

KAYO OKAZAKI

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE CO-60 SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DE Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do
título de DOUTOR EM CIÊNCIAS
na área de Biologia.

SÃO PAULO

1988

KAYO OKAZAKI

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE CO-60 SOBRE O DESENVOLVIMENTO

EMBRIONÁRIO DE Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS na Área de Biologia.

ORIENTADORA: DRA. TOSHIE KAWANO

São Paulo
1988

Este trabalho foi realizado
na Divisão de Radiobiologia,
Departamento de Aplicações
em Ciências Biológicas do
Instituto de Pesquisas Ener
géticas e Nucleares - Comis
são Nacional de Energia Nu
clear/São Paulo.

Aos meus filhos

TOKI e MASSA

dedicó esta tese.

À Dra. TOSHIE KAWANO, orientadora da presente tese que muito auxiliou em minha formação científica, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo estímulo constante, apoio e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, particularmente:

. À Direção do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, pela oportunidade e condições fornecidas para a realização deste trabalho;

. Ao Dr. José Roberto Rogero, chefe do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, que soube sempre apoiar e incentivar a elaboração desta tese, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado;

. À Dra. Nélida Lucia del Mastro, chefe da Divisão de Radiobiologia do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, pelas sugestões e estímulos constantes e amizade nos momentos difíceis;

. Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Gomes Simões, chefe do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela gentileza de nos ter pôsto à disposição as facilidades de seu Departamento durante o desenvolvimento desta tese;

. À Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay, do Serviço de Genética do Instituto Butantan, pela sua constante participa

ção, amizade, sugestões e inestimáveis auxílios prestados durante a realização deste trabalho;

. À Dra. Ângela M. Vianna Morgante e à Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pelas valiosas sugestões dadas para a feitura desta tese;

. Ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto, pela inestimável orientação prestada no tratamento estatístico dos dados;

. Ao Prof. Dr. Clóvis de Araujo Peres e Eduardo da Silva Ramos Mauro e Ernesto Miyakawa do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, pela análise estatística;

. Ao Prof. Warton Monteiro, da Universidade Federal de Brasília, pelas valiosas críticas e sugestões fornecidas;

. Ao Sr. Antonio Soares Gouvea, Chefe da Divisão de Apoio à Engenharia e Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, e à srta. Vanda Khatounian, pelo uso do computador e pelas ajudas prestadas durante a elaboração desta tese;

. Aos Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva e Dr. Casimiro Jaime A.S.Munita, pelas valiosas ajudas prestadas na irradiação dos materiais;

. Ao Sr. Anézio da Silva, que muito auxiliou na confecção das fotografias;

. À Sra. Mery P.Z.Igami e à Sra. Maria Tereza Z. Malavolta, da Divisão de Informação e Documentação Científicas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP, pela revisão das referências bibliográficas;

. Ao Prof. Rui Ribeiro Franco, chefe do Departamento de Documentação Científica e Formação de Recursos Humanos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN / SP, pela revisão do texto;

. À Mestre Olívia Kimiko Kikuchi e à Liliane Ré, cujo apoio e amizade foram muito importantes no desenvolvimento deste trabalho;

. Aos colegas da Divisão de Radiobiologia que me fizeram companhia tornando os momentos, mesmo os mais difíceis, agradáveis.

3.2.6. Índice Mitótico	41
3.2.7. Análise estatística	42
4. RESULTADOS	44
4.1. Análise da Radiossensibilidade de Embriões	44
4.1.1. Mortalidade	44
4.1.1.1. Curvas de sobrevivência	45
4.1.1.2. Estimativa da DL ₅₀	50
4.1.2. Malformações	51
4.1.3. Eclosão	60
4.2. Estimativa da Duração do Ciclo Celular	67
4.3. Análise Citogenética	69
4.4. Índice Mitótico	71
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	85
5.1. Análise da Radiossensibilidade	86
5.1.1. Mortalidade	86
5.1.2. Malformações	90
5.1.3. Eclosão	97
5.2. Análise Citogenética	104
6. SUMÁRIO	115
7. SUMMARY	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

1. INTRODUÇÃO

Os seres vivos estão, permanentemente, sujeitos à ação de vários tipos de radiações ionizantes, sejam de fonte natural ou artificial. Num sentido amplo, qualquer transferência de energia da radiação para os organismos vivos pode determinar um efeito biológico. As alterações físico-químicas decorrentes da ionização dos átomos da matéria viva ocorrem numa fração de segundos, enquanto que os processos por meio dos quais estas mudanças eventualmente levam às manifestações biológicas podem levar horas, meses ou mesmo décadas. No entanto, pouco se sabe ainda hoje dos eventos envolvidos entre a interação da radiação com a matéria viva e os efeitos biológicos resultantes, isto é, a inter-relação entre os fenômenos químicos, bioquímicos e biológicos.

A potencialidade da radiação ionizante para produzir danos em seres vivos é conhecida desde a descoberta dos raios X e da radioatividade natural no fim do século passado. Já em 1902 foi publicado o primeiro caso de indução de câncer por radiação (Prasad, 1984) e em 1927, Muller, trabalhando com Drosophila, foi o primeiro a demonstrar que os raios X podem induzir mutações. A extensão do dano produzido pela radiação ionizante só foi avaliada mais pormenorizadamente após a segunda guerra mundial, sendo então reconhecida a necessidade de proteção contra esses efeitos. Assim, o estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante recebeu um enfoque maior nas

últimas décadas, em consonância com a maior utilização de vários tipos de radiação para as mais diversas finalidades, na medicina, na indústria, na agricultura e na geração de energia elétrica. Tem-se então, de um lado, numerosos benefícios advindos da energia nuclear que não podem ser ignorados e, por outro lado, os efeitos nocivos que as radiações ionizantes podem apresentar para o homem.

Relevantes para os organismos vivos são as alterações induzidas no material genético, podendo acarretar consequências de grande significado biológico. Entre elas incluem-se a indução de mutação, malignidade, malformações e até a morte do indivíduo (Casarett, 1968; Hall, 1978; Pizzarello & Colombetti, 1982; Prasard, 1984). De acordo com o relatório da "United Nations, Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation" (UNSCEAR, 1962) não existiria uma dose "segura" de radiação sob o ponto de vista genético, sendo que qualquer exposição à radiação pode envolver um certo risco de indução de efeitos somáticos e genéticos.

Estudos sobre os efeitos da radiação ionizante no desenvolvimento de embriões vêm despertando grande interesse não somente do ponto de vista da embriologia experimental, como também na avaliação das injúrias da radiação nos processos iniciais do desenvolvimento ontogenético. Assim, diferentes organismos têm sido utilizados, entre os quais figuram helmintos (Suzuki & Egami, 1983), insetos (Mavor, 1927; Yang &

Ducoff, 1969; Rossmore & Hoffman, 1971; Burgess & Bennett, 1972; Nauman & Whitten, 1976; Varanda et alii, 1985), crustáceos (Snider & Kersten, 1936), peixes (Welandar et alii, 1948; Welandar, 1954; McGregor & Newcombe, 1968), anfíbios (Butler, 1936; Rugh, 1954) e mamíferos (Job et alii, 1935; Warkany & Schraffenberger, 1947; Russell & Russell, 1954; Wilson, 1954; Phemister et alii, 1969; Rugh, 1969; Strange & Murphree, 1972; Kusama & Yoshizawa, 1984; Brent et alii, 1986). Os dados obtidos enfatizam diferentes efeitos produzidos durante o desenvolvimento embrionário, como o retardo no crescimento, indução de malformações e morte dos embriões. Entretanto, pouco se sabe ainda hoje sobre os mecanismos de ação da radiação ionizante.

Embora a idade do embrião no momento da irradiação e a dose aplicada sejam consideradas como fatores fundamentais na determinação da radiosensibilidade, outros fatores, físicos (o tipo de radiação, a taxa e o fracionamento de dose), químicos (a pressão de oxigênio, substâncias radiomodificadoras) ou biológicos (constituição genética) podem influenciar as manifestações do dano da radiação.

Certos animais, por exemplo, moluscos, ouriços-do-mar, peixes e anfíbios podem ser considerados como organismos bem adaptados para serem utilizados no estudo dos efeitos das radiações nos processos iniciais do desenvolvimento (Russell & Russell, 1954; McGregor & Newcombe, 1968; Wolsky, 1982). A natureza semitransparente dos ovos de moluscos, fato que per

mite a identificação de qualquer estágio de desenvolvimento IN VIVO, bem como a possibilidade de obtenção de um número relativamente grande de ovos são fatores que tornam esses animais um material excelente para análise.

Para a avaliação da resposta biológica dos organismos frente à radiação, uma variedade de parâmetros pode ser analisada. Dentre eles merecem consideração especial: mortalidade, malformações, eclosão e aberrações cromossômicas.

1.1. Considerações Gerais sobre Mortalidade

Um critério prático para avaliar a letalidade produzida por irradiação externa de corpo inteiro em um organismo consiste na utilização da chamada DL_{50} que corresponde à dose letal para 50% dos integrantes da população exposta. A dose $DL_{50(30)}$, isto é, a dose de radiação que mata 50% da população em 30 dias é muito empregada, por exemplo, em mamíferos, mas, dependendo do sistema biológico, qualquer outro período de tempo ou fração letal pode também ser usado.

De modo geral, os embriões são mais radiosensíveis do que os adultos da mesma espécie. Assim sendo, achamos interessante relacionar a dose letal da radiação estimada por vários autores em diferentes espécies de organismos adultos de moluscos (TABELA I). As unidades de dose de radiação apresentadas foram aquelas utilizadas pelos autores.

TABELA I: Estimativa da dose letal de radiação ionizante (*) em espécimes adultos de moluscos

ORGANISMO	IDADE OU TAMANHO DA CONCHA	DOSE LETAL (DIAS)	DOSE (TAXA DE DOSE)	REFERÊNCIA
<u>Radix japonica</u> (Jay)	-	DL ₅₀ (20)	12kR	Bonham & Palumbo, 1951
		DL ₅₀ (40)	8kR	
		DL ₅₀ (80)	2kR de raios X (120-600 R/min)	
<u>Thais lamellosa</u>	-	DL ₅₀ (80)	17kR	
		DL ₅₀ (60)	13kR	
		DL ₅₀ (30)	6kR de raios X (100-660R/min)	
<u>Melania tuberculata</u>			213R	Azevedo & Gomes, 1956
<u>Australorbis glabratus</u>			1.200R	
<u>Planorbis metidiensis</u>	-	morte	1.750R	
<u>Biomphalaria pfeifferi</u>			1.750R	
<u>Planorbis corneus</u> (albinus)			1.800R de Co-60 (2,6 R/h)	
<u>Australorbis glabratus</u> mutante de Brasil e Porto Rico	2 a 210 dias	DL ₅₀ (90)	6.000 a 9.000 R de raios X (1.000 a 1.500 R/min)	Perlowagora-Szumiec, 1964a
<u>Physa acuta</u>	-	morte após 3 dias	220kR de raios X (1.000 a 2.000 R/min)	Ravera, 1966
<u>Oncomelania formosa</u>	4,5 a 5,5 mm de comprimento	DL ₁₀₀ (80)	20.000 R de raios X	Chi & Boeller, 1968
<u>Biomphalaria glabrata</u> , cepa de Porto Rico	14-16 mm de diâmetro da concha	DL ₁₀₀ (60)	32.000 rad	Liard et alii, 1968
		DL ₈₀ (60)	16.000 rad	
		DL ₂₀ (60)	8.000 rad de Co-60 (670 rad/min)	
<u>Biomphalaria glabrata</u> , cepa de Porto Rico	3 a 5 meses de idade	morte dentro de algumas horas	150 a 250 krad	Farvar & Cember, 1969
		morte dentro de alguns dias	75 a 100 krad de Co-60 (125krad/h)	
<u>Nassarius obsoletus</u>	-	DL ₅₀ (30)	>70 krad (310 rad/min)	Engel & Davis, 1973
<u>Biomphalaria glabrata</u> , cepa de Porto Rico	4-7 mm de diâmetro da concha	DL ₅₀ (30)	4.900 rad de Co-60 (322 rad/seg)	Michelson & Du Bois, 1981
<u>Physa acuta</u>	1 a 3 meses	DL ₅₀ (80)	40 kR de raios gama (250 ou 500 R/min)	Fujita & Egami, 1984

(*) Roentgen (R) é a unidade de medida de exposição de raios X e gama. Corresponde à produção de uma carga elétrica de $2,58 \times 10^{-4}$ Coulombs em 1kg de ar seco. Rad ("radiation absorbed dose") é a unidade de medida de dose de radiação absorvida. Equivale a 100 erg de energia depositada em 1 grama de material. Como regra geral, pode-se considerar que, para o tecido mole, 1 rad é aproximadamente igual à dose resultante de exposição de 1 roentgen de raios X ou radiação gama de energia intermediária. A nova unidade, que substitui o rad é o gray (Gy), introduzida pela Comissão Internacional de Unidades de Radiação (CIUR). Equivale a uma energia absorvida de 1 Joule por kilograma de matéria. Portanto, a relação entre a unidade antiga e a nova é: 1 Gy = 100 rad.

Como se pode verificar na TABELA I, existe uma grande variabilidade nas doses de efeito letal entre os diversos organismos e muitas vezes é difícil a comparação dos dados obtidos por diferentes autores, em virtude das diferenças nos métodos experimentais e nos critérios de análise adotados. Mesmo dentro de uma mesma espécie, diferentes cepas podem mostrar graus diferentes de radiosensibilidade (Bacq & Alexander, 1961).

Um dos primeiros trabalhos sobre a avaliação dos efeitos da radiação ionizante em ovos de caramujo, mutante híbrido de Australorbis glabratus, vetor do Schistosoma mansoni foi realizado por Perlowagora-Szumlewicz & Berry (1964). Na tentativa de averiguar a possibilidade de controlar caramujos transmissores da doença, os autores utilizaram doses de 2.000 a 40.000 R de raios X nos diferentes estádios de desenvolvimento. As doses de 2.000 a 4.000 R foram letais após alguns dias em ovos de 1-2 e 4-5 dias, respectivamente, enquanto que embriões de 9-10 dias resistiram a dose de 40.000 R. Perlowagora-Szumlewicz (1964 b, 1966) verificou também um decréscimo na sobrevivência de caramujos nascidos de ovos irradiados com doses subletais, em função da idade (3 a 9-10 dias) e da dose aplicada (2.000 a 10.000 R de raios X). Os caramujos "juvenis" (primeiras seis semanas após a eclosão) foram os mais atingidos pela radiação. No entanto, apesar do pequeno número de sobreviventes, os originários de ovos irradiados que conseguiram atingir a maturidade sexual apresentaram o mesmo padrão de crescimento e sobrevivência encontrado em caramujos adultos controle. A autora demonstrou que a intensidade dos efeitos da radiação foi su

ficiente para reduzir a população de caramujos, mas não impediu o reestabelecimento da população normal em gerações subsequentes.

Mais recentemente, Kawano (1982) analisou os efeitos da cafeína e radiação gama (1.000 R) no desenvolvimento embrionário de mutante albino (SL) de Biomphalaria glabrata(*) observando também uma maior susceptibilidade dos embriões nos estádios mais precoces de desenvolvimento.

A análise da radiosensibilidade de embriões do caramujo Physa acuta foi realizada por Ravera (1966). O efeito da radiação diminuiu com o aumento da idade e com o decréscimo da dose de radiação. Os valores de DL_{50} estimados para os estádios de segunda clivagem (quatro blastômeros), trocôfora, veliger e veliger evoluído ("hippo stage") submetidos a doses de 200 a 10.000 R de raios X (200 R/min.) foram 1075,2350, 4900 e 10.750 R, respectivamente. Segundo Fujita & Egami (1984), os valores de $DL_{50(80)}$ estimados para embriões de 0 a 7 dias, irradiados com doses de 0,5, 2 e 4kR de radiação gama de $Cs-137$ (250 ou 500 R/min.) foram cerca de 0,9 e 2 kR para os estádios de ovo (0 dia) e mórula (1 dia), respectivamente. A dose de 4 kR não afetou a taxa de sobrevivência de embriões de setedias após a oviposição.

Em relação aos ovos do caramujo Helisoma succinatum, Bonham (1955) observou uma susceptibilidade maior à ra-

(*) O nome genérico Biomphalaria é considerado pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica como sinônimo de Australorbis (Paraense, 1966).

dição no estágio de primeiras clivagens, especialmente nas fases de metáfase e anáfase do que nos estádios subsequentes do desenvolvimento. Os valores da DL_{50} no momento da eclosão para os ovos em divisão foi 100 R e daqueles em interfase foram de 300-400 R de raios X (400 R/min.). Para os estádios de trocócara e embrião já com início de formação de concha (estádios 3 - 6), a DL_{50} oscilou entre 500 e 1.000 R.

1.2. Considerações Gerais sobre Malformações

A radiação ionizante é um potente indutor de malformações em organismos vivos. Embora muitos estudos tenham sido realizados em diferentes espécies de animais, os mecanismos que levam a estas anomalias são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que o efeito final é precedido por uma série de eventos anormais e complexos durante a embriogênese, resultando no desvio do desenvolvimento normal dos embriões (Russell & Russell, 1954; Wilson, 1954; Wolsky, 1982).

Os primeiros trabalhos sobre a embriologia experimental em moluscos datam do final do século passado (Crampton, 1896). Estes organismos têm sido empregados como materiais úteis ao estudo da embriologia experimental, em razão de possuírem as diferentes regiões do ovo já destinadas a formar os futuros órgãos logo após a fertilização e antes da primeira clivagem. Muitos experimentos têm sido realizados utilizando pro

cessos ou agentes químicos ou físicos, por exemplo, várias substâncias, deleção, centrifugação e choque térmico. Assim, consideramos interessante mencionar os principais tipos de malformações encontrados em embriões de moluscos, resultantes de diversos tratamentos.

Vários autores (Raven, 1942; 1949; Raven & Burgers, 1952; Verdonk, 1965; Geilenkirchen, 1967; Biggelaar, 1971a) submetendo ovos de Limnaea stagnalis de diferentes idades à ação de LiCl, obtiveram:

- . exogástrula: embrião com aspecto vesicular sem a invaginação dos endômeros durante a gastrulação;
- . malformação da concha: com alteração na forma e no tamanho ou quando a concha é rudimentar;
- . embrião hidrópico: com intumescimento no corpo e pouco desenvolvimento dos órgãos internos;
- . embrião com evaginação do estomodéon (futura boca);
- . malformação cefálica, principalmente aquela as sociada a anomalias de número e posição dos olhos:
 - . monoftalmia: ausência de um dos olhos;
 - . microftalmia: olhos pequenos, frequentemente desiguais em tamanho e forma;

- . trioftalmia: um olho extra na região mediana;
- . sinoftalmia: convergência dos olhos na região mediana;
- . ciclopia: um único olho central;
- . anoftalmia: ausência completa dos olhos;
- . duplicação dos olhos: um ou ambos os olhos duplicados.
- . malformação inespecífica: embrião que chega a gastrular, porém apresenta um desenvolvimento anormal e que não pertence às classes de malformações acima descritas.

Verdonk (1965) verificou em ovos de L. stagnalis que o tratamento com lítio ($2, 2,5$ e $3,5 \times 10^{-5}M$) causou malformações cefálicas específicas, dependendo do estágio de desenvolvimento submetido ao tratamento. Verificou que os ovos, antes da primeira clivagem e no início da gástrula, foram muito resistentes aos distúrbios morfogenéticos, pelo menos na alteração do padrão cefálico. As susceptibilidades maiores foram encontradas nos estádios de segunda e quarta clivagens e blástula, obtendo, respectivamente, malformações cefálicas dos tipos teratomórfico, acefálico e monoftálmico. As malformações da série ciclocefálica, que, segundo o autor, incluem sinoftalmia, ciclopia, anoftalmia e acefalia e que seriam resultantes da alteração da simetria bilateral da região cefálica, foram obtidas quando os embriões foram tratados com LiCl no estádio final da blástula. Na tentativa de explicar a origem de

vários tipos de malformações encontrados, o autor partiu da hipótese de que as substâncias ditas morfogenéticas representariam um importante papel na determinação de estruturas da região cefálica nestes organismos.

A natureza das substâncias morfogenéticas é matéria de especulação, mas vários autores (Geilenkirchen, 1964; Boon-Niermeijer, 1987) admitem que elas estariam localizadas no pólo animal do ovo, antes da primeira clivagem e que seriam responsáveis pelo destino dos blastômeros dos ovos de moluscos (Dongen et alii, 1981). Durante as clivagens subseqüentes, estas substâncias seriam distribuídas entre os micrômetros do primeiro quarteto no pólo animal. As malformações cefálicas experimentais seriam, segundo Verdonk, resultantes da interferência do lítio na clivagem, que afetaria o desenvolvimento do padrão cefálico muito seriamente, especialmente nos estádios de dois ou quatro blastômeros, causando malformações cefálicas teratomórficas, enquanto que uma distribuição anormal de fatores morfogenéticos seria consolidada por subseqüentes clivagens. Após a terceira clivagem, o lítio interferiria, interrompendo a clivagem em todas as linhagens do primeiro quarteto de micrômetros, produzindo embriões acefálicos ou em certas linhagens celulares somente, originando embriões monoftálmicos, dependendo da fase de desenvolvimento no momento do tratamento. Eventualmente, a determinação da simetria bilateral da região cefálica seria influenciada pelo tratamento com lítio, resultando em malformações ciclocefálicas.

Raven (1942) obteve exogástrula utilizando solução de LiCl em ovos de L. stagnalis. A fase de maior sensibilidade para o desenvolvimento de exogástrula, segundo Raven et alii (1947) foi no estágio de dois a quatro blastômeros. Geilenkirchen (1967) verificou também em ovos de L. stagnalis tratados com LiCl ($5 \times 10^{-2} M$) que, entre a oviposição e a terceira clivagem, a maior frequência de exogástrula ocorreu entre a prófase da segunda e da terceira clivagem, sendo que estádios anteriores e posteriores a este período de desenvolvimento raramente resultaram em exogástrula. O autor sugeriu que, por ocasião da segunda clivagem, ocorreria um processo específico relacionado com a gastrulação e que o tratamento com lítio afetaria o processo indutivo importante para a gastrulação. Biggelaar (1971a) observou ainda que nessas exogástrulas induzidas por lítio ocorre uma sincronia na divisão de todas as células do primeiro quarteto de micrômeros $1a^1 - 1d^1$ após o estágio de 24 blastômeros (blástula), enquanto que, em embriões normais, o blastômero $1d^1$ se divide trinta minutos após os outros três micrômeros pertencentes ao mesmo quarteto (Biggelaar, 1971b), isto é, este quarteto de blastômeros em condições normais não se dividem sincronicamente. O mesmo autor observou ainda que as futuras exogástrulas atingem a fase de 16 células (quinta clivagem) normalmente, mas as células vegetativas que seguem a divisão são consideravelmente retardadas. O autor admitiu que este atraso está associado à supressão da assincronia de divisão do primeiro quarteto de micrômeros e ao bloqueio de gastrulação. Em embriões que não se desenvolveram em exogástrula, a

cronologia da divisão não foi influenciada. O fato do tratamento por lítio aplicado no estágio de quatro blastômeros interferir o padrão de clivagem somente após a quinta clivagem, levou o autor a sugerir que, durante o desenvolvimento normal, as divisões no estágio de 16 células provavelmente já estejam programadas no início do estágio de quatro blastômeros.

Kawano et alii (1979) analisaram os efeitos da cafeína (0,1%) sobre os vários estádios do desenvolvimento embrionário de um mutante (albino) de Biomphalaria glabrata. Além da malformação da concha, encontraram embriões teratomorfos, cuja frequência aumentou consideravelmente após a primeira clivagem, atingindo o máximo no estágio de gástrula (34%) e finalmente decaindo no estágio de trocófora (2%). Posteriormente, Simões & Kawano (1982) e Kawano & Simões (1987) utilizando o tipo selvagem de B. glabrata encontraram malformações cefálicas dos tipos monoftalmia e duplicação destra e sinistra dos olhos em embriões, tratados com cafeína no estágio de primeira clivagem.

Os efeitos de substâncias como cloreto de 2-cloro-etil trimetil amônio (CCC) nas concentrações de 10^{-3} e 10^{-4} M e giberelina (GA3) a 0,25 ppm (Kawano et alii, 1982) foram analisados em embriões de B. glabrata. Os autores obtiveram vários tipos de malformações, por exemplo, exogástrula, malformação da concha, malformações inespecíficas e diversas anomalias cefálicas como monoftalmia, duplicação dos olhos e anoftalmia.

Experimentos de deleção para verificar a potencialidade morfogênética de blastômeros foram realizados por Cather et alii (1976) em L. stagnalis, L. (stagnicola) palustris e Bithynia tentaculata e por Clement (1967) em Ilyanassa obsoleta. Os resultados mostraram que a remoção de um determinado micrômero no estágio de terceira clivagem acarretou ausência do olho direito (monoftalmia sinistra) ou esquerdo (monoftalmia destra) do embrião, dependendo do micrômero removido (1a ou 1c). Por outro lado, Cather (1967) observou em embrião de I. obsoleta que a deleção de um determinado micrômero (2d) no estágio de quarta clivagem causou uma anomalia na concha.

Efeitos da centrifugação (640 Xg por 10 minutos) em ovos de L. stagnalis nos estádios entre a oviposição e a terceira clivagem foram analisados por Geilenkirchen (1964). Em decorrência desse tratamento, foram obtidos vários tipos de malformações, entre as quais, exogástrula, malformações cefálicas e inespecíficas. Verificou-se um atraso na clivagem, sendo maior na prófase da segunda e terceira clivagens, enquanto que os efeitos morfogênicos foram mais acentuados na telófase da primeira, segunda e terceira clivagens. O autor atribuiu o atraso ao rompimento do aparelho mitótico, e o efeito morfogênético da centrifugação a um distúrbio na distribuição normal das substâncias morfogênicas entre os blastômeros.

Geilenkirchen (1966) e Boon-Niermeijer (1976) verificaram os efeitos de choque térmico (37º - 38º C) em ovos

de Lymnaea nos estádios de primeiras clivagens. Observaram a ocorrência de anomalia da concha, malformações cefálicas e inespecíficas, exogástrula e embriões hidrópicos. Os autores verificaram também um maior ou menor grau de susceptibilidade à indução de malformações relacionado com o estágio do ciclo celular durante o qual as células foram submetidas a choque térmico. Quando o estresse térmico foi aplicado antes da metáfase, observou-se um atraso na clivagem, mas com completa recuperação, não se verificando efeitos morfogenéticos. Entretanto, quando o tratamento térmico se deu durante a metáfase - anáfase, houve um dano irreversível na mitose, causando anomalias morfogenéticas. Estas observações conduziram à hipótese de que o choque térmico interferiria num processo relevante para a divisão celular, e que o distúrbio na morfogênese seria resultante da alteração na cronologia da divisão celular.

Labordus (1971) analisou os efeitos da radiação UV (2.400 a 2.800 Å) em ovos de L. stagnalis entre a oviposição e a quarta clivagem e obteve exogástrula, embriões hidrópicos e malformações cefálicas. Verificou-se que os distúrbios na morfogênese eram, em parte, decorrentes da perda ou da distribuição anormal do material cromossômico entre os blastômeros.

Em relação a malformações obtidas pela ação da radiação ionizante durante o desenvolvimento embrionário de moluscos pode-se mencionar o trabalho de Kawano (1982) que analisou os efeitos de uma dose de 1.000 R de Cs-137 e cafeína (0,1%)

em mutante de B.glabrata. A autora verificou a ocorrência de embriões teratomorfos em todos os estádios analisados, verificando também uma maior incidência de malformação da concha em trocófora jovem, estágio em que se inicia a formação da glândula da concha.

Tendo em vista o que foi exposto, tanto a idade do embrião, como a fase do ciclo celular no momento do tratamento parecem estar intimamente relacionadas com a indução de anomalias morfogenéticas. Aparentemente, os mesmos tipos de malformações são produzidos por diferentes tratamentos em embriões de moluscos.

1.3. Considerações Gerais sobre Eclosão

Carvalho et alii (1974) verificaram os efeitos da radiação gama nas doses de 500 a 4.000 rad (2.890 rad/min.) sobre a eclosão dos ovos de Pomacea haustum (Prosobranchia, Pilidae) com menos de 24 horas após a oviposição. Verificaram uma inibição e atraso na eclosão, dependentes da dose aplicada. Nos grupos controle e irradiados com 500, 1.000 e 1.500 rad, a eclosão ocorreu entre o 11º e o 14º dia após a postura, com 89,0, 41,6, 35,5 e 21,1%, respectivamente. Os grupos irradiados com 2.000, 3.000 e 3.500 rad, a eclosão ocorreu entre o 12º e o 16º dia, cujas taxas de eclosão foram sensivelmente mais baixas em relação ao controle, com 7,9, 4,9 e 0,3%, res-

pectivamente. Nas desovas irradiadas com 2.500 e 4.000 rad não se verificou a eclosão até 30 dias após a exposição.

A taxa de eclosão foi também grandemente reduzida pela radiação em embriões de Physa acuta, irradiados com 200 a 10.000 R de raios X (200 R/min.) nos vários estádios de desenvolvimento (Ravera, 1966). O efeito foi mais pronunciado irradiando os estádios menos evoluídos. A porcentagem de eclosão diminuiu com o aumento da dose e, para a mesma dose, com o decréscimo da idade do embrião irradiado. Similarmente, o aumento da dose ampliou o intervalo da oviposição até a eclosão, e a mesma dose, em estádios mais precoces, ampliou ainda mais os intervalos.

Perlowagora-Szumlewicz & Berry (1964) e Perlowagora-Szumlewicz (1966) observaram que 40% dos embriões de Australorbis glabratus com 3 dias de idade, submetidos a 2.000 R de raios X, se desenvolveram e eclodiram, enquanto que 72% dos embriões de 4-5 dias, irradiados com a mesma dose, eclodiram e apenas 24% nasceram de ovos irradiados com 3.000 R da mesma idade embrionária. Doses de exposição de 25.000 a 40.000 R não impediram a eclosão de embriões de 9-10 dias, chegando a nascer 68% dos caramujos. Verificou-se ainda que, enquanto os ovos controle eclodiram entre o 8º ao 11º dia, os ovos tratados eclodiam com uma defasagem relativamente grande, entre o 20º e o 29º dia após a postura. Com base nestas observações, a autora sugeriu que durante o período de atraso possa ocorrer u

ma recuperação de danos subletais de radiação antes de atingir a eclosão.

1.4. Considerações Gerais sobre Aberrações Cromossômicas

É fato conhecido que a radiação ionizante é eficaz em produzir aberrações cromossômicas em células de eucariotos. Dependendo da organização submicroscópica dos cromossomos, diferentes tipos de aberrações podem ser produzidos nas várias fases do ciclo celular: do tipo cromossômico com irradiação na interfase G₁, antes da duplicação do DNA; do tipo cromatídico em G₂, após a duplicação do DNA; uma mistura destes dois tipos em S e do tipo subcromatídico, na prófase tardia (Casarett, 1968; Kihlman, 1977; Natarajan & Zwanenburg, 1982; Stephan, 1986).

Estes grupos de aberrações estruturais são classificados de acordo com a porção afetada dos cromossomos. Sua formação exige quebras nos cromossomos, isto é, descontinuidades maiores que a largura da própria cromátide. A ocorrência de descontinuidade menor do que a largura de uma cromátide, cuja porção distal permanece na mesma direção da porção proximal é chamada de falha acromática ou "gap". Originalmente, as falhas foram classificadas como quebras, mas uma vez que elas não produzem fragmentos acêntricos na anáfase, deixaram de ser consideradas como descontinuidades verdadeiras. No entanto, muitos autores sustentam a hipótese de que as falhas devem ser incluídas entre as aberrações cromossômicas estruturais, e que,

se não são fraturas verdadeiras, devem ser locais predispostos a essas lesões.

Uma quantidade considerável de dados aponta o DNA como a principal molécula crítica do dano da radiação e que alterações na estrutura do DNA podem levar à formação de a berrações cromossômicas (Bender et alii, 1974; Scott & Zampetti-Bosseler, 1980, 1982; Zampetti-Bosseler & Scott, 1981; Aardema & Preston, 1986; Takahashi et alii, 1986). Há, essencialmente, quatro tipos de lesões induzidas no DNA por radiação io nizante (Radford, 1986; UNSCEAR, 1986): quebra na fita sim ples, quebra na fita dupla, danos de base, e ligações cruzadas entre DNA-DNA, DNA-proteína etc. Muitas dessas lesões primárias são, contudo, reparadas rapidamente para reverter à confi guração original; um erro neste reparo, entretanto, pode levar à formação de aberrações cromossômicas (Bender et alii, 1974). Dentre os diferentes tipos de lesões induzidas no DNA pela radiação, as quebras na fita dupla parecem ser uma das principais lesões envolvidas na produção de aberrações cromossômicas (Natarajan & Zwannenburg, 1982; Natarajan et alii, 1986; UNSCEAR, 1986). Contudo, pouco se sabe ainda hoje sobre o mecanismo de formação de aberrações cromossômicas. Há, basicamente, duas hipóteses que tentam explicar como se origina uma mudança estrutural. A primeira hipótese lançada foi a de "quebra e reunião" ("breakage-and-reunion") proposta por Sax (1938). Esta hipótese propõe que a radiação ionizante produz uma quebra física nos cromossomos. As extremidades quebradas dos cromossomos podem reconstituir a

configuração original, e dessa maneira os cromossomos aparecem normais; fundir-se com outra extremidade quebrada próxima para dar origem a uma aberração de rearranjo, ou permanecer abertas, aparecendo como quebras cromossômicas ou cromatídicas na metáfase. As principais características desta hipótese são: o evento primário é uma quebra nos cromossomos, a quebra e reunião são eventos independentes, separadas no tempo, e as deleções terminais envolvem somente uma quebra, enquanto que os rearranjos, duas quebras.

A segunda hipótese, a de "troca" ("exchange") foi formulada por Revell (1966, 1974). Postula a passagem de uma partícula ionizante nos cromossomos causando uma lesão menos drástica, uma instabilidade local nos cromossomos. Quando duas dessas lesões estiverem próximas uma da outra no tempo e no espaço, elas, eventualmente, poderão se associar e, ocorrendo uma interação recíproca entre os eventos primários, produzir uma troca que poderá ser acompanhada por uma quebra no ponto de troca. Dois locais de danos em diferentes cromossomos podem produzir uma aberração de rearranjo. Porém, quando a instabilidade ocorrer em ambas as cromátides-irmãs, ou numa mesma cromátide num ponto onde a cromátide forma uma alça, a troca poderá eventualmente resultar em uma deleção. A teoria proposta por Revell difere da anterior em dois aspectos principais: o evento primário da radiação não é meramente uma quebra, mas sim, uma lesão inicial, um estado ativado que conduz à instabilidade local e que todas as aberrações induzidas, incluindo de

leções terminais, originam-se de interação entre duas regiões danificadas.

Muito se discute sobre a validade dessas duas hipóteses e embora elas tenham sido propostas como formas alternativas, atualmente aceitam-se ambas como válidas para explicar os mecanismos de formação de aberrações cromossômicas (Lawrence, 1971; Kihlman, 1977).

Vários estudos sugerem que as aberrações cromossômicas representam um papel essencial na morte reprodutiva das células, isto é, na perda da capacidade de se dividirem, tanto em vegetais como em animais (Kihlman, 1977). Utilizando-se diferentes critérios de morte reprodutiva, vários autores encontram uma relação estreita entre frequência de aberrações cromossômicas e inibição da capacidade germinativa do pólen de Tradescartia paludosa (Evans, 1968), redução no crescimento da raiz de Vicia faba (Read, 1961), bem como perda da capacidade de formar colônias em células IN VITRO (Dewey et alii, 1970; Bedford et alii, 1978; Scott & Zampetti-Bosseler, 1985).

Algumas doenças que afetam o homem são causadas por defeitos de reparo e estão associadas a quebras cromossômicas, por exemplo, anemia de Fanconi, ataxia telangectásica, síndrome de Bloom e Xeroderma pigmentosum (Berg, 1979; Therman, 1986).

Tumores induzidos por substâncias carcinogênicas em camundongos, ratos, hamster e cobaias apresentam células com anomalias cromossômicas (Di Paolo & Popescu, 1976). Uma grande maioria de células cancerosas humanas, várias formas de leucemia, linfomas e tumores sólidos são cromossomicamente anormais com defeitos estruturais, desequilíbrio numérico ou ambos (Yunis, 1983; Le Beau et alii, 1985).

Aberrações cromossômicas são encontradas também em pessoas expostas acidentalmente à radiação (Bender & Gooch, 1962a; Brewen et alii, 1972), em pessoas submetidas a terapêutica ou diagnóstico por radiação (Conen et alii, 1963) e em sobreviventes de Nagasaki e Hiroshima (Miller, 1969; Lloyd, 1979).

Uma associação íntima entre aberrações cromossômicas e anomalias do desenvolvimento foi verificada por vários autores em diversos animais, inclusive no homem. McGregor & Newcombe (1972) encontraram em truta Salmo gairdnerii uma série de malformações dos olhos, incluindo monoftalmia, anoftalmia e ciclopia em descendentes de ovos fertilizados com espermatozóide irradiado (com 25 a 400 rad de radiação gama). Os autores atribuíram essas malformações, predominantemente à indução de aberrações cromossômicas.

Segundo Wolsky (1982), várias anomalias de desenvolvimento produzidas pela radiação durante a embriogênese e a organogênese em diversas espécies de animais, incluindo anfibios, répteis e mamíferos, podem estar correlacionadas com a

berrações cromossômicas. Observações análogas foram feitas por Rugh (1969) ao examinar células de um feto de camundongo irradiado com doses de 100 a 500 rad de raios X, no 99 dia de pre nez, período considerado particularmente radiossensível à in dução de anomalias congênitas. Verificaram-se, além da indução de aneuploidia, vários tipos de aberrações estruturais. O autor sugeriu que os cromossomos alterados por radiação fossem responsáveis pela indução de vários tipos de anomalias congêni tas.

Matsuda et alii (1983, 1985a) observaram vários tipos de aberrações cromossômicas estruturais, por exemplo, fa lhas acromáticas, quebras, fragmentos, translocações e anéis em zigotos de camundongos, irradiados e cultivados IN VITRO. Os resultados citogenéticos obtidos mostraram uma estreita as sociação entre morte embrionária e aberrações cromossômicas ra dioinduzidas. Resultados similares foram obtidos por Reichert et alii (1984) em embriões de camundongos. Brent et alii (1986) verificaram que a perda de embriões de mamíferos (roedores e inclusive o homem) durante o período de implantação no útero é, provavelmente, ocasionada em virtude do dano cromossômico.

Carr (1963) verificou uma incidência relativamente alta de aberrações numéricas ou estruturais (cerca de 20%) em abortos espontâneos na espécie humana. Aberrações envolvendo os grupos 17-18 e 21-22 foram identificadas em casos de ciclopia humana (Cohen, 1966; Nitowsky et alii, 1966). Uma

reavaliação feita recentemente (UNSCEAR, 1986) estima que cerca de 40% dos abortos espontâneos que ocorrem no período de 5-28 semanas de gestação, 6% das mortes neonatais e 5% das anormalidades congênitas estão associados a problemas cromossômicos.

Diante do que foi exposto, a indução de aberrações cromossômicas pela radiação constitui, provavelmente, uma das principais manifestações biológicas perceptíveis do dano em células proliferativas (Geard, 1982). Assim, a análise cromossômica pode fornecer informações úteis, por exemplo, sobre a predição da susceptibilidade de sistemas irradiados ao dano genético da radiação.

Bender e Gooch (1962b) baseados na consistência da relação entre dose aplicada e frequência de aberrações, tanto IN VIVO como IN VITRO, em linfócitos de sangue periférico, foram os primeiros a propor o exame das aberrações cromossômicas para a avaliação quantitativa de doses absorvidas de radiação. São relatados vários casos na literatura mostrando uma coerência entre os valores de doses, estimados por métodos físicos, após a exposição de corpo inteiro de indivíduos e aqueles avaliados por métodos citogenéticos. Dessa forma, os linfócitos periféricos são considerados, ao lado da dosimetria física, os tipos celulares adequados para serem utilizados como "dosímetros biológicos", em virtude de sua alta radiosensibilidade, e por constituírem uma população naturalmente sincrônica

ca de células (Dolphin et alii, 1973; Lloyd, 1979; Lloyd & Edwards, 1983; Preston, 1985; Stephan, 1986).

Os tipos mais comuns de aberrações utilizadas para este propósito são as aberrações acêntricas (fragmentos e anéis acêntricos) e as de rearranjo (anéis cêntricos e principalmente dicêntricos) que em virtude da facilidade de sua identificação são consideradas as melhores indicadoras de dano por radiação (Buckton & Evans, 1973). Todas essas aberrações são chamadas de "instáveis" pelo fato delas serem perdidas durante a divisão celular. De fato, os cromossomos acêntricos, visto não apresentarem centrômero, são impossibilitados de se orientarem no fuso mitótico. Já os dicêntricos frequentemente resultam na formação de pontes na anáfase, podendo interferir na separação física das duas células-filhas. Assim sendo, estes tipos de aberrações podem ser eliminados seletivamente da população de células proliferativas (Carrano & Heddle, 1973; Braselmann et alii, 1986). Não obstante estas observações, a análise citogenética realizada em linfócitos de sobreviventes de Nagasaki e Hiroshima (Awa et alii, 1978) e de pessoas acidentalmente expostas à radiação (Bender & Gooch, 1962a), mostrou que aberrações cromossômicas "instáveis" podem persistir por vários anos. Um dos exemplos extremos são as anomalias citogenéticas complexas observadas nos sobreviventes da explosão atômica 20 ou mesmo 35 anos após a exposição (Miller, 1969, Lloyd, 1979).

1.5. Biomphalaria glabrata como Material de Estudo

Entre os caramujos do gênero Biomphalaria, a espécie glabrata representa um dos importantes vetores da esquistossomose, doença endêmica que afeta mais de 200 milhões de pessoas em cerca de 70 países, principalmente na América do Sul, África e Oriente Médio (Marston & Hostettmann, 1985). Pela sua importância médica e social, estudos com esta espécie de caramujo têm tratado diversos aspectos, por exemplo, a biologia da reprodução (Paraense & Deslandes, 1955; Scherrer et alii, 1976), sistemática (Paraense, 1975), epidemiologia (Rey, 1956; Barbosa, 1970), embriologia (Camey & Verdonk, 1970; Kawano et alii, 1985b) e citogenética (Simões et alii, 1985). Contudo, no que diz respeito à influência da radiação ionizante sobre o desenvolvimento embrionário de B. glabrata pouco tem sido feito. No tocante ao estudo de anormalidades cromossômicas radioinduzidas só constam da literatura os trabalhos de Narang (1974) e Narang & Narang (1974).

Investigações sobre esta espécie de caramujo são de especial interesse não somente do ponto de vista da importância como hospedeiro intermediário do Schistosoma mansoni, mas também pode constituir um material favorável para se avaliarem os efeitos da radiação, o que possibilita uma comparação com outros sistemas biológicos. Trata-se de um organismo de fácil manutenção e manipulação em condições de laboratório, apresentando um período embrionário relativamente curto, o que

possibilita a coleta de dados concernentes ao comportamento de embriões em espaço de tempo curto. Além disso, a embriologia deste caramujo já foi analisada minuciosamente por Camey & Verdonk (1970).

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado com o intuito de contribuir para a avaliação dos possíveis efeitos da radiação gama de Co-60, nos processos iniciais de desenvolvimento embrionário do caramujo Biomphalaria glabrata, focalizando os aspectos seguintes:

- i) análise da radiosensibilidade de embriões submetidos a doses de 5, 10, 15, 20 e 25 Gy nos estádios de ovo, blástula, gástrula, trocócfora jovem, trocócfora e veliger, levando-se em consideração três parâmetros biológicos: mortalidade, malformações e eclosão. A escolha desses parâmetros decorre de sua grande ocorrência na literatura quando se trata de susceptibilidade de embriões. Além disso, esses parâmetros são facilmente mensuráveis e passíveis de comparação quantitativa.
- ii) análise dos efeitos citogenéticos da radiação ionizante em embriões no estágio de blástula expostos a doses de 5, 10 e 15 Gy.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Empregaram-se nos experimentos desovas de Biomphalaria glabrata (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) (FIGURA 1), tipo selvagem. Cada desova contém um número variável de ovos, envoltos individualmente pela cápsula do ovo (FIGURA 2). Os espécimes utilizados foram coletados de uma criação mantida em laboratório por aproximadamente 12 anos, provenientes de Lagoa Santa (MG). Os caramujos adultos foram mantidos à temperatura ambiente, em cubas de plástico (25 x 55 x 17cm) com cerca de 20 litros de água desclorada, continuamente arejada por meio de uma bomba de aeração e alimentados com folhas de alface fresca ou seca, ad libitum.

As FIGURAS 3 e 4 mostram os vários estádios de desenvolvimento embrionário de B.glabrata utilizados nos experimentos.

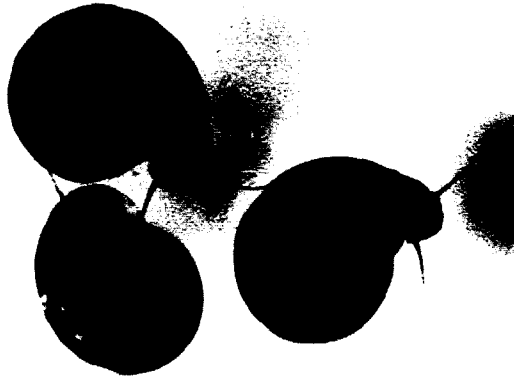


FIGURA 1: Espécimes adultos de Biomphalaria glabrata, medindo cerca de 14 mm de diâmetro da concha.

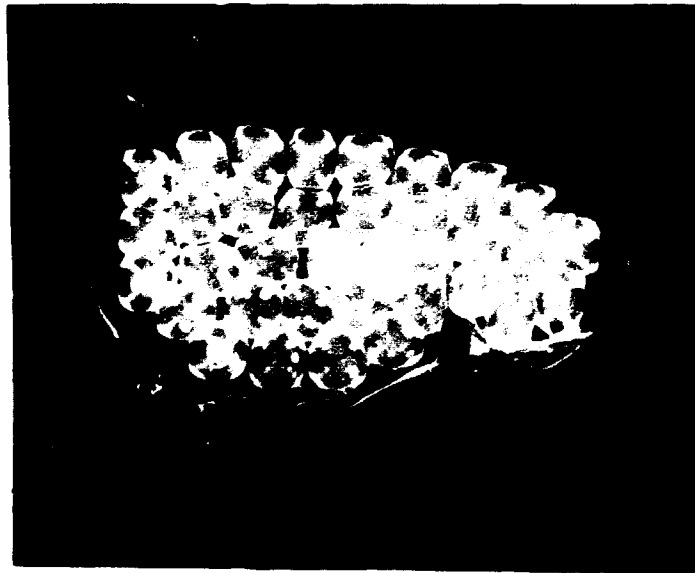


FIGURA 2: Desova de Biomphalaria glabrata, contendo vários ovos, envoltos por uma cápsula do ovo. Estes ovos se encontram no estágio de blástula. O maior diâmetro da cápsula do ovo mede cerca de 600 a 750 μm .

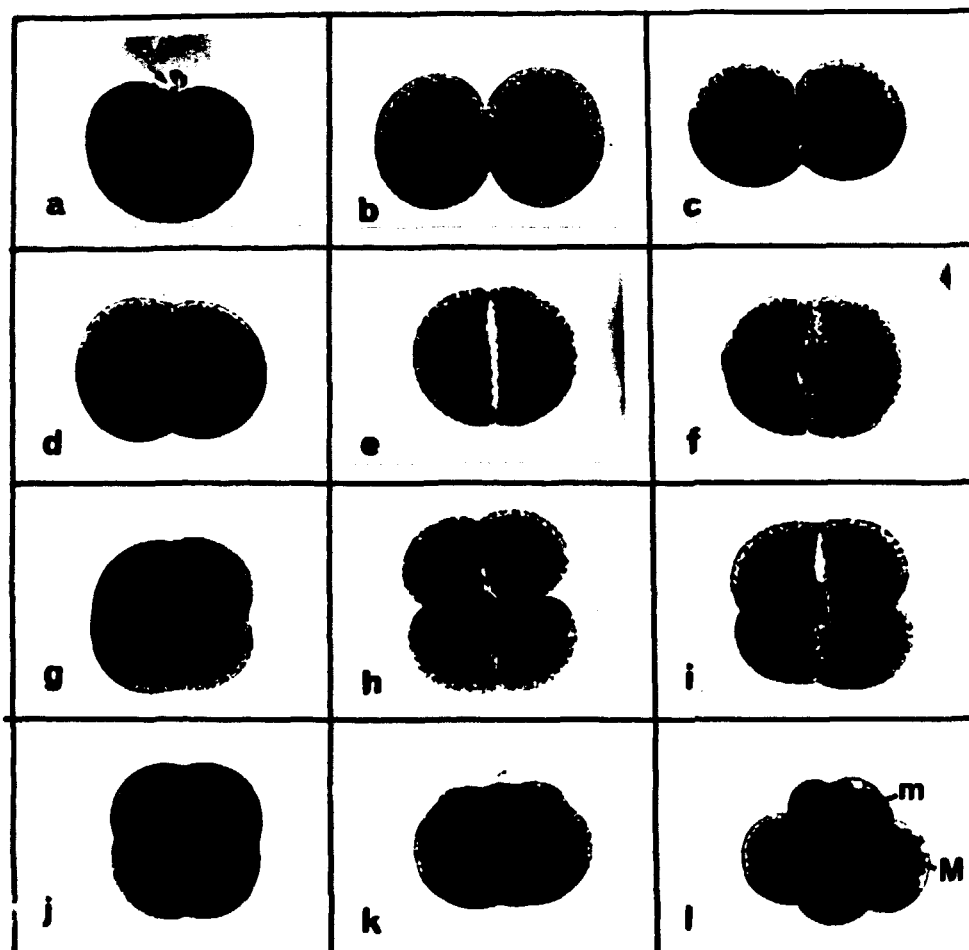


FIGURA 3: Estádios de primeiras clivagens do ovo de *B. glabra*: a) início da primeira clivagem, mostrando o sulco de clivagem no pólo animal do ovo. A seta indica a presença de corpúsculos polares; b, c, d, e, f) estádios de dois blastômeros, mostrando a cavidade de clivagem entre os blastômeros (e, f); g, h, i) segunda clivagem do ovo com quatro blastômeros; j, k, l) terceira clivagem do ovo com oito blastômeros. Neste estágio ocorre a diferenciação morfológica dos blastômeros com quatro micrômeros (m) no pólo animal e quatro macrômeros (M) no pólo vegetativo do ovo (l). 200x

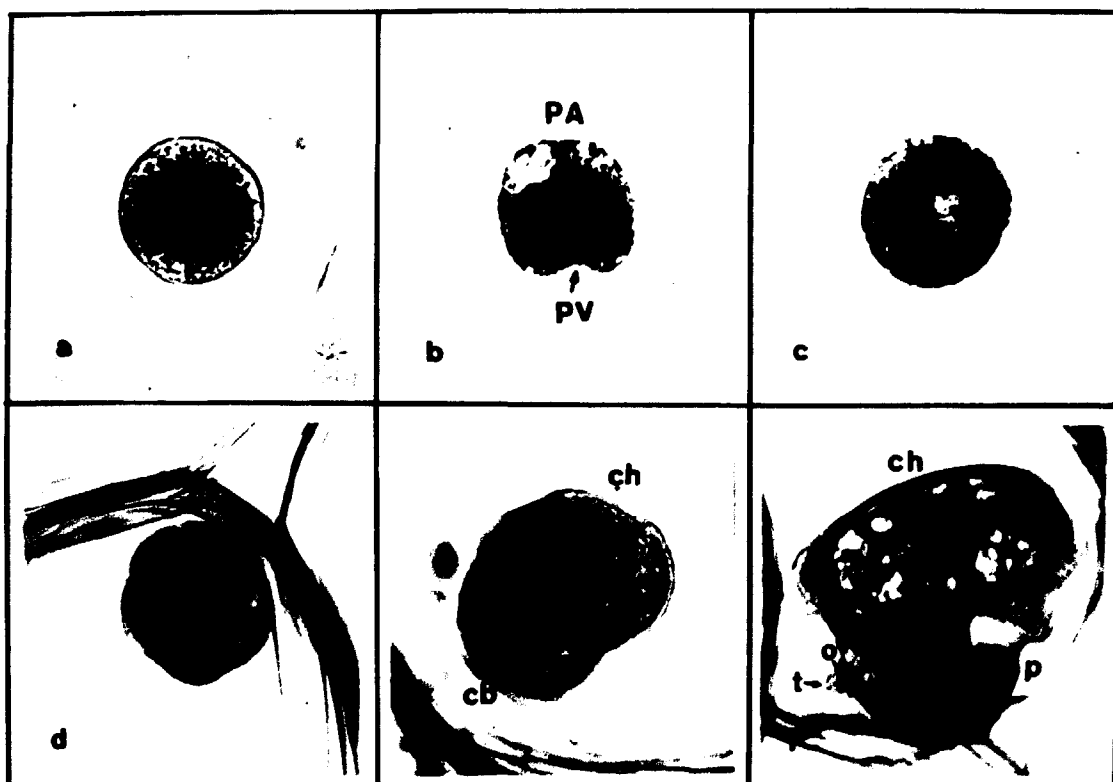


FIGURA 4: Vários estádios de desenvolvimento de B. glabrata:
 a) blástula (160X); b) perfil de gástrula. PV = pólo vegetativo, PA = pólo animal. A seta indica a região do futuro blastóporo (120X); c) gástrula vista pelo pólo vegetativo (120X); d) trocófora jovem (120X); e) trocófora. cb = região da cabeça; ch = região da concha (120X); f) veliger ou "hippo stage". ch = concha; p = pê, o = olho; t = tentáculo (80X).

3.2. Métodos

3.2.1. Identificação dos Estádios Embrionários

Adotaram-se os critérios de Camey & Verdonk (1970) na identificação dos estádios de desenvolvimento de B. glabrata, mantidos à temperatura de 25°C. A idade do embrião foi determinada escolhendo-se a primeira segmentação do ovo, como sendo o ponto de referência para os demais estádios embrionários, uma vez que o período de tempo entre a oviposição e a primeira clivagem não é regular. Por causa da assincronia no processo de divisão dos ovos da mesma desova, convencionou-se ser tempo zero a ocasião quando 50% dos ovos da mesma desova apresentaram o sulco de segmentação no pólo animal do ovo na primeira clivagem (FIGURA 3,a) (Estádio 1, segundo Raven, 1946). Foram utilizados seis estádios:

- 1) primeiras clivagens do ovo, incluindo a primeira, a segunda e a terceira clivagens, contendo de um a oito blastômeros (0 a 3 horas e 50 minutos de idade);
- 2) blástula, com aproximadamente 24 a 64 blastômeros (6 a 15 horas);
- 3) gástrula (24 a 30 horas);
- 4) trocófora jovem (48 a 54 horas);
- 5) trocófora (72 a 78 horas);
- 6) veliger jovem (100 a 110 horas).

3.2.2. Coleta das Desovas

Além de oferecer uma melhor facilidade para coleta de desovas, tiras de plástico transparente deixadas flutuando na superfície da água foram usadas preferencialmente para oviposição. Cada desova foi recortada do plástico com o auxílio de uma tesoura. Os ovos foram contados e classificados de acordo com o estágio embrionário. A coleta das desovas foi realizada em diversas épocas do ano.

3.2.3. Condições de Irradiação

As desovas foram mantidas numa placa de Petri (5 cm de diâmetro x 2 cm de altura), dispostas na periferia, com o mínimo de água, o suficiente para evitar a dessecação. Os embriões foram irradiados numa fonte de Co-60 "GAMMACELL 220 IRRADIATION UNIT" da Comissão de Energia Nuclear do Canadá Limitada. A taxa de dose média foi 136 Gy/h. A dose foi recalculada mensalmente, levando-se em consideração um decaimento de 0,989 % por mês.

3.2.4. Análise da Radiossensibilidade de Embriões

Para o estudo da radiossensibilidade de embriões foram utilizados três parâmetros biológicos - mortalidade, malformações e eclosão - como critérios de avaliação dos efeitos da radiação ionizante.

O primeiro passo para a realização do presente trabalho foi a escolha da faixa de dose adequada a este sistema biológico. As referências na literatura são poucas no que diz respeito ao estudo da radiosensibilidade de embriões de moluscos. Além disso, a extrapolação nem sempre é aplicável, visto tratar-se de diferentes espécies e cepas, diversos critérios de análise e condições experimentais empregados. Assim sendo, as doses estabelecidas, 5 a 25 Gy foram escolhidas com base em experimentos preliminares realizados. As doses usadas delimitaram a região de letalidade que abrangeu desde a dose subletal até a dose que provocou cerca de 90% de mortalidade e permitiram analisar outros parâmetros além da mortalidade, ou seja, malformações e eclosão.

Para cada estágio embrionário, as desovas foram separadas ao acaso em vários lotes, contendo, cada um, cerca de 100 - 200 embriões. Cada lote foi irradiado separadamente, com doses únicas de 5, 10, 15, 20 e 25 Gy de radiação gama. De cada estágio embrionário, um lote foi usado como testemunha (0 Gy). Em virtude da alta mortalidade de ovos observada nos estádios de clivagem, blástula e gástrula quando submetidos a 15 Gy, aplicaram-se doses mais altas somente aos estádios de trocófora jovem (20 Gy), trocófora (20 e 25 Gy) e veliger jovem (somente 20 e 25 Gy). Após as irradiações, as desovas foram transferidas individualmente para recipientes de plástico com compartimentos contendo água desclorada e identificadas uma a uma. As desovas foram mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante todo o período experimental para evitar dis

crepâncias no ritmo de desenvolvimento embrionário. As observações das desovas foram realizadas diariamente ao microscópio estereoscópico CARL ZEISS, com aumento de 20 vezes, anotando-se o número de embriões mortos, malformados, eclodidos ou não, até o 15º dia após a irradiação. Este intervalo de tempo foi considerado adequado para se verificar o comportamento de embriões submetidos à radiação, tendo em vista a duração normal do período embrionário ser relativamente curta, cerca de uma semana, à temperatura de 25º C. Foram realizados cinco réplicas para cada estágio embrionário.

3.2.4.1. Embriões Mortos

Todos os embriões mortos, malformados ou não, foram incluídos indistintamente no mesmo grupo, em vista da dificuldade de se fazer uma identificação precisa entre eles, uma vez que os embriões mortos se apresentaram intumescidos ou deformados.

3.2.4.2. Embriões Malformados

Neste grupo foram incluídos todos os embriões sobreviventes que apresentaram malformações identificáveis IN VIVO. Aqueles que mostraram uma redução no tamanho ou um atraso no desenvolvimento, desde que não apresentassem qualquer malformação visível, foram computados como embriões "normais". Foram adotados os critérios de Raven (1949), Verdonk (1965) e Geilenkirchen (1966) na identificação dos embriões malformados.

3.2.4.3. Embriões Eclodidos

Foram considerados eclodidos os embriões que emergiram da cápsula do ovo. Em média, os embriões controle eclodem entre o 6º e o 9º dia após a primeira segmentação do ovo, a 25°C. Neste grupo não foram computados os embriões malformados.

3.2.4.4. Cálculo dos Parâmetros

A cada dia de observação foi feito o cálculo das porcentagens de cada um dos parâmetros analisados (mortos, malformados, eclodidos ou não), partindo da média ponderada das porcentagens das cinco réplicas, para cada um dos estádios embrionários considerados.

3.2.4.5. Preparo das Lâminas de Embriões

"IN TOTUM"

Para a análise dos embriões "IN TOTUM" utilizou-se o método de Camey & Verdonk (1970), que consiste nas etapas seguintes:

- . Operação de descapsular embriões em água filtrada com o auxílio de pinças de ponta fina, ao microscópio estereoscópico;

- . lavagem em água filtrada, livrando-se da substância albuminosa que cobre os embriões;
- . fixação com AgNO_3 (Merck) a 0,75% sob luz solar, até o limite celular começar a se evidenciar;
- . lavagem dos embriões em água filtrada durante 10 a 12 horas;
- . desidratação dos embriões na série alcoólica, 50, 70 e 80% cerca de 10 horas em cada etapa; em álcool 96% cerca de duas horas e em absoluto, três vezes, 20 minutos em cada passagem, seguido finalmente por dois banhos de xilol, dois minutos cada;
- . montagem em bálsamo entre lâmina e lamínula.
Um pedaço de cartolina com a parte central cortada circularmente foi inserido entre a lâmina e a lamínula para dar altura suficiente para não danificar os embriões.

Os desenhos dos embriões foram feitos com o auxílio de câmara lúcida CARL ZEISS.

3.2.5. Análise Citogenética

Para o estudo cromossômico escolheu-se o embrião no estágio de blástula, pois nesta fase ocorre um grande número de divisões celulares, tornando-a muito sensível à radia-

ção, propiciando portanto, um maior número de alterações evidenciáveis na análise citogenética. Nesse sentido, os embriões foram irradiados com doses de 5, 10 e 15 Gy e a análise citogenética foi realizada 24 horas após o tratamento. Para os embriões submetidos a 10 Gy também foram feitas preparações citológicas 48 horas após a irradiação.

Em desovas irradiadas a maioria dos embriões se encontravam nos estádios de gástrula e trocófora jovem, 24 e 48 horas após o tratamento, respectivamente. Para os grupos controle foram utilizados embriões nos estádios de desenvolvimento equivalentes aos dos grupos irradiados.

3.2.5.1. Preparo das Lâminas Citológicas

Foram utilizados aproximadamente 50 embriões para cada preparação citológica. Para a obtenção dos cromossomos metafásicos empregou-se a técnica de suspensão celular desenvolvida por Kawano et alii (1987) com algumas modificações:

- . tratamento das desovas em solução de colchicina (Sigma) a 0,05%, por 2 a 4 horas, a 28°C;
- . operação de descapsular os embriões em solução hipotônica de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a 0,2%, retirando-se toda a massa gelatinosa que cobre os embriões;
- . várias lavagens em citrato de sódio a 0,2%;

- . préfixação em solução de ácido acético a 5% , por 5 minutos;
- . fixação em etanol: ácido acético (3:1), 3 vezes, por 30 minutos em cada etapa;
- . dissociação mecânica dos embriões em solução de ácido acético a 50% com a ajuda de uma micropipeta para desfazer por completo as células do embrião;
- . gotejamento do material numa lâmina preaquecida a 40°C e secagem à temperatura ambiente por cerca de 24 horas;
- . hidrólise em solução de HCl 1 N em banho - maria, a 60°C, durante 6 minutos e várias lavagens em água destilada;
- . coloração com Giemsa (Merk) a 2% em solução tampão fosfato pH 6,9, durante 10 minutos, lavagem em água destilada e secagem à temperatura ambiente;
- . montagem em Permunt entre lâmina e lamínula.

3.2.5.2. Análise das Lâminas

Fez-se a observação cromossômica num fotomicroscópio CARL ZEISS com objetiva de imersão 100 X, ocular 8 X e optovar 1,25. Para cada dose de radiação, 24 e 48 horas após a exposição, foram examinadas 450 a 550 metáfases, escolhidas aleatoriamente. Os cromossomos foram classificados de acordo

com o critério estabelecido por Levan et alii (1964), baseando-se na posição centromérica dos cromossomos.

As metáfases obtidas foram classificadas segundo dois critérios básicos: a) quanto ao número de centrômeros e b) quanto à presença de aberrações estruturais, cromossômicas ou cromatídicas. As metáfases contendo $2n-1$ e $2n-2$ centrômeros foram incluídas nas análises, porém aquelas com menos de $2n-2$ centrômeros foram desprezadas. As aberrações estruturais foram classificadas segundo Buckton & Evans (1973) e de acordo com a "International Atomic Energy Agency" (IAEA, 1986). Em virtude da possibilidade de que as células tenham passado por mais de uma divisão mitótica após o tratamento, as aberrações de rearranjo e os fragmentos acêntricos encontrados na mesma figura metafásica foram contados separadamente. Todas as aberrações estruturais, identificadas com coloração convencional, foram desenhadas e registradas. As fotografias foram tiradas com objetiva de imersão 100 X, ocular projectiva 3,2 X e optovar 1,25 e filtro verde.

3.2.6. Índice Mitótico

Determinou-se o índice mitótico de células de embriões irradiados no estágio de blástula, com doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama, 24 horas após a exposição. A fórmula utilizada foi: $I.M. = \frac{A}{A + B} \times 100$, onde:

A = número de células em divisão

B = número de células em interfase

Foram analisados aproximadamente 2.000 núcleos, escolhidos aleatoriamente para cada um dos grupos, irradiados e controle.

3.2.7. Análise Estatística

As curvas de sobrevivência foram obtidas no 15º dia após a irradiação nas doses de 5, 10, 15, 20 e 25 Gy, a partir do número total de animais vivos (malformados, eclodidos e não eclodidos). Os dados foram organizados em cinco arquivos, um para cada estágio. Cada um desses arquivos teve quatro variáveis: dose, número de réplicas, número de embriões da réplica submetidos à dose de radiação e à sobrevivência observada a essa dose.

As curvas de cada um dos estágios embrionários foram ajustadas de acordo com o modelo $Y = \exp(-ax - bx^2)$, onde:

Y = taxa de sobrevivência corrigida pela sobrevivência natural;

a e b = parâmetros do modelo;

x = dose de radiação.

Empregou-se uma linearização do modelo acima usando o logaritmo natural (Peres, 1981), tornando possível o uso da regressão linear (Draper & Smith, 1982). Essa regressão foi ponderada pelo número de embriões de cada conjunto dose-réplica.

Os parâmetros desse modelo foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ponderados utilizando o pacote de rotinas e programas estatísticos "Statistical Analysis System" (SAS); os dados foram processados num computador IBM 4381 MG2. A partir das curvas ajustadas foi estimada a DL_{50} para o 15º dia, para cada um dos estádios embrionários considerados.

As taxas de mortalidade e freqüência de embriões malformados observadas com diferentes doses de radiação foram submetidas a técnicas padronizadas de análise de regressão ou a testes de comparação de médias (análise de variância ou teste t), após a transformação da variável estudada segundo $Y' = \arcsin \sqrt{Y}$. Para as análises de regressão empregaram-se programas de computação eletrônica que escolhem automaticamente a função que melhor se ajusta ao conjunto de dados, em função do valor do coeficiente de correlação obtido. Os índices mitóticos obtidos nas diferentes doses foram submetidos ao mesmo tratamento. Para a comparação das freqüências de aberrações cromossômicas empregaram-se, além de uma análise de regressão para verificar a existência de uma dependência funcional dessas freqüências em relação a diferentes doses, testes de qui-quadrado para se contrastar as freqüências absolutas observadas, em diferentes tempos ou em diferentes doses. O nível de significância escolhido para os testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da Radiossensibilidade de Embriões

4.1.1. Mortalidade

As figuras 5 (A-E) mostram as curvas de mortalidade de embriões de B.glabrata submetidos à ação da radiação ionizante, nos vários estádios de desenvolvimento. Pode-se verificar que:

- . os ovos no estágio de clivagem (5A) apresentaram um aumento rápido na mortalidade entre o terceiro e o quinto dia nas doses de 10 e 15 Gy, atingindo, respectivamente, 80,4 e 93,5% no 15º dia após o tratamento. A mortalidade na dose de 5 Gy foi de 55,8%.
- . os embriões no estágio de blástula (5B) apresentaram taxas de mortalidade de 24,7, 53,6 e 76,7%, nas doses de 5, 10 e 15 Gy, respectivamente, no 15º dia após a irradiação;
- . as taxas de embriões mortos no estágio de gástrula (5C) foram 11,7, 40,9 e 85,6%, respectivamente, para as doses de 5, 10 e 15 Gy;
- . em trocófora jovem (5D), as porcentagens de embriões mortos foram relativamente mais al-

tas em relação ao controle (4,9%) somente para doses a partir de 5 Gy (8,1%) com 40,7, 67,9 e 91,7% de mortalidade nas doses de 10, 15 e 20 Gy, respectivamente;

- . no estágio de trocófora (5E), o valor de mortalidade na dose de 5 Gy (3,9%) foi muito próximo ao do controle (3,1%), sendo que as taxas de embriões mortos aumentaram consideravelmente para as doses acima de 10 Gy (7,8%), com 28,4, 64,0 e 95,0%, respectivamente, nas doses de 15, 20 e 25 Gy;
- . não houve diferença significativa entre as porcentagens de mortalidade de embriões irradiados nos estádios de gástrula (11,7%) e trocófora jovem (8,1%) com 5 Gy e trocófora com 5 (3,9%) e 10 Gy (7,8%). Uma análise de variância realizada após a transformação dos dados revelou um valor de F (3; 16) igual a 2,79 ($p > 0,05$).

4.1.1.1. Curvas de Sobrevida

A figura 6 apresenta as curvas ajustadas de sobrevida de embriões de B. glabrata nas várias fases de desenvolvimento, submetidos à ação da radiação gama.

Observa-se que em todos os estádios embrionários há um declínio na curva de sobrevivência à medida que aumenta a dose de radiação, sendo esta queda tanto mais pronunciada quanto mais precoce é o embrião.

As estimativas dos parâmetros do modelo quadrático, utilizado para o ajuste das curvas de sobrevivência, com os respectivos desvios padrões e os coeficientes de ajuste do modelo (R^2), para cada um dos estádios embrionários, encontram-se na TABELA II. Os coeficientes de ajuste indicam que o modelo se ajusta satisfatoriamente aos dados ($R^2 > 0,85$) para cada uma das curvas.

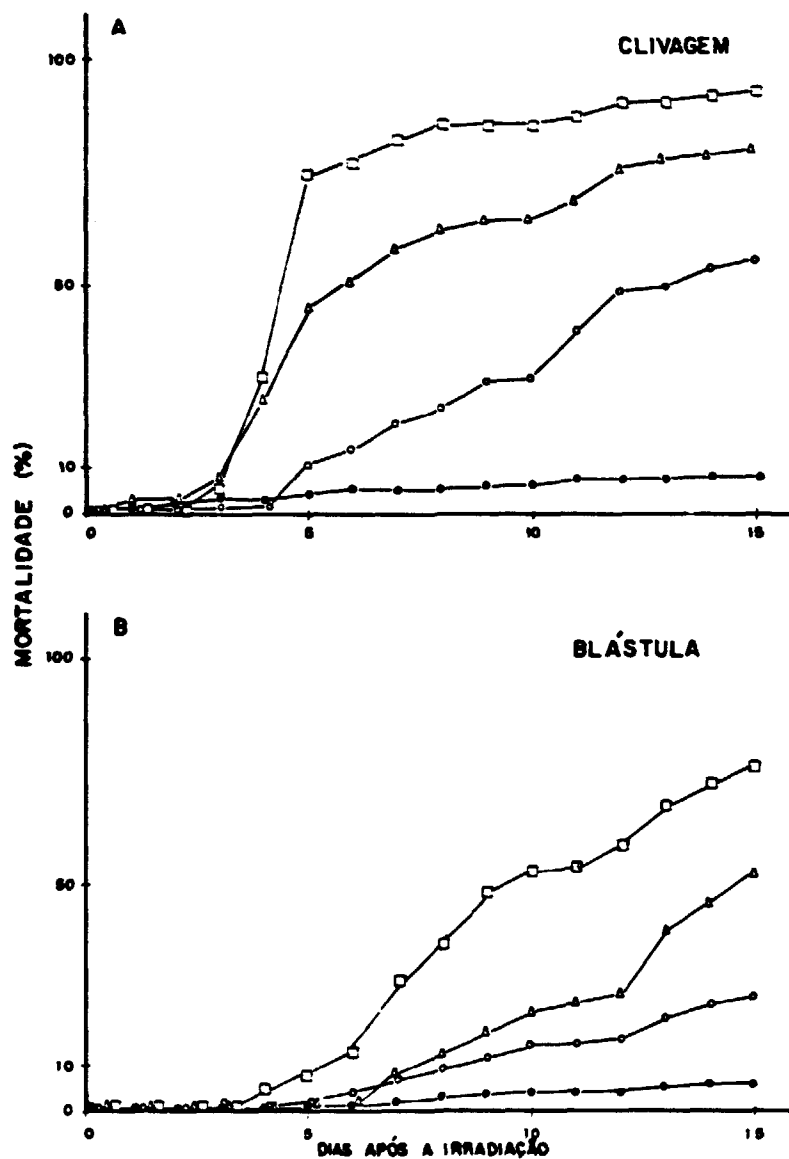
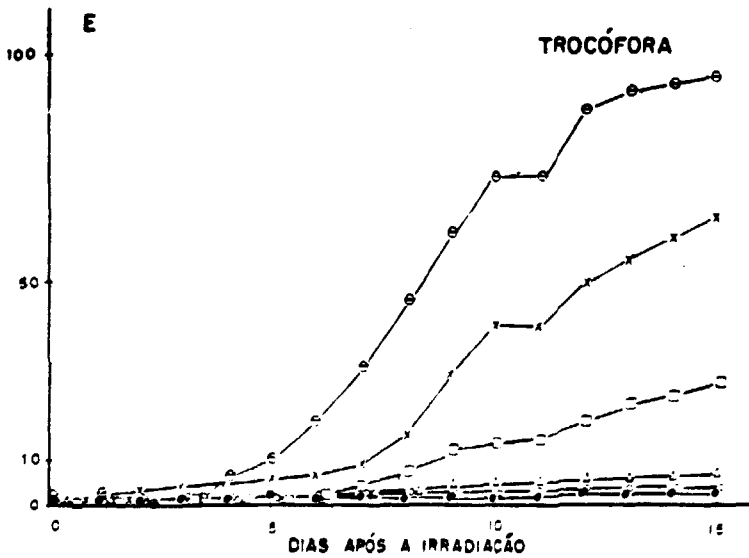
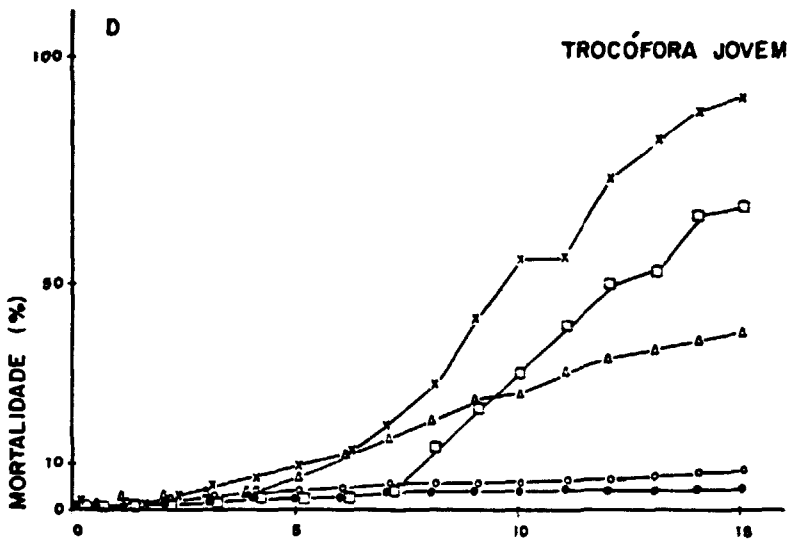
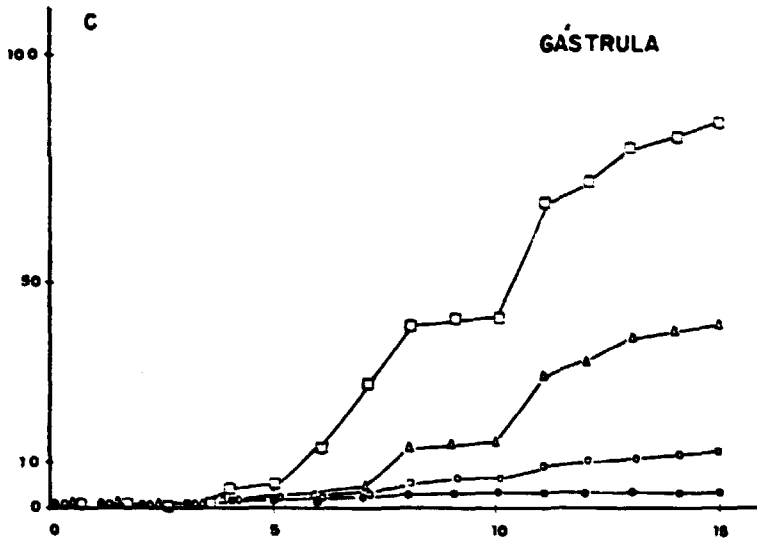


FIGURA 5 (A-E): Curvas de mortalidade cumulativa de embriões de *Biomphalaria glabrata*, submetidos à ação da radiação gama de Co-60, nos vários estádios de desenvolvimento. ●—● 0 Gy; ○—○ 5 Gy; △—△ 10 Gy; □—□ 15 Gy; x—x 20 Gy; ◉—◉ 25 Gy.



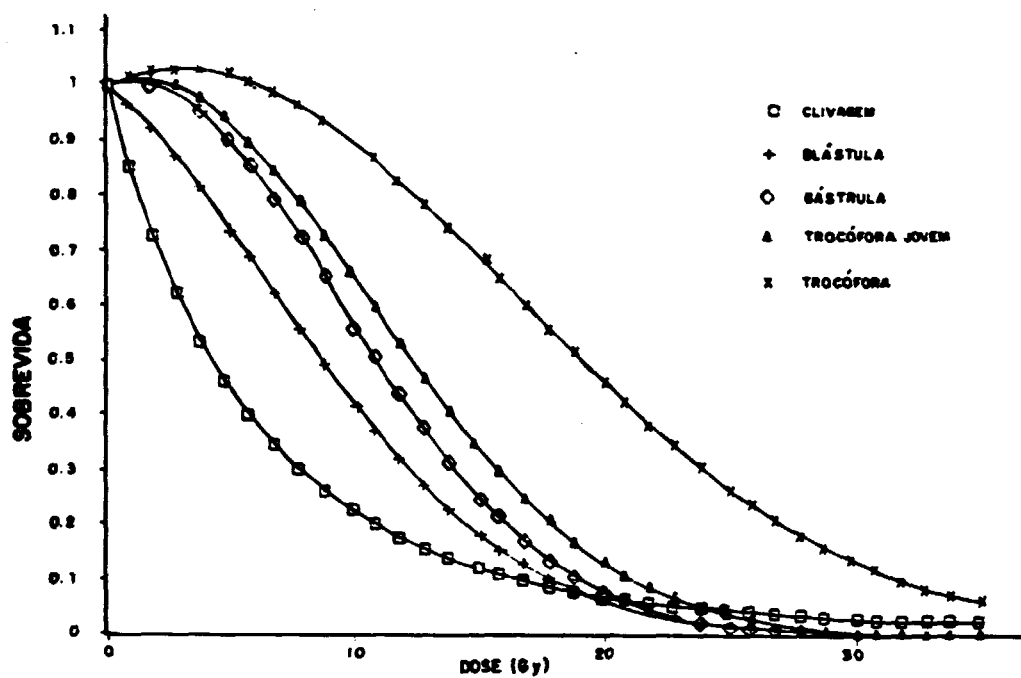


FIGURA 6: Curvas ajustadas de sobrevivência de embriões de Biomphalaria glabrata irradiados nos vários estágios de desenvolvimento embrionário. O ajuste das curvas foi feito pelo método de regressão linear ponderada.

TABELA II: Estimativas do modelo dose-resposta para sobrevivência, a pós 15 dias, para cada um dos estádios de desenvolvimento embrionário considerados, através do método da regressão linear ponderada.

ESTÁDIO	PARÂMETRO	ESTIMATIVA	DESVIC PADRÃO	R ²
Clivagem	a	0,165	0,024	0,940
	b	-0,002	0,003	
Blãstula	a	0,031	0,024	0,862
	b	0,005	0,002	
Gãstrula	a	-0,016	0,016	0,871
	b	0,007	0,002	
Trocófora jovem	a	-0,017	0,011	0,885
	b	0,006	0,001	
Trocófora	a	-0,018	0,006	0,869
	b	0,003	0,000	

4.1.1.2. Estimativas da DL₅₀

As estimativas da DL₅₀ para o 15º dia após a irradiação para cada um dos estádios embrionários encontram-se na TABELA III. As estimativas foram feitas usando curvas ajustadas pelo método da regressão linear ponderada.

TABELA III: Estimativas da DL_{50} (15 dias) para cada um dos estádios embrionários de Biomphalaria glabrata.

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	DL_{50} (15 dias) (Gy)
Clivagem	4,4
Blástula	8,9
Gástrula	11,1
Trocófora jovem	12,5
Trocófora	19,3

Pode-se observar um aumento da DL_{50} com o aumento da idade do embrião, atingindo, no estágio de trocófora, valores cinco vezes maiores do que na fase de clivagem.

4.1.2. Malformações

As figuras 7(A-E) representam as porcentagens de embriões malformados obtidas ao longo do tempo e em função da dose de radiação. Observa-se que em todos os estádios embrionários, exceção feita à clivagem (7A), o número de embriões com malformações aumenta rapidamente com o aumento da dose de radiação, diminuindo posteriormente durante os dias de observação.

A TABELA IV mostra as modas das frequências de embriões malformados obtidas com várias doses de radiação, nos diferentes estádios de desenvolvimento. Pode-se notar que:

- . a moda dos embriões malformados obtida com dose de 5 Gy, no estágio de clivagem foi de 45,9% no 5º dia após o tratamento. Com o aumento da dose de radiação, as frequências dos embriões malformados diminuíram, com valores de 36,3 e 17,4% nas doses de 10 e 15 Gy, respectivamente. Uma análise de regressão com os dados transformados mostrou que existe uma função linear $Y' = 0,53 - 0,02X$, o que indica uma tendência de diminuição das frequências de embriões malformados com o aumento da dose de radiação (teste do coeficiente angular, $b = 0$ e do coeficiente de correlação, $r = 0$: $F(1; 13) = 22,89$; $p < 0,05$; teste de linearidade da função: $F(1; 12) = 0,27$; $p > 0,05$).
- . os valores máximos de embriões malformados na dose de 5 Gy diminuíram significativamente com o aumento da idade do embrião. A análise estatística mostrou uma dependência funcional entre a porcentagem de embriões malformados e o estágio embrionário em que foi realizada a irradiação. Essa dependência pode ser expressa pela equação $Y' = 0,40 - 0,09x$, onde Y' é a porcentagem transformada de embriões malformados e x é o valor nominal do estágio embrionário. O coeficiente de correlação ($r = -0,978$) e o coeficiente angular ($b = -0,09$) são signi

- ficativamente diferentes de zero ($t = 8,18$; g.l.=3; $p < 0,05$);
- . não houve diferença significativa entre as modas dos embriões malformados na dose de 10 Gy nos estádios de blãstula (55,5%) e gãstrula - (44,6%) ($t = 1,50$; g.l. = 5; $p > 0,05$);
 - . os valores obtidos com a dose de 15 Gy nos estádios de blãstula (73,8%), gãstrula (81,2%) e trocõfora jovem (68,7%) não diferiram significativamente entre si ($F(2; 12) = 1,16$; $p > 0,05$);
 - . em trocõfora jovem, as frequências de embriões malformados foram relativamente mais altas em relação ao controle (2,3%), para doses a partir de 10 Gy (26,3%);
 - . no estágio de trocõfora, o valor dos embriões malformados na dose de 5 Gy (1,2%) foi igual ao do controle, sendo que, na dose de 10 Gy (4,6%), houve uma diferença estatística significativa em relação ao controle ($t = 3,43$; g.l. = 4; $p < 0,05$). Nas doses a partir de 15 Gy (22,4%) houve um aumento considerável nas modas dos embriões malformados com o aumento da dose de radiação, com 59,0 e 84,3%, respectivamente, a 20 e 25 Gy.

A observação IN VIVO de desovas irradiadas mostrou ainda que as malformações inespecíficas (FIGURA 8) foram os tipos mais comuns em todos os estádios embrionários e em todas as doses analisadas. Outros tipos de malformações foram também observados, porém em frequência muito baixa, por exemplo, exogástrula, malformação da concha, eversão do estomodêo e malformações cefálicas do tipo monoftalmia e duplicação dos olhos (FIGURA 9). Mencione-se que as exogástrulas e malformações cefálicas foram encontradas em ovos irradiados nos estádios menos evoluídos, enquanto que, embriões com eversão do estomodêo e malformação da concha, nos estádios de trocôfora jovem e trocôfora.

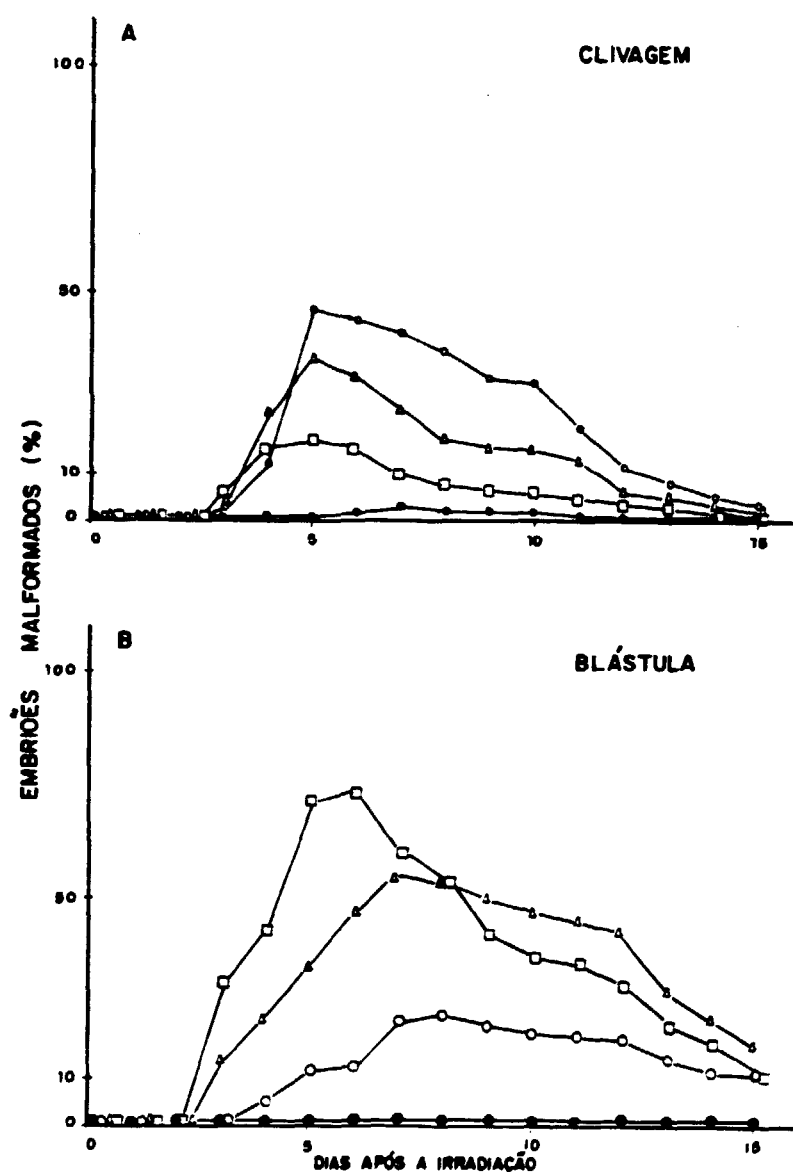


FIGURA 7(A - E): Curvas de porcentagens de embriões malformados de *Biomphalaria glabrata*, obtidas após o tratamento com radiação gama de ^{60}Co , nos vários estádios de desenvolvimento ●—● 0 Gy; ○—○ 5 Gy; ▲—▲ 10 Gy; □—□ 15 Gy; x—x 20 Gy; ◉—◉ 25 Gy.

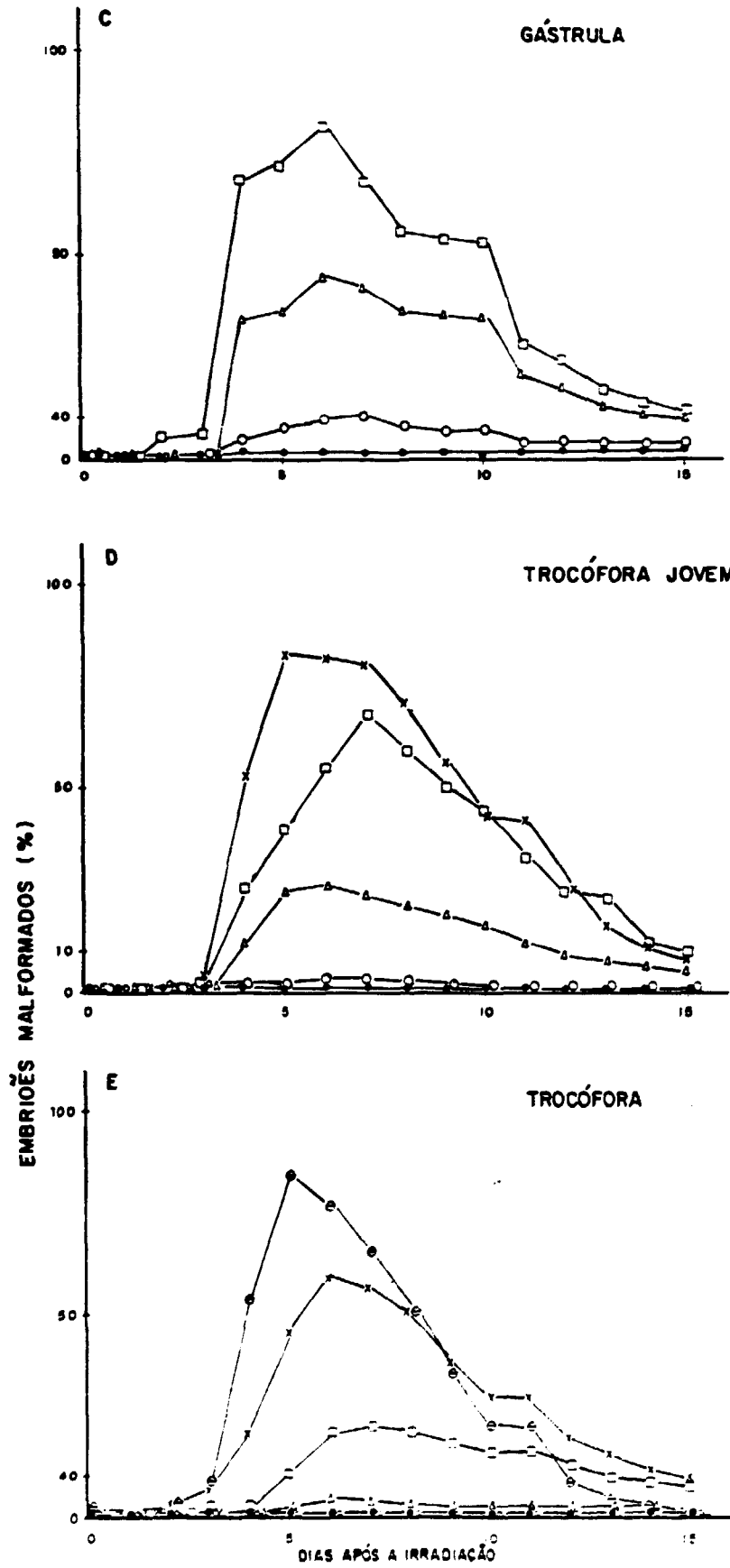


TABELA IV: Dias correspondentes às modas das taxas de embriões malformados referentes às diferentes doses e estádios de desenvolvimento.

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	DOSE (Gy)	DIA APÓS A IRRADIAÇÃO EM QUE OCORREU MAIOR NÚMERO DE EMBRIÕES MALFORMADOS	EMBRIÕES MALFORMADOS (%)
CLIVAGEM	0	7	3,5%
	5	5	45,9%
	10	5	36,3%
	15	5	17,4%
BLÁSTULA	0	6	1,1%
	5	8	24,3%
	10	7	55,5%
	15	6	73,8%
GÁSTRULA	0	6	0,7%
	5	7	9,2%
	10	6	44,6%
	15	6	81,2%
TROCÓFORA JOVEM	0	1	2,3%
	5	6	3,1%
	10	6	26,3%
	15	7	68,7%
	20	5	82,7%
TROCÓFORA	0	3 e 4	1,2%
	5	1	1,2%
	10	6	4,6%
	15	7	22,4%
	20	6	59,0%
	25	5	84,3%



FIGURA 8: Desova irradiada no estágio de blástula com 10 Gy, no 69 dia após o tratamento, mostram vários embriões com malformações inespecíficas. A seta indica um embrião morto. 48 x.

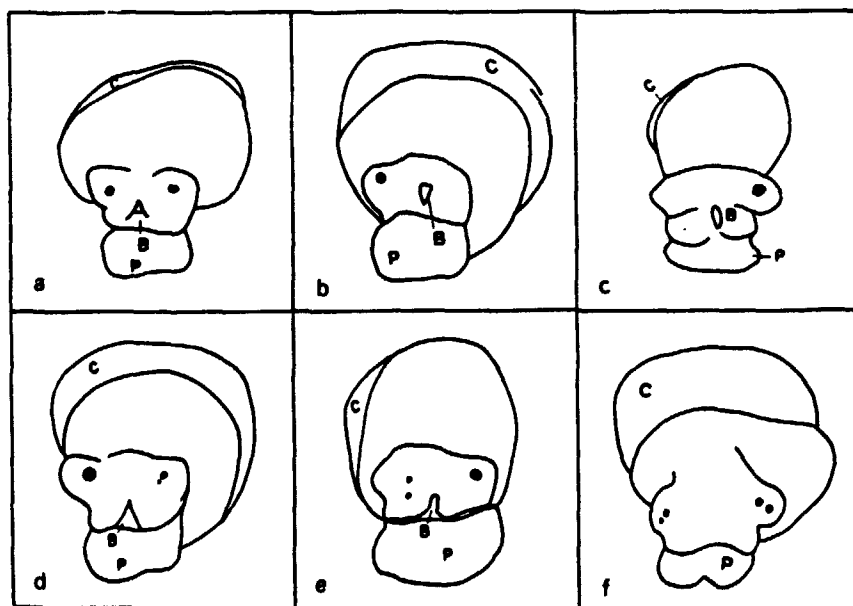


FIGURA 9: Desenho esquemático de malformações cefálicas encontradas em embriões de Biomphalaria glabrata, irradiados no estágio de blástula, com 10 Gy de radiação gama e fixados no 59 dia após a exposição, quando os embriões se encontravam no estágio de veliger. a) embrião normal; b) monoftalmia destra; c) monoftalmia sinistra; d) duplicação sinistra dos olhos, e) duplicação destra dos olhos; f) duplicação destra e sinistra dos olhos. B = boca; C = concha; P = pé. 90x.

4.1.3. Eclosão

As figuras 10 (A-E) mostram a influência da radiação gama sobre a eclosão de embriões de B.glabrata nos vários estádios de desenvolvimento. Pode-se observar que:

- . a taxa de embriões eclodidos decresceu consideravelmente com o aumento da dose de radiação, em todas as fases embrionárias.
- . a taxa de eclosão dos embriões controle variou de 90 a 96,8%.
- . a porcentagem de eclosão na dose de 5 Gy aumentou com o aumento da idade do embrião.
- . as freqüências de eclosão observadas nos estádios de clivagem (13,5%), blãstula (14,4%) e gãstrula (16,0%) irradiados com 10 Gy foram muito próximas entre si.
- . o valor de eclosão observado no estádio de trocófora jovem irradiada com 5 Gy (88,5%) foi muito próximo ao do controle.
- . não houve diferença na taxa de eclosão de trocófora irradiada com 5 Gy (95,4%) em relação ao controle.
- . os valores de eclosão na dose de 15 Gy foram muito baixos para todos os estádios embrionários analisados.

A figura 11 mostra os caramujos jovens saindo da cápsula do ovo. Cabe assinalar que os embriões malformados dificilmente chegavam a eclodir, morrendo a maioria dentro da cápsula do ovo.

A figura 12 mostra as modas das freqüências da eclosão dos embriões controle e irradiados com várias doses de radiação, nas diferentes fases de desenvolvimento.

Observou-se ainda, em desovas irradiadas, a ocorrência de embriões que não eclodiram até o 15º dia após a exposição. Eles apresentavam aspecto aparentemente "normal" e eram indistinguíveis dos controles. O número de embriões não eclodidos foi particularmente mais alto em desovas irradiadas com 15 Gy no estágio de trocófora, com cerca de 55% de não eclodidos (TABELA V).

A TABELA V sintetiza os resultados de mortalidade, malformações e eclosão obtidos no 15º dia após a irradiação e utilizados como critérios de avaliação da radiosensibilidade dos embriões.

A TABELA VI mostra os resultados obtidos de embriões irradiados no estágio de velíger jovem (100 - 110 horas após a primeira segmentação do ovo, à temperatura de 25º C, segundo Camey e Verdonk, 1970) com 20 e 25 Gy de radiação gama.

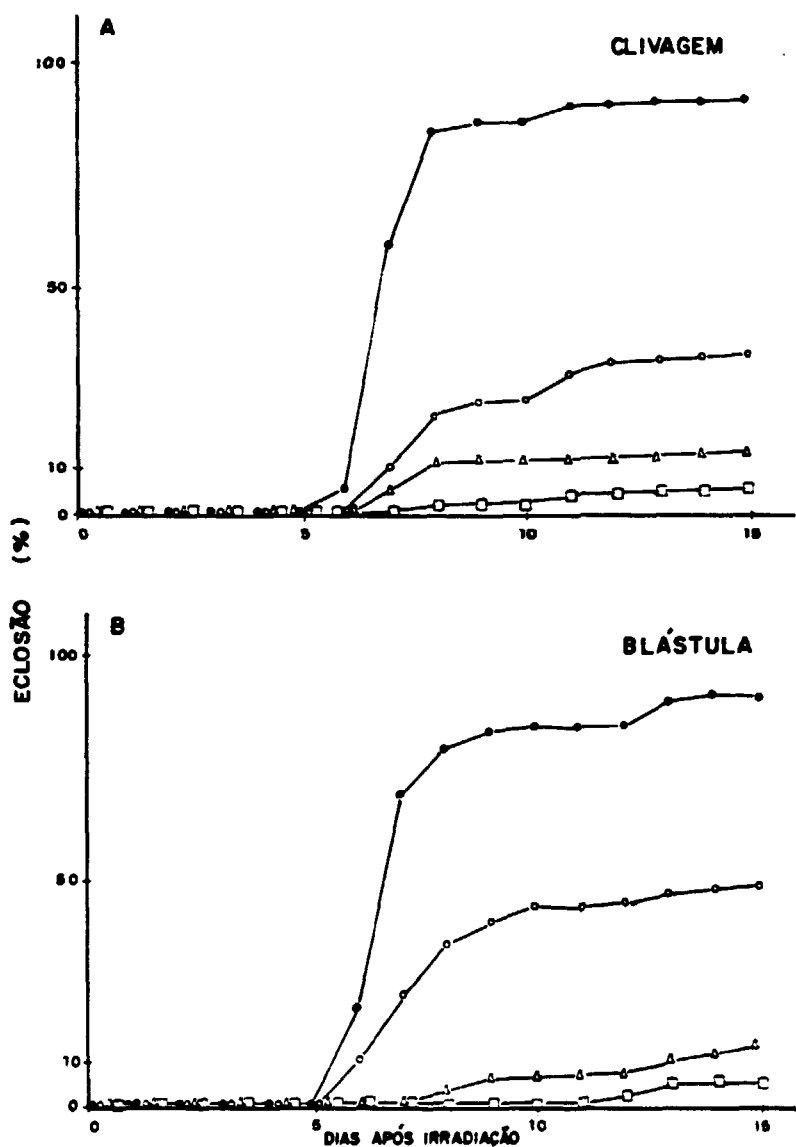


FIGURA 10 (A - E): Curvas de eclosão cumulativa de embriões de Biomphalaria glabrata, submetidos à ação da radiação ionizante nos vários estádios de desenvolvimento. ●—● 0 Gy; ○—○ 5 Gy; △—△ 10 Gy; □—□ 15 Gy; ×—× 20 Gy; ◐—◐ 25 Gy.

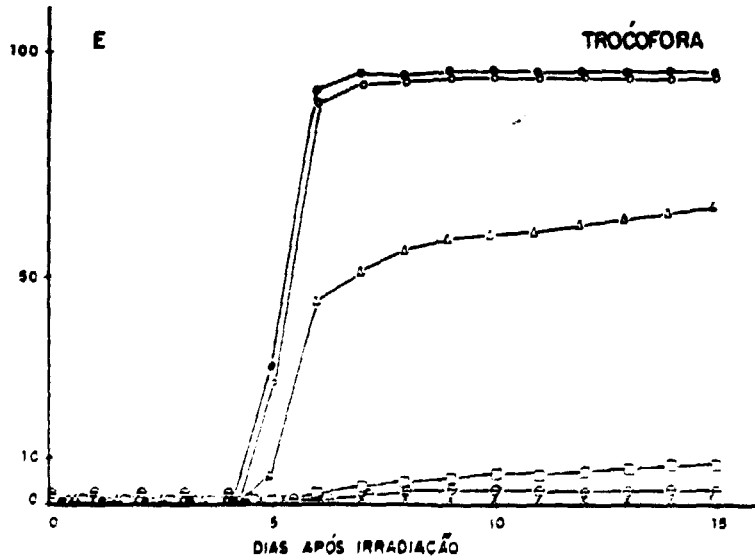
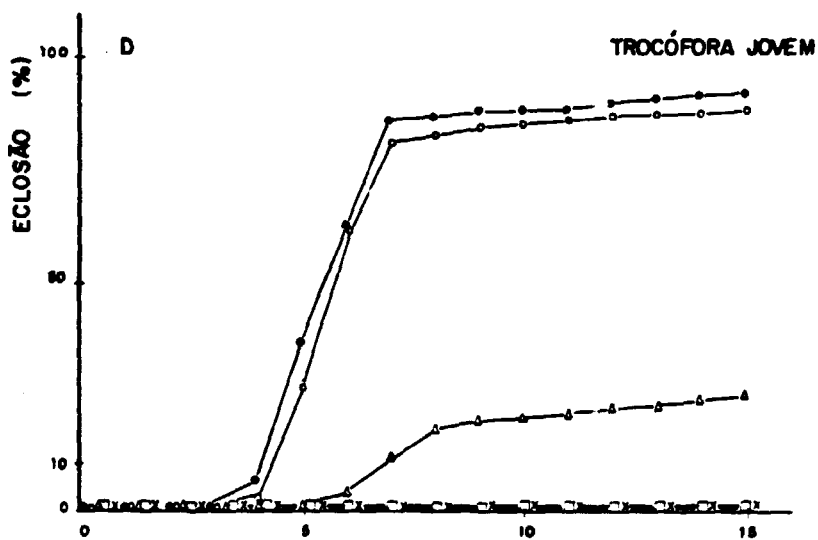
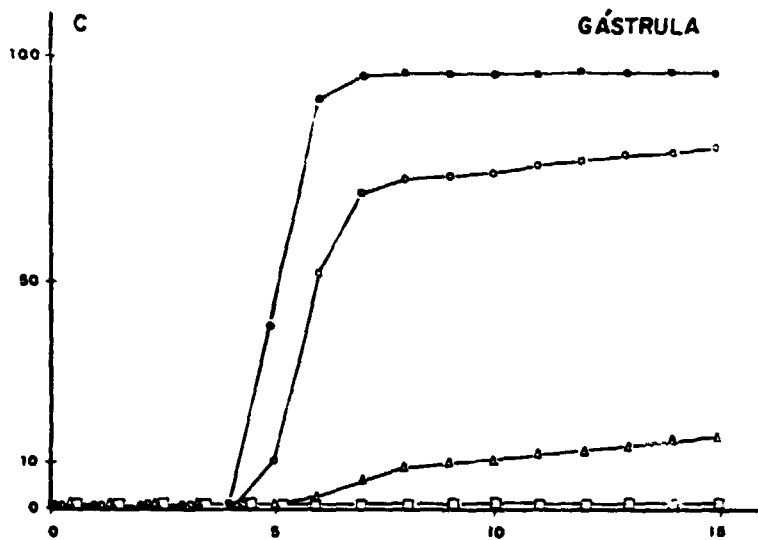




FIGURA 11: Desova controle de B. glabrata, mostrando caramujos jovens emergindo da cápsula de ovo. 48 x.

TABELA V: Efeitos da radiação gama de Co-60 sobre os embriões de Biomphalaria glabrata nos diversos estádios de desenvolvimento, 159 dia após a irradiação.

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	DOSE (Gy)	NÚMERO DE DESOVAS	NÚMERO DE EMBRIÕES	MORTOS (%)	S O B R E V I D A (%)			
					MALFORMADOS	ECLODIDOS	"NORMAIS"	NÃO ECLODIDOS
CLIVAGEM	0	28	557	8,40	0,20	90,40		1,10
	5	28	693	55,80	3,60	34,60		5,90
	10	29	701	80,40	2,80	13,50		3,30
	15	29	596	93,50	0,50	5,20		0,80
BLÁSTULA	0	44	1154	6,50	0,20	91,10		2,38
	5	41	1032	24,70	11,70	48,60		15,00
	10	41	1130	53,60	17,80	14,40		14,20
	15	41	918	76,70	15,40	5,50		2,40
GÁSTRULA	0	40	994	3,20	0,00	96,80		0,00
	5	41	1085	11,70	2,70	79,40		6,20
	10	41	1060	40,90	9,60	16,00		33,50
	15	41	1019	85,60	10,60	0,40		3,40
TROCÓFORA JOVEM	0	35	773	4,90	0,30	92,60		2,30
	5	38	766	8,10	0,40	88,50		3,00
	10	41	858	40,70	5,50	26,10		27,70
	15	38	1034	67,90	10,80	0,50		20,80
	20	27	895	91,70	8,00	0,00		0,20
TROCÓFORA	0	42	953	3,10	0,00	96,50		0,40
	5	42	931	3,90	0,00	95,40		0,60
	10	42	908	7,80	0,70	66,40		25,20
	15	42	1111	28,40	7,50	9,10		55,00
	20	24	770	64,00	8,10	1,90		26,00
	25	25	840	95,00	1,80	3,20		0,00

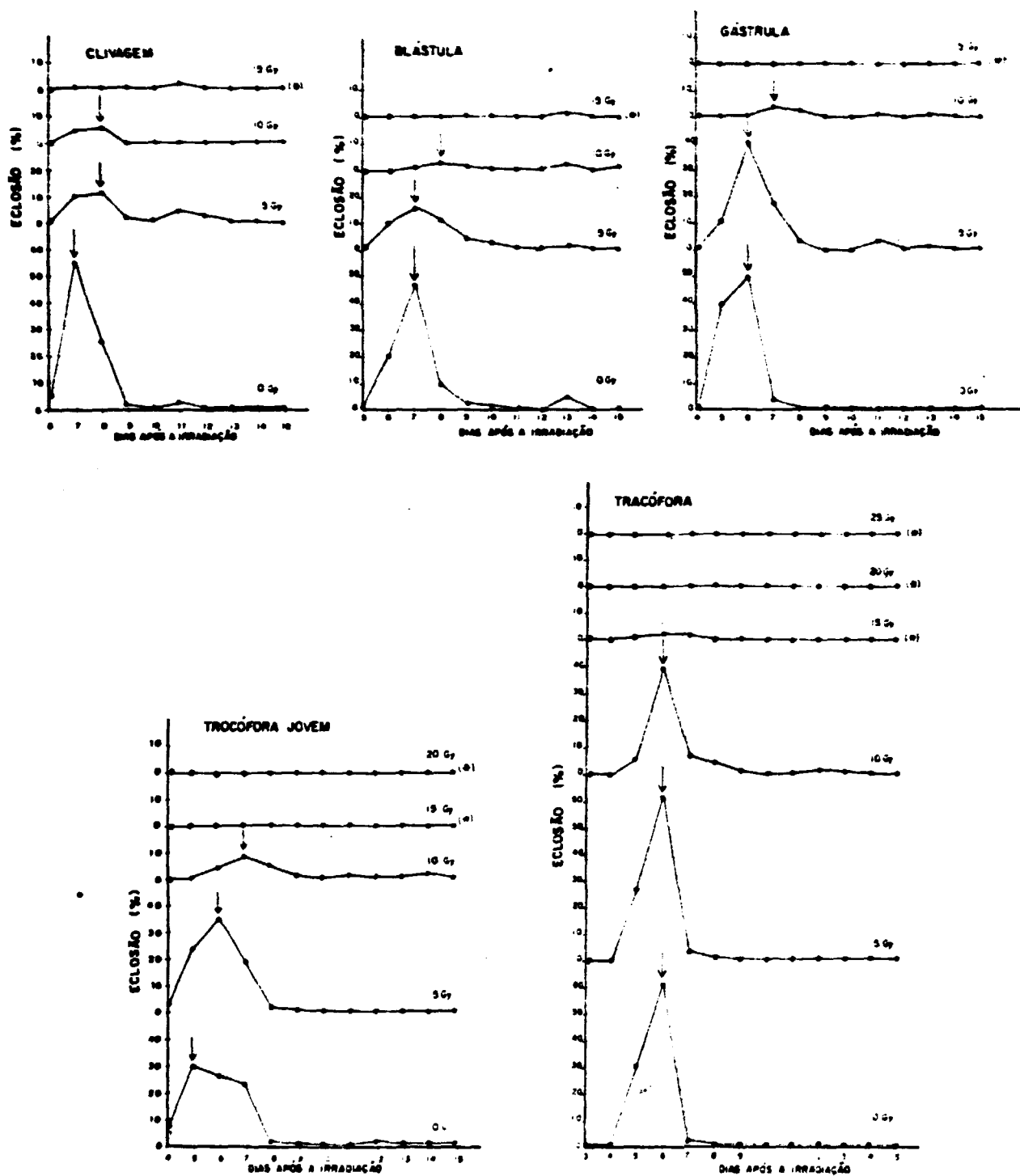


FIGURA 12: Distribuição das taxas de eclosão em função do número de dias, em embriões controle e irradiados de *B. glabrata*, nos vários estádios de desenvolvimento.

(*) Dados não suficientes para observação de modas (†)

TABELA VI: Efeitos da radiação gama de Co-60 sobre os embriões de B.glabrata, irradiados no estágio de veliger jovem, 15º dia após a irradiação.

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	DOSE (GY)	NÚMERO DE DESOVAS	NÚMERO DE EMBRIÕES	MORTOS (%)	VIVOS (%)		
					MALFOR- MADOS	ECLO- DIDOS	NÃO ECLO- DIDOS
Veliger	0	5	183	0,50	0	98,9	0,50
jovem	20	25	1118	16,0	1,2	5,0	77,7
	25	25	1074	58,5	2,5	4,9	34,1

4.2. Estimativa da Duração do Ciclo Celular

Fez-se uma estimativa da duração média do ciclo celular no embrião de B.glabrata, nos estádios entre a blástula e a trocófora jovem, com base no estudo de linhagens celulares realizado por Camey & Verdonk (1970; cálculo de Machado*). A estimativa do ciclo celular foi realizada em células epidérmicas, empregando-se o ajuste ao modelo de crescimento exponencial $N = N_0 e^{\lambda C_0}$

N = número final de células

N_0 = número inicial de células

λ = $\frac{h}{\Delta t}$ inclinação da reta

C_0 = duração do ciclo celular

(*) Cálculo feito por Paulo Zepheryno Lopes Machado, do Instituto de Biociências da USP.

O resultado obtido mostra um ciclo celular de 12 horas, aproximadamente (figura 13),

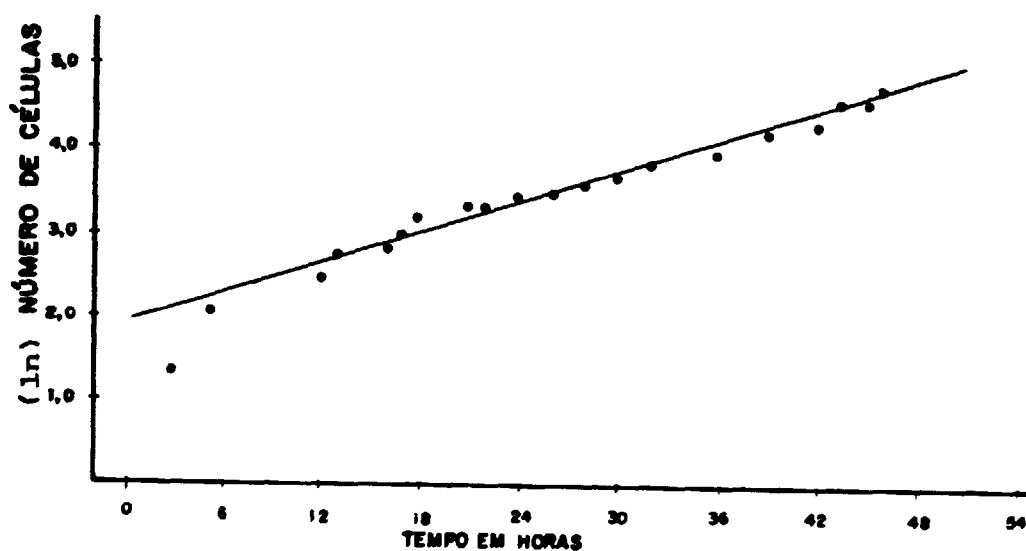


FIGURA 13: Número total de células embrionárias de B. glabrata em função do tempo, após a primeira segmentação do ovo, à temperatura de 25°C.

ADENDO

O texto da página 68 deve ser substituído pelo seguinte:

A regressão exponencial obtida pelo método dos quadrados mínimos foi $Y = 6,0445 \cdot e^{0,06X}$ ou, sob forma linearizada, $\ln Y = 1,8 + 0,06X$, onde Y é o número de células e X é o tempo medido em horas (figura 13).

Para se determinar a duração do ciclo celular (tempo médio em horas, necessário para dobrar o número de células) tomamos dois valores quaisquer : $Y(2) = N$ e $Y(1) = N_0$, tais que, $Y(2)/Y(1) = N/N_0 = 2$.

Obtemos então a equação $N/N_0 = 2 = e^{0,06 [X(2)-X(1)]} = e^{0,06 \cdot C_0}$, onde $X(2)-X(1) = C_0$ é a duração média do ciclo celular. Portanto, $2 = e^{0,06 \cdot C_0}$ e $\ln 2 = e^{0,06 \cdot C_0}$, portanto, $C_0 = \frac{\ln 2}{0,06} = 11,55 \approx 12$ horas, aproximadamente.

4.3. Análise Citogenética

As metáfases obtidas de embriões normais de B. glabrata mostraram o número cromossômico de $2n = 36$, com 12 pares metacêntricos (grupos I, II, V, VII e IX), 4 pares submetacêntricos (grupos III e VIII) e 2 pares subtelocêntricos (grupos IV e VI) (figura 14). Embora o cariótipo de B. glabrata apresente como número básico 36 cromossomos, verificaram-se algumas metáfases poliplóides, tanto nos preparados a partir de embriões controle, quando processados no estágio de trocófora jovem (figura 15), como de embriões irradiados, 48 horas após a irradiação (figura 16).

As figuras 17 e 18 apresentam vários tipos de aberrações cromossômicas estruturais encontradas em células de embriões irradiados com diferentes doses de radiação, 24 e 48 horas após a exposição. Os principais tipos foram dicêntricos, anéis, quebras, falhas acromáticas e fragmentos acêntricos.

A TABELA VII mostra as freqüências de vários tipos de aberrações cromossômicas radioinduzidas encontradas em células de embriões irradiados com doses de 5, 10 e 15 Gy, no estágio de blástula, fixados 24 horas após o tratamento. As freqüências de metáfases com aberrações cromossômicas nos grupos irradiados com 5, 10 e 15 Gy são cerca de 8,4, 17,5 e 22,4 vezes maiores, respectivamente, em relação ao controle. Igualmente, os números de aberrações por célula, nas doses de 5, 10 e 15 Gy são cerca de 8,3, 21,3 e 32,0 vezes maiores, respecti-

vamente, em relação ao grupo não tratado. A frequência de células com aberrações estruturais aumenta sensivelmente com o aumento da dose de radiação (figura 19).

As taxas de aberrações do tipo cromossômico foram significativamente mais altas do que as do tipo cromatídico, em todas as doses analisadas, 24 horas após a irradiação - (TABELA VIII).

As frequências de aberrações cromossômicas, 48 horas após a irradiação com 10 Gy de radiação gama acham-se na TABELA IX. Observa-se que a porcentagem de células com aberrações estruturais na dose de 10 Gy é cerca de 4,9 vezes maior do que a do grupo controle. Da mesma maneira, o número de aberrações por célula é cerca de 5,3 vezes maior em relação ao grupo não tratado. As taxas de aberrações do tipo cromossômico foram relativamente mais altas do que as do tipo cromatídico, tanto no grupo testemunha como no grupo irradiado com 10 Gy (TABELA X).

A TABELA XI apresenta a distribuição de células com número modal e hipomodal de cromossomos ou de centrômeros nos grupos irradiados e testemunha, 24 horas após o tratamento. Verificar que os números modais e hipomodais nos grupos controle e irradiados com 5 e 10 Gy estão muito próximos entre si. No entanto, a frequência de metáfases com 36 centrômeros ou cromossomos na dose de 15 Gy foi mais baixa em relação aos demais

grupos. O teste de qui-quadrado de homogeneidade rejeitou a hipótese de que o número de cromossomos seja homogêneo em todas as doses de radiação utilizadas. Excluindo-se a dose de 15 Gy, o teste não rejeitou a hipótese ao nível de 5%.

As frequências de células com número modal e hipomodal de cromossomos verificadas 48 horas após a irradiação com 10 Gy estão apresentadas na TABELA XII. Não houve uma diferença significativa entre os números modais de cromossomos na dose de 10 Gy e o grupo testemunha, 48 horas após a irradiação (qui-quadrado; $t = 2,27$; g.l. = 2; $P > 0,05$).

4.4. Índice Mitótico

Como as figuras metafásicas em preparações citológicas obtidas a partir de embriões irradiados eram relativamente pouco numerosas em relação ao controle, interessou - nos averiguar os índices mitóticos de células embrionárias submetidas a doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama, 24 horas após a exposição (TABELA XIII). Pudemos notar que há uma redução de 50,4, 56,9 e 77,3% nos valores de índices mitóticos, nas doses de 5, 10 e 15 Gy, respectivamente, em relação ao controle.

A figura 20 mostra os índices mitóticos em função da dose, de células de embrião, irradiado na fase de blástula, 24 horas após o tratamento.

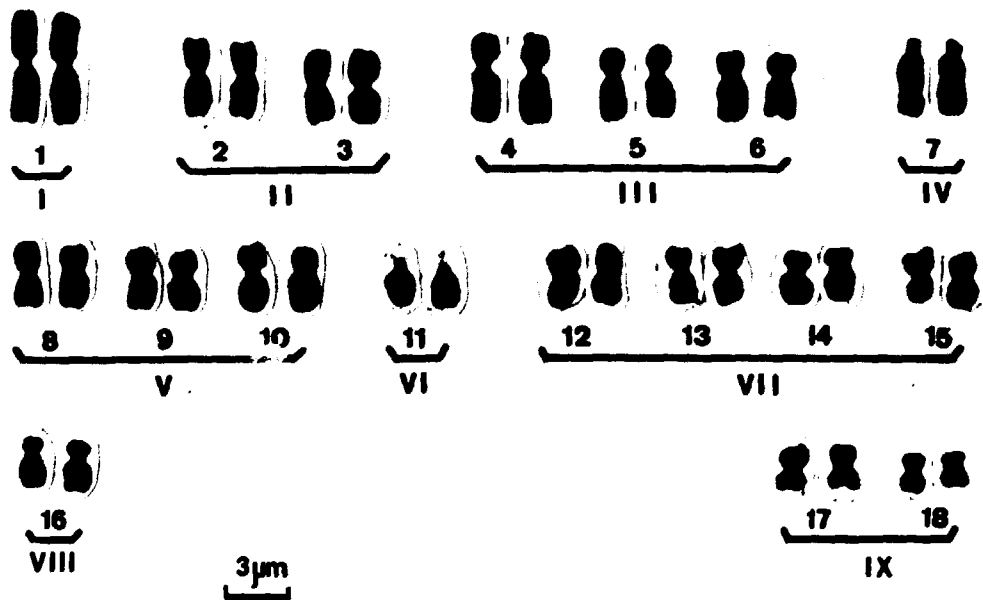


FIGURA 14: Cariótipo normal de embrião de *Biomphalaria glabrata*, contendo $2n = 36$ cromossomos, classificados em 12 pares metacêntricos (grupos I, II, V, VII e IX), 4 pares submetacêntricos (grupos III e VIII) e 2 pares subtelo-cêntricos (grupos IV e VI).

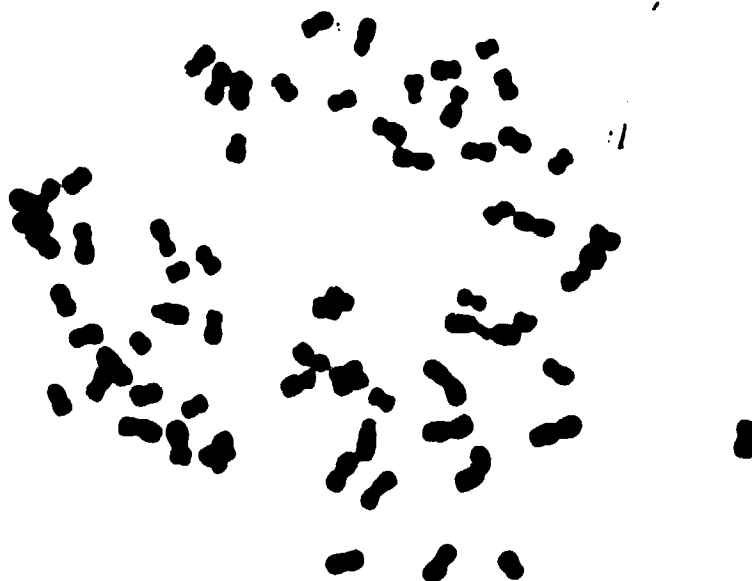


FIGURA 15: Célula poliplóide normal originária de trocófora jovem de B.glabrata. 1.600x.



FIGURA 16: Metáfase poliplóide com vários cromossomos dicêntricos e tricêntricos, obtida de embriões irradiados com 10 Gy no estágio de blástula, 48 horas após o tratamento. 2.560x.



FIGURA 17: Tipos de aberrações cromossômicas encontradas em células embrionárias de B. glabrata: a) falha cromatídica; b) falhas cromossômicas; c) anel cêntrico; d) anel acêntrico. 2 400X.

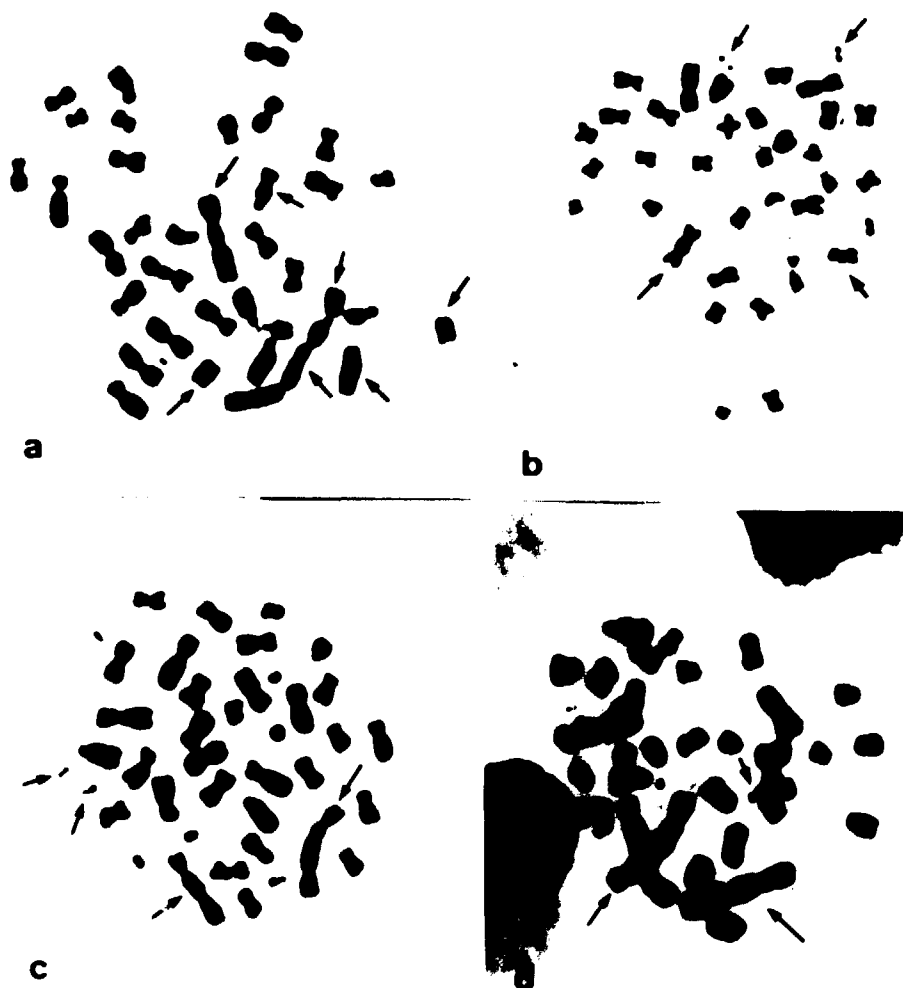


FIGURA 18: Tipos de aberrações cromossômicas encontradas em células embrionárias de B.glabrata: a) tricêntrico, dicêntricos e fragmentos acêntricos; b ,c) dicêntricos e fragmentos acêntricos puntiformes ("minutes"); d) tricêntricos e fragmentos acêntricos puntiformes ("minutes"). 2.400X.

TABELA VII: Freqüências de aberrações cromossômicas radioinduzidas encontradas em embriões de Biomphalaria glabrata, irradiados no estágio de blástula com doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama de Co-60, fixados 24 horas após a exposição.

DOSE (Gy)	NÚMERO DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES									Nº DE METÁFASES COM ABERRAÇÕES (%)	Nº TOTAL DE ABERRAÇÕES (Nº DE ABER- RAÇÕES POR CÉLULA)	
		CROMOSSÔMICAS						CROMATÍDICAS					
		D	T	AC	AA	FA	Q	G	FA	Q			G
0	450	1	0	0	0	0	0	3	1	4	3	10 (2,22)	12 (0,03)
5	500	34	1	2	1	51	2	7	20	1	4	93 (18,60)	123 (0,25)
10	550	81	2	2	4	147	33	40	30	6	10	214 (38,91)	355 (0,64)
15	450	82	5	5	8	258	3	17	38	5	12	224 (49,78)	433 (0,96)

D=dicêntrico; T=tricêntrico; AC=anel cêntrico; AA=anel acêntrico; FA= fragmento; Q=quebra; G=falha acromática

TABELA VIII: Frequência de aberrações cromossômicas e cromatídicas encontradas em embriões de B.glabrata no estágio de blástula, irradiados com diferentes doses de radiação, fixados 24 horas após a exposição.

DOSE (GY)	Nº DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES		
		CROMOSSÔMICAS (%)	CROMATÍDICAS (%)	TOTAL
0	450	4 (33,33)	8 (66,67)	12
5	500	98 (79,68)	25 (20,32)	123
10	550	309 (87,04)	46 (12,96)	355
15	450	378 (87,30)	55 (12,70)	433

TABELA IX: Frequências de aberrações cromossômicas radioinduzidas encontradas em embriões de B.glabrata, irradiados no estágio de blástula com dose de 10 Gy de radiação gama, processados para a análise citogenética 48 horas após a irradiação.

DOSE (Gy)	NÚMERO DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES										Nº DE METÁFASES COM ABERRAÇÕES (%)	Nº TOTAL DE ABERRAÇÕES (Nº DE ABER- RAÇÕES POR CÉLULA)
		CROMOSSÔMICAS							CROMATÍDICAS				
		D	T	AC	AA	FA	Q	G	FA	Q	G		
0	450	0	0	1	0	2	3	2	0	0	4	11 (2,44)	12 (0,03)
10	500	19	1	3	0	29	2	9	12	0	3	60 (12,0)	78 (0,16)

D=dicêntrico; T=tricêntrico; AC=anel oêntrico; AA=anel acêntrico; FA=fragmento acêntrico; Q=quebra; G=falha acromática

TABELA X: Frequências de aberrações cromossômicas e cromatídicas encontradas em embriões de B.glabrata, irradiados com doses de 10 Gy de Co-60, fixados 48 horas a pós a exposição.

DOSE (GY)	Nº DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES		
		CROMOSSÔMICAS (%)	CROMATÍDICAS (%)	TOTAL
0	450	8 (66,67)	4 (33,33)	12
10	500	63 (80,77)	15 (19,23)	78

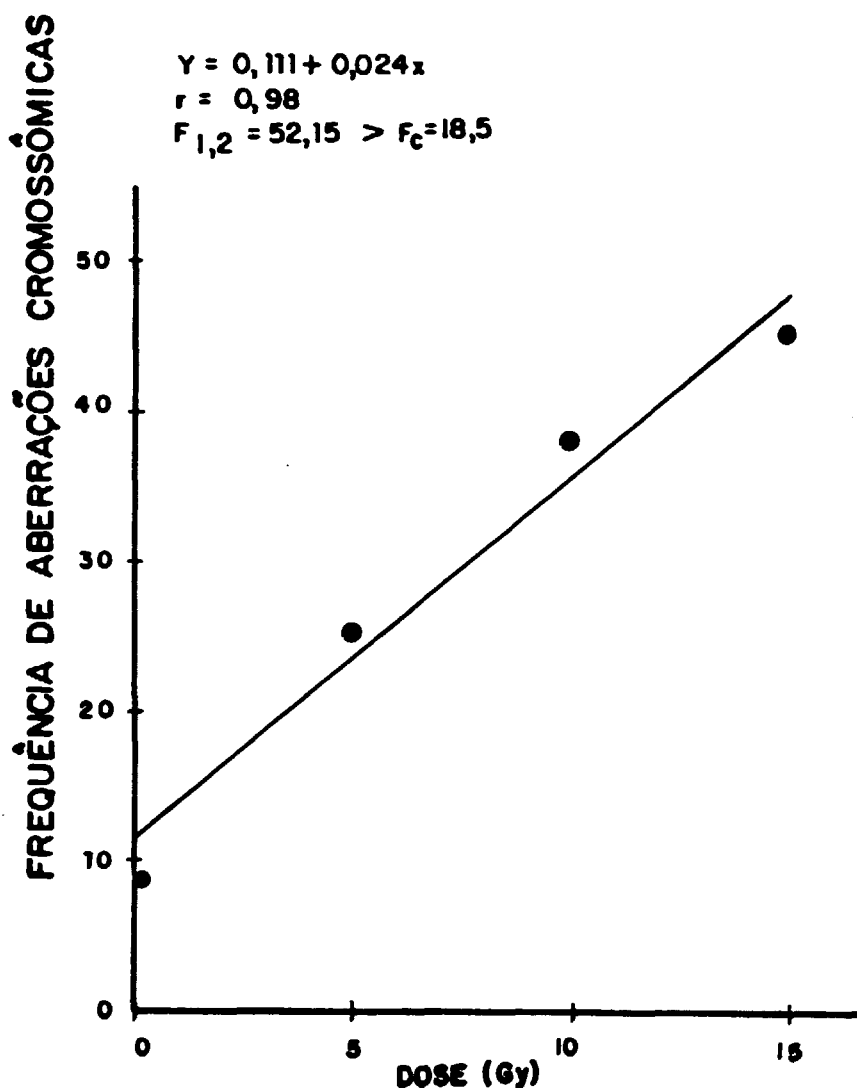


FIGURA 19: Frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas, em embriões de B. glabrata, tratados no estágio de blástula, processados 24 horas após a irradiação.

TABELA XI: Freqüências de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros (ou de cromossomos), observadas em embriões de B.glabrata no estágio de blástula, submetidos a doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama e processados 24 horas após o tratamento.

DOSE (Gy)	Nº DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS CONFORME O NÚMERO DE CENTRÔMEROS (%)		
		36	35	34
0	450	388 (86,22)	42 (9,33)	20 (4,44)
5	500	422 (84,40)	50 (10,0)	28 (5,60)
10	550	485 (88,18)	48 (8,73)	17 (3,09)
15	450	317 (70,44)	90 (20,0)	43 (9,56)

TABELA XII: Freqüências de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros (ou de cromossomos) observadas em embriões de B. glabrata no estágio de blástula, submetidos à dose de 10 Gy e processados 48 horas após a exposição.

DOSE (Gy)	Nº DE METÁFASES	FREQUÊNCIAS CONFORME O NÚMERO DE CENTRÔMEROS (%)		
		36	35	34
0	450	364 (80,89)	52 (11,56)	34 (7,56)
10	500	422 (88,40)	50 (10,0)	28 (5,60)

TABELA XIII: Índice mitótico de células embrionárias de B.glabrata, irradiadas com 5, 10 e 15 Gy de radiação gama, obtido 24 horas após a exposição.

DOSE (GY)	NÚMERO DE CÉLULAS ANALISADAS			I.M. (%)
	TOTAL	EM INTERFASE	EM DIVISÃO	
0	2169	1872	297	13,70
5	2013	1876	137	6,80
10	1981	1865	116	5,90
15	2063	2000	63	3,10

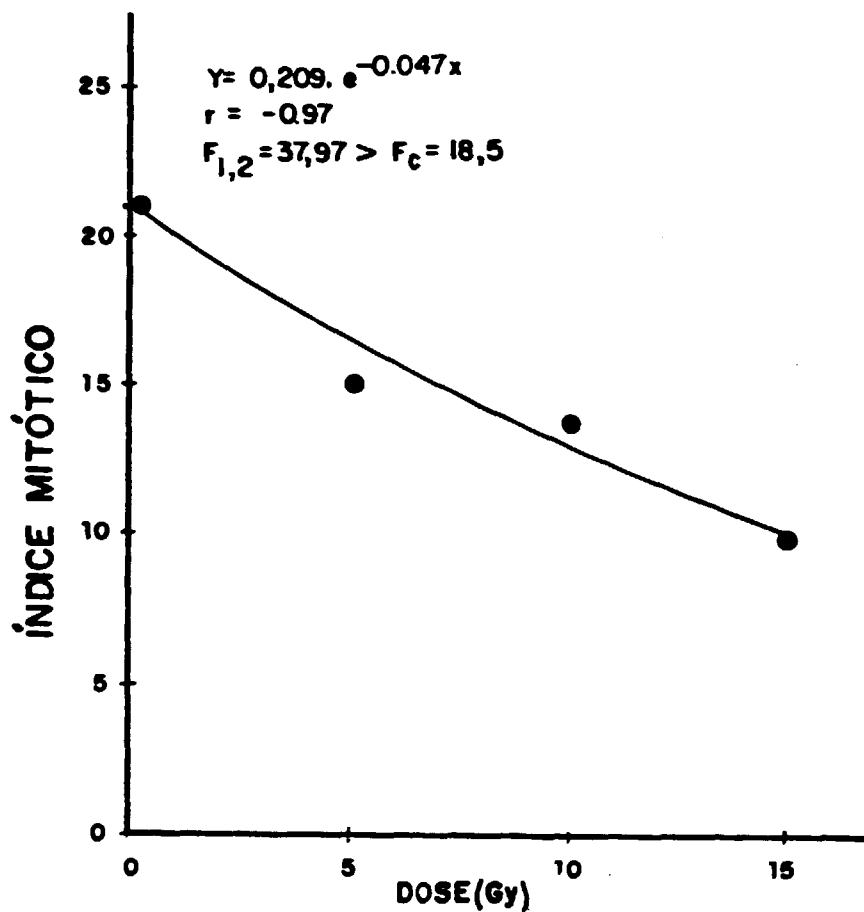


FIGURA 20: Índice mitótico de células embrionárias de B. glabrata, irradiadas com doses de 5, 10 e 15 Gy de Co-60, obtido 24 horas após o tratamento.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dentre os vários fatores ambientais, a radiação ionizante é um potente indutor de danos nos organismos vivos, podendo afetar não somente o indivíduo exposto, mas também os seus descendentes. Em vista deste fato, propusemo-nos a estudar as possíveis manifestações biológicas da radiação, em embriões de Biomphalaria glabrata. Os estádios embrionários utilizados foram aqueles caracterizados por eventos morfogenéticos bem definidos: a) fase de primeiras clivagens do ovo; b) blástula, onde ocorre uma rápida sucessão de divisões celulares; c) gástrula, pelo movimento morfogenético responsável pelo estabelecimento de primórdios de futuros tecidos e órgãos; d) trocófora jovem e trocófora, pela organogênese ativa e e) veliger jovem, pelos estados finais da organogênese (Camey & Verdonk, 1970). Os resultados obtidos mostram uma susceptibilidade relativamente alta dos embriões à ação da radiação gama, cuja intensidade de dano é dependente principalmente da dose aplicada e da idade do embrião no momento do tratamento.

Verificamos que o comportamento dos embriões dentro da mesma desova irradiada, muitas vezes não é homogêneo. Alguns embriões morrem dentro de poucos dias; outros mostram um desenvolvimento anormal com eventual morte dos embriões malformados; já outros eclodem como se eles tivessem "escapado" do dano da radiação. Entretanto, a resposta biológica dos em-

briões frente à radiação, de maneira geral seguiu uma tendência definida que foi avaliada para as doses escolhidas.

5.1. Análise da Radiossensibilidade

5.1.1. Mortalidade

As curvas de mortalidade obtidas para os diferentes estádios de desenvolvimento embrionário de B.glabrata mostram que a taxa de embriões mortos aumenta consideravelmente com o aumento da dose de radiação. À medida que aumenta a idade do embrião, a susceptibilidade diminui rapidamente. A fase de ovo é o mais radiossensível em todas as doses analisadas. Mais de 90% de indivíduos não se desenvolvem quando irradiados com dose de 15 Gy. Igualmente, blástula, gástrula e trocófora jovem mostram-se sensíveis ao tratamento, porém as curvas de mortalidade não são tão acentuadas quanto aquelas do estágio de ovo. A fase menos afetada é a de trocófora, com 28,40% de mortalidade na dose de 15 Gy; contudo, nas doses mais altas, há um aumento considerável da mortalidade, proporcional à dose de radiação. Os valores de DL_{50} (15 dias) estimados revelam que o estágio de ovo (4,4 Gy) é cerca de cinco vezes mais radiossensível do que o de trocófora (19,3 Gy).

As curvas de sobrevivência obtidas se assemelham às de células de mamíferos expostas a raios X ou gama, com um "ombro" ("shoulder") inicial nas faixas de doses mais baixas. Nos

sos resultados mostram um "ombro" mais acentuado com o aumento da idade do embrião a partir do estágio de gástrula, não se verificando nos estádios precoces de clivagem e blástula (figura 6). A curva de sobrevivência para o estágio mais evoluído, trocôfora, apresenta valores de sobrevivência maiores do que a unidade nas faixas de doses mais baixas. Essa aparente incongruência se deve ao fato de que na fase mais adiantada, a sobrevivência teve um decréscimo menos acentuado com o aumento da dose de radiação do que nos outros estádios embrionários. Isto fez com que o modelo matemático se ajustasse melhor aos valores negativos do parâmetro a , o que produziu um valor para a sobrevivência levemente maior do que 100 % nas regiões de doses mais baixas.

De acordo com os autores (Hall, 1978; Coggle, 1971; Alper, 1979; Prasad, 1984), a região do "ombro" na curva de sobrevivência indicaria um acúmulo de danos subletais. Com o aumento da dose de radiação, aumentaria a probabilidade de que mais células do embrião sejam atingidas e causariam assim, a morte do organismo. Estas observações sugerem um dano cumulativo da radiação. Uma outra interpretação atribuiria a presença do "ombro" na curva de sobrevivência ao processo de reparo e um aumento da letalidade com o aumento da dose de radiação seria devido a uma menor eficiência do reparo. Os estádios precoces de clivagem e blástula não apresentam "ombro", sendo a queda da sobrevivência em função da dose, mais acentuada do que nos estádios mais evoluídos.

Existem muitos dados mostrando que as células proliferativas são muito radiosensíveis e que um dos principais efeitos da radiação ionizante é a morte celular. Sabe-se também que a susceptibilidade das células varia com a fase do ciclo celular, sendo maior na mitose do que na interfase. Bonham (1955) ao verificar uma radiosensibilidade maior no estágio de clivagem em relação às fases posteriores do desenvolvimento em caramujo Helisoma subcrenatum, admitiu que quando a radiação é aplicada nos estádios mais evoluídos é pouco provável que todas as células do embrião estejam na fase mitótica "crítica" no momento do tratamento. O autor sugeriu que aquelas em interfase que sobrevivem à radiação possam ser responsáveis pela sobrevivência do organismo. Observações análogas foram feitas por Domon (1980) em embriões de camundongos na fase de dois blastômeros, cultivados IN VITRO. Esse autor assinalou que a fase do ciclo celular no momento da irradiação pode ser um fator importante na determinação da sensibilidade de embrião à radiação ionizante.

Assim sendo, os estádios mais precoces do desenvolvimento, caracterizados por uma rápida proliferação celular seriam mais severamente afetados pela radiação. Por exemplo, na fase de dois blastômeros, a morte de uma célula é crítica para o desenvolvimento do organismo, visto que esta célula representa o precursor de metade das células de um embrião. Neste estágio, um efeito de tudo ou nada parece operar ao nível da célula (Rugh, 1969; Boon-Niermeijer & Scheur, 1984; Boon-Niermeijer, 1987), dependendo da susceptibilidade da fase do ciclo celular no momento da irradiação.

A medida que o embrião se desenvolve, há um aumento progressivo na diferenciação celular com a especialização de tecidos e órgãos, coincidindo com o aumento da radioreistência dos embriões. O estágio de trocófora é o menos atingido pela radiação; provavelmente neste estágio, a maioria dos primórdios dos órgãos do adulto já estão quase formados. No entanto, a letalidade aumenta com o aumento da dose de radiação, 20 e 25 Gy. Neste caso, provavelmente a extensão da lesão induzida é tal que torna incompatível a sobrevivência do embrião.

Vários autores ao observarem uma queda na radiosensibilidade com o aumento da idade do embrião, em insetos (Mavor, 1927; Evans, 1936; Nauman & Whitten, 1976; Varanda et alii, 1985), peixes (Welander et alii, 1948), anfíbios (Butler, 1936, Rugh, 1954) e mamíferos (Russell & Russell, 1954; Wilson, 1954; Rugh, 1969), verificaram que a susceptibilidade à radiação estava intimamente correlacionada com a atividade mitótica e com o grau de diferenciação dos tecidos. Já em 1906, Bergonie e Tribondeau, com base em observações em células de mamíferos, tinham verificado que a radiosensibilidade de células ou tecidos era diretamente proporcional à sua taxa proliferativa e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação. Embora algumas exceções a esta regra sejam conhecidas, estas observações são confirmadas na maioria dos sistemas biológicos (Sanders & Kathen, 1983).

5.1.2. Malformações

Verificou-se em desovas irradiadas, uma freqüência relativamente alta de embriões malformados. Em todas as fases embrionárias, exceção feita à da clivagem, o número de embriões com malformações aumenta rapidamente com o aumento da dose de radiação, atingindo o máximo entre o quinto e o oitavo dia após o tratamento. No estágio de clivagem, entretanto, a taxa de embriões malformados é inversamente proporcional à dose de radiação, com valor máximo na dose de 5 Gy (45,9%). Uma queda significativa nas modas das freqüências dos embriões malformados com o aumento da dose de radiação, 10 (36,3%) e 15 Gy (17,4%), ocorreu em virtude da grande mortalidade dos ovos, dias após a irradiação, como já foi mencionado anteriormente. Por outro lado, os estádios que apresentam incidências mais altas de malformações na dose de 10 Gy são os de blástula e gástrula, com valores estimados de 55,5 e 44,6%, respectivamente, entre o sexto e o sétimo dia após a irradiação. Da mesma maneira, na dose de 15 Gy, os estádios de blástula, gástrula e trocófora jovem são os que apresentam valores mais altos, com 73,8, 81,2 e 68,7%, respectivamente, entre o sexto e o sétimo dia após a exposição. Já o estágio mais evoluído, trocófora, é o menos afetado no intervalo de dose de 5 a 15 Gy. Contudo, a freqüência de embriões com malformações aumenta rapidamente nas doses de 20 (59,0%) e 25 Gy (84,3%). Ao que tudo indica, quanto mais evoluído é o embrião, mais altas são as doses necessárias para produzir um efeito quantitativamente semelhante em relação aos embriões menos desenvolvidos.

É interessante observar que, de um modo geral, há uma tendência das modas acompanharem o aumento da dose de radiação. Quanto mais alta a dose, menor é o tempo necessário para verificar-se o efeito. Posteriormente, o número de embriões malformados diminui gradativamente durante os dias de observação em todos os estádios embrionários analisados, em virtude da morte paulatina desses embriões. Certamente, as malformações apresentadas pelos embriões deviam ser tão severas que a maioria dos malformados era incapaz de sobreviver, morrendo antes da eclosão. Em contrapartida, os sobreviventes que chegavam até a eclosão, raramente apresentaram malformações.

Os resultados obtidos mostram que os tipos de malformações resultantes do tratamento - malformações cefálica e inespecífica, exogástrula, malformação da concha e embrião com eversão do estomodeo - aparentemente não dependem da dose aplicada. Em todas as doses analisadas são encontrados os mesmos tipos de malformações. Contudo, a incidência de ocorrência é claramente dependente da dose. Por outro lado, verificou-se uma associação entre o tipo de malformação e o estádio de desenvolvimento no qual foi realizado a irradiação, com exceção feita à inespecífica que foi observada em todos os estádios. A exogástrula e a malformação cefálica são encontradas quando os estádios mais precoces de desenvolvimento são tratados, enquanto que a malformação da concha e embrião com eversão do estomodeo aparecem nos estádios mais evoluídos (trocófora jovem e trocófora). Observações semelhantes foram feitas por Verdonk (1965) em ovos de Limnaea stagnalis, submetidos a diferentes concentrações de LiCl (2, 2,5 e 3,5 x 10⁻⁵M) nas várias fases

de desenvolvimento. Vários tipos de malformações cefálicas foram obtidas, entre as quais, monoftalmia, acefalia, sinoftalmia, ciclopia e anoftalmia, sendo que os mesmos tipos estavam presentes em todas as concentrações usadas e geralmente nas mesmas proporções. Verdonk assinalou que, aparentemente, o tipo de malformação cefálica causada pelo tratamento com lítio não depende da concentração, mas que a concentração adequada para produzir malformações cefálicas está relacionada com a susceptibilidade do ovo em certa fase de desenvolvimento.

Os mesmos tipos de malformações morfogenéticas obtidas com a irradiação são também encontrados com outros agentes em embriões de moluscos, por exemplo choque térmico (Raven et alii, 1955; Geilenkirchen, 1966; Boon-Niermeijer, 1976), centrifugação (Raven & Beenackers, 1955; Geilenkirchen, 1964), deleção (Cather, 1967; Clement, 1967; Cather et alii, 1976) e várias substâncias (Raven, 1949; Raven & Burgers, 1952; Verdonk, 1965; Geilenkirchen, 1967; Biggelaar, 1971a; Kawano et alii, 1979; Kawano et alii, 1982; Kawano & Simões, 1987). Estas observações mostram que as malformações morfogenéticas induzidas pela radiação provavelmente não são específicas dela.

O tipo predominante de malformações por nós encontrado foi o inespecífico. Todavia, como também foram obtidos outros tipos de malformações, julgamos interessante comentar estas anomalias morfogenéticas, embora pouco freqüentes em embriões irradiados de B. glabrata.

Segundo Camey & Verdonk (1970), as estruturas da região cefálica nestes organismos, excetuando-se a boca, se originam quase sempre dos descendentes celulares do primeiro quarteto de micrômeros (1a - 1d) no pólo animal do ovo, por ocasião da terceira clivagem. Durante o desenvolvimento embrionário, há células que interrompem a sua divisão para se diferenciar em estruturas larvárias, por exemplo, a placa apical e a vesícula cerebral. Por outro lado, células como as das placas cefálicas, continuam o processo de divisão diferenciando-se mais tarde em olhos e tentáculos do embrião. Já no estágio de trocófora jovem, as estruturas que formam as partes principais da região cefálica estão quase formadas. Assim, no estágio de trocófora, toda a região da cabeça é constituída por um conjunto de células situadas na parte mediana central, a placa apical e, lateralmente a esta observa-se a formação de duas placas cefálicas e, margeando ambas, na região dorsal, encontra-se a vesícula cerebral.

Como se pode observar, as células precursoras responsáveis pela formação de toda a estrutura cefálica do embrião se originam quase inteiramente nos estádios precoces de desenvolvimento em B. glabrata. Vários autores (Geilenkirchen, 1967; Biggelaar, 1971a, b) sugerem que o processo indutivo importante para a gastrulação provavelmente ocorre também nos estádios de primeiras clivagens do ovo. Portanto, a ação de vários agentes, físicos ou químicos, nestas fases de desenvolvimento, podem acarretar num desvio no padrão cefálico ou numa supressão da gastrulação; daí se encontrar esses tipos de anomalias.

As malformações cefálicas do tipo monoftalmia e duplicação dos olhos obtidas neste trabalho foram encontradas também por tratamento com cloreto de 2-cloroetil trimetil amônio (CCC) (Kawano et alii, 1982) e com cafeína (Kawano e Si-mões, 1987) nestas mesmas espécies. Os autores sugerem que as malformações cefálicas obtidas seriam ocasionadas por um atraso na mitose, seguido por uma divisão alterada das células das placas cefálicas (futuras regiões de olhos e tentáculos), resultando numa assimetria na sua formação.

Sabe-se que a radiação ionizante pode causar atraso da divisão em qualquer fase do ciclo celular, embora o G_2 (Whitmore et alii, 1961; Leshner, 1963; Prasard, 1984) e a prófase (Carlson, 1954; Cather, 1959) pareçam ser as fases mais sensíveis. O G_2 corresponde, provavelmente, ao tempo necessário para a célula sintetizar proteínas específicas, essenciais no processo de mitose e durante esta fase ocorre toda uma preparação para a divisão celular. Assim, interferência na síntese ou na construção de precursores específicos poderia causar um bloqueio no avanço do ciclo celular (Grosch & Hopwood, 1979). Carlson (1954) sugeriu que o atraso maior na prófase em neuroblastos de gafanhoto, irradiados com 250 R de raios X (5 minutos de exposição) seja, em parte, ocasionado pela defasagem na ruptura da membrana do núcleo. Cather (1959) atribuiu um atraso maior nesta fase da mitose em ovos de Ilyanassa obsoleta, irradiados com 4.000 R de raios X (1.000 R/min.), a uma dificuldade na separação de fitas de cromatina.

Com fundamento nestas informações, pode-se sugerir uma possível interferência da radiação ionizante na cronologia normal de divisão celular das placas cefálicas que, provavelmente se encontravam na fase de proliferação, resultando em malformações cefálicas monoftálmica e duplicação dos olhos. Como a placa apical e a vesícula cerebral provavelmente já estavam formadas, daí não se observar malformações cefálicas da série ciclocefálica.

Por outro lado, estruturas do tipo estomodéu e glândula da concha se formam nos estádios mais evoluídos de desenvolvimento em embriões de B. glabrata (Raven, 1958). O estomodéu é originário de micrômeros do segundo e terceiro quartetos, na ocasião da quarta clivagem e no início do estágio de blástula, respectivamente. O estomodéu é formado pela invaginação do estomoblasto que forma a margem do blastoporo no final da gastrulação e se diferencia nos estádios de trocófora jovem e trocófora. Nestes estádios, o estomodéu, juntamente com o velum que, futuramente vai dar origem ao órgão de locomoção do caramujo, se encontram na região ventral do embrião, e na região dorsal, se localiza um grupo de células que irão formar a glândula da concha. Esta, por sua vez, se origina do micrômero 2d do segundo quarteto na quarta clivagem. Sugeriu-se, portanto, que a radiação ionizante, de alguma maneira afetou as células ativas na morfogênese destes órgãos, resultando assim, embriões com malformação da concha e embriões com eversão do estomodéu.

Estas observações levam a supor que, no caso de malformações inespecíficas, provavelmente várias linhagens celulares foram afetadas pela radiação. Assim, embriões expostos à radiação podem apresentar um desenvolvimento posterior irregular com as partes mais atingidas se desenvolvendo pouco e outras áreas com crescimento e desenvolvimento normais.

Apesar das várias investigações sobre as malformações morfogênicas resultantes de diversos tratamentos em espécies de moluscos, os efeitos diretos dos agentes aplicados são pouco conhecidos. Vários autores verificaram em L.stagnalis que os tratamentos, por exemplo, irradiação com UV (Labor-dus, 1971), choque térmico (Boon-Niermeijer, 1976) e centrifugação (Geilenkirchen, 1964) podem acarretar mitoses anormais e danos nos cromossomos: formação de fusos multipolares, separação incompleta dos cromossomos, formação de ponte anafásica, a traso na migração de alguns cromossomos na anáfase, ocorrência de massa de material cromossômico no centro do fuso e inclusive a morte de algumas células. Labor-dus (1971) sugeriu que os distúrbios na morfogênese podem ser, em parte, decorrentes da perda ou da distribuição anormal de material cromossômico entre as células.

Uma íntima associação entre alteração da seqüência normal de divisões celulares e as malformações morfogênicas é verificada também em L.stagnalis (Geilenkirchen, 1964; 1966; Biggelaar, 1971a; Boon-Niermeijer, 1976) e em B.glabrata (Kawano et alii, 1987).

Estas considerações não implicam na exclusão de outros fatores, mas o significado morfogênético da cronologia da divisão celular merece uma atenção especial, desde que tal evento representa um pré-requisito para o estabelecimento de uma relação normal entre células e tecidos, que são evidentemente de grande relevância para o organismo em desenvolvimento (Boon-Niermeijer, 1975).

5.1.3. Eclosão

Os resultados obtidos mostram que a taxa de eclosão em B.glabrata é grandemente reduzida pela radiação. A taxa de embriões eclodidos decresce com o aumento da dose de radiação e com o decréscimo da idade do embrião. O declínio acentuado na porcentagem de eclosão com o aumento da dose de radiação, particularmente nos estádios precoces de desenvolvimento, foi em grande parte decorrente da alta mortalidade dos embriões: seja como consequência direta da ação letal da radiação, seja pela eventual morte dos embriões malformados. O número de embriões eclodidos no estágio de trocófora irradiada com 5 Gy (95,4%) é muito próximo ao do grupo controle. No entanto, uma dose de 15 Gy é suficiente para reduzir consideravelmente a taxa de eclosão em todos os estádios embrionários tratados. O número de embriões eclodidos é muito baixo em embriões irradiados no estágio de trocófora com 20 (1,9%) e 25Gy (3,2%). Em decorrência destas observações, interessou-nos ve-

rificar a influência da radiação sobre a eclosão no estágio mais evoluído, veliger jovem, após as exposições a 20 e 25 Gy. Verificou-se também neste caso, uma forte queda na eclosão, com 5,0 e 4,9%, respectivamente.

Todavia, Perlowagora-Szumlewicz & Berry (1964) e Perlowagora-Szumlewicz (1966) observaram que são necessárias doses muito maiores para impedir a eclosão em embriões de A. glabratus. Por exemplo, a taxa de eclosão de embriões de 6-8 dias irradiados com 2.000 R de raios X foi similar à do controle e embriões de 9-10 dias (veliger) resistiram à dose de 40.000 R, chegando a eclodir 68%, embora eles morressem logo após a eclosão. Para explicar esta diferença de radiosensibilidade de embriões dentro da mesma espécie, poder-se-ia pensar tratar-se de uma linhagem mais resistente aos efeitos da radiação, uma vez que os autores utilizaram um mutante híbrido de B. glabrata. Uma outra possibilidade seria de que a diferença é decorrente de diferentes taxas de doses empregadas. Embora os autores não tenham feito qualquer menção a esse respeito, sabe-se, da literatura que a taxa de dose representa um fator modificador importante da expressão dos danos da radiação. Existem várias evidências experimentais mostrando efeitos menos prejudiciais quando uma mesma dose de raios X ou gama é aplicada a um sistema em taxas mais baixas do que altas. Cooley & Miller (1971) analisaram efeitos de diferentes taxas de dose sobre a eclosão em desovas do caramujo Physa heterotropa. Não houve diferença significativa na porcentagem de eclosão entre o grupo ir

radiado cronicamente com a taxa de dose de 1 rad/hora (23,75 h/dia de radiação gama) e o controle. Entretanto, para o grupo submetido a 10 rad/h observou-se uma queda na porcentagem de eclosão, não se verificando a eclosão na intensidade e dose de 25 rad/h. Em peixes, Egami & Hama (1975) verificaram em embriões de Oryzias latipes submetidos a 2kR de radiação gama com diferentes taxas de dose (250, 33,3 e 1,7 R/min) que os efeitos da radiação foram mais pronunciados numa taxa de dose mais alta (250 R/min), inibindo fortemente a eclosão. Noventa e seis por cento dos peixes, entretanto, eclodiram numa taxa de dose mais baixa (1,7 R/min), não apresentando diferença em relação ao controle. Mais recentemente, Hydo-Taguchi & Etoh (1983) observaram que quando embriões de Oryzias latipes foram irradiados cronicamente com taxas de dose de 10, 100 e 1000 R/dia com doses totais de 117, 1170 e 11.000 R de radiação gama, respectivamente, nenhum decréscimo na taxa de eclosão foi encontrado, mesmo com a dose total de 11.000 R. Inclusive, a sobrevivência dos peixes após a eclosão irradiados com estas taxas de dose foi similar ao do grupo controle. Estudos realizados em vários sistemas biológicos mostram que a atenuação do efeito da radiação com o aumento do tempo de exposição para a mesma dose total pode ser atribuída ao reparo dos danos subletais da radiação.

Além do decréscimo na taxa de eclosão, verificou-se também uma defasagem no tempo de eclosão em embriões de B.glabrata irradiados subletalmente. As eclosões de embriões

controle da mesma desova raramente ocorrem simultaneamente. Contudo, em regra, a maioria deles eclode dentro de três a quatro dias, a partir do primeiro dia de eclosão (figura 12). Em desovas submetidas a várias doses de radiação, a eclosão ocorreu com uma defasagem de um até quatro dias, em relação ao primeiro dia de eclosão dos embriões controle, observando-se um certo deslocamento das modas quando comparadas com o respectivo controle. Com o aumento da dose de radiação houve uma certa tendência em aumentar o tempo necessário para a eclosão, em todos os estádios embrionários tratados, exceção feita a trocôfora. Neste caso, as modas de eclosão nas doses de 5 e 10 Gy (sexto dia após a irradiação) coincidiram com as do controle. A defasagem na eclosão verificada em embriões irradiados subletalmente pode ser, em parte, decorrente de um desenvolvimento mais lento observado em embriões tratados, ou pode ser provocado por alguma lesão induzida pela radiação que tenha interferido no tempo necessário para a eclosão.

Contudo, Perlowagora-Szumlewicz & Berry (1964) e Perlowagora-Szumlewicz (1966) observaram um atraso sensivelmente maior na eclosão de embriões irradiados, quando confrontado com o deste trabalho. Eles verificaram que embriões de 4-5 e 6-8 dias, respectivamente, irradiados com doses de 2.000 - 3.000 R e 4.000 - 10.000 R, eclodem entre o vigésimo e o vigésimo nono dia após a postura, com uma defasagem de 12 e 18 dias em relação à primeira e à última eclosão de embriões controle. Os autores levantaram a hipótese de que este atraso relativamente longo observado em ovos irradiados esteja condicio

nado à necessidade de recuperação de danos subletais produzidos pela radiação antes de atingir a eclosão.

Outro aspecto que deve ser mencionado é quanto a duração do desenvolvimento embrionário. Em nosso trabalho, verificamos um período de 6 a 9 dias após a primeira segmentação do ovo, à temperatura de 25°C, o que coincide com o observado por Paraense (1970), Kawano et alii (1979) e Kawano (1982). No entanto, Perlowagora-Szumlewicz & Berry (1964) encontraram um período de 8 - 11 dias. Os autores, entretanto, não mencionaram a temperatura do experimento. De acordo com relatos da literatura, B. glabrata de mesma ou de diversas procedências quando submetida a condições ambientais diferentes, mostra comportamento variável no tocante à duração do ciclo embrionário. Um dos fatores ambientais importantes é a temperatura. De um modo geral, temperaturas mais altas aceleram o tempo de desenvolvimento, enquanto que as baixas atrasam. Assim, Jachowski (1963) encontrou uma duração de 14 a 16 dias à temperatura de 21-24°C, sendo que uma duração de 9,6 a 14,7 dias foi observada por Barbosa et alii (1987) com valores mais altos nas estações frias e mais baixos nas estações quentes.

Estas observações levam a supor que fatores genéticos associados a fatores ambientais e condições experimentais às quais os animais foram submetidos possam estar envolvidos nas diferenças encontradas entre os resultados desses autores e o por nós obtido.

Verificamos ainda em desovas irradiadas com 15 Gy no estágio de trocófora, uma porcentagem relativamente alta de embriões que não eclodiram (55,6%) (TABELA V), embora, aparentemente, apresentassem um desenvolvimento normal. Tanto a taxa de mortalidade (28,40%) (figura 5 E), assim como a frequência de embriões malformados (22,4%) (TABELA IV; figura 7 E) não foram suficientemente altas a ponto de explicar uma forte redução na taxa de eclosão observada na dose de 15 Gy (9,1%) (figura 10 E). Uma possível inibição da eclosão poderia ser responsável por essa queda na taxa de eclosão, em embriões irradiados no estágio de trocófora. Observações posteriores mostraram que estes embriões morreram dentro da cápsula de ovo entre o vigésimo e o trigésimo dia após a irradiação. Deve-se assinalar que o mesmo fenômeno foi verificado também em embriões irradiados no estágio de veliger jovem, particularmente na dose de 20 Gy, com cerca de 77,7% de embriões não eclodidos até o 15º dia após a irradiação (TABELA VI).

Segundo Rogers (1966), a eclosão de ovos de hel mintos envolve um processo que depende de três etapas principais: um estímulo aplicado ao ovo, uma resposta metabólica do ovo, com a secreção de um fluido de "eclosão" e a eclosão resultante da ação deste fluido secretado na cápsula do ovo. Em peixes, Shimada et alii (1985) irradiando embriões de Oryzias latipes com doses de 10 a 440 Gy de radiação gama (2,5 Gy/min) verificaram que as doses que produziram 50% de eclosão em embriões de 0, 1, 2, 3 e 4 dias após a fertilização foram respectivamente, 15, 23, 18, 50 e 400 Gy. Os autores correlaciona -

ran estas mudanças na taxa de eclosão em embriões irradiados com o estágio de desenvolvimento de tecidos, especialmente o da glândula de eclosão. Segundo Hydo-Taguchi et alii (1973) esse seria o tecido crítico para a eclosão. Esta glândula, em Oryzias latipes começa a se diferenciar no segundo dia após a fertilização, sendo que antes deste período, as células da glândula de eclosão estão sofrendo uma intensa proliferação que corresponde ao estágio de embrião de um dia de idade. Após este estágio, as células diferenciadas da glândula sintetizam enzima de eclosão que age no córion dos ovos, dissolvendo - o no momento da eclosão (Yamagami, 1970). Shimada et alii (1985) consideraram que o decréscimo acentuado na radiosensibilidade de embriões de três dias poderia estar relacionado com a etapa final de diferenciação das células da glândula de eclosão. Assim sendo, as alterações na taxa de eclosão dos embriões refletiriam uma lesão por radiação que afetaria não somente a proliferação mas também a diferenciação de células e tecidos da glândula de eclosão. Por outro lado, Welander (1954) verificou que a radiação não influíu de maneira significativa na eclosão de embriões de Salmo gairdnerii (teleosteo), irradiados com doses de 25 a 2.570 R de raios X (133 R/min). Grande número de ovos eclodiram após a irradiação com 2.400 R em embriões tratados no estágio de formação dos olhos ("early" e "late eye stage"). Outros agentes, temperatura e luz, alteraram a taxa de eclosão nesses animais. Baseados nesses resultados, Welander sugeriu que a enzima de eclosão provavelmente não teria sido afetada pela radiação na faixa de dose empregada.

Em Planorbidae, a eclosão parece ocorrer sob a ação da rádula (aparelho mastigador do caramujo) que, juntamente com a movimentação do caramujo dentro da cápsula do ovo, auxilia na ruptura da membrana do ovo, no momento da eclosão (Rey, 1956). A rádula é uma estrutura ectodérmica que, como o estomodéu, se origina dos micrômeros do segundo e terceiro quartetos e se diferencia no estágio de trocófora. Segundo Brahmachary (1983), além da rádula, parece que os caramujos jovens utilizam uma enzima, talvez semelhante àquela dos helmintos e peixes que auxiliam na eclosão, liquefazendo a substância gelatinosa que cobre os embriões ou mesmo agindo na membrana da cápsula do ovo. Assim, aliando estas informações aos resultados encontrados pode-se sugerir que uma forte diminuição na taxa de eclosão observada nos estádios mais evoluídos de desenvolvimento, trocófora e veliger jovem, pode ser decorrente de uma possível inibição da eclosão resultante de alguma lesão induzida pela radiação na formação da rádula ou de uma enzima específica, necessária para a eclosão.

5.2. Análise Citogenética

A análise de metáfases obtidas de embriões normais de B. glabrata mostrou número básico de $2n = 36$ cromossomos, o que corrobora as observações anteriormente feitas por outros autores (Azevedo & Gonçalves, 1956; Burch, 1960; Goldman et alii, 1984; Kawano et alii, 1987). Os cromossomos foram i-

dentificados, de acordo com a posição do centrômero, como sendo 12 pares metacêntricos, 4 submetacêntricos e 2 subtelocêntricos. Estas observações coincidem com as de Kawano et alii (1987). Estes autores verificaram ainda que, esta espécie apresenta um único par de cromossomos subtelocêntricos, portador da região organizadora do nucléolo (par VI), evidenciado pela coloração por nitrato de prata. Entretanto, no que diz respeito à classificação morfológica dos cromossomos, os resultados obtidos apresentam discordâncias com os relatados por outros autores. Narang (1974, 1976) classificou os cromossomos de B.glabrata como sendo 11 pares metacêntricos, 6 submetacêntricos e 1 acrocêntrico em mutante de Santa Luzia, Minas Gerais. Já Raghunathan (1976) encontrou 10 pares metacêntricos, 4 submetacêntricos, 2 acrocêntricos e 2 telocêntricos em embriões de B.glabrata originária de Porto Rico. Por outro lado, Goldman et alii (1984) obtiveram 15 pares metacêntricos, 2 submetacêntricos e 1 subtelocêntrico em caramujos provenientes de Curitiba, Paraná.

Como assinalam Kawano et alii (1987), não está claro se estas diferenças são decorrentes dos problemas técnicos relacionados às preparações citológicas ou das variações existentes entre diferentes populações de caramujos. Narang (1974), por exemplo, usou a técnica de esmagamento que pode oferecer pouca resolução para um estudo cromossômico mais acurado, podendo acarretar em interpretações nem sempre corretas.

Cabe assinalar que as metáfases poliplóides foram encontradas tanto nos preparados citológicos de embriões irradiados, como também nos dos controles, quando tratados no estágio de trocófora jovem. As células poliplóides não foram encontradas no estágio de gástrula. A presença de metáfases poliplóides em tecidos somáticos de embriões de B. glabrata foi verificada também por Simões et alii (1985).

Uma possível origem de células poliplóides foi levantada por Schreiber (1966) e Schreiber & Camey (1966). Esses autores baseando-se no teor de DNA de blastômeros, medido pelo método citofotométrico sugeriram que elas seriam provenientes de certos grupos de blastômeros, os endômeros que aparecem no estágio final de blástula que durante a gastrulação por endobolia, invaginam na região do futuro blastóporo. Relatarem que durante a gastrulação, estes endômeros aumentariam em tamanho e sofreriam três ciclos de divisões endomitóticas, dando origem a células 16 c, que segundo Fallieri et alii (1969), originariam a glândula digestiva embrionária no estágio de trocófora. Uma vez que o ovotestis e a glândula digestiva de caramujos adultos são essencialmente constituídos de células poliplóides (Tuan et alii, 1984; Uemura & Simões, 1984), é de supor que estas apresentem uma função importante na formação desses órgãos. Uma observação que favorece esta suposição é a presença de metáfases poliplóides com várias aberrações estruturais (dicêntricas e tricêntricas) (figura 16), obtidas por nós, de preparações de embriões irradiados no estágio de blástula, processados no de trocófora jovem. Estas observações não coincidem com as de Narang (1974). Este autor verificou a pre

sença de metáfases poliplóides tanto nas preparações feitas a partir de ovotestis de caramujos irradiados com 3.000 a 5.000 R de raios X (250R/min) quanto naquelas feitas de embriões F_1 . O autor as considerou como sendo, unicamente, um dos efeitos da radiação.

As aberrações cromossômicas estruturais encontradas em embriões irradiados foram rearranjos, quebras, falhas acromáticas e fragmentos acêntricos, cuja frequência aumenta com o aumento da dose de radiação, 24 horas após a exposição. As aberrações encontradas são predominantemente do tipo cromossômico, tanto em amostras processadas 24, bem como 48 horas após o tratamento.

Sabe-se que as aberrações do tipo cromossômico são produzidas quando as células são irradiadas na fase G_1 do ciclo celular, antes da duplicação de DNA. No entanto, existe também a possibilidade das células irradiadas após a síntese de DNA, nas fases S ou G_2 , apresentarem quebras em duas cromátides (aberrações isocromatídicas). Muitos autores consideram as aberrações isocromatídicas como sendo do tipo cromossômico, pois envolvem quebras simultâneas nas duas cromátides-irmãs, aparentemente nos locais correspondentes.

Um outro aspecto que deve ser levado em consideração é quanto à possibilidade de aberrações do tipo cromossômico serem originárias do tipo cromatídico, este produzido nas fases S ou G_2 do ciclo celular. As aberrações cromatídicas, se não interferirem mecanicamente na separação de cromá-

tides na fase de duplicação, elas podem eventualmente passar para as células-filhas e prosseguir através da fase de duplicação e reaparecer como aberrações do tipo cromossômico nas mitoses subsequentes (Buckton & Evans, 1973; Bender et alii, 1974). Nossos resultados obtidos a partir de células epidérmicas do embrião permitiram estimar a duração do ciclo celular e mostrar que pode ocorrer, em média, dois ciclos de divisões celulares entre os estádios de blástula (estádio irradiado) a trocôfora jovem (estádio analisado) (figura 13).

Dentre os vários tipos de aberrações estruturais observadas, os dicêntricos e principalmente os fragmentos acêntricos foram os mais comuns em embriões de B. glabrata. Frequências relativamente altas de fragmentos acêntricos (82,5 a 88,3%) foram encontradas também em oócitos e em zigotos de camundongos fertilizados IN VITRO com doses de 10 a 100 R de raios X (60 R/min) (Matsuda et alii, 1985a) e com 0,052 a 0,295 Gy de radiação gama de Co-60 (0,0425 - 0,17 Gy/h) (Matsuda et alii, 1986). A maioria das aberrações encontradas foi do tipo cromossômico em ambos os casos (85,8 a 88,5%). Matsuda et alii (1985b) verificaram também em zigotos de camundongos fertilizados com esperma irradiado com 50 a 400 R de raios X (60 R/min) que as aberrações foram principalmente do tipo cromossômico (82,1%), com 67,5% de fragmentos, 6% de rearranjos e 8,6% de quebras e falhas. Os autores sugeriram que as aberrações cromossômicas que se originam de dano induzido em esperma podem ser causados principalmente por evento de uma quebra.

O fato de embriões irradiados de B.glabrata apresentarem em suas células, uma frequência tão elevada de fragmentos acêntricos em relação aos dicêntricos, leva-nos a pensar em algumas hipóteses. Uma delas é quanto ao modo de formação dessas aberrações. As deleções, tanto terminais como intersticiais, são resultantes de quebras ocorridas no mesmo cromossomo e podem ser produzidas antes ou após a síntese de DNA. Por outro lado, os dicêntricos são resultantes de duas quebras envolvendo cromossomos diferentes e são produzidos antes da duplicação de DNA. Neste caso, para a sua formação, as duas quebras necessitariam ser produzidas dentro de um certo período de tempo, de modo que a primeira quebra não sofra reunião antes da segunda ser produzida, de tal maneira que elas se interajam e ocorram trocas entre as extremidades quebradas. Além do mais, as duas quebras produzidas necessitariam estar suficientemente próximas uma da outra para que ocorra o rearranjo por erro no reparo (IAEA, 1986). Não se pode descartar também a possibilidade dos fragmentos acêntricos serem originários de aberrações de rearranjo (dicêntricos, tricêntricos e acêntricos) (Stephan, 1986).

Para verificar a influência do tempo de tratamento após a irradiação sobre a frequência de aberrações cromossômicas, os embriões expostos a 10 Gy foram também processados 48 horas após a irradiação. Examinando-se os dados obtidos, verificamos que o número de metáfases com aberrações estruturais foi cerca de três vezes menor (12,0%) em relação o

de 24 horas (38,9%). Igualmente, o número de aberrações por célula foi aproximadamente quatro vezes menor (0,16 aberrações/célula), quando comparado com as amostras de 24 horas (0,64 aberrações/célula). O teste de proporções rejeitou a hipótese de que a frequência de metáfases com aberrações, bem como o número de aberrações por célula, sejam iguais 24 e 48 horas após a irradiação.

Existem vários trabalhos que mostram que durante a proliferação celular pode ocorrer um processo seletivo de eliminação de determinados tipos de aberrações cromossômicas - (Carrano & Heddle, 1973, Braselmann et alii, 1986). Estimativas da taxa de eliminação de aberrações cromossômicas realizadas em vários sistemas IN VITRO mostram uma perda de cerca de 50% de dicêntricos em cada geração celular, por exemplo, em micrósporos de Tradescantia (Conger, 1965), em células de hamster chinês (Carrano, 1973b) e em linfócitos periféricos humanos (Sasaki & Norman, 1967; Carrano & Heddle, 1973; Bauchinger et alii, 1986). Quanto à taxa de eliminação de fragmentos acêntricos, os valores obtidos por diferentes autores apresentam discordâncias. Segundo Sasaki & Norman (1967), cerca de 70% de fragmentos acêntricos podem ser eliminados da primeira divisão após a irradiação em linfócitos e o restante pode ser incorporado em uma das células-filhas, aparecendo como fragmentos pareados na segunda divisão metafásica. Carrano (1973a) observou que cerca de 57% de fragmentos acêntricos seriam transmitidos para as células-filhas na anáfase em células de hamster chinês. Já

Carrano & Heddle (1973) estimam que cerca de 80% dos fragmentos seriam transmitidos pareados para cada célula-filha em linfócitos humanos. Os dados de Carrano & Heddle são reforçados por Bauchinger et alii (1986) que avaliaram que somente 20% de fragmentos seriam eliminados durante a primeira divisão celular, após a irradiação.

Experimento interessante é aquele realizado por Reichert et alii (1984) em oócitos de camundongos irradiados com 2 Gy de raios X (0,42 Gy/min). A análise cromossômica foi feita também no estágio de zigoto e feto de 13,5 dias de gestação. Verificou-se uma eliminação gradativa de aberrações cromossômicas no decurso de desenvolvimento embrionário. Cerca de 87% dos oócitos mostraram aberrações cromossômicas estruturais após a irradiação com 2 Gy; em contraste, os zigotos, somente 69% e os fetos de 13,5 dias eram indistinguíveis dos controles. Além de aberrações estruturais encontraram também as numéricas, principalmente hipoploidia. Com base nestas observações, os autores sugeriram que a maioria das aberrações induzidas em oócitos irradiados com dose de 2 Gy eram eliminados com a morte precoce dos embriões no 13,5º dia de prenhez.

Com fundamento nestas informações, pode-se sugerir que o decréscimo na frequência de aberrações cromossômicas com o aumento de tempo entre a irradiação e a fixação seja decorrente de uma possível eliminação de células com aberrações cromossômicas, em embriões de B. glabrata.

Deve-se assinalar também que as preparações citológicas obtidas de embriões submetidos à dose de 15 Gy mostram uma queda significativa na frequência de metáfases com 36 cromossomos. Os grupos controle e irradiados com 5 e 10 Gy não diferem estatisticamente entre si quanto à porcentagem de metáfases com número modal e hipomodal de cromossomos, 24 horas após a exposição. Da mesma maneira, uma comparação dos números modais de cromossomos de células, 24 e 48 horas após a irradiação com 10 Gy mostra que não existe diferença significativa entre eles (qui-quadrado; $t = 4,74$; g.l. = 2; $p > 0,05$). Embora as lâminas citológicas obtidas tanto de embriões controle como os de embriões tratados tenham apresentado metáfases incompletas, raramente observaram-se células com número superior a 36 cromossomos. Estas observações, de certa forma, descartariam a possibilidade de ocorrência de não-disjunção mitótica. Segundo Beiguelman (1982), uma das prováveis causas de perda cromossômica seria o atraso anafásico ("anaphase lag") decorrente do atraso da migração de uma ou mais cromátides para um dos pólos do fuso durante a anáfase. Assim sendo, estas cromátides ficariam fora do núcleo telofásico e acabariam por degenerar, de sorte que o número de cromossomos diminuiria em uma das células-filhas, enquanto na outra ele se conservaria inalterado. Uma outra possibilidade, ainda segundo o mesmo autor, seria a ocorrência de rearranjos cromossômicos que comportar-se-iam de modo anômalo durante a anáfase, que impediriam a viabilidade do cromossomo afetado. Desse modo, resultariam duas células-filhas hipodiplóides.

Com base nestas informações, os resultados obtidos neste trabalho são sugestivos de uma possível perda de cromossomos em células irradiadas com dose de 15 Gy. O fato de não se verificar um aumento na frequência de dicêntricos na dose de 15 Gy leva à suspeita de um possível envolvimento de cromossomos dicêntricos neste fenômeno.

Verificou-se ainda em preparações citológicas de embriões irradiados, um aumento no grau de inibição mitótica com o aumento da dose de radiação, com uma redução nos valores de índices mitóticos de 50,4, 65,9 e 77,3%, nas doses de 5, 10 e 15 Gy, respectivamente, em relação ao controle, 24 horas após a exposição. Analisando os resultados obtidos, verifica-se que existe uma correlação entre a frequência de aberrações cromossômicas e o bloqueio da mitose, os quais aumentam consideravelmente com o aumento da dose de radiação, 24 horas após o tratamento.

Uma forte inibição da mitose, ao que parece, pode ser decorrente da presença de aberrações cromossômicas radioinduzidas e também de células seriamente danificadas pela radiação, impossibilitadas de aparecerem nas mitoses subsequentes.

Embora os processos que levam à morte celular após a irradiação sejam pouco elucidados, muitos autores (Coggle, 1971; Kihlman, 1977; Bedford et alii, 1978; Scott & Zampetti - Bosseler, 1980; Preston, 1985) apontam como prováveis causas de morte celular:

- . a perda de fragmentos acêntricos, deixando uma ou ambas as células-filhas geneticamente deficientes;
- . a formação de ponte anafásica resultante de dicêntrico, impedindo a separação física das células-filhas;
- . a eventual ruptura da ponte anafásica, causando uma distribuição desigual de material cromossômico entre as células-filhas.

Assim, com base nos resultados obtidos e nas informações da literatura pode-se concluir que, a dose de 15 Gy neste sistema, embrião de B.glabrata, é muito prejudicial, fato evidenciado pela inibição acentuada do processo mitótico, frequência relativamente alta de aberrações cromossômicas estruturais e uma possível perda de cromossomos. Russell & Russell (1954) levantaram a hipótese de que o dano intracelular primário da radiação sobre o embrião seria a ocorrência de quebras cromossômicas que levariam à formação de aberrações cromossômicas. Uma vez que o material nuclear representa um papel crítico na divisão celular, alterações na estrutura e função dos cromossomos podem se manifestar nas etapas subsequentes do desenvolvimento, em organismos de rápida proliferação celular. Uma relação íntima entre aberrações cromossômicas e morte do embrião foi documentada por Matsuda et alii (1983, 1985a) e por Reichert et alii (1984) em camundongos. Outros relacionaram as a

berrações cromossômicas com a indução de malformações em embriões de camundongos (Rugh, 1969), peixes (McGregor & Newcombe, 1972) e em várias espécies de anfíbios, répteis e mamíferos (Wolsky, 1982).

Com base nas informações disponíveis na literatura, os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma associação entre as aberrações cromossômicas radioinduzidas e os efeitos morfogenéticos da radiação em embriões de B.glabrata, irradiados no estágio de blástula.

6. SUMÁRIO

Neste trabalho o autor apresenta alguns aspectos dos efeitos da radiação ionizante sobre o embrião e o material genético de Biomphalaria glabrata (Mollusca: Gastropoda), importante vetor da esquistossomose.

Para tanto, submeteu os embriões nos vários estádios de desenvolvimento, a saber, fases de ovo, blástula, gástrula, trocófora jovem, trocófora e veliger jovem, a doses de 5, 10, 15, 20 e 25 Gy de radiação gama de Co-60. Foram utilizados quatro parâmetros biológicos, mortalidade, malformação, eclosão e aberrações cromossômicas, como um critério de avaliação da radiosensibilidade dos embriões.

Quanto à mortalidade, os resultados obtidos indicaram que os embriões mostraram maior radiosensibilidade nos estádios mais precoces de desenvolvimento. A susceptibilidade diminuiu com o aumento da idade do embrião e com o decréscimo da dose de radiação. Os valores estimados da DL_{50} (15 dias) revelaram que o estádio de ovo foi cerca de cinco vezes mais radiosensível do que o de trocófora.

Verificou-se também que o número de embriões malformados aumentou rapidamente com o aumento da dose de radiação, atingindo o máximo entre o quinto e o oitavo dia após a

irradiação, em todos os estádios embrionários. Contudo, para o estágio de ovo, o número de embriões malformados foi inversamente proporcional à dose de radiação. As maiores incidências de embriões malformados foram encontradas nos estádios de blástula e gástrula, na dose de 10 Gy, e também na fase de trocófora jovem, na dose de 15 Gy. O estágio menos afetado foi a trocófora, no intervalo de dose de 5 a 15 Gy. Obtivemos vários tipos de malformações morfogenéticas, entre as quais, malformação cefálica, exogástrula, malformação da concha e embrião com eversão do estomodéu, sendo a malformação inespecífica a mais frequente.

A taxa de eclosão diminuiu com o aumento da dose e com o decréscimo da idade do embrião, sendo que, na dose de 15 Gy, o número de embriões eclodidos foi grandemente reduzido qualquer que fosse o estágio embrionário irradiado. Observou-se uma pronunciada inibição na eclosão em embriões tratados nas fases de trocófora e veliger jovem. Em embriões irradiados subletalmente, verificou-se um atraso no tempo necessário para a eclosão, exceção feita ao estágio de trocófora irradiada com 5 Gy. Neste caso, o comportamento do embrião foi muito similar ao do grupo controle.

Para o estudo cromossômico utilizaram-se embriões irradiados no estágio de blástula com doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama e processados 24 horas após a irradiação. No caso de embriões irradiados com 10 Gy, a análise citogenética foi feita também 48 horas após a exposição. Confirmou-se que o número diplóide da espécie é $2n = 36$, com 12 pa-

res metacêntricos, 4 submetacêntricos e 2 subtelocêntricos. Os principais tipos de aberrações cromossômicas estruturais encontradas foram os dicêntricos, anéis, quebras, falhas acromáticas e fragmentos acêntricos, cuja freqüência aumentou com o aumento da dose de radiação. Os dicêntricos e principalmente os fragmentos acêntricos foram os tipos mais comuns. Um decréscimo significativo na freqüência de metáfases com aberrações com o aumento de tempo entre a irradiação e a fixação (24 e 48 horas), parece estar associado à eliminação de células com aberrações cromossômicas.

Os resultados sugerem também uma possível perda de cromossomos de células irradiadas com dose de 15 Gy, 24 horas após o tratamento.

Observamos uma queda no índice mitótico com o aumento da dose de radiação, mostrando um certo paralelismo entre a freqüência de aberrações cromossômicas e o grau de depressão mitótica, 24 horas após a irradiação. O autor sugere que possa existir uma associação entre a ocorrência de aberrações cromossômicas e os efeitos morfogenéticos da radiação, em embriões irradiados na fase de blástula.

7. SUMMARY

It has been presented some aspects of the effects of the ionizing radiation on the embryo and on the genetical material of Biomphalaria glabrata (Mollusca: Jastropoda), an important vector of the Schistosomiasis.

For that matter, the embryos were submitted at various stages of development, which is, stage of cleavage, blastula, gastrula, young trochophore, trochophore and young veliger, to doses of 5, 10, 15, 20 and 25 Gy of Co-60 gamma radiation. As a criteria of evaluation of the embryos radiosensitivity, four biological parameters were used: mortality, malformation, hatching and chromosomal aberrations.

In relation to the mortality, the results showed that the embryos were more radiosensitive at the earlier stages of development. The susceptibility decreased with the increase of the embryos age and with the decrease of the radiation dose. The estimated values of DL_{50} (15 days) revealed that the stage of egg was five times more radiosensitive than the stage of trochophore.

It was also noticed that the number of malformed embryos increased rapidly with the increase of the radiation dose at all embryonic stages. However, at the stage of egg,

the number of malformed embryos was inversely proportional to the radiation dose. The greater incidences of malformed embryos were found at the stages of blastula and gastrula at the dose of 10 Gy and also at the stage of young trochophore, at the dose of 15 Gy. The less affected stage was the trochophore at the dose range of 5 to 15 Gy. Several types of morphogenetic malformation were obtained and among them, head malformation, exogastrula, shell malformation and embryo with an evaginated stomodaeum, being the aspecific malformation the most frequent.

The rate of hatching decreased with the increase of the dose and with the embryo's age and thus, at the dose of 15 Gy, the number of hatched embryos was greatly reduced, despite the embryonic irradiated stage. It was noticed a significant hatching inhibition in embryos treated at the trochophore and young veliger stages. In embryos irradiated with sublethal doses, it was observed a delay in the time necessary for the hatching, save the trochophore stage irradiated with 5 Gy. In this case, the behavior of the embryo was very similar to the control group.

Embryos at the blastula stage irradiated with doses of 5, 10 and 15 Gy gamma radiation were processed 24 hours after the irradiation for the chromosomal study. In the case of embryos irradiated with 10 Gy, cytogenetic analysis was made, also 48 hours after the exposure. It was confirmed that the diploid number of the specie is $2n = 36$, with 12 pairs of

metacentric, 4 submetacentric and 2 subtelocentric. The main types of structural chromosomal aberrations found were dicentrics, rings, breaks, gaps and acentric fragments, whose frequency increased with the increase of the radiation dose. The dicentrics and mainly the acentric fragments were the most common type. Increasing the time period between the radiation and the fixation (24 and 48 hours), a significant decrease in the frequency of metaphases with aberrations occurred and it seems to be associated with the elimination of the cells with chromosomal aberrations.

The results also suggest a possible loss of chromosomes of irradiated cells with dose of 15 Gy, 24 hours after the exposure.

It was observed a reduction in the mitotic index with the increase of the radiation dose, showing some paralelism between the frequency of the chromosomal aberrations and the degree of mitotic depression, 24 hours after radiation. An association between the occurrence of chromosomal aberrations and the morphogenetic effects of radiation was suggested, in irradiated embryos at the blastula stage.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- . AARDEMA, M.J. & PRESTON, R.J. DNA-repair kinetics and the sensitivity of cells to x-ray-induced chromosome aberrations: a mouse myeloid leukemia cell line and normal mouse bone marrow cells. Mutat. Res., 162:225-32, 1986.
- . ALPER, T. Cellular radiobiology. London, Cambridge Univ., 1979.
- . AWA, A.A.; SOFUNI, T.; HONDA, T.; ITOH, M.; NERUSHI, S.; OTAKE, M. Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. J. Radiat. Res., 19:126-40, 1978.
- . AZEVEDO, P.J.F. & GOMES, F.C. L'action biologique de la radiation gamma sur des mollusques d'eau douce. Bull. Soc. Pathol. Exot., 49:917-21, 1956.
- . AZEVEDO, J.F. & GONÇALVES, M.M. Ensaio sobre o estudo da numeração cromossômica de algumas espécies de moluscos de água doce. An. Inst. Med. Trop., Lisboa, 13(4):569-77, 1956.

(*) De acordo com as normas preconizadas pela "ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS" (ABNT-PNB-66). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com o "WORLD LIST OF SCIENTIFIC PERIODICALS", 1963.

- . BACQ, Z.M. & ALEXANDER, P. Comparative radio-sensitivity of living organisms. In: FUNDAMENTALS of radiobiology. 2ed. New York, Pergamon, 1961.
- . BARBOSA, F.S. Epidemiologia. In: CUNHA, A.S. da Esquistossomose mansoni. São Paulo, USP, 1970. p.31-59.
- . 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.
- . BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; BRASELMANN, H. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. Radiat. Environ. Biophys., 25:253-60, 1986.
- . BEDFORD, J.S.; MITCHELL, J.B.; GRIGGS, H.G.; BENDER, M.A. Radiation-induced cellular reproductive death and chromosome aberrations. Radiat. Res., 76:573-86, 1978.
- . BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. Guanabara Koogan, 1982.
- . BENDER, M.A. & GOOCH, P.C. Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. Radiat. Res., 16:44-53, 1962a.

- . BENDER, M.A. & GOOH, P.C. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. Proc. Nat. Acad. Sc. USA., 48:522-32, 1962b.

- . BENDER, M.A.; GRIGGS, H.G.; BEDFORD, J.S. Mechanisms of chromosomal aberration production. III chemicals and ionizing radiation. Mutat. Res., 23:197-212, 1974.

- . BERG, K. Inherited variation in susceptibility and resistance to environmental agents. In: BERG, K. Genetic damage in man caused by environmental agents. New York, Academic, 1979. p.1-25.

- . BIGGELAAR, J.A.M. Van den. Development of division asynchrony and bilateral symmetry in the first quartet of micromeres in eggs of Lymnaea. J. Embryol. Exp. Morph., 26(3):393-9, 1971a.

- . BIGGLELAAR, J.A.M. Van den. Timing of the phases of the cell cycle during the period of asynchronous division up to the 49-cell stage in Lymnaea. J. Embryol. Exp. Morph., 26(3):367-91, 1971b.

- . BONHAM, K. Sensitivity to x-rays of the early cleavage stages of the snail Helisoma subcrenatum. Growth, 19:9-18, 1955.

- . BONHAM, K. & PALUMBO, R.F. Effects of x-rays on snails, crustacea and algae. Growth, 15:155-88, 1951.

- . BOON-NIERMEIJER, E.K. The effect of puromycin on the early cleavage cycles and morphogenesis of the pond snail Lymnaea stagnalis. Wilhelm Roux's Arch., 177:29-40, 1975.

- . BOON-NIERMEIJER, E.K. Morphogenesis after heat shock during the cell cycle of Lymnaea stagnalis: a new interpretation. Wilhelm Roux's Arch., 180:241-52, 1976.

- . BOON-NIERMEIJER, E.K. Responses of a developing organism upon heat stress. Rijksuniversiteit, Utrecht, June, 1987. (Phd, Thesis)

- . BOON-NIERMEIJER, E.K. & SCHEUR, H. Van de. Thermosensitivity during embryonic development of Lymnaea stagnalis (Mollusca). J. Therm. Biol., 9:265-9, 1984.

- . 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. & JOOSSE, J. Freshwater snails (Basommatophora). In: TOMPA, A.S.; VERDONK, N.H.; BIGGELAAR, J.A.M. van den, eds. Reproduction. Vol.7: The mollusca. New York, Academic, 1984.

- . BRASELMANN, H.; BAUCHINGER, M.; SCHMID, E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. Radiat. Environ. Biophys. 25:243-51, 1986.

- . BRENT, R.L.; BECKMANN, D.A.; JENSH, R.P. The relationship of animal experiments in predicting the effects of intrauterine radiation effects in the human. In: KRIEDEL, H.; SCHMAHL, W.; STIEVE, F.E.; GERBER, G.B. Radiation risks to the developing nervous systems: symposium on..., held in Neuherberg, 18-20 June 1985. Stuttgart, Gustav Fisher, 1986. p.367-97.

- . BREWEN, J.G.; PRESTON, R.J.; LITTLEFIELD, L.G. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co γ -rays. Radiat. Res., 49:647-56, 1972.

- . BUCKTON, K.E. & EVANS, H.J. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. Geneva, World Health Organization, 1973.

- . BURCH, J.B. Chromosome studies of aquatic pulmonate snails. The nucleus, 3(2):177-208, 1960.

- . BURGESS, E.E. & BENNETT, S.E. Mortality and abnormalities caused by gamma irradiation of alfalfa weevil pupae. Ann. Entomol. Soc. Am., 65(6):1331-3, 1972.

- . BUTLER, E.G. The effects of radium and x-rays on embryonic development. In: DUGGAR, B.M. ed. Biological effects of radiation. New York, McGraw-Hill, 1936. v.1, p.389-410.
- . 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.
- . CARLSON; J.G. Immediate effects on division, morphology and viability of the cell. In: HOLLANDER, A. ed. Radiation biology. New York, McGraw-Hill, 1954. v.1, pt.2, p.763-824.
- . CARR, D.H. Chromosome studies in abortures and stillborn infants. Lancet, 2(7153):603-6, 1963.
- . CARRANO, A.V. Chromosome aberrations and radiation-induced cell death. I. Transmission and survival parameters of aberrations. Mutat. Res., 17:341-53, 1973a.
- . CARRANO, A.V. Chromosome aberration and radiation-induced cell death. II Predicted and observed cell survival. Mutat. Res., 17:355-66, 1973b.
- . CARRANO, A.V. & HEDDLE, J.A. The fate of chromosome aberrations. J. Theor. Biol, 38:289-304, 1973.

- . CARVALHO, O. dos S.; ANDRADE, R.M. de; ADRIANO, A.R.C.; MANSUR NETO, E. Effects of gamma-radiation on eggs of Pomacea haustum (Reeve, 1843) from the Pampulha lake, Belo Horizonte, M.G. (Prosobranchia, Pilidae). Rev. Brasil. Biol., 34(4):565-72, 1974.
- . CASARETT, A.P. Radiation biology. Englewood Cliffs, New York, Prentice-Hall, 1968.
- . CATHER, J.N. The effects of x-radiation on the early cleavage stages of the snail, Ilyanassa obsoleta. Radiat. Res., 11:720-31, 1959.
- . CATHER, J.N. Cellular interactions in the development of the shell gland of the gastropod, Ilyanassa. Exp. Zool., 166(2):205-23, 1967.
- . CATHER, J.N.; VERDONK, N.H.; ZWAAN, G. Cellular interactions in the early development of the gastropod eye, as determined by deletion experiments. Malacological Rev., 9:77-84, 1976.
- . CHI, L.W. & BOELLER, F. X-radiation of Oncomelania formosana, snail host of Schistosoma japonicum. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17:900-3, 1968.
- . CLEMENT, A.C. The embryonic value of the micromeres in Ilyanassa obsoleta as determined by deletion experiments. I. The first quartet cells. J. Exp. zool., 166(1):77-88, 1967.

- . COGGLE, J.E. Biological effects of radiation. London, Wykeham, 1971.
- . COHEN, M.M. Chromosomal mosaicism associated with a case of cyclopia. J. Pediatr., 69:793-8, 1966.
- . CONEN, P.E.; BELL, A.G.; ASPIN, N. Chromosomal aberration in an infant following the use of diagnostic x-rays. Pediatrics, 31:72-9, 1963.
- . CONGER, A.D. The fate of metaphase aberrations. Radiat. Bot., 5:81-96, 1965.
- . COOLWY, J.L. & MILLER, F.L. Effects of chronic irradiation on laboratory populations of the aquatic snail, Physa heterostropha. Radiat. Res., 47:716-24, 1971.
- . CRAMPTON, H.E. Experimental studies on gastropod development. Wilhelm. Roux's Arch. Entw. Mech. Org., 3:1-18, 1896.
- . DEWEY, W.C.; FURMAN, S.C.; MILLER, H.H. Comparison of lethality and chromosomal damage induced by x-rays in synchronized chinese hamster cells IN VITRO. Radiat. Res., 43:561-81, 1970.
- . DI PAOLO, J.A. & POPESCU, N.C. Relationship of chromosome changes to neoplastic cell transformation. Am. J. Pathol., 85:709-38, 1976.

- . DOLPHIN, G.W.; LLOYD, D.C.; PURROTT, R.J. Chromosome aberration analysis as a dosimetric technique in radiological protection. Health Phys., 25:7-15, 1973.
- . DOMON, M. Cell cycle-dependent radiosensitivity in two-cell mouse embryos in culture. Radiat. Res., 81:236-45, 1980.
- . DONGEN, C.A.M. Van; MIKKERS, F.E.P.; DEBRUYN, C.H.; VERHEGGEN, P.E.M. Molecular composition of the polar lobe of first cleavage stage embryos in comparison with the lobe-less embryo in Nassarius reticulatus (Mollusca) as analysed by isotachopheresis. In: ANALYTICAL isotachopheresis. Amsterdam, Elsevier, 1981. p.207-16.
- . DRAPER, N.R. & SMITH, H. Applied regression analysis. 2.ed. New York, Wiley, 1982.
- . ECAMI, N. & HAMA, A. Dose-rate effects on the hatchability of irradiated embryos of the fish Oryzias latipes. Int. J. Radiat. Biol., 28(3):273-8, 1975.
- . ENGEL, D.W. & DAVIS, E.M. An atypical response to radiation by the mud snail, Nassarius obsoletus. Int. J. Radiat. Biol., 24(2):199-201, 1973.
- . EVANS, H.J. Repair and recovery at chromosome and cellular levels: similarities and differences. Brookhaven Symp. Biol., 20:111-33, 1968.

- . EVANS, T.C. Qualitative and quantitative changes in radiosensitivity of grasshopper eggs during early development. Phys. zool., 9(4):443-54, 1936.

- . FALLIERI, L.A.; CAMEY, T.; SCHREIBER, M.; SCHREIBER, G. DNA and nuclear size in early development of some invertebrates. Genetics, Suppl., 61:171-81, 1969.

- . FARVAR, M.A. & CEMBER, H. Lethal effects of gamma radiation on the Schistosome larva carrier snail (Australorbis glabratus). Am. J. Public Health, 59:2077-80, 1969.

- . FUJITA, S. & EGAMI, N. Effect of gamma irradiation on the reproductive system of the pond snail Physa acuta. Radiat. Res., 98:362-9, 1984.

- . GEARD, C.R. Effects of radiation on chromosomes. In: PIZZARELLO, D.J. & COLOMBETTI, L.G. eds. Radiation biology. Boca Raton, Fl. CRC, 1982.

- . GEILENKIRCHEN, W.L.M. Periodic sensitivity of mechanisms of cytodifferentiation in cleaving eggs of Limnaea stagnalis. J. Embryol. Exp. Morphol., 12(2):183-95, 1964.

- . GEILENKIRCHEN, W.L.M. Cell division and morphogenesis of Limnaea eggs after treatment with heat pulses at successive stages in early division cycles. J. Embryol. Exp. Morphol., 16(2):321-37, 1966.
- . GEILENKIRCHEN, W.L.M. Programming of gastrulation during the second cleavage cycle in Limnaea stagnalis: a study with lithium chloride and actinomycin D. J. Embryol. Exp. Morphol., 17:367-74, 1967.
- . GOLDMAN, M.A.; LOVERDE, P.T.; CHRISMAN, C.L.; FRANKLIN, D.A. Chromosomal evolution in planorbid snails of the genera Bulinus and Biomphalaria. Malacologia, 25(2):427-46, 1984.
- . GROSCH, D.S. & HOPWOOD, L.E. Biological effects of radiations. 2ed. New York, Academic, 1979.
- . HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist. 2ed. Hagerstown, Maryland, Harper & Row, 1978.
- . HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. Experientia, 36:1014-5, 1980.
- . HYODO-TAGUCHI, Y. & ETOH, H. The fecundity and fertility of medaka exposed to chronic γ -radiation in their embryonic stages. J. Radiat. Res., 24(3):270-7, 1983.

- . 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., 53:385-91, 1973.

- . INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological dosimetry. Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Vienna, 1986. (Technical Report Series, 260).

- . JACHOWSKI, R. The early development of the Planorbid snail, Australorbis glabratus (Say). Proc. Helminthol. Soc. Wash. D.C., 30(2):245-8, 1963.

- . JOB, T.T.; LEIBOLD, G.J.; FITZMAURICE, H.A. Biological effects of roentgen rays. Am. J. Anat., 56:97-117, 1935.

- . KAWANO, T. O efeito da radiação ionizante e da cafeína no desenvolvimento da Biomphalaria glabrata. Cienc. Cult., 34(4):532-8, 1982.

- . 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. & SIMÕES, L.C.G. Morphogenetic effects of caffeine on Biomphalaria glabrata (Pulmonata, Planorbidae). Dev. Biol. Proc. C., 90(3):281-302, 1987.

- . KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G.; ALMEIDA TOLEDO, L.F. Karyotype and nucleolar organizer regions of Helisoma duryi (Wetherby, 1897). Rev. Bras. Genet., 8(2):285-90, 1985a.

- . KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G.; ALMEIDA TOLEDO, L.F. Nucleolar organizer region in three species of the genus Biomphalaria (Mollusca, Gastropoda). Rev. Bras. Genet., 10(4):695-707, 1987.

- . KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G.; HOFMANN, P.R.P. Aspectos da biologia do desenvolvimento de Biomphalaria. Cienc. Cult., (São Paulo), 37(8):1282-6, 1985b.

- . KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G.; UEMURA, G. O efeito do ácido giberélico (GA3) e do cloreto de 2-cloroetil trimetil amônio em embriões de Biomphalaria glabrata. In: MENEGHINI, R. coord. Mutagênese e carcinogênese ambiental: anais do 6º simpósio anual da ACIESP, realizado em São Paulo, 9-11 nov. 1981. v.3, 1982 (Publicação ACIESP, 36-III).

- . KIHLMAN, B.A. Caffeine and chromosomes. Amsterdam, Elsevier, 1977.

- . KUSAMA, T. & YOSHIZAWA, Y. The synergistic effects of radiation and caffeine on embryonic development in mice. J. Radiat. Res., 25:225-33, 1984.

- . LABORDUS, V. The effect of ultraviolet light on developing eggs of *Lymanaea stagnalis* (Mollusca, Pulmonata). Cap.IV: The interference of irradiations with morphogenesis. Haarlem, Amsterdam, Henkens-Holland, 1971. p.477-95.

- . LAWRENCE, C.W. Cellular radiobiology. New York, Edward Arnold, 1971. (The Institute of Biology's studies in Biology, 30).

- . LE BEAU, M.M.; WESTBROOK, C.A.; DIAZ, M.O.; ROWLEY, J.D.; OREN, M. Translocation of the p 53 gene in 1(15:17) in acute promyelocytic leukemia. Nature(London), 316:826-8, 1985.

- . LESHER, S. Radiosensitivity of rapidly dividing cells. Laval Medical, 34:53-6, 1963.

- . LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52:201-20, 1964.

- . LIARD, F.; CHIRIBOCA, J.; PELLEGRINO, J.; COLON, J.I.; SILVA, R.M. Effect of radiation on the reproductive potential of *Biomphalaria glabrata*. Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol., 1(3-4):157-62, 1968.

- . LLOYD, D. & EDWARDS, A.A. Chromosome aberrations in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate. In: ISHIHARA, T. & SASAKI, M. eds. Radiation-induced chromosome damage in man. New York, Alan R. Liss, 1983. p.23-49. (Progress and topics in cytogenetics, 4).

- . LLOYD, D. Radiation exposure and chromosome damage. Occup. Health, Nov., :504-9, 1979.

- . MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. Review article n^o 6. Phytochemistry, 24(4):639-52, 1985.

- . 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., 151:275-80, 1985a.

- . MATSUDA, Y.; YAMADA, T.; TOBARI, I. Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after x-irradiation. Mutat. Res., 148:113-7, 1985b.

- . MATSUDA, Y.; YAMADA, T.; TOBARI, I. Chromosome aberrations induced by tritiated water or ⁶⁰Co γ-rays at early pronuclear stage in mouse eggs. Mutat. Res., 160:87-93, 1986.

- . MATSUDA, Y.; YAMADA, T.; TOBARI, I.; OHKAWA, A. Preliminary study on chromosomal aberrations in eggs of mice fertilized in vitro after x-irradiation. Mutat. Res., 121:125-30, 1983.

- . MAVOR, J.W. A comparison of the susceptibility to x-rays of Drosophila melanogaster at various stages of its life-cycle. J. Exp. Zool., 47(1):63-83, 1927.

- . MCGREGOR, J.F. & NEWCOMBE, H.B. Major malformations in trout embryos irradiated prior to active organogenesis. Radiat. Res., 35:282-300, 1968.

- . 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., 49:155-69, 1972.

- . MICHELSON, E.H. & DU BOIS, L. Resistance to schistosome infection in Biomphalaria glabrata induced by gamma radiation. J. Invest. Path., 38(1):39-44, 1981

- . MILLER, R.W. Delayed radiation effects in atomic-bomb survivors. Science, 166:569-74, 1969.

- . MITELMAN, F. & LEVAN, G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1871 cases. Hereditas, 95:79-139, 1981

- . NARANG, N. Cytogenetic effects of radiation on the planorbid snail, Biomphalaria glabrata. Caryologia, 27(4):385-93, 1974.

- . NARANG, N. Karyotype studies of the three species of Biomphalaria (Mollusca: Pulmonata). Cienc. Cult., (São Paulo), 28(8):933-6, 1976.

- . NARANG, N. & NARANG, S. Chromosomal studies during spermatogenesis and the radiation induced chromosomal aberrations in Biomphalaria glabrata. Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol., 7(4):419-25, 1974.

- . NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F.; MULLENDERS, L.H.F.; MEIJERS, M. The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. Mutat. Res., 160:231-6, 1986.

- . NATARAJAN, A.T. & ZWANENBURG, T.S.B. Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. Mutat. Res., 95:1-6, 1982.

- . NAUMAN, C.H. & WHITTEN, J.M. Radiosensitivity of the flesh fly Sarcophaga bullata (Parker), throughout larval and pupal life. Radiat. Res., 66:587-96, 1976.

- . NITOWSKY, H.M.; SINDHVANANDA, N.; KONIGSBERG, U.R.; WEINBERG, T. Partial 18 monosomy in the cyclops malformation. Pediatrics, 37:260-9, 1966.

- . PARAENSE, W.L. "Biomphalaria amazonica and B. cousini", two new species of neotropical planorbid molluscs. Rev. bras. Biol., 26(2):115-26, 1966.
- . PARAENSE, W.L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni. In: CUNHA, A.S. Esquistossomose mansoni. São Paulo, USP, 1970. p.13-30.
- . PARAENSE, W.L. Estudo atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros (Mollusca, Gastropoda). Arg. Mus. Nac., (Rio de Janeiro), 55:105-28, 1975.
- . PARAENSE, W.L. & DESLANDES, N. Isolamento reprodutivo entre Australobis glabratus e A. nigricans. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 52(2, 3, 4):321-4, 1955.
- . PERES, C. de A. Derivação de um modelo para análise de efeitos biológicos induzidos por radiação. São Paulo, 1981. (Tese de livre docência, Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo).
- . PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Schistosomiasis: age of snails and susceptibility to x-irradiation. Science, 144:302-3, 1964a.
- . PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Survival, growth and fecundity of Australorbis glabratus snails developed from eggs exposed to ionizing radiation. Exp. Parasitol., 15:232-41, 1964b.

- . PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Estudos relativos aos efeitos da radiação ionizante sobre caramujos com vistas ao combate a estes hospedeiros do Schistosoma mansoni. Rev. bra. Malariol. Doenças Tropicais, 18:139-52, 1966.

- . PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & BERRY, E.G. Effects of ionizing radiation on Australorbis glabratus eggs. Exp. Parasitol, 15:226-31, 1964.

- . PHEMISTER, R.D.; GARNER, R.J.; SHIVELY, J.N.; TIETZ, W.J. Radiosensitivity of the developing beagle. In: SIKOV, M.R. & MAHLUM, D.D. eds. Radiation biology of the fetal and juvenile mammal. Washington, D.C., Atomic Energy Commission, 1969. (CONF-690501)

- . PIZZARELLO, D.J. & COLOMBETTI, L.G. Radiation biology. Boca Raton, Florida, CRC, 1982.

- . PRASARD, K.N. Handbook of radiobiology. Boca Raton, Florida, CRC, 1984.

- . PRESTON, R.J. Use of cytogenetic endpoints in human lymphocytes as indicators of exposure to genotoxicants. In: LI, A.P. New approaches in toxicity testing and their application in human risk assessment. New York, Raven, 1985. p.41-50.

- . RADFORD, I.R. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell killing after x-irradiation of mammalian cells. Int. J. Radiat. Biol., 49(4):611-20, 1986.
- . RAGHUNATHAN, L. The karyotype of Biomphalaria glabrata, the snail Vector of Schistosoma mansoni. Malacologia, 15(2):447-50, 1976.
- . RAVEN, CHR.P. The influence of lithium upon the development on the pond snail Limnaea stagnalis L. Proc. Ned. Akad. V. Wetench. Amsterdam, 45:856, 1942.
- . RAVEN, CHR.P. The development of the egg of Limnaea stagnalis L. from the first cleavage till the trochophore stage, with special reference to its "chemical embryology". Arch. Néerl. Zool., 7(3-4):353-434, 1946.
- . RAVEN, CHR. P. On the structure of cyclopic, synophthalmic and anophthalmic embryos obtained by the action on lithium in Limnaea stagnalis. Arch. Néerl. Zool., 8:(3):1-31, 1949..
- . RAVEN, CHR. P. Morphogenesis: the analysis of molluscan development. London, Pergamon, 1958.
- . RAVEN, CHR. P. & BEENAKKERS, A.M.TH. On the nature of head malformations obtained by centrifuging the eggs of Limnaea stagnalis. J. Embryol. Exp. Morph., 3(3):286-303, 1955.

- . RAVEN, CHR. P. & BURGERS, A.C.J. The influence of temperature on the lithium effect in Limnaea stagnalis. Akad. Wet. Ser. C, 55(5):554-61, 1952.

- . RAVEN, CHR. P.; DE ROON, A.C.; STADHOUDERS, A.M. Morphogenetic effects of a heat shock on the eggs of Limnaea stagnalis. J. Embryol. Exp. Morph., 3(2):142-59, 1955.

- . RAVEN, CHR. P.; KLOEK, J.C.; KUIPER, E.J.; DE JONG, D.J. The influence of concentration, duration of treatment and stage of development in the lithium-effect upon the development of Limnaea stagnalis. Amsterdam, North-Holland 1947. (Reprinted from Proceed., 50(6):584-94, 1947.)

- . RAVERA, O. Effects of x-irradiation on various stages of the life cycle of Physa acuta, Draparnaud, a fresh-water gastropod. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Disposal of radioactive wastes into seas, oceans and surface waters: proceedings of the symposium on..., held in Vienna, 16-20 May, 1966. p.799-808.

- . READ, J. Chromosome damage and growth reduction produced in roots of Vicia faba by x-rays and by triethylene melamine. Int. J. Radiat. Biol., 3(1):95-8, 1961

- . REICHERT, W.; BUSELMAIER, W.; VOGEL, F. Elimination of x-ray-induced chromosomal aberrations in the progeny of female mice. Mutat. Res., 139:87-94, 1984.

- . REVELL, S.H. Evidence for a dose-squared term in the dose response curve for real chromatid discontinuities induced by x-rays and some theoretical consequences thereof. Mutat. Res., 3:34-53, 1966.

- . REVELL, S.H. The breakage-and-reunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: a short history. Adv. Radiat. Biol., 4:367-416, 1974.

- . 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.

- . 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., 33:155-67, 1973.

- . ROOSMOORE, H.W. & HOFFMAN, E.A. The effect of ^{137}Cs radiation on growth, development and mortality of the larvae of the tussock moth Hemerocampa leucostigma. J. Invertr. Pathol., 17:277-81, 1971.

- . RUGH, R. Chairman's remarks. In: SIKOV, M.R. & MAHLUM, D.D. eds. Radiation biology of the fetal and juvenile mammal. Washington, D.C., USAEC, 1969. (CONF-690501).
- . RUGH, R. The effect of ionizing radiations on amphibian development. J. Cell & Comp. Physiol., 43(Suppl.1): 39-67, 1954.
- . RUSSELL, L.B. & RUSSELL, W.L. An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. J. Cell & Comp. Physiol. 43(Suppl.1):103-47, 1954.
- . SANDERS, C.L. & KATHEN, R.L. Ionizing radiation. Tumorigenic and tumoricidal effects. New York, Battelle, 1983.
- . SASAKI, M.S. & NORMAN, A. Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes. Nature, 214:502-3, 1967.
- . SAX, K. Chromosome aberrations induced by x-rays. Genetics, 23:494-516, 1938.
- . SCHREIBER, G. Citologia quantitativa I. An. Acad. Bras. Cienc., 38(1):137-41, 1966.
- . SCHREIBER, G. & CAMEY, T. The DNA content in nuclei of the blastomeres of Biomphalaria glabrata (Say) (Moll.Gaster.). Ann. Histochem., 11:313-8, 1966.

- . SCOTT, D. & ZAMPETTI-BOSSELER, F. The relationship between cell killing, chromosome aberrations, spindle defects and mitotic delay in mouse lymphoma cells of differential sensitivity to x-rays. Int. J. Radiat. Biol., 37(1):33-47, 1980.

- . SCOTT, D. & ZAMPETTI-BOSSELER, F. Cell cycle dependence of mitotic delay in x-irradiated normal and ataxia-telangiectasia fibroblasts. Int. J. Radiat. Biol., 42(6):679-53, 1982.

- . SCOTT, D. & ZAMPETTI-BOSSELER, F. Relationships between chromosome damage cell cycle delay and cell killing induced by bleomycin or x-rays. Mutat. Res., 151:83-8, 1985.

- . SHERRER, J.F.; CHQUILOFF, M.A.G.; FREITAS, J.R. Estudo comparativo da reprodução em quatro variedades genéticas de Biomphalaria glabrata (Say, 1818). I. Fecundidade. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 18(5):315-21, 1976.

- . SHIMADA, Y.; EGAMI, N.; SHIMA, A. Effect of heat on radiosensitivity at different development stages of embryos of the fish Oryzias latipes. Int. J. Radiat. Biol., 48(4):505-12, 1985.

- . SIMÕES, L.C.G. & KAWANO, T. O efeito morfogenético da cafeína em Biomphalaria glabrata. In: MENEHINI, R. coord. Mutagênese e carcinogênese ambiental: anais do 6º simpósio anual da ACIESP, realizado em São Paulo, 9-11 nov. 1981. v.3, 1982. (Publicação ACIESP, 36-III).

- . SIMÕES, L.C.G.; KAWANO, T.; HOFMANN, P.R.P. Citogenética do gênero Biomphalaria. Cienc. Cult., (São Paulo), 37(8):1289-93, 1985.

- . SNIDER, G. & KERSTEN, H. Susceptibility to soft x-rays of Daphnia magna during its development from egg to young in the brood pouch. J. Exp. Zool., 74(1):1-6, 1936.

- . STEPHAN, G. Cytological indicators: cytogenetic indicators. In: BIOLOGICAL indicators for radiation dose assessment: international workshop on..., held in Reimsburg, 12-16, dez., 1983. Muenchen, MMV Medizin Verlag, 1986. p.106-22.

- . STRANGE, J.R. & MURPHREE, R.L. Exposure-rate response in the prenatally irradiated rat: effects of 100 R on day 11 of gestation to the developing eye. Radiat. Res., 51:674-84, 1972.

- . SUSUKI, J. & EGAMI, N. Mortality of the earthworms, Eisenia foetida, after γ -irradiation at different stages of their life history. J. Radiat. Res., 24(3):209-20, 1983.

- . THERMAN, E. Human chromosomes: structure, behavior, effects. 2ed. New York, Springer-Verlag, 1986.
- . TUAN, R.; SIMÕES, L.C.G.; KAWANO, T. Estudo sobre poliploidia e meiose em B. glabrata. Cienc. Cult., (São Paulo), 36(7):843, 1984. (36ª SBPC, 4-11 julho, 1984).
- . UEMURA, G. & SIMÕES, L.C.G. Cariótipo de 3 espécies do gênero Biomphalaria. Cienc. Cult., 36:853, 1984.
- . UNITED NATIONS. Genetic and somatic effects of ionizing radiation: report to the general assembly on the effects of atomic radiation. New York, United Nations, 1986.
- . UNITED NATIONS. Report of the UN Scientific Committee on the effects of atomic radiation. New York, 1962. General Assembly, 17th Session suppl. 16(A/5216).
- . VARANDA, E.A.; TAKAHASHI, C.S.; SOARES, A.E.E. Effect of gamma radiation on eggs, larvae and pupae of Melittobia hawaiiensis - Detection of a body color mutation. Rev. Brasil. Genet., 8(3):439-48, 1985.
- . VERDONK, N.H. Morphogenesis of the head region in Lymnaea stagnalis L. Utrecht, Thoben Nijmegen, 1965.

- . YAMAGAMI, K. Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, Oryzias latipes. Develop. Biol., 29:343-8, 1970.

- . YANG, T.C.H. & DUCOFF, H.S. Radiosensitivity studies of x-irradiated Tribolium castaneum larvae. Radiat. Res., 39:643-54, 1969.

- . YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. Science (Wash. D.C.) 221:227-36, 1983.

- . WARKANY, J. & SCHRAFFENBERGER, E. Congenital malformations induced in rats by roentgen rays. Amer. J. Roentgenol., 57(4):455-63, 1947.

- . WELANDER, A.D. Some effects of x-irradiation of different embryonic stages of the trout (Salmo gairdnerii). Growth, 18:227-55, 1954.

- . WELANDER, A.D.; DONALDSON, L.R.; FOSTER, R.F.; BONHAM, K.; SEYMOUR, A.H. The effects of roentgen rays on the embryos and larvae of chinook salmon. Growth, 12:203-42, 1948.

- . WHITMORE, G.F.; STANNERS, C.P.; TILL, J.E.; GULYAS, S. Nucleic acid synthesis and the division cycle in x-irradiated L-strain mouse cells. Biochim. Biophys. Acta, 47:66-7, 1961.

- . WILSON, J.G. Differentiation and the reaction of rat embryos to radiation. J. Cell & Comp. Physol., 43 (Suppl.1): 11-37, 1954.

- . WOLSKY, A. The effect of radiations on developmental processes. In: PIZZARELLO, D.J. & COLOMBETTI, L.G. Radiation biology. Boca Raton, Florida, CRC, 1982. p-149-92.

- . ZAMPETTI-BOSSELER, F. & SCOTT, D. Cell death, chromosome damage and mitotic delay in normal human ataxia telangiectasia and retinoblastoma fibroblasts after x-irradiation. Int. J. Radiat. Biol., 39(5): 547-58, 1981.