

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**EFEITO GENOTÓXICO DA RADIAÇÃO GAMA EM DUAS LINHAGENS
CELULARES DE PLANÁRIAS MIXOPLÓIDES *Girardia schubarti***



Monografia de Bacharelado

Janaína Pacheco Jaeger

Porto Alegre, 2003

**EFEITO GENOTÓXICO DA RADIAÇÃO GAMA EM DUAS LINHAGENS
CELULARES DE PLANÁRIAS MIXOPLÓIDE *Girardia schubarti***

Janaína Pacheco Jaeger

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ênfase molecular, celular e funcional

Porto Alegre, 2003

"A conquista é antecedida pela aventura, nesta só mergulham aqueles que se despojam do egoísmo e incorporam ideais transformadores à vida".

César Ricardo

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Bernardo Erdtmann pela oportunidade e indispensável orientação no início deste trabalho.

Ao Dr. João Antonio Fêgas Henriques pela atenção, confiança e, principalmente, pelos ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Sharbel Maluf por ter me dado a primeira oportunidade de conhecer e trabalhar com citogenética.

À Dra. Juliana Silva pela assessoria e disposição e ao físico Alexandre Bacelar pela irradiação das amostras.

À doutoranda Tanise Knakievicz e ao mestrando Daniel Prá pela amizade e imprescindível auxílio na realização deste trabalho. Muito obrigada.

Aos meus queridos pais pelo amor e pela base sólida que me deram suporte para que eu fosse em busca de meus ideais. Às minhas irmãs pelo carinho e companheirismo.

Ao meu amor Carlos Eduardo pelo apoio, paciência e cumplicidade.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	07
I.1. As Planárias	07
I.1.1. <i>Girardia schubarti</i>	09
I.1.2. O Uso de Planárias como Bioindicadores	10
I.2. Exposição a Genotóxicos	12
I.2.1. Genotoxicidade Induzida por Radiações Ionizantes	13
I.3. Análise de Aberrações Cromossômicas	14
I.4. Objetivos	16
II. MÉTODOS	17
II.1. Coleta das amostras	17
II.2. Cultivo	17
II.3. Exposição	17
II.4. Análise de Aberrações Cromossômicas	18
III. RESUSTADOS E DISCUSSÃO	20
III.1. Avaliação da Sensibilidade das Linhagens Celulares da Espécie Mixoplóide <i>Girardia schubarti</i>	20
III.2. A Espécie Mixoplóide <i>Girardia schubarti</i> como Organismo-teste	27
IV. CONCLUSÕES	28
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

I. INTRODUÇÃO

I.1. As Planárias

As planárias são acelomadas, possuem simetria bilateral, cefalização e, apesar de sua estrutura corporal relativamente simples, possuem células metabolicamente competentes, bem como tecidos e órgão especializados. Elas apresentam uma posição evolutiva destacável na base da árvore filogenética dos animais ditos superiores. Além disso, são os organismos mais primitivos a apresentarem três folhetos embrionários e são um dos poucos grupos ainda vivos que representam o marco inicial na complexificação da vida animal.

Esses animais apresentam corpos pequenos, maturidade sexual precoce e não há cuidado parental. São carnívoros, consumidores de terceira ordem e alimentam-se de animais filtradores, tais como: rotíferos, ovos e larvas de insetos e restos de organismos em decomposição. As planárias também bioacumulam substâncias presentes no meio, tanto orgânicas quanto inorgânicas, as quais, em geral, são bastante sensíveis. Por esse motivo, a presença de planárias no ambiente indica a saúde do ecossistema (Knakievicz, 2001).

As espécies endêmicas do Rio Grande do Sul habitam mananciais de água doce, tanto lóticos (águas paradas), quanto lênticos (águas correntes).

Uma das características mais notáveis das planárias é a capacidade de regeneração. Uma parte do organismo, separada deste, é capaz de refazer o todo. Pode-se cortar um indivíduo adulto em mais de dúzia de pedaços, resultando que cada parte forme um novo indivíduo do tamanho aproximado do segmento cortado, mas com todos os órgãos funcionais (Hauser, 1984; 1985; 1986).

Regeneração epimórfica em planárias, como em vertebrados, requer a formação do blastema (tecido em regeneração) que subsequente cresce e diferencia nas partes que estão faltando. Regeneração em planárias começa com a formação de um epitélio de cicatrização dentro de horas depois da amputação. A dinâmica celular desse processo difere a partir dos vertebrados em que a cicatriz

não é convertida pela proliferação ativa das células epiteliais, mas através de séries de mudanças drásticas da morfologia e em propriedades migratórias das células tronco de planárias (Gremigni, 1981; Alvarado e Newmark, 1998; Alvarado, 2000).

Em planárias, células tronco residentes no parênquima (mesênquima) passam por uma pequena migração a partir do local da amputação para o epitélio de cicatrização e originam o blastema. Essas células tronco, ou neoblastos, compõem 20%-30% da população de células em planárias adultas e são células mitoticamente ativas ao longo de toda a vida somente nesses organismos (Baguñà, 1981; Baguñà e cols., 1989). Os neoblastos servem para dois propósitos. Primeiro, eles repõem as células diferenciadas não-proliferativas e mortas do organismo adulto. Segundo, eles compõem o volume do componente mesenquimal no blastema regenerante (Alvarado e Newmark, 1998).

Há propostas de que o mecanismo de controle da mitogênese seja de origem neurosecretória (Baguñà, 1974; Friedel e Webb, 1979) e um desses neurohormônios seria a serotonina (Franquinet e Le Moigne, 1979; Martelly e Franquinet, 1984). Geralmente, o material para estudo cromossômico é esse tecido em regeneração, preparado pelo método de "squash" (Kawakatsu e cols., 1983). Em nosso laboratório, faz-se uma suspensão celular, similar às preparações citogenéticas de tecidos de peixes, (Hochberg e Erdtmann, 1988) para observação de cromossomos mitóticos.

As planárias são pertencentes ao *phylum Platyhelminthes*, classe Tubellaria a qual apresenta apenas vermes de vida livre. Estão contidas na monofilética ordem Tricladida, sendo o gênero *Girardia* (objeto de estudo deste trabalho) pertencente à infraordem Paludicola (água doce) e família Dugesiidae.

Apesar das planárias ainda terem muitos aspectos básicos a serem desvendados, principalmente as espécies brasileiras, elas detêm características especiais que as tornam especialmente recomendáveis para testes de genotoxicidade (Lau, 1998; Prá e cols., 2000):

- I. Apesar de sua primitiva posição filogenética, são organismos complexos, com especialização dos elementos histológicos anatômicos;
- II. Possuem grande capacidade de regeneração, onde um fragmento se regenera em um novo indivíduo completo e com todos os órgãos funcionais. A planária pode ser cortada em vários pedaços, podendo ser usada uma parte

do mesmo organismo em cada dose do tratamento e controle; assim, torna-se controle de si mesma, eliminando diferenças interindividuais;

- III. Quando cortadas, têm alto índice mitótico e poucos cromossomos;
- IV. Adaptam-se muito bem às condições de laboratório e seu cultivo, assim como a análise cromossômica, é barata e fácil;
- V. São altamente sensíveis a agentes genotóxicos e mostram resistência à toxicidade, sobrevivendo à indução de aberrações cromossômicas e quebras no DNA durante o tratamento com drogas e amostras ambientais de águas ou misturas complexas;
- VI. A espécie *G. schubarti* é endêmica do Sul do Brasil e facilmente encontrada na natureza, permitindo comparações dos resultados em experimentos controlados de laboratório com avaliações feitas diretamente no ambiente;
- VII. As planárias são bioindicadoras de qualidade da água, sendo que a espécie *Girardia schubarti* é muito sensível à poluição orgânica, só sendo encontrada em águas correntes, limpas e bastante oxigenadas;
- VIII. No laboratório, os testes controlados realizados com planárias simulam todas as condições de testes *in vitro*, só que são *in vivo*, pois são realizados com organismos íntegros, vivendo similarmente às condições naturais. Testes com planárias em laboratório parecem perfazer perfeitamente as condições dos testes *in vitro* e *in vivo*, com a vantagem da sua manutenção ser mais simples e barata do que as células em cultura.

1.1.1. *Girardia schubarti*

A espécie *Girardia schubarti* é endêmica do Sul do Brasil e facilmente encontrada na natureza em nosso Estado. Essa espécie habita águas correntes e adapta-se muito bem às condições de laboratório, aceitando condições idênticas de manutenção, o que permite o seu cultivo simultâneo. Possuem poucos cromossomos, facilmente identificáveis, sem bandeamento (Lau, 1998).

É comum encontrar-se animais diplóides ($2n=8$), triplóides ($3n=12$) ou mixoplóides ($2n/3n$) de *G. schubarti* no Rio Grande do Sul. A linhagem mixoplóide por ser mais delgada, mais clara e menor que a diplóide, pode, sob o aspecto

morfológico, ser classificada como outra espécie (Knakiewicz, 2001). A ocorrência de mixoplóide também foi observada em outros continentes (Benazzi e Benazzi-Lentati, 1976; Oki e cols., 1981; Hoshino e cols., 1991), incluindo exemplares pertencentes a outros gêneros. Mosaicismo é extremamente raro em vertebrados, mas ocorre como condição natural na espécie de tartarugas *Platemys platycephala* (Bickham e cols., 1985; 1993).

Todos os animais que apresentam triploidia total ou parcial e que foram avaliados citogeneticamente se reproduzem assexuadamente por esquizogênese (fissão do corpo) ou por partenogênese (Knakiewicz, 2001). As espécies diplóides, mesmo sendo hermafroditas com sistemas reprodutores adaptados à fertilização interna e à deposição de casulos, têm sua autofecundação impossibilitada. Isso ocorre em parte, porque o movimento da massa espermática para fora do sistema masculino e a produção de fluido seminal dependem da ejaculação, que ocorre apenas durante a cópula (Barnes, 1996). Desta forma, as planárias realizam fecundação sempre cruzada.

Alguns indivíduos esquizogênicos podem reproduzir-se sexuadamente. Esses espécimes apresentam alta fertilidade e sua prole é quase sempre esquizogênica, com as mesmas características apresentadas pela geração parental. Benazzi (1981), a partir desses resultados, sugere que a esquizogênese é controlada por fatores genéticos.

Por apresentar células diplóides e triplóides em um mesmo indivíduo, a linhagem mixoplóide *Girardia schubarti* chama muita atenção como um organismo-teste. Adicionalmente por ser uma população clonal (reprodução por fissão), pode-se inferir que qualquer diferença existente entre as linhagens celulares, gerada pela exposição à um agente genotóxico, seja devido à uma diferença de sensibilidade, já que o metabolismo celular é o mesmo.

1.1.2. O Uso de Planárias como Bioindicadores

Um bioindicador é um organismo ou um conjunto de organismos que permite caracterizar o estado de um ecossistema e evidenciar tão precocemente quanto possível as modificações naturais ou provocadas. Em outras palavras,

bioindicadores são definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental, alterando as suas funções vitais ou acumulando toxinas (Martos e Maia, 1997).

Esses organismos, cujas funções vitais se correlacionam tão estreitamente com determinados fatores ambientais, podem ser empregados como indicadores na avaliação de uma dada área. Os processos bioquímicos básicos são os mesmos em muitos organismos e por isso parece ser razoável utilizar organismos como bioindicadores, que reagem mais rapidamente do que o homem, frente a toxinas ambientais. Esses organismos podem ser usados para detectar alterações ambientais provocadas pelas atividades humanas, as quais podem ser perigosas para o próprio homem (Lima, 2003).

A bioindicação existe quando valores atuais ou valores de entrada de um dado sistema se diferem de valores considerados padrões. Com frequência, é desejável se reconhecer o efeito biológico de um fator antrópico em tempo hábil, a fim de se poder tomar providências de controle. Poluentes ambientais podem se caracterizar como estímulos e provocar respostas nos organismos vivos. Essa peculiaridade pode ser empregada como um critério ou indicação na determinação da presença de poluentes no meio ambiente. Quando organismos são usados como bioindicadores em propostas de monitoramento ambiental, eles funcionam como instrumentos (Lima, 2003).

As planárias são bioindicadoras naturais de qualidade da água. A espécie *Girardia schubarti* é muito sensível à poluição orgânica, só sendo encontrada em águas correntes, limpas e bastante oxigenadas. Em laboratório, os testes com planárias simulam todas as condições dos testes *in vitro*, só que são *in vivo*, pois são realizados com organismos íntegros, vivendo similarmente às condições naturais (Lau, 1998).

I.2. Exposição a Genotóxicos

No decorrer da evolução, todos os seres vivos vêm sendo expostos a uma infinidade de genotóxicos naturais que estão nos alimentos e bebidas, nas fumaças inaladas e nas irradiações diversas recebidas do meio ambiente (Lau, 1998).

A intensidade do efeito dos agentes genotóxicos depende não só da quantidade a que um organismo é exposto, mas também de outros fatores, como o tamanho e espécie desse organismo, o seu estado nutricional e o modo de exposição. Assim, deve haver uma variação mensurável entre taxas e concentrações que não produzam efeitos detectáveis e aquelas que induzam um efeito máximo. A observação de um efeito, seja ele benéfico ou prejudicial, complica-se pelo fato de que sistemas aparentemente homogêneos são, na verdade, heterogêneos. Mesmo dentro de uma mesma espécie, pode haver diferenças marcantes da resposta genotóxica entre diferentes indivíduos. Um efeito produzido em um indivíduo não será, necessariamente, repetido em outro, podendo, inclusive, ser de maior amplitude entre espécies de um mesmo gênero do que entre grupos filogeneticamente distantes. Assim, estimativas de significância do potencial genotóxico de um agente devem envolver métodos estatísticos de avaliação (Zakrzewski, 1991), identificando ao máximo possível as variáveis e parâmetros utilizados (Lau, 1998).

Os genotóxicos podem induzir mutações em células somáticas e germinativas *in vivo* e, assim, conduzir ao câncer e a desordens hereditárias, respectivamente. Os estudos dos efeitos biológicos de mutagênicos químicos e físicos sobre o DNA devem levar em conta o modo como esses efeitos se comportam em relação a pequenas e grandes variações na dose. A quantificação desses efeitos biológicos não é a mesma, tanto que modelos matemáticos diferentes têm sido usados para avaliações citogenéticas resultantes de exposição à radiação e/ou mutagênicos químicos (Bochkov e cols., 1982).

1.2.1. Genotoxicidade Induzida por Radiações Ionizantes

Com as explosões atômicas de Hiroshima e Nagasaki, a humanidade tomou consciência, brusca e assustadoramente, da eficiência destruidora das radiações e da amplitude dos efeitos biológicos por elas produzidos (Alcântara Gomes e Caldas, 1969; Freire Maia, 1972). A partir da observação da grande importância desses efeitos, fez-se necessário avaliar a quantidade de radiação às quais os organismos foram expostos. Mesmo em situações onde as medidas físicas de dose podem ser adotadas, uma estimativa por métodos biológicos é de grande utilidade, pois fornece dados próprios a cada indivíduo. A indução de aberrações cromossômicas, uma das várias respostas biológicas às radiações ionizantes, tem sido utilizada como um meio de se estimar a dose média de corpo inteiro recebida por um indivíduo superexposto, técnica essa denominada dosimetria biológica ou citogenética (Freire Maia, 1972).

Os efeitos causados por baixas doses de irradiação diferem daqueles causados por altas doses de irradiação. Até o presente, pouco se conhecia sobre os efeitos a longo termo de exposição crônica de indivíduos e populações a baixas doses de irradiação. Esse problema, particularmente, concentra pessoas que vivem em territórios altamente contaminados com material radioativo como na região em que ocorreu o acidente de Chernobyl, ou habitantes de zonas que possuem radioatividade natural, tais como os que vivem em Guarapari, Araxá e Poço de Caldas no Brasil (Senyuk e cols., 2002).

As radiações ionizantes induzem diferentes tipos de lesões no DNA: quebras simples, quebras duplas, danos em bases nitrogenadas e ligações cruzadas, entre DNA-DNA ou entre DNA-proteínas. As quebras duplas de DNA e os danos múltiplos localizados são genotóxicos para a célula e são a origem dos efeitos letais ou mutagênicos, das instabilidades genéticas e dos efeitos carcinogênicos e de transformação (Ramalho, 1993; Saffi e Henriques, 2003).

A lesão pode surgir como um efeito direto da interação da radiação com uma macromolécula, como o DNA, ou indiretamente, quando a radiação transfere sua energia para uma outra molécula (por exemplo a radiólise da água); que sofre modificações estruturais e que, por excitação ou ionização, dá origem a uma série de espécies químicas bastantes difusíveis e reativas devido a elétrons não

pareados. Essas espécies químicas são os radicais livres, que irão reagir com o DNA, promovendo a sua transformação estrutural e modificando suas propriedades biológicas (Lau, 1998).

As radiações ionizantes, por terem essa capacidade de causar quebras na molécula de DNA, são consideradas agentes clastogênicos (indutores de aberrações cromossômicas), que não dependem da fase S do ciclo celular (síntese do DNA) para promoção de quebras duplas. No entanto, o tipo de lesão produzida pode ser influenciada pela fase do ciclo celular na qual está a célula ao ser irradiada (Ramalho, 1993).

Um exemplo de utilização terapêutica da radiação gama são pacientes com tumores malignos avançados que sofreram tratamento quimiorradioterápico. Na Lituânia, os tecidos malignos foram ativados com baixas doses de radiação gama (6-9 Gy), as quais causaram a morte desses tecidos. Este tratamento, chamado tratamento gamadinâmico (GDT), teve como resultados imediatos o desaparecimento completo de tumores e necroses significantes e parciais dos tecidos malignos (Bloznelyte-Plesniene e Stancius, 2002).

As planárias, quando utilizadas para testes, são irradiadas durante o processo de regeneração, onde há um incremento do índice mitótico (Saló e Baguñà, 1984). A radiação gama possui baixo LET – Transferência Linear de Energia (Linear Energy Transference), produzindo danos qualitativamente diferentes daqueles causados por outros tipos de radiações ionizantes, como α e β . Conforme aumenta a LET da radiação incidente, a média de aberrações cromossômicas também sofre um rápido incremento (Sachs e Brenner, 1993).

I.3. Análise de Aberrações Cromossômicas

Aberrações cromossômicas são quaisquer mudanças na estrutura do cariótipo, que criam um novo contexto genético pela movimentação do DNA de um lugar para outro, diferente do original (Kirsch, 1993).

Para se analisar aberrações cromossômicas, são conhecidas diferentes metodologias, as quais detectam alterações quanto ao número e estrutura dos cromossomos. Aberrações estruturais podem ser de dois tipos, cromossômicas

(também chamadas isocromatídicas) e cromatídicas (Carrano e Natarajan, 1988). Agentes físicos, como as radiações ionizantes, produzem mais aberrações do tipo cromossômica. Mutações cromossômicas e eventos relacionados são a causa de muitas doenças genéticas humanas, como, por exemplo, a síndrome de Fanconi e a síndrome de Bloom, as quais são características de instabilidade cromossômica (para revisão, ver Taylor, 2001).

A análise de aberrações cromossômicas é um teste de uso generalizado para diversos sistemas e diferentes organismos e tecidos. Os testes podem ser conduzidos *in vitro* (por exemplo, linfócitos de sangue humano irradiados em cultura) e *in vivo* (por exemplo, células de humanos irradiadas acidentalmente). Os testes com mutagênicos necessitam estudos prévios e/ou concomitantes em populações controle, não expostas, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, para avaliação da taxa de mutação cromossômica espontânea. A frequência de mutações espontâneas é particularmente importante para se identificar quais agentes exógenos possam estar atuando para alteração e variação da mesma.

A indução de aberrações em cromossomos de eucariontes *in vivo* por qualquer agente, seja físico ou químico, além de avaliar a mutagenicidade, é um indicativo de que o mesmo também é carcinogênico, ao menos no sistema avaliado. Trata-se de uma avaliação citogenética clássica, internacionalmente aceita para o biomonitoramento. Segundo Ashby (1991), se um produto produz aberrações cromossômicas *in vivo* é muito mais potente na predição do câncer e na avaliação do mecanismo de ação de carcinogênicos conhecidos. Muitos compostos, que são positivos no teste de aberrações cromossômicas, são carcinogênicos em mamíferos; no entanto não há uma correlação perfeita entre esse teste e carcinogenicidade. A correlação é dependente da classe química (Carrano e Natarajan, 1988) e existem carcinogênicos não detectados por esse teste, porque eles parecem agir através de outros mecanismos, que não genotoxicidade (agentes não genotóxicos carcinogênicos) (Ashby, 1991; OECD Guideline, 1995).

I.4. Objetivos

Os objetivos principais deste estudo foram:

1. Avaliar a sensibilidade de células diplóides e triplóides, bem como a aplicabilidade da linhagem mixoplóide *Girardia schubarti* para o teste de genotoxicidade.
2. Definir o protocolo experimental e os parâmetros de análise de aberrações cromossômicas desta espécie, induzida pela exposição à radiação gama.

II. MÉTODOS

II.1. Coleta das amostras

A amostragem de planárias *in loco* foi realizada em Salvador do Sul, RS, sendo estocadas à 4°C. Foi mantido o cruzamento ao acaso em laboratório para preservar a variabilidade genética característica das populações no seu ambiente natural.

II.2. Cultivo

As planárias são mantidas em laboratório, dentro de recipientes plásticos atóxicos, em água reconstituída (aproximadamente 20 ml/l de carbonato de cálcio) segundo Cabridenc (1979), o que praticamente elimina qualquer variação na composição da água. A temperatura é controlada (21°C) e a alimentação é feita semanalmente com fígado de boi ou gema de ovo congelados.

A água precisa ser mantida extremamente limpa, por isso é trocada juntamente com os recipientes, após a alimentação e novamente trocada 2 ou 3 dias depois, quando já se completou o processo de digestão e foram liberados dejetos orgânicos (Wirth e Heller, 1985).

II.3. Exposição

A irradiação das planárias foi realizada no Serviço de Radiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 24h antes do teste de aberrações cromossômicas, tempo no qual obtém-se o máximo efeito (Coco-Martin e cols.,

1994). O equipamento utilizado foi uma fonte de césio 137, com dosimetria de 3,85 Gy/min, marca Gammacell, desenvolvida pela empresa Nordion, Canadá.

Foram expostas à radiação gama 14 planárias/grupo testado, em doses de 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25 Gy.

II.4. Análise de Aberrações Cromossômicas

As planárias são alimentadas durante três dias e cortadas no quinto dia, para estimular a proliferação celular (Baguñà, 1973; 1974; 1976). A exposição é feita no nono dia, em relação ao primeiro dia de alimentação e, no décimo dia, usa-se o tecido regenerante colchicinado (0,2% durante 2h e 30min) para o preparo de suspensão celular (adaptado de Lau, 1998). A preparação das lâminas é feita somente no décimo primeiro dia (Fig. 1).

Paralelamente à exposição das amostras, um grupo de planárias foi mantido em água de cultivo, sendo o controle negativo.

O preparo de suspensão celular foi realizado da seguinte maneira (Fig.2):

- a) hipotonização com KCl 0,075M durante 15min;
- b) material bem divulgacionado com pipeta de Pasteur;
- c) centrifugação – 900rpm durante 5min, em microcentrífuga Sanyo, modelo MicroCentaur;
- d) descarte do sobrenadante e adição de glicerol (14:3:2:1 de água destilada, metanol, glicerol e ácido acético, respectivamente) por 5min;
- e) fixação do material com Carnoy por 1 hora;
- f) centrifugação – 900rpm durante 7min.;
- g) fixação do material com Carnoy, *over-night*;
- h) 4 lavagens com fixador;
- i) pinga-se o material em suspensão sobre lâminas limpas e geladas;
- j) flambam-se as lâminas;
- k) coloração feita com Giemsa.

As lâminas foram identificadas por código numérico e fez-se análise ao microscópio. As metáfases foram analisadas e classificadas conforme normais ou, quando anormais, especificadas quanto ao tipo, conforme classificação de Carrano e

Natarajan (1988). O número total de células analisadas depende da significância estatística dada pelo número de aberrações induzidas. Os dados foram expressos como número total de aberrações por 50 células de cada nível de ploidia.

Com o intuito de verificar se havia relação dose-resposta dependente entre o número de aberrações cromossômicas e as doses de radiação gama utilizadas no tratamento, foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2). A análise de resíduos do mesmo teste foi efetuada para averiguar se o número de danos das células diplóides e triplóides diferia dos valores esperados.

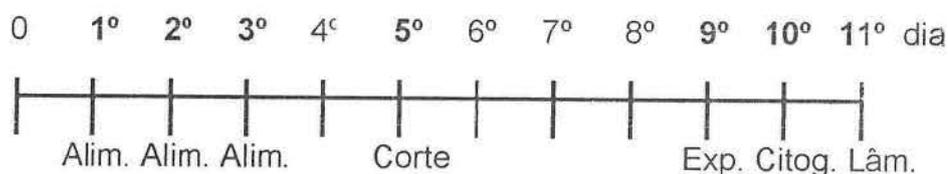


Figura 1 – Esquema de exposição e citogenética dos organismos amostrados.

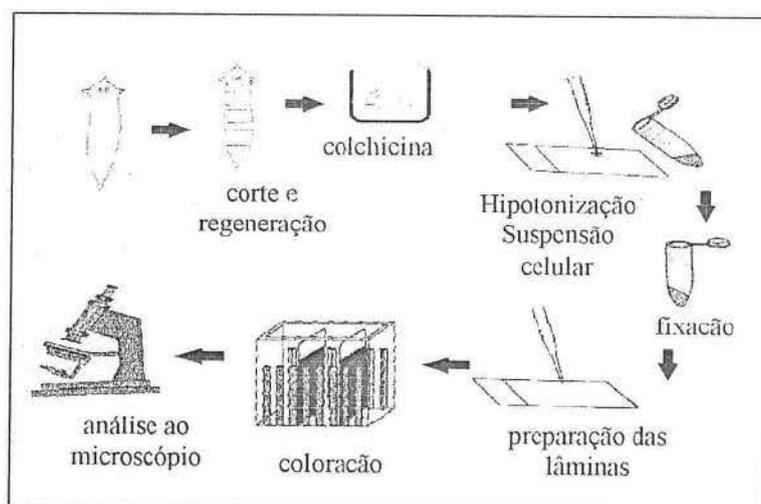


Figura 2 – Protocolo esquematizado da técnica de citogenética adaptada de Lau (1998).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. Avaliação da Sensibilidade das Linhagens Celulares da Espécie Mixoplóide *Girardia schubarti*

A análise de aberrações cromossômicas (AC), bem como outros procedimentos mundialmente reconhecidos, como o teste cometa e micronúcleo, são os mais indicados para a avaliação da sensibilidade de um novo organismo-teste, pois trata-se de testes de genotoxicidade muito sensíveis e bem estabelecidos, possuem ampla aplicabilidade e têm sido usados em vários organismos e tecidos (Betti e cols., 1994). A análise de aberrações cromossômicas, apesar de muito trabalhosa em relação a outros ensaios atualmente usados, é a mais informativa a respeito dos processos que ocorrem nos cromossomos das células somáticas após a exposição a agentes genotóxicos (Lau, 1998).

No presente trabalho, a análise das aberrações cromossômicas foi baseada nos critérios de Carrano e Natarajan (1998). No entanto, no decorrer das análises, observou-se a presença de não-disjunção mitótica em células diplóides, o que acarretaria a necessidade de se utilizar novas classificações. Embora tenham sido feitas essas constatações, esses resultados não foram aproveitados para as análises estatísticas, prevalecendo os critérios anteriormente estabelecidos.

Em relação ao organismo teste escolhido, as planárias mostraram-se altamente radiosensíveis. Os fatores que mais influenciam na sua radiosensibilidade são a existência e funcionalidade de mecanismos de reparo, o grau de diferenciação celular e a velocidade do ciclo celular (Alcântara Gomes e Caldas, 1969; Alcântara Gomes e Leitão, 1986).

O número de danos em células diplóides e triplóides de planárias mixoplóides *Girardia schubarti*, quando expostas às doses de radiação gama e em dose zero, é mostrado na tabela 1 e 2. Na figura 3, podem-se observar metáfases de células normais e seus cariótipos e células diplóides e triplóides com aberrações cromossômicas induzidas por radiação gama.

Tabela 1: Número total de aberrações cromossômicas (AC) em células 2n de planárias mixoplóides *Girardia schubarti* expostas à radiação gama.

Doses (Gy)	Nº de AC		Células aberrantes		Anomalia de divisão	Total células analisadas
	Quebras cromat	Quebras isocrom	Total	%	Não-disjunção mitótica	
0,00	2	1	3	5	0	60
0,25	1	3	4	8	0	50
0,50	1	6	7	14	0	50
0,75	1	4	5	10	0	50
1,00	3	8	11*	22	0	50
1,25	1	1	2	4	4	50

* P<0,05 em relação ao esperado

Tabela 2: Número de aberrações cromossômicas (AC) em células 3n de planárias mixoplóides *Girardia schubarti* expostas à radiação gama.

Doses (Gy)	Nº de AC		Células aberrantes		Anomalia de divisão	Total células analisadas
	Quebras cromat	Quebras isocrom	Total	%	Não-disjunção mitótica	
0,00	0	0	0	0	0	60
0,25	1	1	2	4	0	50
0,50	0	4	4	8	0	50
0,75	1	3	4	8	0	50
1,00	0	2	2	4	0	50
1,25	1	3	4	8	0	50

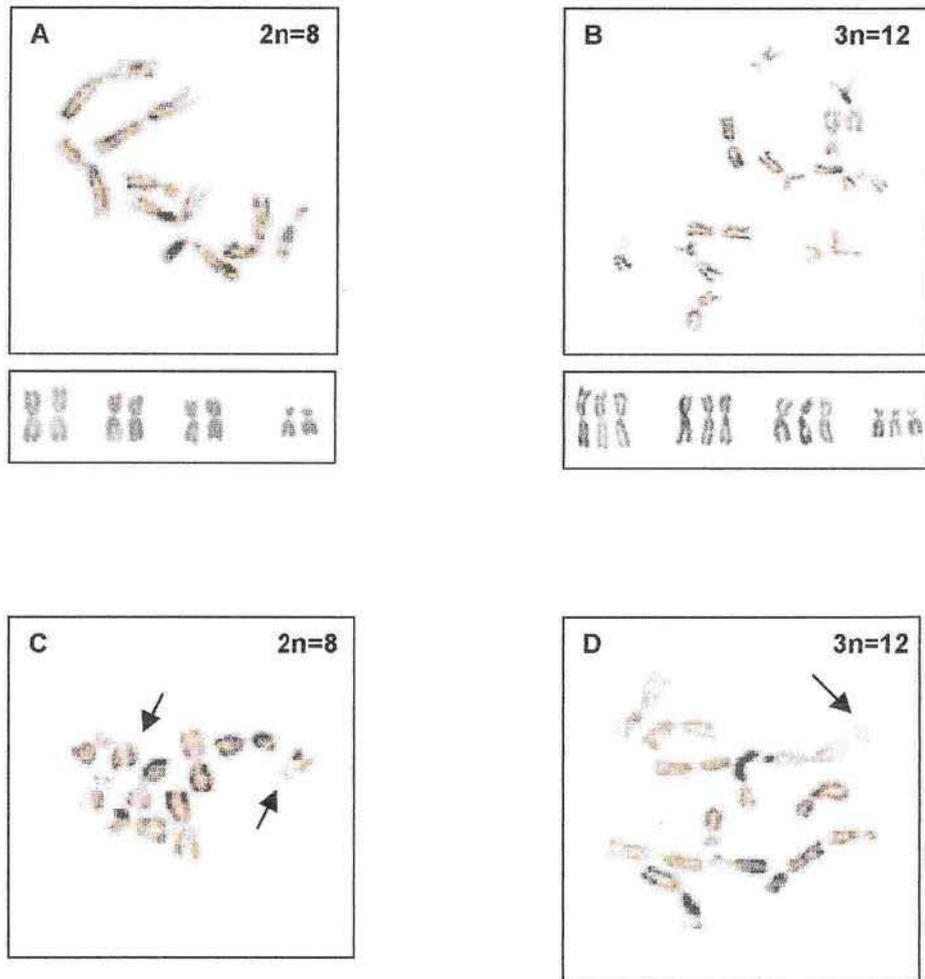


Figura 3: Metáfases e cariótipos de células normais e células diplóides e triplóides de *Girardia schubarti* mixoplóide com aberrações cromossômicas induzidas por radiação gama. Os painéis superiores mostram metáfases de células normais 2n(A) e 3n(B) de *Girardia schubarti* mixoplóide e seus cariótipos. Os painéis inferiores representam células com aberrações cromossômicas após serem expostas à radiação gama deste mesmo organismo, 2n(C) e 3n(D). As setas indicam quebras isocromatídicas.

Conforme os resultados obtidos, as células diplóides apresentaram valores estatisticamente significativos para a análise da curva de resposta, tendo um padrão de resposta dose-dependente ($P=0,030$) (Fig 4). Nota-se claramente um declínio na curva dose-resposta na dose mais elevada devido ao aumento da toxicidade, onde teve-se uma diminuição do número de aberrações cromossômicas (Tab 1 e Fig 4).

Já a linhagem celular triplóide não obteve o mesmo padrão de resposta, apresentando valores não-significativos para a análise estatística ($P=0,305$).

À medida que foram aumentadas as doses de radiação, elevou-se concomitantemente a toxicidade celular, como pôde ser observado pelas células que tiveram o seu DNA pulverizado - altamente fragmentado (Fig 5). Essas células não foram levadas em consideração nas análises estatísticas, visto que nem sempre foi possível ter certeza de que se tratavam de células com esse padrão, podendo ser facilmente confundidas com eventuais sujeiras presentes nas lâminas analisadas. No decorrer do trabalho, também foram observadas células diplóides com não-disjunção mitótica, mas que, por não constarem na classificação de Carrano e Natarajan (1988), não foram adicionadas nas análises (Tab 1 e Fig 6).

De acordo com a análise de resíduos do teste Qui-quadrado, nota-se uma diferença significativa entre o número de aberrações cromossômicas das células $2n$ e o valor esperado para a dose de $1,00$ Gy, ($R_{aj}=2,96$), fato que pode ser explicado por uma maior sensibilidade das mesmas. Em relação às células $3n$, nenhum dos valores obtidos diferiram significativamente dos valores esperados, mostrando uma maior resistência à radiação gama. A taxa de mutação espontânea também foi maior em células diplóide do que em triplóides, corroborando ainda mais esses resultados (Tab 1 e 2).

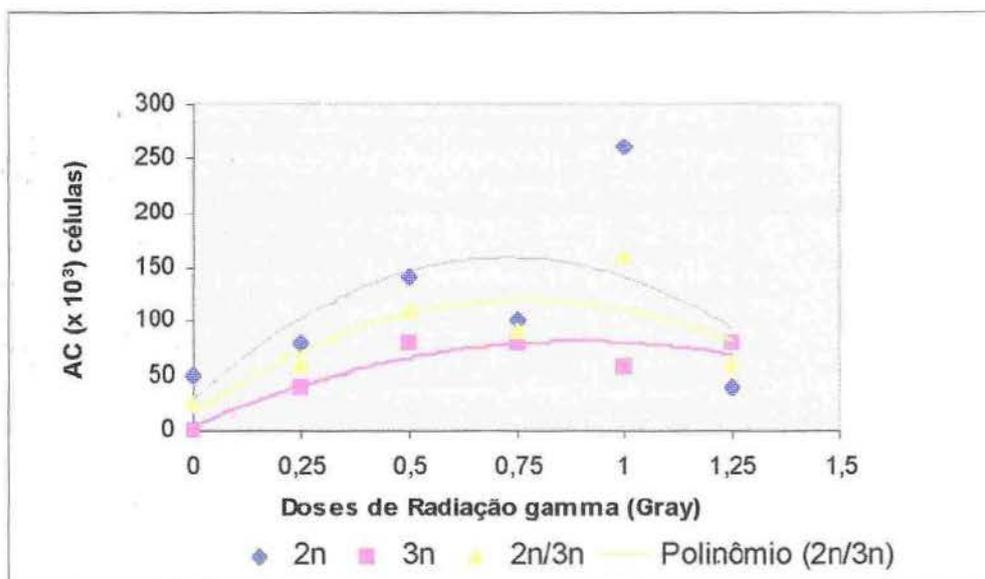


Figura 4: Efeito genotóxico diferencial da radiação gama em células $2n$ e de planárias *G. schubarti* mixoplóides avaliado pela análise de aberrações cromossômicas.

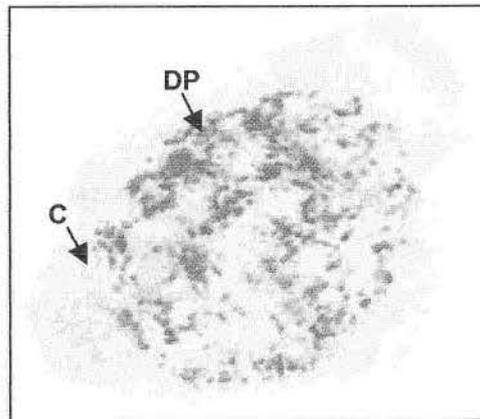


Figura 5: Célula de *Girardia schubarti* mixoplóide com DNA pulverizado exposta a elevadas doses de radiação gama. DP=DNA pulverizado, C= citoplasma.

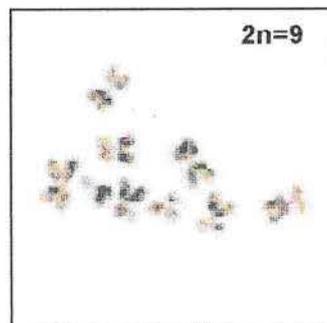


Figura 6: Célula diplóide de *Girardia schubarti* mixoplóide exposta à radiação gama com não-disjunção mitótica.

A maior radiosensibilidade das células diplóides foi verificada pelo fato dessas apresentarem, em quase todas as doses, um número maior de aberrações cromossômicas após a exposição à radiação gama. Entretanto, se a presença de células com não-disjunção mitótica fosse levada em consideração nas avaliações, a linhagem diplóide teria maior incidência de aberrações cromossômicas em todas as doses a que foram expostas. Além disso, somente essa linhagem mostrou redução

do efeito na dose de 1,25 Gy, fato que enfatiza a maior sensibilidade dessas células (Tab 1).

Para o teste utilizado, foram incluídas várias doses (0,25; 0,5; 0,75; 1,00 e 1,25 Gy), pois muitas vezes foi citado na literatura a ausência da curva dose-resposta em experimentos com linfócitos de humanos e primatas expostos a baixas doses de radiação (Takahashi e cols., 1982). Talvez, se fossem aumentadas as doses de radiação em nossos experimentos, as triplóides também apresentariam o mesmo padrão de resposta dose-dependente, já que as mesmas se mostraram mais resistentes. Devido ao fato de ambas linhagens celulares serem pertencentes a um mesmo organismo, pode-se relacionar essa diferença de resposta à radiação gama. Isso porque a relação dose-resposta não pode ser definida com segurança em populações heterogêneas, onde os efeitos da exposição podem diferir entre os indivíduos (Lutz, 2001).

A linhagem diplóide, além de ser mais sensível ao tratamento, apresenta maior taxa de mutação espontânea, talvez por ter uma capacidade de reparo diferente da linhagem triplóide. O fato de as células $2n$ apresentarem decaimento na resposta em doses mais elevadas, devido à toxicidade, já aponta uma menor capacidade de reparação do DNA dessas células.

Existem numerosos mecanismos de reparo do DNA nos quais as células estão envolvidas, incluindo reparo de emparelhamento incorreto de bases ("mismatch repair"), por excisão de bases (BER), por excisão de nucleotídeos (NER) e recombinação (homóloga e não-homóloga) (Gros e cols., 2002). A resposta final ao dano será determinada não só por mecanismos de reparo, mas também por outras funções celulares, que facilitam a restauração da lesão. Um exemplo clássico é o caso de lesões que induzem parada de ciclo celular, permitindo tempo à célula para entrar em morte celular programada (apoptose), ou fazer o reparo e, dessa forma, reduzir sua letalidade ou outras conseqüências genéticas após exposição a um determinado agente genotóxico (Pouget e Mather, 2001; Saffi e Henriques, 2003).

A habilidade celular em remover danos no DNA pode estar correlacionada com a atividade proliferativa. Nesse caso, enzimas de reparo estão envolvidas no controle gênico do ciclo celular e, embora sejam as mesmas nos dois processos, a indução proliferativa não afeta a capacidade da célula na reparação de danos. Ao contrário, com a ativação do ciclo celular, os níveis de expressão de enzimas de

reparo aumentam consideravelmente. Entretanto, um alto nível de eventos de reparo em células com proliferação ativada não necessariamente reflete uma maior capacidade desse mecanismo. O que pode ocorrer é que o processo de reparo esteja acontecendo com maior frequência e não com maior eficiência (Mayer e cols., 2002).

Em relação aos estudos de genotoxicidade em planárias, foi observado que, durante o tratamento, quando os animais foram alimentados com o intuito de se aumentar o índice mitótico, a relação entre o número de células $3n$ e $2n$ aumentou (dados não mostrados). De acordo com a constatação de que a atividade proliferativa pode estar associada com o sistema de reparo, as células triploides, por apresentarem um maior índice mitótico, também podem estar sofrendo um maior número de eventos de reparo. Isso poderia explicar o fato dessas células mostrarem-se mais resistentes ao tratamento com radiação gama. Cabe ressaltar que isso não significaria necessariamente uma maior eficiência desses mecanismos. Outro aspecto a ser analisado é o fato de que, por essas células terem um maior número de cópias de DNA, teriam mais fitas-molde para a reparação de danos, ou seja, estariam sofrendo uma maior quantidade de recombinação.

A diferença de sensibilidade entre as linhagens celulares de planárias mixoplóides *Girardia schubarti* em relação ao tratamento deverá ser analisada mais profundamente, com o intuito de se definir quais são as verdadeiras causas que proporcionam esse resultado. Para isso, estudos adicionais relacionados com o perfil da expressão gênica e atividade do sistema de reparo deverão vir a ser úteis no sentido de esclarecer a respeito de outros fatores possivelmente relacionados a essa diferença de sensibilidade.

III.2. A Espécie Mixoplóide *Girardia schubarti* como Organismo-teste

A espécie mixoplóide *Girardia schubarti* mostrou-se muito adequada e sensível como bioindicador de genotoxicidade através do teste de aberrações cromossômicas. Lau (1998) já havia comprovado a eficiência de planárias diplóides *Girardia schubarti* e *Girardia tigrina* para a avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos pela análise de aberrações cromossômicas e teste

cometa. Dessa forma, a espécie mixoplóide enfatiza a relevância das planárias como bioindicadoras de poluição ambiental, devido a eficácia desses organismos em detectarem danos ao DNA, induzidos por diferentes agentes genotóxicos.

Na padronização do teste de aberrações cromossômicas, a espécie mixoplóide apresentou o maior pico mitótico em tempo distinto das espécies diplóides. Isso pôde ser observado ao utilizar-se o quinto dia de regeneração para a técnica de citogenética e verificar-se que eram obtidas mais células em metáfases do que com três dias, como ocorria com as outras espécies. Devido a esse aspecto, houve a necessidade de se fazer uma adaptação do protocolo anteriormente estabelecido por Lau (1998). Após o corte dos animais, a técnica, que antes era realizada passados três dias de regeneração, teve procedência somente no quinto dia. Outras alterações foram relevantes para a obtenção de uma melhor qualidade dos cromossomos, como diminuição do tempo de uso de colchicina no tecido regenerante de 3h para 2h e 30min, hipotonização com KCl modificado de 20min para 15min, ausência de tripsina e adição de glicerol no processo de suspensão celular e alteração do tempo de centrifugação de 800rpm durante 5min para 900rpm durante 7min.

Dados citogenéticos são cada vez mais importantes no estudo taxonômico dos tricládidos. Por causa da existência de formas sexuais e assexuais em populações diplóides e poliplóides em algumas espécies e de ocorrência de processos aberrantes envolvidos na mitose e na meiose, esse grupo de animais oferece aspectos interessantíssimos de pesquisa, em nível citogenético, taxonômico e evolutivo (Benazzi e Benazzi-Lentati, 1976; Sluys e Jong, 1984). Os dados obtidos neste trabalho, bem como em trabalhos anteriores (para revisão, ver Lau, 1998; Prá, 2001), também fazem das planárias organismos muito apropriados para a avaliação da genotoxicidade, tanto de corpos de águas naturais, quanto de efluentes de esgotos urbano-industriais. Sendo as planárias organismos com capacidade de metabolização desenvolvida, há a expectativa de que possam ser utilizadas com eficiência em testes de genotoxicidade em laboratórios, sob as mesmas condições dos testes *in vitro*, sem perder a vantagem de ser um teste *in vivo*.

IV. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi avaliada a sensibilidade de duas linhagens celulares da espécie mixoplóide *Girardia schubarti*, com o objetivo de validar e de determinar sua habilidade e sensibilidade na detecção do potencial genotóxico. Os resultados foram obtidos pela análise de aberrações cromossômicas, e os testes, realizados com planárias regenerantes, tratadas *in vivo* com a radiação gama como agente genotóxico. As principais conclusões foram:

- A linhagem celular diplóide mostrou-se mais sensível à radiação gama do que a linhagem celular triplóide;

- A maior resistência das células triplóides pode ser devido: a) a uma maior quantidade de eventos de reparo, já que apresentam maior índice mitótico; e/ou b) a um maior número de processos de recombinação;

- A planária mixoplóide *Girardia schubarti* revelou-se um excelente organismo-teste para uso em avaliações de aberrações cromossômicas e danos no DNA induzidos *in vivo* por radiação gama;

- Os resultados obtidos garantem o valor preditivo dessa espécie como organismo-teste adequado para avaliações da genotoxicidade ambiental, especialmente para amostras de água ou misturas complexas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara Gomes, R. e Caldas, 1969. Introdução à Radiobiologia (Ação Biológica das Radiações). Instituto de Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 75-90.
- Alcântara Gomes, R. e A.C. Leitão, 1986. Radiobiologia e Fotobiologia. Instituto de Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro.
- Alvarado, A.S. e P.A. Newmark, 1998. The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair and Regeneration*, 6: 413-420.
- Alvarado, A.S., 2000. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays*, 22: 578-590.
- Ashby, J., 1991. Determination of the genotoxic status of a chemical. *Mutation Research*, 248: 221-231.
- Baguñà, J., 1973. Ph.D. Thesis. University of Barcelona, Spain. *in* Baguñà, J., 1976. Mitosis in the intact and regeneranting planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. I Mitosis studies during growth, feeding and starvation. *The Journal of experimental zoology*, 195: 53-64.
- Baguñà, J., 1974. Dramatic mitotic response in planarians after feeding and a hypothesis for the control mechanism. *The Journal of experimental zoology*, 190: 117-122.
- Baguñà, J., 1976. Mitosis in the intact and regeneranting planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II Mitosis studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *The Journal of experimental zoology*, 195: 65-80.

- Baguñà, J., 1981. Planarian neoblasts. *Nature*, 290: 14-25.
- Baguñà, J., E. Saló, e M.C. Auladell, 1989. Regeneration and pattern formation in planarians. III Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development*, 107: 77-86.
- Barnes, R.D., 1996. *Zoologia dos invertebrados*. São Paulo, Editora Roca Ltda., 6ª ed.
- Benazzi, M., 1981. Reproductive biology of *Dugesia sanchezi*, a fresh-water planarian from Chile. *Hydrobiologia*, 84: 163-165.
- Benazzi, M. e G. Benazzi-Lentati, 1976. In John, B. (ed) *Animal Cytogenetics, Vol.1. Platyhelminthes*. Gebrüder Borntraeger, Berlim-Stuttgart: 1-182.
- Betti, C., T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno e R. Barale, 1994. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, 307: 323-333.
- Bickham, J.W., P.K. Tucker e J.M. Legler, 1985. Diploid-Triploid Mosaicism: An unusual Phenomenon in side-necked Turtles (*Platemys platycephala*). *Science*, 227: 1591-1593.
- Bickham, J.W., B.G. Hanks, D.W. Hale e J.E. Martin, 1993. Ploidy Diversity and the Production of Balanced Gametes in Male twist-necked Turtles (*Platemys platycephala*). *Copeia*, 3: 723-727.
- Bloznelyte-Plesniene, L. e A. Stancius, 2002. Gammadynamic treatment in advanced malignant tumors. *Medicina (Kaunas)*, 38(2): 186-189.
- Bochkov, N.P., K.N. Yakovenko e N.I. Voskoboynik, 1982. Dose and concentration dependence of chromosome aberrations in human cells and the combined action of radiation and chemical mutagens. *Cytogenetics and cell genetics*, 33: 42-47.

- Cabridenc, R., 1979. Dureza (Teores em Sais Minerais) *in* Les bioassais en ecotoxicologie. IRCHA, São Paulo, IV, pp.3.
- Carrano, A.V. e A.T. Natarajan, 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC Publication 14. Mutation Research, 204: 379-406.
- Coco-Martin, J.M., M.F.M.A. Smeets, M. Poggensee, E. Mooren, I. Hofland, M. Vanden-Brug, C. Ottenheim, H. Bartelin e A.C. Begg, 1994). Use of fluorescence in situ hybridization to measure chromosome aberrations as a predictor of radiosensitivity in human tumor cells. International Journal of radiation biology, 66(3): 297-307.
- Franquinet, R. e A. Le Moigne, 1979. Relation entre les variations des taux de sérotonine et d'AMP cyclique au cours de la régénération d'une planaire. Biologie Cellulaire, 34: 71-76.
- Freire Maia, N., 1972. Dosimetria biológica *in* Radiogenética Humana. Ed. USP, São Paulo, pp. 93-95.
- Friedel, T. e R.A. Webb, 1979. Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by a neurosecretory fraction. Can. Journal of Zoology, 57(9): 1818-1819.
- Gremigni, V., 1981. The problem of cell totipotency, dedifferentiation and transdifferentiation in Tubellaria. Hydrobiologia, 84: 171-179.
- Gros, L., M.K. Saparbaev e J. Laval, 2002. Enzymology of the repair of free radiacals-induced DNA damage. Oncogene, 21(58): 8905-8925.
- Hauser, J., 1984. The fundamental problem of the cell changes during the regeneration. Acta Biologica Leopoldensia, ano VI(1): 115-124.
- Hauser, J., 1985. Self-division: suicide or reproduction? Acta Biologica Leopoldensia, ano VII(2): 175-182.

- Hauser, J., 1986. Warum tiere Köpfen?- Grundprobleme des Regenerationsvorganges bei Planarien und die parallele zum Krebsproblem. Brasilien – die Neue Welt, Verlag A.F. Koska (Ed.), Wien, Berlin, 1-16pp.
- Hochberg, V.B.M. e B. Erdtmann, 1988. Cytogenetical and morphological considerations on *Rhambdia queilen* (Piches-Pimelotidae) – The occurrence of the B chromosomes and polymorphic NOR regions. *Revista Brasileira de Genética*, 11: 563-576.
- Hoshino, K., K. Ohnishi, W. Yoshida e T. Shinozawa, 1991. Analysis of ploidy in a planarian by flow cytometry. *Hydrobiologia*, 227:175-178.
- Kawakatsu, M., J. Hauser, S.M.G. Friedrich, I. Oki, S. Tamura e T. Yamayoshi, 1983. Morphological, karyological and taxonomic studies of freshwater planarians from South Brazil IV. *Dugesia anderlani* sp. Nov. (Tubellaria, Tricladida, Paludicola), a new species from São Leopoldo in estado de Rio Grande do Sul. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 56(3): 196-208.
- Kirsch, I.R., 1993. The causes and Consequences of Chromosomal Aberrations. CRC Press, Inc. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1-534pp.
- Knakievicz, T., 2001. Dissertação de Mestrado. Avaliação citogenética e estudo da distribuição geográfica das espécies de planárias (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) no Rio Grande do Sul. Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.
- Lau, A.H., 1998. Dissertação de Mestrado. Testes de Genotoxicidade em Planárias – Análise de Aberrações Cromossômicas e Teste Cometa. Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.
- Lima, J.S., 2003. Bioindicação em Ecossistemas Terrestres. Internet: <http://www.techoje.com.br/meioambiente/ab0007-1.htm>

- Lutz, W.H., 2001. Susceptibility differences in chemical carcinogenesis linearize the dose-response relationship: threshold doses can be defined only for individuals. *Mutation Research*, 482: 71-76.
- Martelly, I. e R. Franquinet, 1984. Planarian regeneration as a model for a cellular activation studies. *Trends in biochemical sciences*, 8: 1468-1471.
- Martos, H.L. e N.B. Maia, 1997. *Indicadores Ambientais*. Ed. Liber Arte, São Paulo, 266pp.
- Mayer, C., O. Popanda, O. Zelezny, M.C. Brevern, A. Bach, H. Bartsch e P. Schmezer, 2002. DNA repair capacity after γ -irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA repair*, 1: 237-250.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals TGP/94.60, 1995. *In vitro* mammalian chromosome aberration test. 1-9pp.
- Oki, I., S. Tamura, T. Yomayosh e M. Kawakatsu, 1981. Karyological and taxonomic studies of *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu in the Far East. *Hydrobiologia*, 84: 53-56.
- Pouget, J.P. e S.J. Mather, 2001. General aspects of the cellular response to low-and high- LET radiation. *European journal of nuclear medicine*, 28(7): 939-40.
- Prá, D., A.H. Lau, T. Knakievicz, F. Carneiro, G.J. Segura e B. Erdtmann, 2000. Avaliação da permanência da resposta positiva em planárias tratadas com dose aguda de MMS. Trabalho apresentado no 46º Congresso Nacional de Genética. *Genetics and Molecular Biology*, 23(3): 718-719.
- Prá, D., 2001. Dissertação de Bacharelado. Avaliação da genotoxicidade das águas da bacia do dilúvio pelo ensaio cometa em planárias. Curso de Graduação - Bacharelado com ênfase em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.

- Ramalho, A.T., 1993. Dosimetria citogenética. Comissão Nacional de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 1-15pp.
- Sachs, R.K. e D.B. Brenner, 1993. Effect of LET on chromosomal aberration yields. I. do long-lived, exchange-prone double strand breaks play a role? International journal of radiation biology, 64(6): 677-688.
- Saffi, J. e J.A.P. Henriques, 2003. Reparação de DNA em células eucarióticas in Genética Toxicológica – eds. Erdtmann, B., J.A.P. Henriques e J. Silva. Ed. Alcance, Porto Alegre – RS. 450pp.
- Saló, E. e J. Baguña, 1984. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. Journal of embryology and experimental morphology, 83: 63-80.
- Senyuk, O.F., V.M. Kavsan, W.E. Muller e H.C. Schroder, 2002. Long-term effects of low-dose irradiation on human health. Cellular and molecular biology, 48(4): 393-409.
- Sluys, R. e H. De Jong, 1984. Chromosome morphological studies of *Dugesia gonocephala* S.L. (Platyhelminthes, Tricladida). Caryologia, 37(1-2): 9-20.
- Takahashi, E., M. Hirai, T. Utsugi e S. Nakai, 1982. Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes from man and crab-eating monkey: the dose-response relationships at low doses. Mutation Research, 94(1): 115-123.
- Taylor, A.M., 2001. Chromosome instability syndromes. Best practice & research. Clinical haematology, 14(3): 631-644.
- Wirth, Q.J. e Z. Heller, 1985. Influência da alimentação, proteína de soja e proteína de carne, no crescimento e desenvolvimento de exemplares recém eclodidos de *Dugesia schubarti* (Marcus, 1946). Acta Biologica Leopoldensia, VII(2): 275-284.

Zakrzewski, S.F., 1991. Principles of Environmental Toxicology. American Chemical Society, Washington, 1-270pp.

ERRATA

No item II.1 da página 17, onde está dito “A amostragem de planárias” e “estocadas à 4°C”, leia-se “A coleta de planárias” e “estocadas à 21°C”, respectivamente.