhecidas, porém estas observações têm sido confirmadas para a maioria dos sistemas biológicos.

Pesquisas realizadas com outras espécies de animais como peixes (HYODOTAGUCHI et al., 1973) insetos (VARANDA et al., 1985) e mamíferos (RUTLEDGE, 1997), verificaram que a radiosensibilidade é diretamente proporcional a dose de radiação aplicada e inversamente proporcional a idade do embrião, dados que corroboram os obtidos neste trabalho.

O valores estimados da DL_{50} permitem avaliar o potencial mutagênico da radiação ionizante ou de outros agentes xenobióticos. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1964 b, c) utilizando raios X em embriões de *B. glabrata* de diferentes idades, verificou que a $DL_{50(30 \text{ dias})}$ foi de 7,6 R para o estágio de trocófora; 7,5 R para véliger e 8,7 R para o estágio de hipo. OKAZAKI et al. (1996), encontraram valores de 11,5 Gy para a $DL_{50(15 \text{ dias})}$ de larvas de *B. glabrata* no estágio de trocófora jovem e 17,0 Gy para o estágio larval de trocófora. No presente trabalho, os valores estimados para a DL_{50} no oitavo dia após a irradiação mostram que os estádios de trocófora jovem (20,3) e trocófora (21,2) são aproximadamente 7 vezes mais radiosensíveis do que os estádios de véliger jovem (153,6) e véliger (148,7). Existe portanto uma diferença entre os valores das DL_{50} encontradas nos experimentos realizados por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1964 b, c), OKAZAKI et al. (1996) e os encontrados em neste trabalho. Essa diferença pode ter ocorrido devido aos métodos de análise, utilização de cepas mais radiorresistentes, diferentes taxas de dose e o tempo de observação escolhido por esses autores para a determinação da DL_{50} . Experimentos realizados por COOLEY & MILLER (1971), utilizando diferentes taxas de dose em molusco pulmonado *Physa heterostropha*, obtiveram danos significativamente diferentes, ou seja os moluscos expostos a alta

taxa de dose apresentaram maior dano quando comparados àqueles expostos a baixa taxa de dose. EGAMI & HAMA (1975) encontrou resultados semelhantes expondo embriões de peixes (*Oryzias latipes*) à dose de 2 kR de raios X, com diferentes taxas de dose (1,7 R/min; 33,3 ou 250 R/min). Os experimentos demonstraram que a inibição da eclosão dos embriões irradiados com alta taxa de dose (250 R/min) foi a mais alta, mostrando uma relação direta entre a taxa de dose e o dano biológico.

De modo geral, observou-se que a taxa de mortalidade de larvas de *B. glabrata* nos estádios de trocófora jovem e trocófora submetidas a diferentes doses de radiação gama de ^{60}Co é diretamente proporcional à dose de radiação aplicada e inversamente proporcional à idade da larva. O estágio de véliger apresentou baixas taxas de mortalidade, demonstrando assim sua maior radiorresistência.

Estudos realizados com embriões, larvas ou células de diferentes organismos expostos à radiação ionizante mostraram não apenas o aumento na taxa de mortalidade, mas também o aparecimento de malformações (WOLSKY, 1982; GILBERT, 1997).

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que a freqüência de larvas malformadas no estágio de trocófora jovem e trocófora foram as mais altas, com valores de 44,35% e 40,48% respectivamente, com a dose de 20 Gy. A redução nas freqüências de malformações com o aumento das doses de radiação nestes estádios, ocorreu devido à morte das larvas dentro dos ovos, dias após a irradiação, mostrando, maior radiosensibilidade das larvas no estágio de trocófora jovem. Com relação aos estádios de véliger jovem, o número de larvas malformadas foi significativamente mais alto que o do grupo controle, porém mais baixos que os observados nos estádios mais jovens.

O estágio de véliger apresentou freqüência de malformações mais alta que a do grupo controle, no entanto, na dose de 25 Gy foi a mais radiosensível. Nas doses de 30 e 35 Gy, a freqüência foi mais baixa, provavelmente, em virtude do aumento na taxa de larvas aparentemente normais, mas com bloqueio na eclosão.

De modo geral, observou-se que, para as larvas em estádios mais desenvolvidos, são necessárias doses mais altas de radiação para se observar o mesmo efeito ocorrido nos estádios mais jovens.

Verificou-se também que as larvas malformadas morreram dentro da cápsula do ovo. Isto sugere que as malformações induzidas pela radiação ionizante tornaram essas larvas incapazes de sobreviver. Por outro lado, as larvas que conseguiram eclodir não apresentavam malformações visíveis.

As malformações específicas como eversão do estomodéu, malformação cefálica do tipo monoftalmia e duplicação dos olhos, e malformação da concha, foram observadas em larvas submetidas à doses de radiação, sendo a ocorrência das mesmas dose-dependente.

Os estádios de trocófora e véliger jovem apresentaram uma maior frequência de malformações da concha. Entretanto, as malformações inespecíficas foram encontradas em todos os estádios larvais submetidos aos raios γ (gama).

As malformações presentes em larvas irradiadas, entretanto, não são específicas da ação da radiação. GEILENKIRCHEN (1961) encontrou essas mesmas malformações submetendo *Limnaea stagnalis* a cátions mono e divalentes (magnésio, cálcio, estrôncio e bário). VERDONK (1965) submeteu ovos de *Limnaea stagnalis* em diferentes etapas do desenvolvimento a diferentes concentrações de cloreto de lítio (2; 2,5; e $3,5 \times 10^{-5}$ M) e verificou que todas as concentrações utilizadas causaram malformações cefálicas, porém a incidência delas estava inversamente relacionada com a idade do embrião e diretamente proporcional a concentração de cloreto de lítio utilizada.

Outros autores submeteram os embriões de *B. glabrata* à ação de substâncias como cafeína (KAWANO et al. 1979; KAWANO, 1982 e KAWANO & SIMÕES, 1987) sulfato de nicotina (KAWANO et al., 1993) e avaliaram os efeitos morfogenéticos destas drogas sobre o desenvolvimento dos embriões, mostrando a presença de malformações semelhantes às encontradas em nossos experimentos.

OKAZAKI & KAWANO (1989) estudaram os efeitos morfogenéticos e citogenéticos da radiação gama de ^{60}Co em embriões no estágio de blástula e

encontraram malformações cefálicas, concha, exogástrula, eversão do estomodéu e uma maior frequência de malformações inespecíficas com as doses de 5, 10 e 15 Gy.

Trabalhos realizados por CAMEY & VERDONK (1970); KAWANO et al. (1992) e BATTENFELD et al. (1993) elucidaram alguns aspectos do desenvolvimento de *B. glabrata*.

O desenvolvimento de embriões de *B. glabrata* mantidos a temperatura de 25 °C, segundo KAWANO et al. (1992) apresentam as seguintes etapas:

Fertilização → **clivagem** → **blástula** (24 horas após a 1ª clivagem) → **gástrula** (26-34 horas após a 1ª clivagem) → **trocófora jovem** (43 horas após a 1ª clivagem) → **trocófora** (66 horas após a 1ª clivagem) → **véliger jovem** (96 horas após a 1ª clivagem) → **véliger** (120 horas após a 1ª clivagem) → **estádio de hipo** (144 horas após a 1ª clivagem) → **eclosão** (6 a 9 dias após a 1ª clivagem).

Os estádios de blástula e gástrula caracterizam-se principalmente pela formação dos três folhetos germinativos, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. O ectoderma é o responsável pela formação do epitélio externo de todo o corpo do molusco e do estomodeu; o endoderma reponsabiliza-se pela formação do estômago, tubo digestivo, glândulas digestivas e cavidade pulmonar; o mesoderma formará os vasos sanguíneos. Dados obtidos por OKAZAKI et al. (1996) submetendo embriões de *B. glabrata* nos estádios de clivagem, blástula e gástrula a doses de 5, 10 e 15 Gy de ⁶⁰Co, mostraram que estes estádios apresentaram uma alta radiosensibilidade, com índices muito altos de malformações e mortes embrionárias. WOLSKY (1982) no entanto verificou que, em anfíbios, os estádios iniciais mostraram-se menos sensíveis a radiação com relação aos estádios mais avançados.

Nesse trabalho, o estágio de trocófora jovem mostrou-se bastante radiosensível, provavelmente devido a intensa proliferação celular que ocorre nesse período.

As larvas no estágio de trocófora apresentam na região ventral o estomodeu que, juntamente com o velum, darão origem posteriormente, ao órgão locomotor do caramujo. Na região dorsal, por sua vez, encontra-se a glândula da concha e o coração. É neste estágio que se inicia a formação do saco radular e da massa bucal do molusco. Observou-se que em larvas submetidas à irradiação neste estágio apresentaram malformações do tipo eversão do estomodeu e malformação da concha e malformações inespecíficas. Estes dados corroboram os encontrados por OKAZAKI et al. (1996).

Nos estádios de véliger jovem e véliger, observou-se uma diminuição da frequência de malformações, quando comparada aos estádios mais jovens; o que pode ser em virtude de uma diferenciação celular mais intensa.

Portanto, sugere-se que as malformações específicas como as da concha, cabeça e eversão do estomodeu ocorreram devido a ação da radiação sobre as células responsáveis pela morfogênese destes órgãos. De fato, as malformações da concha e do estomodeu são mais freqüentes nos estádios de trocófora e véliger jovem, pois são nestes estádios que se encontram as células responsáveis pela formação destes órgãos. No entanto, estas malformações também ocorrem quando estádios mais precoces de desenvolvimento sofrem radiação, o que faz supor que a ação da radiação afeta as células precursoras desses órgãos; que são determinados desde as primeiras divisões celulares. Portanto, a incidência de tais malformações estar relacionada à dose de radiação e o estágio de desenvolvimento.

Possivelmente as malformações inespecíficas, presentes nas larvas de *B. glabrata* irradiadas, podem ser originárias da ação dos raios gama sobre as várias linhagens celulares ao mesmo tempo, provocando o retardo no crescimento de algumas células, enquanto que outras linhagens celulares não afetadas, desenvolvem-se normalmente, originando embriões completamente deformados. Esses dados foram previamente reportados por OKAZAKI et al. (1996).

Apesar dos vários estudos sobre as alterações morfogenéticas, os efeitos diretos dos agentes aplicados são pouco conhecidos. Sabe-se que a radiação ionizante pode agir sobre o ciclo celular, provocando um atraso ou até mesmo o seu bloqueio (GROSCH & HOPWOOD, 1979).

OKAZAKI & KAWANO (1989, 1991), analisando embriões de *B. glabrata* no estágio de blástula, irradiados com doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama de ^{60}Co , observaram que as frequências de aberrações cromossômicas estruturais aumentaram com o aumento da dose de radiação, encontrando valores de 18,6; 38,9 e 49,7%, respectivamente. Os dicêntricos e fragmentos acêntricos foram os tipos mais encontrados. Os autores sugeriram uma relação direta entre aberrações cromossômicas radioinduzidas e os efeitos morfogenéticos da radiação em embriões de *B. glabrata* no estágio de blástula.

MATSUDA et al. (1983, 1985) e REICHERT et al. (1984) observaram uma relação direta entre aberrações cromossômicas e embriões mortos de camundongos expostos aos raios X.

GILBERT (1997) afirmou que a radiação ionizante é um agente teratogênico em potencial, podendo provocar quebras cromossômicas e alterações estruturais na molécula de DNA de mamíferos, causando malformações fetais. Aberrações cromossômicas levando a malformações em peixes foram registradas por MCGREGOR & NEWCOMBE, 1972 e em anfíbios, répteis e mamíferos por RUGH, 1969; WOLSKY, 1982.

Com base nestas observações, verificou-se a ação da radiação sobre o DNA genômico de larvas no estágio de véliger jovem irradiados com 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co . Observou-se uma intensa fragmentação da molécula de DNA com o aumento da dose de radiação, quando comparado com o grupo de larvas não irradiadas. Esses resultados sugere uma relação direta entre danos ao DNA, malformações e mortes das larvas de *B. glabrata* submetidas a radiação gama de ^{60}Co no estágio de véliger jovem. Supõe-se que os estádios de trocófora jovem, trocófora e véliger apresentem comportamento similar. Nos experimentos realizados nesse trabalho utilizou-se o mesmo número de larvas e observou-se uma diminuição

na quantidade de DNA capturado com o aumento da dose de radiação, mostrando uma relação direta entre a dose de radiação aplicada e o dano à cadeia de DNA. Por esta razão não observou-se claramente os danos ao DNA genômico de larvas irradiadas com às doses 30 e 35 Gy. As larvas irradiadas com 20 e 25 Gy, por sua vez, apresentaram um aumento do dano em função da dose de radiação. Dados semelhantes foram encontrados por ZHOU et al. (1997) irradiando células de carcinoma cervical humano, com doses de 2,4, 6, 8, 10, 14, 20, 50 Gy de raios gama de ^{137}Cs , verificando que a frequência de dano ao DNA foi diretamente proporcional às doses aplicadas. AGER et al. (1990) comprovaram a eficácia do método de eletroforese ao detectar danos no DNA de células de mamíferos expostas à radiação ionizante. WURM et al. 1994; DAHM-DAPHI & DIKOMEY, 1995; FORAY et al., 1995 verificaram os danos causados pela radiação ionizante na cadeia de DNA das células, utilizando a técnica de análise do DNA.

A radiação ionizante agiu sobre os organismos causando malformação e morte; por outro lado, embriões e larvas de *B. glabrata* submetidos a radiação apresentaram também alterações na frequência de eclosão. (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1964 a).

OKAZAKI et al. (1996), verificaram que larvas de *B. glabrata* no estágio de trocófora apresentaram taxa de eclosão de 1,90 e 3,20% com as dose de 20 e 25 Gy, respectivamente. Nos experimentos aqui realizados, as larvas nos estádios de trocófora jovem e trocófora mostraram ser mais radiosensíveis, já que nesses casos nenhuma eclosão foi observada após a irradiação. Esta diferença de resultados pode ter ocorrido devido às diferentes condições de irradiação, ou seja, OKAZAKI et al.(1996) utilizaram uma fonte gamma-cell de ^{60}Co com taxa de dose de 136 Gy/h, enquanto que nos experimentos aqui citados foram realizados numa fonte tipo panorâmica de ^{60}Co , com taxa de dose de 311 Gy/h. Segundo MCNALLY (1982); EGAMI & HAMA (1975); a taxa de dose é um importante modificador dos efeitos da radiação em sistemas biológicos. Portanto organismos expostos a taxas de dose mais altas apresentam danos mais evidentes.

Véliger jovem apresentou um percentual de 23,75% de larvas eclodidas com a dose de 20 Gy, decrescendo significativamente com as demais doses. As larvas no estágio de véliger apresentaram os maiores índices de eclosão, quando comparados com os estádios mais jovens (58,87% - 20 GY e 44,81% com a dose de 35 GY).

Os resultados obtidos, neste trabalho, mostra que as frequências de eclosões das larvas de *Biomphalaria glabrata* submetidas aos raios γ de ^{60}Co são diretamente proporcionais à idade da larva e inversamente proporcionais à dose de radiação aplicada.

Outro aspecto observado foi a ocorrência de um considerável atraso no desenvolvimento das larvas irradiadas, com conseqüente atraso na sua eclosão. A eclosão das larvas não irradiadas de uma mesma desova, raramente ocorre simultaneamente, variando de 1 até 3 dias da primeira até a última eclosão (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1966). O tempo das larvas irradiadas foi semelhante ao das larvas controle, ou seja, em torno de 4 dias desde a primeira até a última eclosão. No entanto, a eclosão das larvas irradiadas sofreu um atraso de 3 a 4 dias após o início da eclosão do grupo controle. Foi constatado que, após o período de oito dias de observações das desovas irradiadas, as larvas que não eclodiram durante este período acabaram morrendo no período de 15 a 20 dias após a irradiação. Estes dados corroboram os obtidos por OKAZAKI & KAWANO (1989), porém diferem das observações realizadas por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ(1964 b, 1966) em embriões de *B. glabrata* submetidos a raios X. Esse autor verificou que a eclosão ocorreu cerca de 20 a 29 dias após a irradiação. Sugere-se que esta diferença tenha ocorrido por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ utilizar uma cepa mais resistente de *Australorbis glabratus* (*Biomphalaria glabrata*), originária de um cruzamento de *B. glabrata* de Porto Rico com *B. glabrata* do Brasil. Um outro aspecto a ser levado em consideração é a temperatura, pois embriões de *B. glabrata* não irradiados mantidos a temperatura de 25 °C, eclodem entre o 6° e 8° dias após a primeira clivagem (PARAENSE, 1970; OKAZAKI & KAWANO, 1991; KAWANO, 1992). PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & BERRY (1964) encontraram um período de desenvolvimento em torno de 9 a 11 dias, porém a temperatura

utilizada no experimento não foi mencionada. Sabe-se que temperaturas mais altas do que 28 °C aceleram o desenvolvimento embrionário enquanto que o inverso ocorre com temperaturas mais baixas (22 °C) (BARBOSA et al., 1987). A taxa de dose também participa de alterações na taxa de eclosão. Com bases nessas observações, sugere-se que as diferentes condições experimentais pelas quais os animais foram submetidos possam estar envolvidas com as diferenças no tempo de eclosão obtidas por esses autores e os dados obtidos nesse trabalho.

O atraso na eclosão de ovos expostos às doses de radiação ainda não foi bem elucidado, este fenômeno também foi observado por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1966).

KAWANO et al. (1993), observou que as freqüências de eclosões de embriões de *B. glabrata* expostos a concentrações de 40 e 80 ppm de sulfato de nicotina não apresentaram diferença significativa na taxa de eclosão em relação ao controle. Porém com o aumento da concentração para 120 ppm observou-se um atraso na eclosão das desovas tratadas em relação ao grupo controle.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & BERRY(1964) e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1966) observando embriões de 1 até 10 dias de idade e irradiados com doses de raios X de 2.000 até 40.000r, verificaram que a eclosão dependeu da dose aplicada e da idade dos moluscos. Embriões de 4 a 5 dias de idade submetidos a dose de 2.000r apresentaram 72% de eclosão diferindo, significativamente da dose de 3.000r com 24 % de eclosão para a mesma idade. Estes dados corroboram os observados nesse trabalho.

HYODO-TAGUCHI et al. (1973); EGAMI & HAMA (1975) e SHIMADA et al. (1985), trabalhando com peixes (*Oryzias latipes*) submetidos à radiação ionizante, verificaram que a taxa de eclosão foi diretamente proporcional à idade do embrião e inversamente proporcional à dose de radiação aplicada. Dados semelhantes foram obtidos em experimentos com larvas de *B. glabrata* no presente trabalho.

Observando as larvas nos estádios de trocófora, véliger jovem e véliger irradiadas, notou-se o aparecimento de um grupo de larvas que não eclodiam, apesar de apresentarem aspecto normal semelhante ao do grupo controle. Larvas

no estágio de véliger jovem submetidas à dose de 25 Gy apresentou a maior frequência de larvas nestas condições (86,79%), e no estágio de trocófora submetida à dose de 20 Gy (18,90). O estágio de véliger apresentou uma menor frequência de larvas aparentemente normais com relação ao estágio de véliger jovem. Portanto, o estágio mais susceptível a este dano causado por ação da radiação foi o estágio de véliger jovem. Provavelmente, a radiação atingiu algumas estruturas responsáveis pela eclosão das larvas de *B. glabrata*. Estes dados foram previamente reportados por OKAZAKI et al. (1996) para o estágio de trocófora irradiada com a dose de 20 Gy e por MELO (1994) em *B. straminea* irradiados com doses de 2,5 a 80 Gy de radiação gama de ^{60}Co .

Esses resultados conduziram à investigação dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre as supostas estruturas envolvidas no mecanismo de eclosão dos moluscos *B. glabrata*, ou seja, a rádula ou possíveis enzimas envolvidas na digestão das membranas dos ovos (REY, 1956, GERAERT & JOOSSE, 1984 e BRAMACHARY, 1983).

A análise da rádula foi realizada em larvas de *B. glabrata* irradiadas e não irradiadas nos estágios de trocófora e véliger jovem.

Como mostra a figura 10, a rádula de larva de *B. glabrata* no estágio de hipo não irradiada, mostra-se como uma fita alongada e revestida de numerosos dentes em forma de ganchos com pontas dirigidas para trás. Os dentes microscópicos dispõem-se em fileiras transversais em ordem regular, apresentando perfeita simetria bilateral. Nota-se que cada fileira transversal apresenta um dente central. Contíguos a ele estão os dentes laterais, intermediários e marginais, somando um total de 4 dentes de cada lado do dente central. PARAENSE (1970) observou que a fórmula radular encontrada em adultos de *B. glabrata* com 20 mm de diâmetro foi de 35-1-35, ou seja, em uma fileira transversal existe 35 dentes de cada lado do dente central totalizando 70 dentes em uma única fileira transversal. Este dado difere dos encontrados em larvas de *B. glabrata* no estágio de hipo. Entretanto segundo PARAENSE (1970) a fórmula radular varia com o tamanho do animal. Portanto esta diferença é totalmente justificada, já que a larva de *B. glabrata* no estágio de hipo

apresenta 0,7 a 1 mm de diâmetro. Na literatura especializada nenhum dado foi encontrado sobre rádula de larvas de molusco.

A ação da radiação γ de ^{60}Co sobre as rádulas das larvas de *B. glabrata* nos estádios de trocófora e véliger jovem que não eclodiram oito dias após a irradiação podem ser observadas nas figuras 11, 12 e 13. Verificam-se alterações na morfologia dos dentes da rádula de larvas irradiadas, quando comparadas ao grupo controle. Cada fileira transversal da rádula de *B. glabrata* não irradiada, apresentou o dente central com duas cúspides triangulares e pontiagudas; os dentes laterais com 3 cúspides bem pronunciadas, ladeadas por cúspides menores. Os dentes intermediários apresentaram uma cúspide bem acentuada (mesocone) ladeado por pequenas cúspides, enquanto que os dentes marginais apresentaram aspectos serrilhados. Entretanto, os dentes das rádulas de larvas de *B. glabrata* irradiadas apresentaram todas as cúspides dos dentes centrais, laterais, intermediários e marginais com aspecto rombudo.

As rádulas dos grupos controle assemelham-se às rádulas de *B. glabrata* adultos normais, com exceção dos dentes laterais. Esses apresentaram um número maior de pequenas cúspides, quando comparados com os observados por PARAENSE (1970) e REY (1972) que registraram apenas 3 cúspides. Sugere-se que esta diferença ocorreu devido ao fato da larva estar ainda em desenvolvimento, antes da eclosão, tornando-se difícil a comparação com indivíduos adultos, já que nenhum dado sobre rádula de larva de molusco foi encontrado na bibliografia.

PARAENSE(1970) observou alterações morfológicas em dentes situados na porção anterior da rádula de adultos de *B. glabrata* normais. Entretanto, estas modificações são esperadas, já que esta estrutura funciona como órgão raspador de alimento. Assim, devido ao uso, apresentam as cúspides desgastadas com aspecto rombo. Estes dentes por sua vez, são eliminados e com o crescimento da rádula novos dentes são colocados em uso. Experimentos realizados por JENSEN (1993) evidenciaram que os dentes radulares de *Sacoglossa* (Mollusca: Opisthobranchia) sofrem alterações morfológicas de acordo com a planta usada na dieta.

Entretanto, no presente estudo, praticamente todos os dentes da rádula de larvas irradiadas que não eclodiram até o oitavo dia de observação apresentaram alterações morfológicas, visíveis em eletromicrografias. A rádula é uma estrutura ectodérmica que se origina dos micrômeros dos segundo e terceiro quartetos que se diferenciam no estágio de trocófora e véliger jovem (CAMEY, 1968; BATTENFELD et al., 1993). Portanto, as alterações morfológicas observadas nos dentes das rádulas de larvas irradiadas nestes estádios, devem-se a danos causadas pela ação da radiação ionizante sobre as células responsáveis pela morfogênese deste órgão. As alterações mais acentuadas encontradas no estágio de trocófora devem-se à ação da radiação sobre as células em intensa proliferação celular responsáveis pela formação da rádula.

Comparando-se larvas irradiadas com a dose de 25 Gy no estágio de véliger jovem que não eclodiram, com as larvas no mesmo estágio submetidas à mesma dose de radiação e que conseguiram eclodir, verifica-se que as larvas não eclodidas apresentaram malformações significativas quando comparadas ao controle. Além disso, as larvas irradiadas que conseguiram eclodir, apresentaram aspectos radulares semelhantes ao do grupo controle. Estes resultados fornece evidência de que a rádula participa diretamente da eclosão das larvas de *Biomphalaria glabrata*.

Resultados obtidos até o momento não excluem a possibilidade de uma intermediação enzimática presente no mecanismo de eclosão. Para investigar esta possível participação, realizou-se ensaios eletroforéticos das proteínas totais das larvas irradiadas e não irradiadas.

A eletroforese em presença de SDS (SDS-PAGE) é um método rápido para a quantificação, comparação e caracterização de proteínas. Este método separa proteínas baseado no seu peso molecular (LAEMMLI, 1970). Esperava-se que essa técnica fosse capaz de detectar modificações ou desaparecimento de algumas proteínas. Estas alterações estariam associadas ao bloqueio da eclosão das larvas irradiadas juntamente com a rádula.

Os resultados mostraram que a mobilidade das proteínas de larvas no estágio de véliger jovem irradiadas com 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co e não

irradiadas (controle) não apresentaram qualquer alteração nas bandas características.

A eletroforese, portanto, não se mostrou um método radiosensível para detecção de alterações protéicas em homogenados de larvas de *B.glabrata* irradiadas com as doses de 20, 25, 30 e 35 Gy. Isto pode ter ocorrido devido a grande quantidade de proteínas existente nas amostras, sendo necessário a utilização de técnicas mais sofisticadas para identificação de possíveis alterações estruturais e moleculares das proteínas irradiadas, como por exemplo, marcadores específicos para as proteínas modificadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por MASCARA & MORGANTE (1995) com *Biomphalaria tenagophila* resistente e susceptível à infecção por *S. mansoni*. Homogenados de *B. tenagophila* adultos foram submetidos à eletroforese na presença de SDS, para a diferenciação entre as duas linhagens. No entanto este método mostrou-se insuficiente para identificar as características específicas das linhagens.

No entanto, a técnica de eletroforese de proteínas total foi utilizada com sucesso por HENRIKSEN & JELNES (1980) e NAGDY et al., 1994 na caracterização da relação parasito hospedeiro, bem como para auxiliar na taxonomia das espécies.

Outra técnica de eletroforese foi utilizada, no presente estudo, com o objetivo de elucidar a participação de enzimas proteolíticas na eclosão de larvas de *B. glabrata*. A técnica de eletroforese na presença de SDS e gelatina copolimerizada foi utilizada para detecção de diferentes atividades de proteinase das amostras. Para isso, foram escolhidas larvas no estágio de véliger jovem, que não eclodiram oito dias após a irradiação, mas que apresentavam-se aparentemente normais e larvas não irradiadas no estágio de hipo, com aspectos do desenvolvimento semelhante aos irradiados. A atividade da proteinase aumentou com o aumento da dose de radiação, porém, não diferiu do grupo controle quanto a mobilidade no gel, com as bandas localizando-se nas mesmas posições. A principal banda de proteinase presente no gel, tem peso molecular de 20 K dalton, semelhante ao da tripsina.

Atividades proteolíticas são estudadas em parasitas, onde estas enzimas estão envolvidas na digestão de peptídios, auxiliando a penetração destes parasitas em células e na migração entre os tecidos do hospedeiro. *Schistosoma mansoni*, por exemplo, produz enzimas com atividades proteolíticas que facilitam sua entrada nos tecidos do hospedeiro intermediário (BONGERTZ & HUGERER, 1978). *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* também apresentam proteinases com funções específicas (ALFIERI et al., 1989, 1991 e YOKOYAMA-YASUNAKA et al. 1994). Estes resultados comprovam a existência de proteínase em outros organismos, porém com funções diferentes das encontradas nos experimentos do presente estudo.

Estudos realizados com proteínas totais de *Biomphalaria alexandrina* nativas irradiadas com raios γ , demonstraram um aumento da porcentagem de proteínas com o aumento da dose de radiação, ou seja com as doses de 100, 150 e 200 Gy foram encontradas 56,52; 58,60 e 60,53 % de concentrações proteicas, respectivamente (NABIH & SOLIMAN, 1986).

No presente estudo, a eletroforese de detecção da atividade de proteinase foi capaz de identificar um aumento da quantidade de enzimas nas doses de 30 e 35 Gy. Esses resultados, no entanto, indicam que o aumento da produção de proteinase pode estar relacionado com a necessidade de eliminação de células mortas, decorrentes da radiação.

Enzimas de eclosão, por sua vez, foram caracterizadas em organismos como peixes (YAMAGAMI, 1970, 1972; ISHIDA, 1944) e helmintos (ROGERS, 1973). Essas enzimas são produzidas por glândulas específicas desenvolvidas nos últimos estádios embrionários. Na bibliografia não encontraram-se dados referentes a glândulas específicas na produção de enzimas de eclosão em *B. glabrata*. No entanto, esse molusco possui um grande número de enzimas produzidas por glândulas digestivas como a esterase não específica, fosfatase ácida, transferase amino aspartática, transaminase glutamato-oxalacetato e desidrogenase α -glicerofosfatase que auxiliam a caracterização bioquímica da relação parasito-

hospedeiro (NABIH & ANSARY, 1981; ROLLINSON, 1985; NABIH et al., 1989; NAGDY et al., 1994; BANDONI et al., 1995; MASCARA & MORGANTE, 1991; 1995).

BRAMACHARY (1983) sugere a existência de enzimas envolvidas na eclosão de planorbídeos. De acordo com os resultados aqui apresentados, as larvas de *B. glabrata* não apresentaram atividades proteolíticas ligadas a digestão da cápsula do ovo, pois tanto em larvas irradiadas que não eclodiram quanto as não irradiadas eclodidas, não apresentaram modificações nos seus padrões eletroforéticos de proteínas e enzimas.

6 - CONCLUSÕES:

Os dados obtidos com a irradiação de larvas de *Biomphalaria glabrata* nos estádios de trocófora jovem, trocófora, véliger jovem e véliger com as doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co (311 Gy/h), permitiu concluir que:

- A radiosensibilidade das larvas de *B. glabrata* foi diretamente proporcional a dose de radiação aplicada e inversamente proporcional ao estágio do desenvolvimento larval, isso porque :
 - A taxa de mortalidade foi mais alta no estágio de trocófora jovem;
 - As malformações foram mais intensas no estágio de trocófora;
 - O bloqueio da eclosão foi evidente no estágio de véliger jovem;
 - O estágio de véliger mostrou-se mais radiorresistente com relação a todos os parâmetros analisados;
- As modificações estruturais da rádula induzidas pela radiação ionizante durante a sua formação pode ter sido uma das causas da inibição da eclosão das larvas de *Biomphalaria glabrata*.
- Os parâmetros mortalidade, malformações, eclosão e alterações na rádula de populações naturais de *B. glabrata* podem ser usados como indicadores da ocorrência no ambiente de poluição por radiação ionizante;
- A eletroforese não foi um teste adequado para se detectar alterações nos padrões proteicos de larvas irradiadas com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co .
- O aumento da atividade de proteinases decorrentes da irradiação das larvas pode estar envolvido com a eliminação de células danificadas pela ação da radiação ionizante.
- O dano ao DNA genômico das larvas de *B. glabrata* irradiadas com doses de 20, 25, 30 e 35 Gy de radiação gama de ^{60}Co foi dose-dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGER, D. D., DEWEY, W. C. , GARDINER, K., HARVEY, W., JOHNSON, R. T. & WALDERN, C. A. Measurement of radiation-induced DNA double-strand breaks by pulse-field gel electrophoresis. **Radiat Res**, 122: 181-187, 1990.
- ALFIERI, S.C. ; SHAW, E.; ZILBERFARB, V. & RABINOVITCH, M. *Leishmania amazonensis*: Involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by l-leucine methyl ester. **Exp Parasitol** 68: 423-431. 1989
- ALFIERI, S.C.; PRAL, E.M.F.; SHAW, E. ; RAMAZEILLES, C. & RABINOVITCH, M. *Leishmania amazonensis* : Specific labeling of amastigote cysteine proteinases by radiodinated N-Benzyloxycarbonyl-tyrosyl-alanyl diazomethane. **Exp Parasitol** 73: 424-432, 1991.
- ANDRADE, R. M. Alguns dados hidroquímicos de criadouros de planorbídeos no Distrito Federal. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, 6(4):1954.
- BANDONI, S.M.; MULVEY, M. & LOKER, E.S. Intraspecific and interspecific patterns of allozyme variation among species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae). **Biochem Syst Ecol**, 23, (3): 593-616, 1995.
- BARBOSA, N. D. C.; PIMENTEL-SOUZA, F.; & SAMPAIO, I. B. M. The effect of seasonal, temperature and experimental illumination on reproductive rate in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Braz J Med Biol Res**, 20: 685-96, 1987.

- BARISH, R. J. Basic Physics. In: PIZZARELLO, D. J. **Radiat Biol.** CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1982.
- BATTENFELD, C.; BIELEFELD, U.; BECKER, W. & BRETTING, H. Light and electronmicroscopical studies on the embryonic development of the snail *Biomphalaria glabrata* (SAY). **Zool. Jb. Anat.** 123: 245-271, 1993.
- BEIGUELMAN, B. Teste do qui-quadrado, cap. 3. In: Curso prático de bioestatística. Publicado pela **Rev Bras Genet**, Ribeirão Preto - SP, Brasil, pp. 59-93, 1988.
- BERGONIÉ, J. & TRIBONDEAU L. Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. **Radiat Res**, 11: 587-588, 1906.
- BOLLAG, D. M. & EDELSTEIN, S. J. Gel electrophoresis under denaturing conditions. BOLLAG, D. M. & EDELSTEIN, S. J. in: **Protein Methods**; Third printing, New York, Wiley-Liss, 1992, 95-142.
- BONGERTZ, V. & HUGERER, K.D. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. **Exp Parasitol**, 45: 8-18, 1978.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976.
- BRAHMACHARY, R.L. Mollusca. Fertilization, development and parental care. In: Adiyodi, K. G. & Adiyodi, R. G. Eds. **Reproductive Biology of Invertebrates**. Chichester, Wiley, 1983. (In press) apud Geraerts, W.P.M & Josse, J. Freshwater snail (Basommatophora). In Tompa, A.S.; Verdonk, N. H.; Biggelaar, J. A. M. Van den, eds. **Reproduction. Vol. 7; The Mollusca**. New York, Academic.

- BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis glabratus*, host intermediaire de *Schistosoma mansoni*. **An Parasitol Hum Comp**, 18(1/3):9-45, 1941.
- BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radiat Phys Chem**, 24 (3/4): 273-282, 1984.
- CAMEY, T. Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PhD thesis**, Faculdade de Filosofia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, 1968.
- CAMEY, T. & VERDONK, N.H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. **Neth J Zool**, 20 (1): 93-121, 1970.
- COLLIER, J.R. Gastropods, the snails. In: Scott, F. Gilbert & Anne M. Raunio. Ed **Embriology: Constructing the organism** . Printed in Canada Copyright. 1997 by Siwaver Associates. pag. 189-217.
- COOLEY, J.L. & MILLER, F. L. Effects of chronic irradiation on laboratory populations of the aquatic snail *Physa heterostropha*. **Radiat Res**, 47 : 716-24, 1971.
- DAHM-DAPHI, J. & DIKOMEY, E. Separation of DNA fragments induced by ionizing irradiation using a graded-field electrophoresis. **Int J Radiat Biol**, 67: 161-168, 1995.
- EGAMI, N. & HAMA, A. Dose-rate effects on the hatchability of irradiated embryos of the fish, *Oryzias latipes*. **Int J Radiat Biol**, 28 (3): 273-278, 1975.
- FARVAR, M. A. & CEMBER, H. Lethal effects of gamma radiation on the schistosoma larva caccier snail (*Australorbis glabratus*). **Am J Public Health** 56(11):2077-80, 1969.

- FORAY, N.; ARLET, C. F. & MALAISE, E. P., Dose-rate effect on induction and repair rate of radiation-induced DNA double-strand breaks in a normal and an ataxia telangiectasia human fibroblast cell line. **Biochimie**, 77: 900-905, 1995.
- FRANTSEVICH, 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**, 26(1):47-52, 1995.
- GEILENKIRCHEN, W. L. M. **Effects of mono and divalent cations on viability and oxygen uptake of eggs of *Limnaea stagnalis***. Uitgeversmaatschappij Neerlandia - Utrecht, 1961.
- GERAERTS, W.P.M. & JOOSSE, J. Freshwater snail (Basommatophora). Reproduction. In: Tompa A.S., Verdonk N. H. & Biggelaar J.A.M. van der (Editors), **The Mollusca**. Academic Press, New York, 1984.
- GILBERT, S. F. *Developmental Biology*. Cap. 21, Environmental regulation of animal development. pag. 805-41, 1997.
- GROSCH, D. S. & HOPWOOD, L. E. **Biological effects of radiations**. 2^o ed. New York, Academic, 1979.
- HANELT, B.; ADEMA, C. M.; MANSOUR, M.H. & LOKER, E.S. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. **J Parasitol**, 83(3): 387-94, 1997.
- HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies- a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbour, 1988.
- HENRIKSEN, U. B.; & JELNES, J.E. Experimental taxonomy of *biomphalaria* (Gastropoda: planorbidae). **J Chromatogr**, 188: 169-176, 1980.
- HYODO-TAGUCHI, Y.; ETOH, H. & EGAMI, N. RBE of fast neutrons for inhibition of hatchability in fish embryos irradiated at different developmental stages. **Radiat Res**, 53: 385-391, 1973.

- ISHIDA, J. Further studies on the hatching enzyme of the fresh-water fish, *Oryzias latipes*. **Annot Zool Jpn**, 22 (3): 155-164, 1944.
- IWANAGA, Y. Comparative studies of brazilian species of *Biomphalaria* snail by immunoelectrophoresis. **Venus Jap Jour Malac**, 51(4): 315-321, 1992.
- JELNES, J.E. Enzyme profiles of *Biomphalaria* and *Bulinus* species (Mollusca, Pulmonata). **Malacologia**, 22 (1-2): 45-47, 1982.
- JENSEN, K.R. Morphological adaptations and plasticity of radular teeth of the Sacoglossa (=Ascoglossa)(Mollusca: Opisthobranchia) in relation to their food plants. **Biol J Linn Soc**, 48: 135-155, 1993.
- KAWANO, T., CHAVES, W. R. & SIMÕES, L.C.G. Effects of caffeine on embryonic development of *Biomphalaria glabrata* . **Cienc Cult**, 31 (11): 1266-73, 1979.
- KAWANO, T. O efeito da radiação ionizante e da cafeína no desenvolvimento da *Biomphalaria glabrata* . **Cienc Cult**, 34 (4): 532-8, 1982.
- KAWANO, T. & SIMÕES, L.C.G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). **Proc K Ned Akad Wet Ser C Biol Med Sci**, 90:281-302.1987.
- KAWANO, T.; OKAZAKI, K. & RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. **Malacologia** 34 (1-2): 25-32, 1992.
- KAWANO, T; SIMÕES, L.C.G. & MARQUES, J. *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): efeitos morfogenéticos do sulfato de nicotina. **Rev Brasil Biol**, 53 (4): 539-547, 1993.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** 227: 680-685.

- LIARD, F. CHIRIBÓGA, J.; PELLEGRINO, J.; COLÓN, J. & SILVA, R. M. Effects of radiation on the reproductive potencial of *Biomphalaria glabrata*. **Rev Bras Pesqui Med Biol**, 1(3-4):157-67, 1968.
- MASCARA, D. & MORGANTE, J.S. Enzyme polymorphism and genetic structure of *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda, Planorbidae) populations: founder effect. **Rev Brasil Genet**, 14 (3): 631-644, 1991.
- MASCARA, D. & MORGANTE, J.S. Use of isozyme patterns in the identification of *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) and *B. occidentalis* (Paraense, 1981) (Gastropoda: Planorbidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 90 (3): 359-366, 1995.
- MATSUDA, Y., YAMADA, T., TOBARI, I. & OHKAWA, A. Preliminary study on chromosomal aberration in eggs of mice fertilized "in vitro" after X-irradiation. **Mutat Res**, 121: 125-30, 1983.
- MATSUDA, Y., TOBARI, I. & YAMADA, T. Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. II. Chromosome aberrations induced in mature oocytes and fertilized eggs at the pronuclear stage following X-irradiation. **Mutat Res.**, 151: 275-280, 1985.
- McGREGOR, J. F. & NEWCOMBE, H. B., Dose-response relationships for yields of major eye malformations following low doses of radiation to trout sperm. **Radiat Res**, 49:155-169, 1972.
- McNALLY, N.J. Cell survival . In: PIZZARELLO, D.J. **Radiat Biol**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1982, p. 27-67.
- MELO, A. M. M. A. Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co sobre fecundidade fertilidade, crescimento e sobrevivência de *Biomphalaria straminea* (DUNKER, 1848). **Tese de mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de Biofísica e Radiobiologia, 1994.

- MOOR, B. Organogenesis. In: VERDONK, N.H.; van den BIGGELAAR, J.A.M.; TOMPA, A.S., **The Mollusca, vol 3- development**, ed. Academic Press, New York, 1983.
- MOTTA, M. A. & MELO, A. M. M. A.. D150/30 of gamma ⁶⁰Co radiation on *Biomphalaria straminea* (DUNKER, 1848). **Bull Inst Malac Tokyo.**, 3(4):59-63, 1997 a.
- MOTTA, M.A. & MELO, A.M.M.A. Fecundity changes induced by low doses of gamma radiation on *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92 (4): 559-561, 1997 b.
- MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (SAY), a suitable organism for a biotest. **Environ Technol Lettr**, 8: 141-148, 1987.
- NABIH, I. & ANSARY, EL. Genetic studies on fresh water snails, specific intermediate hosts for schistosomiasis- IV. Gamma radiation as a physical mutagen on deoxyribonucleic acid 'DNA' in *Biomphalaria alexandrina* snails. **Cell Mol Biol**, 27 (2/3): 275-277, 1981.
- NABIH, I. & SOLIMAN, A.M. Studies on fresh water snails, specific intermediate hosts for schistosomiasis II- isolation of total proteins from native and irradiated snails. **Cell Mol Biol**, 32 (3): 315-317, 1986.
- NABIH, I.; SOLIMAN, A.M. & ABDEL-HAMID, A.Z. Studies on fresh water snails, specific intermediate hosts for schistosomiasis I- isolation of total lipids from native and irradiated snails. **Cell Mol Biol**, 35 (4): 373-377, 1989.
- NABIH, I. & ANSARY, EL. Variation of transaminases and lactate dehydrogenase in irradiated *Biomphalaria alexandrina* snails. **Cell Mol Biol**, 37 (4): 385-390, 1991.
- NAGDY, S.A. AL; MOHAMED, S.H. & FAWZI, S.M. Biochemical characterization of human schistosomes and their molluscan hosts by electrophoretic techniques. **Qatar Univ Sci J**, 14 (2): 238-248, 1994.

- OKAZAKI, K. Efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre o desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, pp. 149, 1988.
- OKAZAKI, K. & KAWANO, T. Morphogenetic and cytogenetic effects of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* embryos (Say, 1818). **Mem Inst Oswaldo Cruz, Suppl. I**, 84: 251, 1989.
- OKAZAKI, K. & KAWANO, T. Cytogenetic effects of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. **Caryologia**, 44 (2): 121-136, 1991.
- 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 Med Biol Res.**, 29(8), 1996.
- PARAENSE, W. L. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Academia Mineira de Medicina - Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. Belo Horizonte, MG, **Vol. 14 (Suppl. dos anais de 1983, 1984, 1986)**: 117-126.
- PARAENSE, W. L. & DESLANDES, N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 53: 87-103, 1955 a.
- PARAENSE, W.L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 53: 277-284, 1955 b.
- PARAENSE, W.L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A.S. **Esquistossomose mansoni**,. Editora da Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 1970.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & BERRY, E. G. Effects of ionizing radiation on *Australorbis glabratus* eggs. **Exp Parasitol**, 15:226-231, 1964.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Effect of radiation on the population kinetics of the snail *Australorbis glabratus*: age at exposure and the effects on reproduction. **Radiat Res**, 23:392-404, 1964 a.

- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Schistosomiasis: age of snail and susceptibility to X-irradiation. **Science**, 144:302-303, 1964 b.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Survival, growth and fecundity of *A. glabratus* snail developed from eggs exposed to ionizing radiation. **Exp Parasitol**, 15:232-251, 1964 c.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Estudo relativos aos efeitos da radiação ionizante sobre caramujo com vista ao combate a hospedeiro do *Schistosoma mansoni*. **Rev Bras Doenças Trop**, 28:139-152, 1966.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica - III. Helmintologia- Cap. 30- Planorbídeos hospedeiros do *S. mansoni***, 423-438, ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1977.
- RAVEN, C. P. **Morphogenesis: The Analysis of Molluscan Development**. Pergamon Press, London, 1958.
- REICHERT, W., BULSELMAIER, W. & VOGEL, F. Elimination of X-ray-induced chromosomal aberrations in the progeny of female mice. **Mutat Res** 139: 87-94, 1984.
- REY, L. **Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores de esquistossomose, sua importância em epidemiologia**. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.
- REY, L. **Parasitologia**. Molusco vetores de doenças. cap. 58 : 649-660. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1972.
- RICCARDI, N. & RAVERA, O. Unionidae (Molluscs, Lamellibranchiata) used as an environmental indicator of radioactive contamination from the Chernobyl accident. **Environ Technol Lett**, 10: 347-353, 1989.

- ROGERS, W.P. Exsheathment and hatching mechanisms in helminths. In: Soulsby E.J.L. ed. *Biology of Parasites*. New York, Academic 1966, apud BAIR, R.D. & ETGES, F.J. *Schistosoma mansoni*: factors affecting hatching of eggs. **Exp Parasitol**, 33: 155-167, 1973.
- ROLLINSON, D. Biochemical genetics in the study of schistosomes and their intermediate hosts. **Parasitology**, 27: 123-139, 1985.
- ROZEMBERG, B. Fecundidade comparada de *Biomphalaria straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Say, 1818) em laboratório, no decurso de um ano. **Tese de mestrado em Biologia**, Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ- Rio de Janeiro, 1989.
- RUGH, R. Chairman's remarks. in: **Radiation Biology of the fetal and juvenile mammals**. M. R. Sikov and D. D. Mahlum eds., Washington, D. C. , USAEC, 1969.
- RUTLEDGE, J. C. Developmental toxicity induced during early stages of *mammalian* embryogenesis. **Mutat Res**, 396(1-2): 113-27, 1997.
- SHIMA, A. & SHIMADA, A. Development of a possible nonmammalian test system for radiation-induced germ-cell mutagenesis using a fish the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Proc Natl Acad Sci USA**, 88(6): 2545-9, 1991.
- SHIMADA, Y.; EGAMI, N. & SHIMA, A. Effect of heat on radiosensitivity at different developmental stages of embryos of the fish *Oryzias latipes*. **Int J Radiat Biol**, 48 (4): 505-512, 1985.
- TUBIANA, M. & BERTIN, M. **Radiologia e radioterapia**. Rio de Janeiro. Universo da Ciência; Edições 70, Brasil, LTDA, 1989.
- VARANDA, E. A., TAKAHASHASHI, C.S. & SOARES, A. E. E. Effect of gamma radiation on eggs, larvae and pupae of *Melittobia hawaüensis* - detection of a body color mutation. **Rev Bras Genet**, 8 (3): 439-48, 1985.

- VERDONK, N.H. Morphogenesis of the head region in *Lymnaea stagnalis* L. **PhD thesis**, Utrecht, The Netherlands, 1965.
- WOLSKY, A. The effects of radiations on developmental processes. In: PIZZARELLO, D. J. **Radiation Biology**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1982, p. 149 - 184.
- WORD HEALTH ORGANIZATION - The control of schistosomiasis. **Tech Rep Ser**, 728, 1985.
- WURM, R. E., BURNETT, N. G., DUGGAL, N., YARNOLD, J. R. & PEACOCK, J. H. Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblast. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 30, 625-633, 1994.
- YAMAGAMI, K. A method for rapid and quantitative determination of the hatching enzyme (chorionase) activity of the medaka, *Oryzias latipes*. **Annot Zool Jpn**, 43 (1): 1-9, 1970.
- YAMAGAMI, K. Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost *Oryzias latipes*. **Dev Biol**, 29: 343-348, 1972.
- YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; PRAL, E.M.F.; OLIVEIRA Jr., O.C.; ALFIERI, S.C. & STOLF, A.M.S. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. **Acta Trop**, 57: 307-315, 1994.
- ZHOU, P.K.; HENDRY, J.H. & MARGISON, G.P. Comparative measurements of radiation-induced DNA double-strand breaks by graded voltage and pulsed-field gel electrophoresis. **Int J Radiat Biol**, 71 (1): 95-100, 1997.