

Vanessa Siqueira Grazeffe

ESTABELECIMENTO DO TESTE DO COMETA EM  
HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)  
EXPOSTOS À RADIAÇÃO GAMA ( $^{60}\text{Co}$ ).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.**

Orientador: Profa. Dra. Eliana Nakano

São Paulo  
2009

Vanessa Siqueira Grazeffe

ESTABELECIMENTO DO TESTE DO COMETA EM  
HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)  
EXPOSTOS À RADIAÇÃO GAMA ( $^{60}\text{Co}$ ).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.**

Orientador: Profa. Dra. Eliana Nakano

São Paulo  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Grazeffe, Vanessa Siqueira

Estabelecimento do teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos à radiação gama(<sup>60</sup>Co) / Vanessa Siqueira Grazeffe - São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Eliana Nakano

1. *Biomphalaria* 2. Hemócitos 3. Dano ao DNA 4. Ensaio em cometa 5. Radiação ionizante

SES/CCD/CD-215/09

*“Ambiente limpo não é o que mais se limpa, mas o que menos se suja”.*

*Chico Xavier.*

*“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano. Mas sem ele, o oceano seria menor”.*

*Madre Teresa de Calcutá*

*Dedico este trabalho a minha avó Ivonne, aos meus pais, Nair e José, pelo apoio, amor e carinho incondicional e a Daniel Sato por todo seu amor.*

*Dedico a Dra. Eliana Nakano, orientadora da presente dissertação que muito me auxiliou em minha formação científica, pelos valiosos conhecimentos e pelo estímulo constante, apoio, amizade demonstrado durante a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

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

A professora Dra. Toshie Kawano, Diretora do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, pela oportunidade de iniciar o estágio, carinho, apoio, amizade, amparo.

A professora Dra. Eliana Nakano, Pesquisadora Científica do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, pelo carinho, apoio, amizade, força e orientação.

A professora Dra. Kayo OKazaki do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e toda sua equipe Miriam, Flávia e Márcia pela colaboração, apoio e amizade e condições fornecidas para a realização deste trabalho, sem os quais não poderia ser realizado.

Ao grupo da radiação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial à Beth e Carlos, pela atenção e a gentileza de irradiar nossos caramujos para a realização dos ensaios.

Ao professor Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira do Departamento de Bioinformática do IME da Universidade de São Paulo, pela gentileza de nos ter contribuído com a Análise Estatística deste trabalho.

A todos amigos do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan: pelo apoio, colaboração, companherismo e amizade.

Aos meus familiares que me acompanharam durante todo o período de realização deste trabalho pelo carinho.

A todos aqueles que acreditaram em mim.

## RESUMO

ESTABELECIMENTO DO TESTE DO COMETA EM HEMÓCITOS DE BIOMPHALARIA GLABRATA (SAY, 1818) EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA ( $^{60}\text{Co}$ ).

A eletroforese em gel de células únicas ou o ensaio cometa foi estabelecido nos caramujos de água doce *Biomphalaria glabrata*. Para a detecção de danos nos DNA de hemócitos circulantes, caramujos adultos foram irradiados com doses únicas de 2,5, 5, 10 e 20Gy de radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ). Os efeitos genotóxicos da radiação ionizante foram detectados em todas as doses como um aumento da dose dependente na migração do DNA. O ensaio cometa em *B. glabrata* demonstrou ser uma ferramenta simples, rápida e confiável na avaliação de efeitos genotóxicos de mutagênicos ambientais.

## ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF COMET ASSAY IN HAEMOCYTES OF BIOMPHALARIA GLABRATA (SAY, 1818) EXPOSED TO GAMMA RADIATION ( $^{60}\text{Co}$ ).

The single cell gel electrophoresis or the comet assay was established in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. For detecting DNA damage in circulating hemocytes, adult snails were irradiated with single doses of 2.5, 5, 10 and 20 Gy of ( $^{60}\text{Co}$ ) gamma radiation. Genotoxic effect of ionizing radiation was detected at all doses as a dose-related increase in DNA migration. Comet assay in *B. glabrata* demonstrated to be a simple, fast and reliable tool in the evaluation of genotoxic effects of environmental mutagens.

## LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ABREVIATURAS

### TABELAS

Tabela 1: Relação das espécies usadas e das substâncias avaliadas no Teste do Cometa.

Tabela 2: Categorias de cometas, segundo a migração do DNA

Tabela 3: Danos no DNA de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) pelo teste do cometa.

Tabela 4: Teste do azul de tripan realizado em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*: frequência absoluta e relativa de células viáveis e não viáveis.

### FIGURAS

Figura 1: *Biomphalaria glabrata*.

Figura 2: Acondicionamento dos caramujos para exposição

Figura 3: Fonte  $^{60}\text{Co}$  Gamma Cell Atomic Energy

Figura 4: Estímulo pedal do caramujo

Figura 5: Coleta da hemolinfa do caramujo

Figura 6: Esquema representativo do procedimento experimental para o teste do cometa.

Figura 7: Hemócito não lisado.

Figura 8: Hemócito lisado.

Figura 9: Teste do cometa em indivíduos adultos de *Biomphalaria glabrata*.

Figura 10: Hemócitos corados com azul de tripan: células que não absorveram o corante correspondem aos hemócitos viáveis e as coradas em azul, aos hemócitos não viáveis.

Figura 11: Hemócito sem dano (sem halo).

Figura 12: Hemócito danificado (com halo).

## ABREVIATURAS

Co – Cobalto

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido de etilenodiaminotetracético

FD – Fator de diluição

HCl - Ácido clorídrico

LMP – Baixo ponto de fusão

mA – miliamperes

MN – Micronúcleo

Na – Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NMP – Ponto de fusão normal

OPA – Órgão produtor de amebócito

Pb – Chumbo

PBS – Tampão de fosfato salino

TCl – troca entre cromátides irmãs

$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$  – Tris (Hidroximetil) aminometano

V – Volts

## ÍNDICE

1	Introdução.....	13
1.1	Presença de poluentes mutagênicos no ambiente aquático.....	13
1.2	O teste do cometa na avaliação de mutagênicos ambientais.....	14
1.3	Organismos indicadores de efeitos biológicos .....	21
1.3.1	<i>Biomphalaria glabrata</i> .....	21
2	Objetivos.....	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivo específico.....	25
3	Material e métodos.....	26
3.1	Organismo teste .....	26
3.2	Exposição à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ).....	26
3.3	Coleta de hemolinfa.....	27
3.4	Teste do cometa.....	29
3.4.1	Soluções.....	29
3.4.1.1	Solução de agarose.....	29
3.4.1.2	Solução de lise.....	29
3.4.1.2.1	Períodos de incubação em solução de lise....	30
3.4.1.3	Tampão de eletroforese.....	30
3.4.1.4	Tampão neutralizador.....	30
3.4.2	Preparo das lâminas.....	31
3.4.3	Expressão dos danos e corrida de eletroforese.....	31
3.4.4	Neutralização.....	31
3.4.5	Análise.....	32
3.4.5.1	Análise do teste do cometa.....	32
3.4.5.2	Análise estatística.....	32
3.5	Teste do azul de tripan.....	33
3.6	Descarte de materiais químicos e biológicos.....	33
4	Resultados.....	36
4.1	Avaliação do período de incubação em solução de lise.....	36
4.2	Radiação ionizante gama ( $^{60}\text{Co}$ ).....	37

4.3 Teste do azul de tripan.....	38
5 Discussão.....	40
6 Conclusões.....	47
Referências Bibliográficas.....	48
Anexos.....	64
Anexo 1 – Modelo da Tabela de análise visual dos cometas.....	64
Anexo 2 – Artigo publicado.....	65

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRESENÇA DE POLUENTES MUTAGÊNICOS NO AMBIENTE AQUÁTICO

Os ecossistemas aquáticos são os recipientes temporários ou finais de uma grande quantidade de poluentes que são lançados no ar, no solo ou diretamente nos corpos hídricos pelas atividades industriais, agrícolas e domésticas (Cetesb, 1990).

As águas poluídas são misturas complexas de muitas substâncias químicas, mas, de modo geral, agentes mutagênicos estão presentes em muitas delas (Claxton et. al., 1998; Ohe et. al., 2004). As principais fontes de poluentes mutagênicos são os efluentes de indústrias químicas e petroquímicas, refinarias de óleo e vazamentos de petróleo (Ohe et al., 2004). Os efluentes de estação de tratamento de águas urbanas e esgotos também contribuem para a carga de compostos mutagênicos na água (White e Rasmussen, 1998).

A contaminação do ambiente por agentes que podem danificar o material genético de qualquer organismo apresenta um risco potencial à saúde pública e aos ecossistemas (Würgler e Kramers, 1992; Anderson et al., 1994).

Os efeitos genéticos dependem do tipo de célula afetada; em células somáticas, podem levar ao desenvolvimento de neoplasias e morte celular (Würgler e Kramers, 1992). As mutações nas células somáticas podem ter grande importância para os indivíduos que as possuem, mas não apresentam qualquer efeito às gerações futuras (Depledge et al., 1998). Do ponto de vista evolutivo, as mutações em células germinativas são mais importantes, pois podem ser transmitidas de uma geração à outra (Carvalho, 1987).

As mutações induzidas nas linhagens germinativas podem levar à perda de gametas, provocar malformações ou morte embrionária, podendo assim, afetar diretamente o potencial reprodutivo e causar declínio das populações expostas (Würgler e Krames, 1992; Anderson e Wild, 1994).

As mutações podem influenciar na viabilidade dos organismos. Dependendo do gene mutante, a viabilidade poderá ser maior, igual ou menor do que a viabilidade do organismo normal. Um gene mutante que confere uma viabilidade reduzida aos seus portadores estará sob ação da seleção e tenderá a desaparecer da população, a menos que surjam novas mutações (Carvalho, 1987).

Mesmo que as mutações induzidas confirmem alguma vantagem seletiva para determinada população, isto pode significar desvantagem para outras, e é possível que a estabilidade do ecossistema seja afetada, como por exemplo, na indução de resistência a pesticidas, ou no aumento da virulência de organismos patogênicos (Würgler e Kramers, 1992).

## 1.2 O TESTE DO COMETA NA AVALIAÇÃO DE MUTAGÊNICOS AMBIENTAIS

Embora as análises físico-químicas identifiquem a presença e as respectivas concentrações de diferentes poluentes, elas são incapazes de fornecer dados sobre os efeitos biológicos nos organismos expostos. Apesar dos indicadores de efeitos ecológicos serem relevantes, pois fornecem dados sobre as alterações populacionais, como por exemplo, ocorrência, abundância, dominância e reprodução, eles também não indicam a causa dos efeitos (Shugart *et. al.*, 1992). Para isso, é necessário utilizar outros indicadores, que permitam a detecção precoce desses agentes no ambiente.

Vários ensaios têm sido utilizados para avaliar os efeitos causados por substâncias mutagênicas presentes no ambiente. Entre eles destaca-se o teste de Ames, a análise de aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, o teste do micronúcleo e o teste do cometa.

O teste de Ames é a metodologia de triagem mais utilizada atualmente para detectar poluentes mutagênicos em água, sendo validado em larga escala por diversos laboratórios (Umbuzeiro e Vargas, 2003). Nesse ensaio mede-se a taxa de retromutação da bactéria *Salmonella typhimurium* quando submetida a mutagênicos capazes de provocar a

reversão da forma mutante, que não sintetiza histidina, para a forma selvagem que sintetiza a histidina (Ames et al., 1975).

A análise de aberrações cromossômicas possibilita a identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e é um dos métodos mais sensíveis para a detecção de agentes mutagênicos (Pfeiffer et al., 2000; Silva et al., 2003; Takahashi, 2003).

As trocas entre cromátides irmãs (TCI) são outro parâmetro utilizado no estudo de mutagênese química. Esse fenômeno ocorre quando há quebras em ambas as fitas do DNA, seguida de uma troca entre os segmentos das cromátides de um mesmo cromossomo. Esse evento ocorre na fase S do ciclo celular e são induzidas eficientemente por agentes mutagênicos que se ligam covalentemente com o DNA formando adutos ou interferem direta ou indiretamente na replicação do DNA (Wolff et al, 1974; Parry e Parry,1995).

O teste do micronúcleo (MN) é amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. Os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros. Os fragmentos acêntricos que resultam de quebras cromossômicas se atrasam em relação aos segmentos cêntricos quando se dirigem para os pólos durante a anáfase. Depois da telófase, os cromossomos que não sofreram danos e os fragmentos cêntricos são incluídos nos núcleos das células filhas. Os elementos que se atrasam também são incluídos, mas se reúnem formando um ou mais núcleos secundários que são muito menores que o núcleo principal, recebendo o nome de micronúcleos. Quando ocorrem danos no fuso mitótico ou no próprio cromossomo, cromossomos inteiros não se conectarão aos microtúbulos e irão se atrasar durante a anáfase. Após a telófase, os cromossomos que não segregaram corretamente para o núcleo das células filhas darão origem aos micronúcleos (Schmid, 1975).

O teste do cometa ou eletroforese em gel de células individuais, um ensaio de genotoxicidade que combina técnicas bioquímicas para a detecção de quebras no DNA com abordagens típicas dos ensaios

citogenéticos, e não precisa que as células estejam em proliferação (Singh et al., 1988; Speit & Hartmann, 1999).

O ensaio do cometa detecta quebras na fita dupla, quebras na fita simples, sítios álcali-lábeis e quebras na fita simples associadas a sítios de reparo de excisão incompleto em DNA, ligações cruzadas de DNA com DNA e DNA com proteínas, e morte celular (Tice et al., 2000).

A detecção de quebras na fita simples em DNA de células individuais foi descrita por Rydberg e Johanson (1978). Nessa técnica, as células em agarose são colocadas nas lâminas, em seguida lisadas sob condições levemente alcalinas para permitir o desenrolamento parcial do DNA. Após a lise, as lâminas são neutralizadas e coradas com alaranjado de acridina. A extensão do dano no DNA é quantificada medindo-se a taxa de fluorescência: a coloração verde indica quebra na fita dupla e a vermelha, quebra na fita simples (Rojas et al., 1999).

Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a introduzirem a técnica de microeletroforese para detectar danos no DNA de células individuais. As células suspendidas em agarose são lisadas. Após a lise, as células se apresentam como nucleóides, que correspondem a uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido da maioria das histonas e proteínas nucleares, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Em seguida, os nucleóides são expostos a uma microeletroforese, fazendo com que o DNA migre para o ânodo devido à sua carga negativa. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, as alças de DNA se desenovelam migrando para além do nucleóide, adquirindo o aspecto visual de um cometa, enquanto que as células que não sofrem dano no DNA permanecem com a estrutura do nucleóide intacta. As células são coradas com corante fluorescente específico para DNA e visualizadas em microscópio de fluorescência.

Na microeletroforese realizada sob  $\text{pH} \cong 9,5$ , são detectados apenas quebras na fita dupla do DNA (Ostling e Johanson, 1984). No entanto, essas condições limitavam a utilidade do teste. Singh e colaboradores (1988) readaptaram esse procedimento usando  $\text{pH} > 13$ , promovendo a abertura da

fita dupla do DNA. A partir dessa versão, com essa técnica foi possível detectar quebras na fita simples, quebras na fita simples associadas a sítios de reparo de excisão incompleto e sítios álcali-lábeis em DNA de células individuais, oferecendo um aumento na sensibilidade do teste para identificar agentes genotóxicos. Olive e colaboradores (1990) desenvolveram uma outra versão dessa técnica, na qual o DNA passa por eletroforese num pH de 12,3, permitindo detectar quebras na fita dupla e na fita simples em DNA de células individuais.

Por ser um teste simples, sensível e de custo relativamente baixo, o teste do cometa tem sido empregado na avaliação de genotoxicidade de compostos químicos puros ou misturas, produtos naturais, amostras ambientais, como água bruta, água tratada, efluentes industriais, resíduos sólidos, lixiviados e amostras atmosféricas, pode ser utilizado em programas de monitoramento da qualidade ambiental, na avaliação de processos de tratamento, na localização de fontes potenciais de poluição e em estudos de impacto ambiental (Rojas et al, 1999; Zagatto e Bertoletti, 2006). O teste do cometa também é considerado rápido e eficaz nos estudos de reparo de quebras no DNA tanto na fita dupla, quanto na fita simples para ambas as versões (neutra e alcalina) (Mckelvey-Martin et al., 1993; Rojas et al., 1999, Speit et al., 1999).

Esse teste foi aplicado com êxito em várias espécies de plantas, anelídeos, moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos empregados como bioindicadores em estudos de biomonitoramento ambiental. Na tabela 1 há uma compilação de vários trabalhos com a relação das espécies utilizadas e das substâncias testadas no teste do cometa.

Tabela 1: Relação das espécies usadas e das substâncias avaliadas no Teste do Cometa.

<b>Organismos/ espécies</b>	<b>Agente</b>	<b>Fonte</b>
<b>Plantas</b>		
<i>Nicotina tabacum</i>	Pentaclorofenol	Gichner e Plewa, 1998
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	N-nitrosodimetilamina Peróxido de oxigênio 4-Nitroquinolina N-óxido	Erbes et al., 1997
<i>Vicia faba</i>	Metilmetanosulfonato Etilmetanosulfonato Cloreto de cádmio Mitomicina C Ciclofosfamida Tricloreto de cromo Dicromato de potássio	Koppen e Verschaeve, 1996
<b>Moluscos</b>		
<i>Dreissena polymorpha</i>	Pentaclorofenol	Pavlica et al., 2001
	Ácido Paracético Ácido hipoclorídico Hipoclorito de Sódio	Bolognesi et al., 2004
<i>Mytilus edulis</i>	Metilmetanosulfonato	Rank et al., 2003
	Peróxido de oxigênio N-nitrosodimetilamina	Steinert, 1996 Mitchelmore et al., 1998
	Nitropireno Cobre Benzopireno N Metilnitrosoguanina Nitrofuratoína Citosina-b-D-arabinosídeo 3-cloro-4diclorometil-5hidroxi-5[5H]-furanona	Wilson et al., 1998

Tabela1: Continuação

<b>Organismos/espécies</b>	<b>Agente</b>	<b>Fonte</b>
<b>Moluscos</b>		
<i>Patunopecten yessoensis</i>	Etil-nitrosouréia N-Metilnitrosoguanina Benzopireno 3-cloro-4diclorometil- 5hidroxi-5[5H]-furanona	Sasaki et al., 1997
<i>Tapes japonica</i>	Etil-nitrisouréia N-Metilnitrosoguanina 3-cloro-4diclorometil- 5hidroxi-5[5H]-furanona Benzopireno	Sasaki et al, 1997
<i>Crassostrea virginica</i>	Benzopireno e benzoantraceno 2- Etilnitrosoamina e Aminofluoreno	Nacci et al., 1996
<i>Musculita senhousia</i>	Peróxido de oxigênio	Sastre et al., 1997
<b>Peixes</b>		
<i>Brachydanio-rerio</i>	Metilmetanosulfonato	Deventer, 1996
<i>Psetta nancimus</i>	Etilmetanosulfonato	Belpaeme et al., 1998
<i>Ameiurus nebulosus</i>	Ciclosfamida	Pandrangi et al., 1995
<i>Pleuronectes americanus</i>	Peróxido de oxigênio N-Metilnitrosoguanina	Nacci et al., 1996
<i>Onchorynchus mykiss</i>	Peróxido de oxigênio	Devaux et al., 1997
	Benzopireno	Devaux et al., 1997 Kim et al., 2006
	Aflatoxina B1	Abd-Allah et al., 1999

Tabela 1: Continuação

<b>Organismos/espécies</b>	<b>Agente</b>	<b>Fonte</b>
<b>Peixes</b>		
<i>Salmo trutta</i>	Benzopireno	Mitchelmore et al., 1998
<b>Anguilla anguilla</b>	Benzopireno Bifenilas policloradas Tetraclorodibenzeno-p-dioxina $\beta$ -naftoflavona	Nigro et al., 2002
<b>Anfíbios</b>		
<i>Bufo americanus</i> <i>Rana clamitans</i> <i>Rana catesbiana</i>	Metilmetanosulfonato	Ralph et al., 1996
<b>Crustáceos</b>		
<i>Callinectes sapidus</i>	4-Nitroquinolina N-óxido 2-Metil1,4-naftoquinona	Lee et al., 1999
<b>Palaemonetes pugio</b>	2-Metil1,4-naftoquinona Cromo Mercúrio	Lee et al., 2000
<b>Anelídeos</b>		
<i>Lumbricus terrestris</i>	Mitomicina C Dioxina	Verschaeve e Gilles, 1995
<b>Nereis virens</b>	Etilmetanosulfonato Benzopireno	DeBoeck e Kirsh-Volders, 1997
<b>Mamíferos</b>		
<i>Tursiops truncatus</i>	Peróxido de oxigênio Metil-mercúrio	Betti et al., 1996 Taddei et al., 2001

### 1.3 ORGANISMOS INDICADORES DE EFEITOS BIOLÓGICOS

Os bioindicadores são organismos capazes de detectar a presença de poluentes. Podem revelar respostas e alterações no ecossistema antes de ocorrência de doenças e mortalidade. Devem apresentar ampla distribuição geográfica, serem facilmente coletados e se manter em um território relativamente restrito (Doust et al., 1994; López-Barea e Pueyo, 1998).

O ambiente aquático cobre 2/3 do planeta. As espécies aquáticas são representadas por mais de 90% de invertebrados (Barnes, 1990), que devido à sua alta representatividade são bons candidatos para avaliar o impacto de poluentes em ecossistemas aquáticos (Jha, 1998).

Várias espécies de moluscos são usados no monitoramento de poluentes mutagênicos, como por exemplo, mexilhões do gênero *Mytilus*, *Anodonta cygnea* e outros bivalves marinhos. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* também são utilizados (Scarpato et al., 1990; Brunetti et al., 1992; Gabriele et al., 1992; Brunetti et al., 1998; Jha et al., 2000; Dailianis et al., 2003; Izquierdo et al., 2003; Nakano et al., 2003; Tallarico et al., 2004; Estevam et al., 2006).

#### 1.3.1 *Biomphalaria glabrata*

O gênero *Biomphalaria* pertence ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae (Barnes, 1990). É um caramujo de água doce que vive no Sul dos Estados Unidos, América Central, América do Sul, África e Sudoeste da Ásia (Baker, 1945; Malek, 1985; Morgan et al., 2001).

As bionfalárias habitam corpos de água em zonas de precipitação moderada, podendo ocorrer em zonas de clima seco. Em ambas as situações, elas podem colonizar habitats sujeitos a secas estacionais, devido a sua resistência pronunciada à dessecação. Isso acontece tipicamente no

Nordeste do Brasil, principalmente na zona de transição entre a costa úmida e o interior semi-árido (Coutinho et. al., 1940; Barbosa e Dobbin, 1952).

Esses caramujos são considerados bons bioindicadores para estudos de biomonitoramento por apresentar ampla distribuição geográfica no Brasil, baixa dispersão, são facilmente coletados e o manejo é simples. São hermafroditas e possuem um ciclo de vida relativamente curto, podendo se reproduzir durante o ano todo sob condições controladas de pH, temperatura, oxigênio, alimentação (Munzinger, 1987; Carvalho, 1992).

Os embriões também constituem um bom sistema para estudos de toxicidade. Na espécie *B. glabrata*, os caramujos adultos podem colocar várias desovas por dia, contendo em média, de 9 a 50 ovos (Jansen, 1944; Rey, 1956; Pimentel 1957; Ritchie, 1966; Kawazoe, 1977). Os ovos são revestidos por uma cápsula transparente, que facilita o acompanhamento do desenvolvimento embrionário, que está detalhadamente descrito em Camey e Verdonk (1969), permitindo detectar claramente os efeitos morfogenéticos (Kawano et al., 1992).

Kawano e colaboradores (1992) estudaram os efeitos do sulfato de nicotina, que induziu malformações em *Biomphalaria glabrata*. Extratos vegetais, como os de *Gomphrena macrocephala*, *Holocalix glaziovii*, *Riedeliella graciflora*, *Stevia rebaudiana* e de *Laurus nobilis* foram tóxicos para adultos e embriões de *Biomphalaria glabrata* (Yamamoto et al., 1996; Kawano e Simões, 1986; Ré e Kawano, 1987). Os efeitos morfogenéticos da cafeína e o potencial mutagênico da radiação gama também foram estudados. A cafeína induziu malformações e a radiação gama induziu aberrações cromossômicas e malformações embrionárias em *Biomphalaria glabrata* (Okazaki e Kawano, 1991).

Recentemente, foi estabelecido o teste do letal dominante em *Biomphalaria glabrata*. O sistema foi eficiente, específico e sensível na avaliação de mutações nas células germinativas induzidas por mutagênicos químicos de referência. Resultados obtidos mostraram que *Biomphalaria glabrata* pode absorver e ativar mutagênicos químicos presentes no

ambiente aquático (Nakano et al., 2003; Tallarico et al., 2004; Estevam et al., 2006).

Neste trabalho, o teste do cometa foi aplicado em hemócitos de *B. glabrata* para a avaliação de mutagenicidade em células somáticas. Os hemócitos, também chamados de amebócitos são células sanguíneas encontradas em todas as partes do corpo da bionfalaria (Paraense, 1970).

Nos moluscos, os amebócitos são células capazes de se movimentar independentemente por meio de pseudópodes. Essas células exercem diferentes papéis nas reações imunológicas: (1) fagocitose de materiais estranhos; (2) digestão intracelular de partículas alimentares; (3) excreção de substâncias nocivas ao organismo; (4) armazenamento e transporte de cálcio usado no processo de reparação da concha (Wagge, 1955; Paraense, 1970; Cheng e Auld, 1977).

Os hemócitos em *Biomphalaria glabrata* se originam no órgão produtor de amebócitos (OPA), que se localiza em uma pequena área com células agrupadas presente entre o revestimento epitelial do pericárdio e as células epiteliais do manto superior (Jeong, et al., 1983). Os hemócitos passam pelos estádios de maturação de ameboblasto primário e ameboblasto secundário para chegar a amebócito. Os ameboblastos primários aparecem em pequenos grupos no órgão produtor de amebócitos (OPA), ocupando os espaços intercelulares. Os ameboblastos secundários ficam próximos do interior do OPA, localizados na região do pericárdio. Os amebócitos secundários amadurecem, transformando-se em amebócitos (Jeong et al., 1983)

Vários trabalhos foram realizados com êxito utilizando hemócitos de outras espécies como *Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*, *Crassostrea virginica*, *Nassarius tegula* e *Musculista senhousia* no teste do cometa (Taban et al., 2004; Rank et al., 2005; Bolognesi et al., 2004; Klobucar et al., 2003; Nacci et al., 1996; Sastre et al.1997). Os hemócitos são facilmente obtidos, a manipulação e preparo das lâminas precisam de pouco tempo, minimizando a possibilidade de danos mecânicos, e quando expostos a agentes ambientais apresentam capacidade de transportá-los, além de

apresentarem vários mecanismos de defesa (Nacci et al., 1996; Sastre et al. 1997; Mersh et al., 1996; Klobucar et al., 2003; Bolognesi et al., 2004; Rank et al., 2005).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi padronizar o teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ).

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Padronizar alguns parâmetros do ensaio do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.
- Avaliar a capacidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* em detectar os efeitos genotóxicos da radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A versão alcalina do teste do cometa foi descrita por Singh e colaboradores (1988) e adotada neste trabalho com algumas adaptações.

#### 3.1 ORGANISMO TESTE

Foram utilizados caramujos da espécie *B. glabrata* selvagens, provenientes de Barreiro Baixo em Belo Horizonte (MG), mantidos em laboratório durante várias gerações. Os caramujos foram mantidos em aquários plásticos medindo 50 x 23 x 17 cm com água filtrada e aeradores a uma temperatura ambiente constante de 25 °C. A troca de água foi realizada a cada 15 a 20 dias e alimentação diária com alface fresca *ad libitum*. Foram usados caramujos adultos, com idade entre 3 a 8 meses e concha de diâmetro mínimo de 10 mm (figura 1).



Figura 1: *Biomphalaria glabrata*

#### 3.2 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO GAMA ( $^{60}\text{Co}$ ).

Foram selecionados 12 caramujos por grupo (controle e expostos) e colocados em tubos de plástico, separados individualmente por algodão umedecido (figura 2).

Os caramujos foram irradiados em uma fonte ( $^{60}\text{Co}$ ) Gamma Cell Atomic Energy of Canada LTD, modelo GC 220 do Instituto de Pesquisas

Energéticas e Nucleares da Comissão Nacional de Energia Nuclear, na presença de oxigênio molecular em temperatura ambiente (figura 3).

Em experimentos preliminares foram empregadas doses de 12,5, 25, 50 e 100 Gy para determinação da faixa de dose do experimento definitivo.

Para o experimento definitivo foram usadas as doses de 2,5, 5, 10 e 20 Gy com a taxa de dose de radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) de 2,82 KGy/h, e 90% de atenuação (Pb). Os tempos de irradiação foram 28,9s para 2,5 Gy, 60,8s para 5 Gy, 125s para 10 Gy e 253s para 20Gy.



Figura 2: Acondicionamento dos caramujos para a exposição



Figura 3: Fonte ( $^{60}\text{Co}$ ) Gamma Cell Atomic Energy

### 3.3 COLETA DE HEMOLINFA

Foi realizado nos caramujos um estímulo prévio, 24 horas antes da coleta de hemolinfa. Esta técnica consiste em fazer um estímulo pedal,

tocando a superfície do pé do caramujo com um pedaço fino de papel filtro. Com esse estímulo o caramujo libera a hemolinfa através do poro hemal, que é descartada (figura 4).

Para a obtenção de hemolinfa para o teste do cometa, os caramujos foram colocados em papel de filtro para absorção do excesso de água. A superfície da concha foi seca com algodão ou papel de filtro e feito um estímulo pedal. Para este estímulo, a superfície do pé do caramujo foi tocada com a ponteira da micropipeta, e em seguida, a hemolinfa foi liberada, coletada com a micropipeta e depositada num tubo de microcentrífuga (1,5 ml) (figura 5).

De cada caramujo foi coletado 100  $\mu$ l de hemolinfa.



Figura 4: Estímulo pedal do caramujo



Figura 5: Coleta da hemolinfa do caramujo

### 3.4 TESTE DO COMETA

Após a exposição dos caramujos a radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ), a hemolinfa é coletada e suspensa em 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão. A mistura da hemolinfa com agarose LMP é colocada na lâmina de microscopia previamente montada com uma camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. As lâminas são colocadas na solução de lise (pH10) por 600 minutos. Após a lise, a cuba de eletroforese é preenchida com as lâminas e cobertas com o tampão de eletroforese para que ocorra a expressão de danos. As lâminas ficam em repouso no tampão por 30 minutos e, em seguida é realizada a corrida em 23V a 150mA durante 30 minutos. Após a corrida, as células são neutralizadas com tampão de pH 7,5. Em seguida, as células são coradas com Brometo de etídio a 0,002%, e visualizadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40 vezes (figura 6).

#### 3.4.1 Soluções

##### 3.4.1.1 Solução de Agarose

Para preparar a agarose com ponto de fusão normal (NMP), foi necessário 1,5 g em 100 ml de PBS, e para a agarose de baixo ponto de fusão (LMP), 0,5 g em 100 ml de PBS. Ambas foram mantidas em banho-maria a uma temperatura de 60 °C (agarose NMP) e 37 °C (agarose LMP), respectivamente.

##### 3.4.1.2 Solução de lise

Para a solução de lise, foi usado 1 ml de Triton X-100, 10 ml de DMSO e 89 ml da solução lise “mãe”. Essa solução foi preparada no dia do ensaio e mantida a 4 °C.

Para a solução-mãe, foi usado 73 g de NaCl, 200 ml de água destilada, 18,6 g de EDTA (100 mM) e 0,60 g de TRIS (10 mM). Em seguida, ajustou-se o pH a 10 com 4,0 g de NaOH, adicionou-se 5 g de sarcosinato de Na e a solução foi completada para 445 ml com água destilada. Essa solução foi preparada com antecedência e mantida em temperatura ambiente.

#### 3.4.1.2.1 Períodos de incubação em solução de lise

Após o preparo, as lâminas foram colocadas na solução de lise gelada, cobertas com papel alumínio e mantidas em solução por 0 (controle), 5, 30, 60, 120 e 600 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram coradas com 0,002% de brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência.

#### 3.4.1.3 Tampão de eletroforese

No preparo da solução “mãe” de NaOH (300 mM) foi utilizado 20 g de NaOH em 50 ml de água destilada. Na solução “mãe” de EDTA foi utilizado 15 g de EDTA em 200 ml de água destilada e foi ajustado o pH a 10 com NaOH.

Para 1 litro de tampão, foi utilizado 30 ml da solução “mãe” de NaOH, 5 ml da solução “mãe” de EDTA e completou-se para 1 l com água milli-Q gelada. Essa solução foi preparada na hora da eletroforese.

#### 3.4.1.4 Tampão neutralizador

Usou-se 12,12 g de TRIS em 250 ml de água destilada, ajustou-se o pH a 7,5 com HCl concentrado.

### 3.4.2 Preparo das lâminas

Foi adicionado 1000 µl de agarose NMP quente (banho-maria 60 °C) em lâminas com extremidade fosca. A agarose deve atingir metade da parte fosca da lâmina para garantir sua adesão. A agarose da parte de trás da lâmina foi retirada com uma gaze e a lâmina foi deixada para descansar horizontalmente. Essa etapa foi feita rapidamente para garantir uma boa distribuição da agarose. As lâminas foram deixadas em repouso por uma noite à temperatura ambiente.

Duas lâminas por animal foram separadas e codificadas. Após este procedimento, 500 µl de agarose LMP foram adicionados em um tubo para microcentrífuga contendo 100 µl de hemolinfa e colocados 200 µl desta mistura sobre o gel solidificado de cada lâmina separada; em seguida foi colocada uma lamínula. Após 10 minutos a 4 °C a lamínula foi removida e as lâminas foram colocadas na solução de lise gelada, cobertas com papel alumínio.

### 3.4.3 Expressão dos danos e corrida de eletroforese

Após a lise, as lâminas foram removidas da solução, o excesso de líquido foi retirado e as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal mantidas no gelo sem deixar espaços entre as lâminas. A cuba foi preenchida com o tampão alcalino gelado (pH > 13) até cobrir totalmente as lâminas. Após 30 minutos de incubação, foi feita a eletroforese a 23 Volts (V) e 150 miliamperes (mA) durante 30 minutos.

### 3.4.4 Neutralização

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com tampão Tris por 5 minutos; esse processo foi repetido 3 vezes.

Em seguida, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto durante 10 minutos para serem posteriormente analisadas.

### 3.4.5 Análise

Previamente, as lâminas fixadas foram hidratadas em água destilada durante 5 minutos e, em seguida, coradas com 50µl de brometo de etídio recém preparado e coberto com lamínula. Para a solução corante, foi utilizado brometo de etídio a 0,002%. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, modelo Axiolab) equipado com filtro de excitação 515-560 nm e filtro de barreira 590 nm, no aumento de 400 vezes.

Para a análise foram selecionadas 50 células isoladas e a leitura da lâmina foi feita em ziguezague partindo-se da extremidade superior esquerda para a direita.

#### 3.4.5.1 Análise do teste do cometa

Para a avaliação da migração de DNA foi realizada uma análise visual, que consiste na classificação dos cometas em categorias (0 a 3), de acordo com a extensão da migração do DNA (tabela 2).

#### 3.4.5.2 Análise Estatística.

A análise estatística foi realizada utilizando o Modelo de Regressão Logística Multinomial, versão 14.0 do pacote estatístico para Ciências Sociais (SPSS) para Windows. O modelo de probabilidade usado foi a distribuição multinomial. Para cada dose de radiação foram contados 100 cometas por animal. Assim, o vetor de freqüências de categorias dos cometas é um vetor multinomial com 4 categorias. Após ter ordenado as amostras de acordo com as doses de radiação e as distribuições multinomiais, foi escolhida a técnica estatística de regressão logística. Para avaliar as significâncias sugeridas a partir do gráfico de regressão logística

foram usadas tabelas de contingência com o teste do chi-quadrado (Agresti, 2002).

### 3.5 TESTE DO AZUL DE TRIPAN

Foram utilizados 5 caramujos por grupo: controle, 2,5 e 20 Gy. Após a estimulação 24 horas antes, 10 µl de hemolinfa de cada caramujo foram corados com 10 µl de trypan blue a 0,4%. Essa mistura foi deixada em repouso por 5 minutos e, em seguida, 10 µl da mesma mistura foi colocada na câmara de Neubauer, e após 3 minutos em câmara úmida, foi colocada a lamínula e analisada no microscópio óptico (Olympus, modelo BX50), no aumento de 400 vezes.

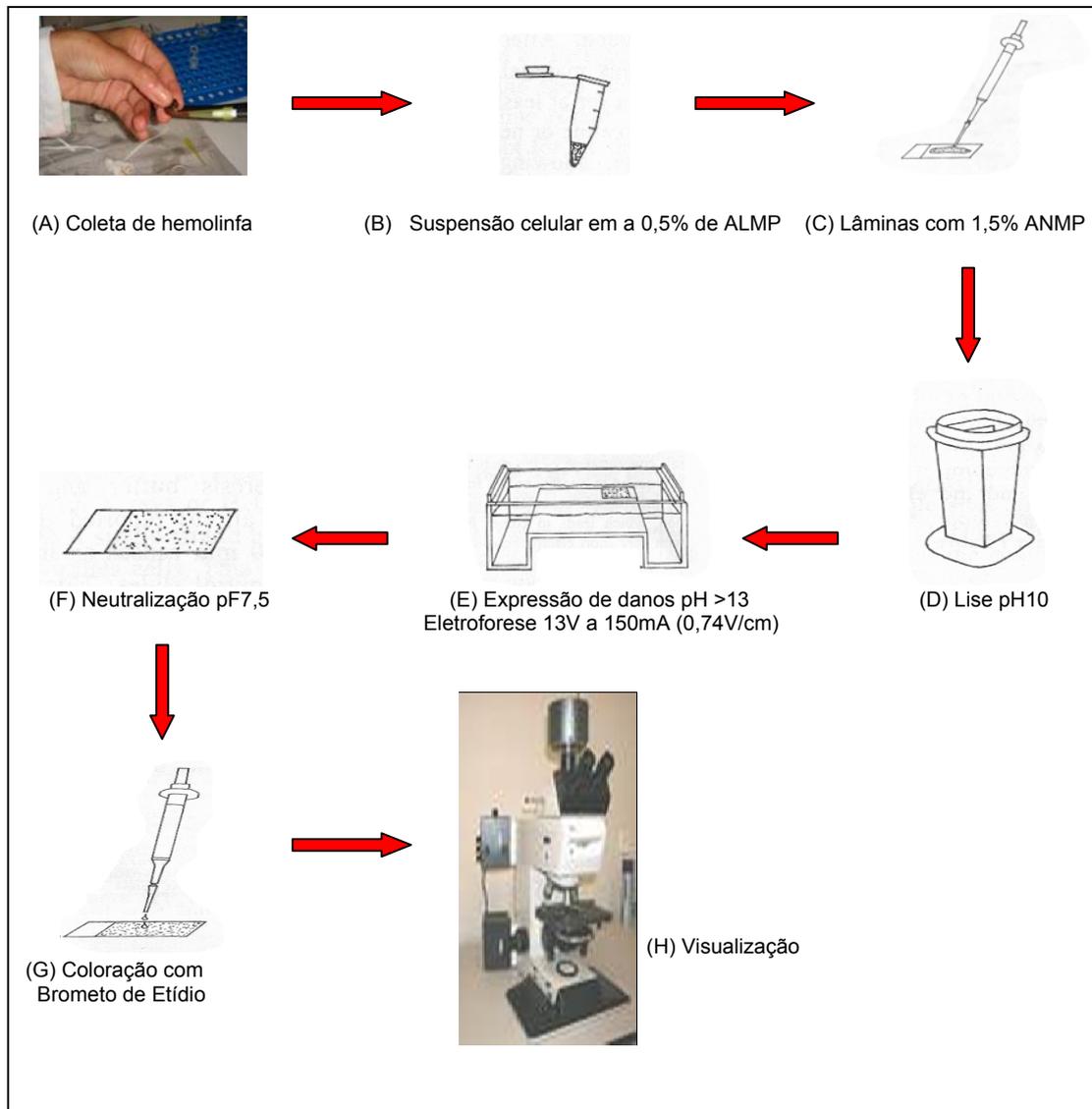
Foi realizada análise visual e a contagem de células foi feita nos quadrantes externos da câmara de Neubauer, sendo considerado o mínimo de 100 células por animal. As células que não incorporaram o corante correspondem às células vivas, e as coradas em azul, às mortas.

### 3.6 DESCARTE DOS MATERIAIS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Após o experimento, os caramujos do grupo controle foram mantidos em aquários estoques. Já, os caramujos que sobreviveram à exposição à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) foram sacrificados com álcool absoluto e descartados no lixo hospitalar.

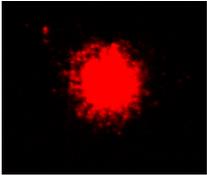
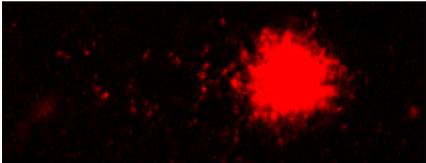
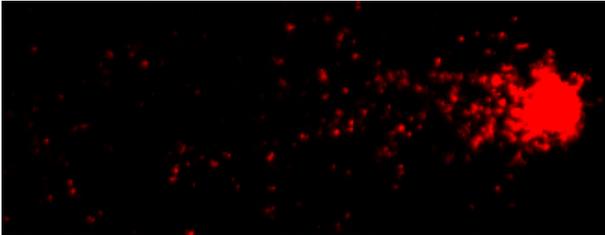
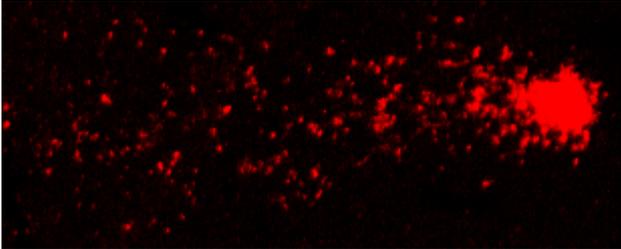
Todos os experimentos foram realizados no IPEN e o mesmo já possui tratamento de esgoto prévio, portanto, as soluções dos experimentos foram descartadas no próprio IPEN. As lamínulas usadas para a análise do teste foram descartadas no lixo para materiais perfuro-cortantes.

Figura 6: Esquema representativo do procedimento experimental para o teste do cometa.



Legenda: (A) Após a exposição, a hemolinfa é coletada; (B) A hemolinfa é suspensa em 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão; (C) A mistura da hemolinfa com agarose LMP é colocada na lâmina de microscopia previamente montada com uma camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%; (D) As lâminas são colocadas na solução de lise pH10 por 600 minutos; (E) Após a lise, a cuba de eletroforese é preenchida com as lâminas e cobertas com o tampão de eletroforese para que ocorra a expressão de danos. As lâminas ficam em repouso no tampão por 30 minutos e, em seguida é realizada a corrida em 23V a 150mA durante 30 minutos; (F) Após a corrida, as células são neutralizadas com tampão de pH 7,5; (G) Em seguida, as células são coradas com Brometo de etídio a 0,002%; (F) E visualizadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40 vezes.

Tabela 2: Categorias de Cometas segundo a migração do DNA

Imagem do DNA danificado	Migração do DNA	Categoria do dano
	Sem (não tem cauda)	0
	Pouca	1
	Intermediária	2
	Muita	3

## 4 RESULTADOS

O teste do cometa foi padronizado em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

O tempo necessário para lisar os hemócitos foi de 600 minutos. A voltagem e amperagem utilizada foram de 0,74 V/cm a 150 mA permitindo que nestas condições fosse obtido a migração de DNA com evidente relação dose-resposta ( $^{60}\text{Co}$ ).

A análise de citotoxicidade com o teste do azul de tripan provou que as doses da radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) utilizadas no teste do cometa não foram citotóxicas para os hemócitos.

### 4.1 AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EM SOLUÇÃO DE LISE.

Os hemócitos de *B. glabrata* foram submetidos à lise por 0, 5, 30 60, 120 e 600 minutos. Foram considerados 2 grupos de hemócitos: não lisado, ou seja, sem o rompimento da membrana nuclear e lisado, com o rompimento da membrana (figuras 7 e 8).

Os períodos de 0, 5, 30, 60 e 120 minutos não foram suficientes para a lise dos hemócitos de *B. glabrata*, que só foi atingida com mínimo de 600 minutos.

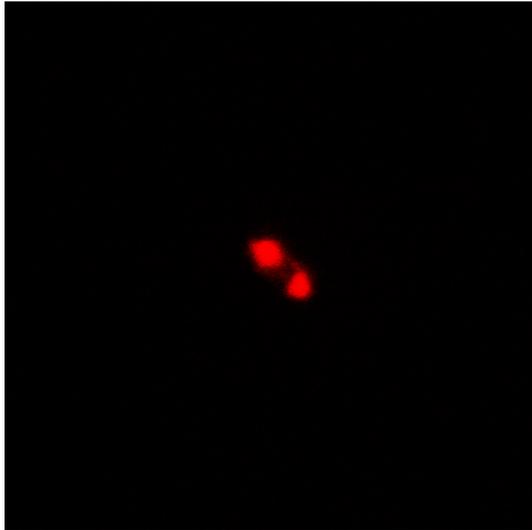


Figura 7: Hemócito não lisado



Figura 8: Hemócito lisado

#### 4.2 RADIAÇÃO IONIZANTE GAMA ( $^{60}\text{Co}$ )

Os dados sobre os danos induzidos pela radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) em caramujos *B. glabrata* estão apresentados nas tabela 3 e figura 9.

Os animais irradiados mostraram um aumento na migração do DNA não proporcional ao aumento da dose. Considerando as 4 diferentes classes de dano no DNA, o teste do chi-quadrado mostrou uma diferença altamente significativa entre os grupos de doses 2,5 e 20 Gy ( $p < ,0001$ ; chi-quadrado = 1534 com 12 graus de liberdade). A partir da avaliação de cada classe de dano separadamente, observou-se uma forte relação de dose-resposta nas classes 0 e 3.

Tabela 3: Danos no DNA de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) detectados pelo Teste do Cometa.

Doses (Gy)	Número de Células	Categoria de dano no DNA (%)			
		0	1	2	3
0	1100	654 (59)	125 (11)	72 (7)	249 (23)
2,5	900	442 (49)	178 (20)	105 (12)	175 (19)
5	900	197(22)	253 (28)	173 (19)	277 (31)
10	1000	159 (16)	296 (30)	264 (26)	281 (28)
20	900	58 ( 6)	49 (5)	133 (15)	660 (73)

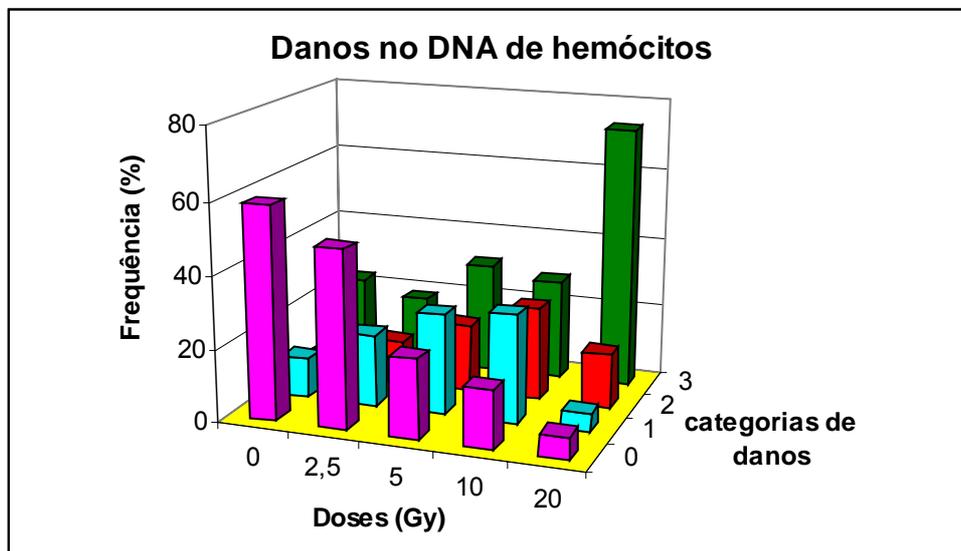


Figura 9: Teste do cometa em indivíduos adultos de *Biomphalaria glabrata*

#### 4.3 TESTE DO AZUL DE TRIPAN.

Os resultados do teste do azul de tripan em espécimes de *B. glabrata* expostos à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) revelaram 90% de viabilidade dos hemócitos em todos os grupos (Figura 10 e tabela 4).

Tabela 4: Teste do azul de tripan realizado em hemócitos de *B. glabrata*:  
 Frequência absoluta e relativa de células viáveis e não viáveis.

<b>Grupo</b>	<b>Células viáveis (%)</b>	<b>Células não viáveis (%)</b>	<b>Total</b>
<b>Controle</b>	1086 (98)	25 (2)	1111
<b>2,5 Gy</b>	987 (97)	26 (3)	1013
<b>20 Gy</b>	1034 (97)	28 (3)	1062

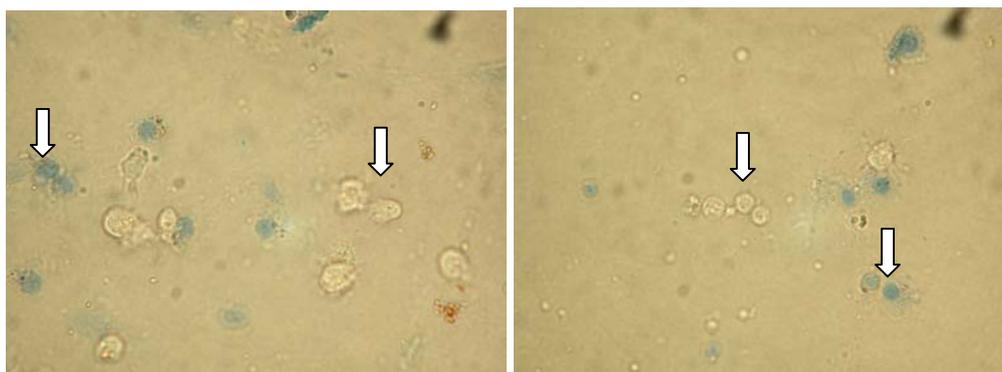


Figura 10: Hemócitos corados com azul de tripan: células que não absorveram o corante correspondem aos hemócitos viáveis e as coradas em azul, aos hemócitos não viáveis.

## 5 DISCUSSÃO

Foram realizados experimentos in vivo para avaliar as variações das etapas do protocolo, a fim de estabelecer parâmetros adequados à aplicação do ensaio cometa nos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

O uso dos hemócitos de *B. glabrata* no teste do cometa necessita um pequeno volume de amostra, obtido por método não-invasivo: realizou-se um estímulo pedal, para o animal liberar a hemolina através do poro hemal. Nacci e colaboradores (1996) destacam em seus estudos, que técnicas como esta não comprometem a sobrevivência do animal, permitem que sejam coletadas diversas amostras e possibilitam monitorar as modificações no DNA e demais efeitos simultâneos.

Uma vez determinada a técnica de extração de hemolinfa foi avaliado o período de incubação em solução de lise. O período de lise corresponde ao tempo necessário para a ruptura das membranas celulares. A solução de lise é constituída por detergentes e altas concentrações de sais; o detergente é responsável pelo rompimento das membranas celulares, enquanto que, as altas concentrações de sais extraem as proteínas nucleares incluindo a maioria das histonas, liberando o DNA na forma de alças superenoveladas aderidas à matriz nuclear (Cook e Brazell, 1976; Olive e Banath, 1995; Razin et al., 1995; Eriksson et al., 2002).

Segundo Singh e colaboradores (1988), o tempo de lise pode variar de acordo com o tipo de célula. Em hemócitos, este tempo pode variar de acordo com o organismo utilizado e da reação celular. Existem trabalhos em que foram utilizados os tempos de 60 minutos (Rank e Jensen, 2003; Rank et al, 2005; Hagger et al., 2005), 120 minutos (Pavlica et al., 2001; Klobucar et al, 2003) e outros, com 600 minutos (Buschini et al., 2003; Bolognesi et al., 2004).

Neste trabalho, os tempos de lise testados para a padronização do ensaio foram de 5, 30, 60, 120 e 600 minutos. Pela análise visual pode-se observar que nos tempos 5, 30, 60 e 120 minutos as células apresentaram o mesmo aspecto que o grupo controle, ou seja, esféricas e com limites bem

definidos, sugerindo a integridade da membrana nuclear (figura 7). Já no tempo de 600 minutos as células não apresentaram formato esférico, nem limites definidos, sugerindo ruptura da membrana (figura 8). O tempo de 600 minutos foi escolhido com base no estudo de Bolognesi e colaboradores (2004) com *Dreissena polymorpha*.

As condições de eletroforese foram determinadas em experimentos preliminares. Segundo Hartmann e colaboradores (2003), a voltagem a ser utilizada pode variar entre 0,7-1 V/cm e a amperagem em aproximadamente 300 mA, desde que estes parâmetros resultem em controles com pouquíssima ou nenhuma migração do DNA, pois, em voltagens muito altas as medidas de migração de DNA por quebras de fita simples ou dupla podem ser equivocadas. Em voltagens muito altas, toda a molécula de DNA, e não apenas o DNA quebrado, migraria para além do núcleo (Singh e Stephens, 1997). Resultados satisfatórios foram obtidos com 0,74 V/cm a 150 mA. Foi observada pouca ou nenhuma migração do DNA nos grupos controles, e nos grupos expostos à radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ), a migração variou entre pouca, média e muita, conforme a dose de radiação.

A radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) foi empregada como agente mutagênico de referência, pois seus efeitos genéticos em diferentes sistemas biológicos são bem conhecidos e tem sido utilizada em diversos trabalhos (Okazaki et al., 1991; Morales-Ramirez et al., 1994; Morales-Ramirez et al., 1997; Tallarico et al., 2004).

Por ser um agente físico, a interação da radiação ionizante com a matéria viva se traduz pela transferência de energia da radiação para o meio irradiado. Portanto, a radiação não sofre interferências de fatores farmacocinéticos, pois não precisa ser absorvida, distribuída e ou biotransformada pelo organismo como ocorre com os agentes químicos. (IAEA, 2001; Morales-Ramirez et al., 1997).

Devido a essas características, a radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) foi escolhida para ser utilizada neste estudo, pois para o uso de um agente químico, fatores farmacocinéticos teriam que ser levados em consideração. Isto

poderia dificultar a padronização do ensaio, uma vez que existem poucos dados na literatura sobre o metabolismo de xenobióticos em *B. glabrata*.

Experimentos preliminares (dados não mostrados) foram realizados para determinar as doses da radiação. Inicialmente foram testadas as doses de 12,5, 25, 50 e 100 Gy, e foi elaborado um guia de análise visual baseado no trabalho de Jalosznski e colaboradores (1997). Os dados mostraram o efeito da radiação gamma  $^{60}\text{Co}$  sobre os hemócitos de *B. glabrata* nas doses 12,5 e 25 Gy. As doses de 50 e 100 Gy revelaram letalidade; para os animais que sobreviveram não foi possível realizar a análise, pois o número de células encontradas foi abaixo de 50 por animal. Esses resultados sugerem que nas doses de 50 e 100 Gy: (a) a frequência de células extremamente danificadas foi muito alta, então os fragmentos de DNA teriam migrado para fora do gel durante a eletroforese, resultando num número pequeno de cometas por lâmina (Vasquez & Tice, 1997); (b) observou-se que o estresse provocado pela radiação poderia ter dificultado a liberação de hemolinfa, impedindo a obtenção de um número suficiente de hemócitos para a análise.

As análises visual e computadorizada são os métodos utilizados para quantificar a migração do DNA. Embora a análise computadorizada seja mais recomendada por medir a taxa de fluorescência nos cometas, a análise visual mostrou ser um método mais rápido e de menor custo (Tice et al., 2000).

Os animais irradiados com doses de 2,5, 5, 10 e 20 Gy apresentaram danos ao DNA com evidente efeito dose-resposta. Os efeitos da exposição dos caramujos à radiação foram detectáveis mesmo em baixas doses, estando de acordo com as recomendações dos protocolos internacionais (Tice et al., 2000).

A alta variabilidade interindividual foi observada entre as frequências de cometas em todos os grupos. Na tabela 5 encontram-se dados sobre as frequências relativa e absoluta de dano. Esses dados indicam uma alta frequência de danos em todos os grupos experimentais, inclusive no controle.

Alguns autores relatam em seus estudos que os invertebrados marinhos apresentam níveis de dano basal mais elevado do que os vertebrados (Mitchelmore et al., 1998). No entanto, quando se trata de organismos marinhos e de água doce deve-se levar em consideração que existem diferenças entre as espécies e o habitat. Muitos autores atribuem as possíveis causas para o alto nível basal, tais como, temperatura, sexo, idade, local, período de coleta, tempo de manutenção em cativeiro e a técnica experimental (Wilson et al., 1998; Buschini et al., 2003; Akcha et al., 2004; Machella et al., 2006). Esses fatores são de grande importância para o monitoramento in situ, porém, neste estudo, os fatores que poderiam influenciar são o tempo de manutenção em cativeiro e a técnica experimental, pois os demais são controlados em laboratório.

Machella e colaboradores (2006) realizaram um estudo sobre a influência do protocolo do cometa na detecção de dano basal no DNA em *Mytillus galloprovincialis*, *Helix aspersa* (caramujo terrestre) e *Dicentrarchus labrax* (peixe). Os resultados mostraram que as alterações do protocolo influenciaram na frequência de dano basal no DNA, principalmente para *Mytillus galloprovincialis*, que apresentou níveis mais altos em relação aos outros organismos. Em comparação com *B. glabrata*, embora os níveis de danos não tenham sido estabelecidos, tecnicamente a alta variabilidade interindividual poderia ser atribuída à padronização do ensaio. Apesar disso, foi possível observar um efeito dose-resposta com a radiação, conforme as recomendações do Tice e colaboradores (2000).

Nos caramujos irradiados, também foi observado um aumento na frequência de cometas com cabeças bem pequenas ou inexistentes e uma longa e difusa cauda (dados não mostrados), usualmente classificados como células mortas (Hartmann et al., 2003). Eles foram excluídos da análise para não gerar um resultado falso positivo (Meintieres et al., 2003; Collins et al., 2008). Esses cometas já foram observados em experimentos in vitro, quando tratados com agentes citotóxicos (induzem morte celular) e não genotóxicos, sendo denominadas células mortas (Hartmann e Speit, 1997; Henderson et al., 1998). Entretanto, esses cometas também foram

observados quando expostos a altas doses de radiação ou a mutagênicos potentes, indicando que estas células não sejam exclusivamente células mortas (Hartmann et al., 2003).

Segundo Hartmann e colaboradores (2003), ainda não está claro se o aumento da fragmentação devido à morte celular poderia gerar um resultado falso positivo no teste do cometa. Os fragmentos de células mortas resultantes de quebras na fita dupla do DNA apresentam um peso molecular muito baixo, podendo migrar para fora do gel e se perder durante a eletroforese, logo, a proporção dessas células poderia ser subestimada (Vasquez e Tice, 1997).

Para uma interpretação correta dos dados do teste do cometa e evitar um resultado falso positivo é recomendada uma avaliação concomitante de citotoxicidade. Os métodos citados pelos protocolos internacionais são difusão do DNA e o teste de exclusão de corantes (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003).

Para confirmar que as doses da radiação utilizadas foram abaixo dos níveis citotóxicos, lâminas adicionais foram processadas para a análise de difusão do DNA no gel de agarose de baixo ponto de fusão. Nesse método, omitiu-se a eletroforese submetendo as células somente à lise. Em alguns protocolos, as células também são tratadas no tampão alcalino após a lise, em seguida é observada a difusão dos fragmentos de DNA. Em caso de quebras no DNA, os fragmentos se difundiriam no gel formando um halo (Vasquez e Tice, 1997; Godard et al., 1999). Em nosso estudo foi utilizado pH 10.1 e não foi possível distinguir as células com ou sem halo, além disso, foi observado a frequência alta de células com halo no grupo controle (dados não mostrados). Isso poderia ser atribuído à concentração da agarose de baixo ponto de fusão. Sestili e colaboradores (2006), no teste do halo, que é um teste similar ao cometa, suspenderam células humanas promonocíticas U 937 em 2 % de agarose de baixo ponto de fusão, e, em seus resultados diferenciaram-se claramente as células com e sem halos. Já, neste estudo, os hemócitos de *B. glabrata* foram suspensos em 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão, resultando em células com muita difusão do DNA e

sugerindo um resultado falso-positivo. Além disso, com a concentração de 0,5 % de agarose, os limites das células não danificadas não estavam bem delimitados (figuras 11 e 12), como nas células promonocíticas. Portanto, o método de difusão do DNA mostrou-se pouco sensível para avaliar citotoxicidade em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

De acordo com os protocolos internacionais, o teste de exclusão de corantes, como o azul de tripan, é considerado um bom método para avaliar citotoxicidade. Esse teste avalia a integridade da membrana celular, que está comprometida nas células em processo de morte celular (Hartmann et al., 2003). Considerando os resultados inconclusivos para morte celular com o método de difusão do DNA, foi realizado o teste de exclusão do azul de tripan. Os resultados obtidos revelaram que as doses 2,5 e 20 Gy de radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) não foram citotóxicas. Sendo assim, a presença de células sem cabeça no teste do cometa pode ser atribuída a outros fatores que não a citotoxicidade.

Diante dos resultados obtidos com o teste do azul de tripan, as respostas positivas com a radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) demonstraram um efeito genotóxico sobre os hemócitos, mostrando que o teste do cometa foi uma ferramenta simples e sensível capaz de detectar os danos no DNA dos hemócitos de *B. glabrata* induzidos pela radiação gamma  $^{60}\text{Co}$ . Além da radiação, estudos preliminares foram realizados com o agente mutagênico indireto ciclofosfamida (Grazeffe et al, 2007) e o corante têxtil Remazol Preto B (Garcia et al., 2008) serviram para a validação do nosso sistema para monitorar poluentes mutagênicos ambientais.

Para estudos futuros sugere-se: (a) avaliar o potencial genotóxico em amostras de ambientes aquáticos poluídos; (b) como o teste do cometa pode ser realizado em qualquer tipo de célula, pode-se avaliar mutagenicidade em espermatozoides e seus efeitos sobre a reprodução; (c) realizar tratamentos enzimáticos para detectar reparo ou lesões específicas no DNA dos hemócitos.

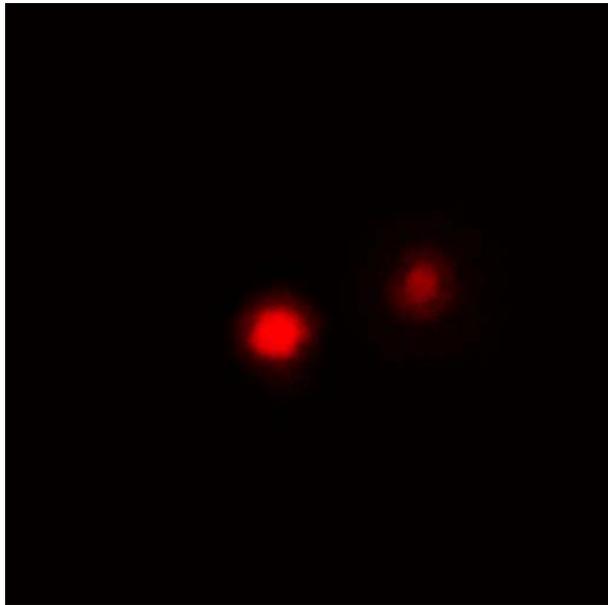


Figura 11: Hemócito sem dano (sem halo)

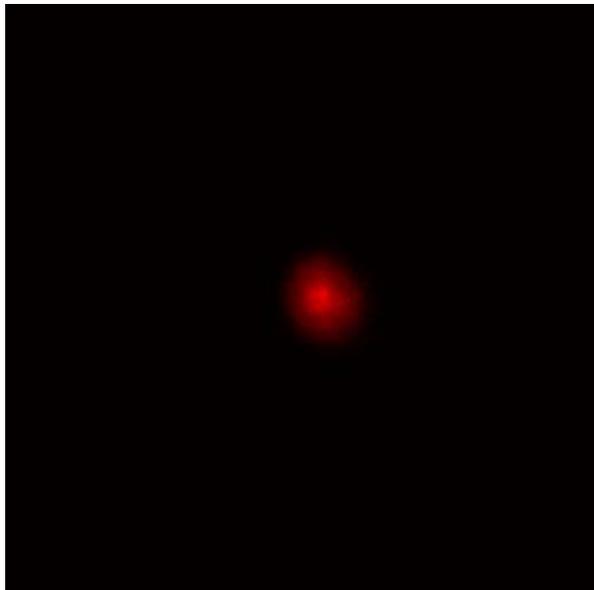


Figura 12: Hemócito danificado (com halo)

## 6 CONCLUSÕES

1. Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* mostraram ser bons organismos para o teste do cometa.
2. *Biomphalaria glabrata* pode fornecer hemolinfa para procedimentos experimentais por meio de estímulo pedal, possibilitando a realização de estudos que requeiram repetidas obtenções de amostras de hemolinfa de um mesmo animal.
3. A análise visual em nosso estudo demonstrou ser efetiva na detecção de dano ao DNA.
4. Os efeitos da radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) foram claramente detectáveis por meio do teste do cometa indicando alta sensibilidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd-Allah GA, El-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA, O'Neill KL. A comparative evaluation of aflatoxin  $\beta$ 1 genotoxicity in fish the models using the comet assay. *Mutat. Res.* 1999; v.446: p.181-188.

Akcha F, Leday G, Pfohl-Leszkowicz A. Measurement of DNA adduct and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat. Res.* 2004; v.552:p.197-207.

Agresti A. *Categorical Data Analysis*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.

Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1975; v.31: p.347-364.

Anderson S, Sadinski W, Shugart L, Brussard P, Depledge M, Ford T, Hose J, Stegeman J, Suk W, Wirgin I, Wogan G. Genetic and Molecular Ecotoxicology: A Research Framework. *Environ. Health. Perspect.* 1994; v.102: p.3-8.

Anderson SL, Wild GC. Linking Genotoxic Responses and Reproductive Success in Ecotoxicology, *Environ. Health. Perspect.* 1994; v.102: p.9-12.

Baker FC. *The molluscan family Planorbidae*. University of Illinois Press, Urbana; 1945.

Barbosa FS, Dobbin JJE. Resistência de *Australorbis glabratus* à dessecação em condições naturais. *Publ. Avulsas. Inst. Aggeu Magalhães.* 1952; v.1: p.145-148.

Barnes RTD. The Mollusk. In: Zoology invertebrate. 4ed. São Paulo: Livraria Rocca; 1990. p.277-278.

Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch –Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res.* 1998; v.415: p.167-184.

Betti C, Nigro M. The comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in cetaceans: preliminary results on the genotoxic effects of methyl-mercury on the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) lymphocytes in vitro. *Mar. Pollut. Bull.* 1996; v.32; p.545-548.

Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, Monteverde M, Poli P, Rossi C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Total Environ.* 2004; v.333: p.127-136.

Brunetti R, Gabriele M, Valerio P, Fumagalli O. The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1992; v.83: p.71-74.

Brunetti R, Majone F, Gola I, Beltrame C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998; v.44: p.65-68.

Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat. Res.* 2003; v.537: p.81-92.

Camey T, Verdonk NH. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Neth J. Zool.* 1969; v.20: p. 93-121.

Carvalho HC. Fatores Evolutivos I e II: Seleções, Mutações e Migrações. In: Fundamentos de Genética e Evolução. 3ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu; 1987. p.431-466.

Carvalho HC. Mutação. In: Fundamentos de Genética e Evolução. 3ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu; 1987. p.361-382.

Carvalho OS. Intermediate hosts of *Shistosoma mansoni* in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; v.87: p.307-309.

Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo; 1990. p.17.

Cheng TC, Auld KR. Hemocytes of the Pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*. J.Invertebr. Pathol. 1977; v.30: p.119-122.

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutat. Res. 1998; v.410: p.237-243.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. Mutagenesis. 2008; v.23: p.143-151.

Cook PR, Brazell IA. Conformational constraints in nuclear DNA. J. Cell. Sci., 1976; v.22: p.287-306.

Coutinho AB, Gouvêa L, Lucgna D. Investigações em torno da epidemiologia da esquistossomose mansônica em Pontezinha e Vitória, Estado de Pernambuco, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1940; v.35: p. 207-230.

Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAmp) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Mar. Environ. Res. 2003; v.56: p.443-470.

DeBoeck M, Kirsch-Volders M. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment. Environ. Mol. Mutagen. 1997; v.30: p.82-90.

Depledge MH. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. Mutat. Res. 1998; v.399: p.109-122.

Devaux A, Pesonen M, Monod G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicol in Vitro. 1997; v.11: p.71-73.

Deventer K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. Bull Environ Contam Toxicol. 1996; v.56: p.911-918.

Doust JL, Schmidt M, Doust LL. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1994; v.69: p. 147-186.

Erbes M, Wessler A, Obst U, Wild A. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. Environ. Mol. Mutagen. 1997; v.30: p.448-458.

Eriksson S, Nygren J, Ahnstron G. Matrix association of early-and-late replicating chromatin studied by single cell electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta. 2002; v.1590: p.103-108.

Estevam CE, Nakano E, Kawano T, de Bragança CA, Amancio FF, de Albuquerque AM. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. *Mutat. Res.* 2006; v.611: p.83-88.

Gabriele M, Brunetti R, Majone F. The micronucleus test in cultured mammalian cells and in *Mytilus* gill tissue. *ATLA.* 1992; v.20: p.103-107.

Garcia VSG, Pinheiro AS, Tallarico LF, Grazeffe V, Miyasato PA, Okazaki K, Kawano T, Nakano E. Genotoxicity of textile dye Remazol Black B after vinylization in snail *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) determined by alkaline comet assay. In: 10<sup>a</sup> Reunião Científica do Instituto Butantan; 2008 dez.; São Paulo. Brasil: Instituto Butantan; 2008.

Gichner T, Plewa MJ. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat. Res.* 1998; v.401: p.143-152.

Godard T, Deslandes E, Lebailly P, Vigreux C, Poulain L, Sichel F, Poul JM, Gauduchon P. Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. *Cytometric.*1999: v.36: p.117-122.

Grazeffe V, Garcia VSG, Schimidt BF, Okazaki K, Kawano T, Pereira CAB, Nakano E. Establishment of the comet assay in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). In: 9<sup>a</sup> Reunião Científica do Instituto Butantan; 2007 dez.; São Paulo. Brasil: Instituto Butantan; 2007.

Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 2005; v.51: p.811-816.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Work Shop. *Mutagenesis*. 2003; v.18: p.45-51.

Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 1997; v.90: p.183-188.

Henderson L, Wofreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*. 1998; v.13: p.89-94.

International Atomic Energy Agency. Technical Report Series. Cytogenetics analysis for radiation dose assessment: a manual. IAEA. Vienna, n. 405, 2001.

Izquierdo JI, Machado G, Ayllon F, d'Amico VL, Bala LO, Vallarino E, Elias R, Garcia-Vazquez EV. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003; v.55: p.24-29.

Jansen G. Sobre a validade do *Australorbis centimentralis* (Lutz, 1918). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1944; v.40: p.201-209.

Jeong KH, Lie KJ, Heyneman D. The Ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 1983; v.7: p.217-228.

Jha AN, Cheung VV, Foulkes ME, Hill SJ, Deplege MH. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an

integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.* 2000; v.464: p.213-228.

Jha AN. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. *Mutat. Res.* 1998; v.399: p.01-2.

Kawano T, Chaves WR, Simões LCG. Effects of caffeine on embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Ciência e Cultura.* 1979; v. 31: p.1266-1273.

Kawano T, Simões LCG. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Rev. Brasil. Biol.* 1986; v.46: p.555-562.

Kawano T, Simões LCG, Marques J. *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): efeitos morfogenéticos do sulfato de nicotina. *Rev. Brasil. Biol.* 1992; v.53: p.539-547.

Kawano T, Okazaki K, Ré L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. *Malacologia.* 1992; v.34: p.25-32.

Kawazoe U. Alguns aspectos da Biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II – Fecundidade e Fertilidade. *Rev. Saúde Pública.* 1977; v.11: p.47-64.

Kim IY, Hyun C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2006; v.64: p.288-297.

Klobucar GI, Pavlica M, Erben R, Papes D. Application of the micronucleus and comet assay to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for

genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 2003; v.64: p.15-23.

Koppen G, Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cell: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Res.* 1996; v.360: p.193-200.

Lee RF, Steinert S, Nakayama K, Oshima Y. Use of DNA strand breaks (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. Sapidus*) embryos, 1999. In: Henshel D, Black M, Harrass M. Environmental toxicology and risk assessment: standardization of biomarkers for endocrine disruption and environmental assessment. Philadelphia: American Society for testing and materials; 1999. p.341-949.

Lee RF, Kim GB, Maruya KA, Steinert S, Oshima Y. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. *Mar. Environ. Res.* 2000; v.50: p.553-557.

López-Barea J, Pueyo C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.* 1998; v.399: p.3-15.

Machella N, Battino M, Pisanelli B, Regoli F. Influence of the SCGE Protocol on the amount of Basal DNA Damage Detected in the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006; v. 47: p.579-586.

Mackelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo, MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 1993; v.288: p.47-63.

Malek EA. Snail hosts of *Shistosoma mansoni* and others snails transmitted diseases in tropical America: A manual morphology. Pan America Health Organization, 1985.

Meintieres S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D. Detection of Ghost Cells in the Standard Alkaline Comet Assay is not a Good Measure of Apoptosis. Environ. Mol. Mutagen. 2003; v.41: p.260-269.

Mersch J, Beauvais MN, Nagel P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. 1996; v.371: p.47-55.

Mitchelmore CL, Birmelin C, Livingstone DR, Chipman JK. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*M.edulis L.*) digestive gland cells using the "comet assay". Ecotoxicol. Environ. Saf.1998; v.41: p.51-58.

Mitchelmore CL, Chipman JK. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo Trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. Aquat. Toxicol. 1998; v.41: p.161-182.

Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat. Res. 1998; v.399: p.135-147.

Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Anguiano-Orozco G, Rodríguez-Reyes R. Pharmacokinetic parameters of genotoxic activity inferred from the comparison of the kinetics of MN-PCE induced by chemical agents ionizing radiation. Mutat. Res. 1997; v.391: p.127-134.

Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Mercader-Martínez J, Rodríguez-Reyes R. Induction of micronuclei by acute and chronic exposure in vivo to

gamma rays in murine polychromatic erythrocytes. *Mutat. Res.* 1994; v.341: p.47-55.

Morgan JAT, Dejong RJ, Snyder SD, Mkoji GM, Locker ES. *Shistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology.* 2001; v.123: p.211-228.

Munzinger A. *Biomphalaria glabrata* (SAY), a suitable organism for a biotest. *Environmental Technology Letters.* 1987; v.8: p.141-148.

Nacci DE, Cayula S, Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 1996; v.35: p.197-210.

Nakano E, Watanabe LC, Ohweiler FP, Pereira CA, Kawano T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat. Res.* 2003; v.536: p.145-154.

Nigro M, Frenzilli G, Scarcelli V, Gorbi S, Regoli F. Induction of DNA Strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.* 2002; v.54: p.517-520.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 2004; v.567: p.109-149.

Okazaki K, Kawano T. Cytogenetic effects of <sup>60</sup>Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. *Caryologia.* 1991; v.44: p. 121-136.

Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; v.82: p.779-783.

Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiat. Res.* 1990; v.122: p.86-94.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; v.123: p.291-298.

Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.* 1995; v.26: p.345-356.

Paraense WL. Planorbídeos Hospedeiros Intermediários de *Shistosoma mansoni*. In: *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo; 1970. p.13-30.

Parry EM, Parry JM. In vitro cytogenetics and aneuploid. In: *Environmental Mutagenesis*. UK: Bios Scientific Publishers; 1995. p.406.

Pavlica M, Klobucar GIV, Mojas N, Erben R, Papes D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.* 2001; v.490: p.209-214.

Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. 2000; v.15: p.289-302.

Pimentel D. Life history of *Austrolorbis glabratus*, the intermediate snails host of *Shistosoma mansoni* in Puerto Rico. *Ecology*. 1957; v.38: p.576-580.

Ralph S, Petras M, Pandrangi R, Vrzoc M. Alkaline Single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. Environ. Mol. Mutagen. 1996; v.28: p.112-120.

Rank J, Jensen K. Comet assay on gill cell and hemocytes from the blue mussel *Mytillus edulis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2003; v.54: p.323-329.

Rank J, Jensen K, Jespersen PH. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytillus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. Mutat. Res. 2005; v.585: p.33-42.

Razin SV, Gromovoa II, Iarovaia OV. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. International Review of cytology. 1995; v.162B: p.405-448.

Ré L, Kawano T. Effects of *Laurus nobilis* (Lauraceae) on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; v.82: p.315-320.

Rey L. Contribuição para o comportamento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores de esquistossomose. Rio de Janeiro. Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1957.

Ritchie LS, Hernandez A, Amador RR. Biological Potentials of *Australorbis glabratus*: Life Span and Reproduction. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1966; v.15: p.614-617.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl. 1999; v.722: p.225-254.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cell. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds). DNA Repair Mechanisms. New York: Academic Press; 1978. p.465-468.

Sasaki F, Izumiyama F, Nishidate E, Ishibashi S, Tsuda S, Matsusaka N, Asano N, Saotome K, Sofun T, Hayashi M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell electrophoresis (SCA) assay : a preliminary study. *Mutat. Res.* 1997; v.393: p.133-139.

Sastre M, Steinert S, Streib-Montee R. Single cell gel/comet assay applied to the analysis of pollution-induced damage in the mud elk *Nassarius regula* and the ribbed mussel *Musculita senhousia*. In: Abstract of the 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola, FL; 1997. p.77.

Scarpato R, Migliore L, Barale, R. The micronucleus test assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutat. Res.* 1990; v.245: p.231-237.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975; v.31: p.9-15.

Sestili P, Martinelli C, Stocchi V. The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. *Mutat. Res.* 2006; v.607: p.205-214.

Shugart LR, MacCarthy JF, Halbrook, RS. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal.* 1992; v.12: p.353-360.

Silva J, Fonseca MB. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana: Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance; 2003. p.70-84.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider, EL.; A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988; v.175: p.184-191.

Singh NP, Stephens RE. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res. DNA Repair.* 1997; v.383: p.167-175.

Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 1999; v.113: p.203-212.

Steinert SA. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar. Environ. Res.* 1996; v.42: p.253-259.

Taban IC, Bechmann RK, Torgrimsen S, Baussant T, Sanni S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Mar. Environ. Res.* 2004; v.58: p.701-705.

Taddei F, Scarcelli V, Frenzilli G, Nigro M. Genotoxic hazard of pollutants in cetaceans: DNA damage and repair evaluated in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by the comet assay. *Mar. Pollut. Bull.* 2001; v.42: p.324-328.

Takahashi CS. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA; 2003. p.151-168.

Tallarico LF, Okazaki K, Kawano T, Pereira CAB, Nakano E. Dominant lethal effect test of <sup>60</sup>Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat. Res.* 2004; v.561: p. 139-145.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; v.35: p. 206-221.

Umbuzeiro GA, Varga VMF. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ED. ULBRA; 2003. p.81-112.

Vasquez M, Tice RR. Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay. *Environ Mol Mutagen.* 1997; v.29, p.53.

Verschaeve L, Gilles J. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1995; v.54: p.112-119.

Wagge LE. Amoebocytes. *International Review of Cytology.* 1955; v.4: p.31-78.

White PA e Rasmussen JB. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 1998; v.410: p.223-236.

Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.* 1998; v.399: p.87-95.

Wolff S, Bodycote J, Painter RB, Sister chromatid exchanges induced by UV radiation at different stages of the cell cycle: the necessity of cells to pass through S. *Mutat. Res.* 1974; v.25: p.73-81.

Würgler FE, Kramers PGN. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*. 1992; v.7: p. 321-327.

Yamamoto MM, Kawano T, Young MCM, Chu EP, Haraguchi M, Hiroki K. Molluscicidal activity of three Brazilian plant species. *Fitoterapia*. 1996; v.57: p.59-62.

Zagatto PA, Bertoletti E. *Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações*. São Carlos: RIMA; 2006.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Modelo da tabela de análise Visual dos cometas

Data do experimento:

Data da análise

Código:		Código:		Código:		Código:	
nº	Classe	nº	Classe	nº	Classe	nº	Classe
1	26	1	26	1	26	1	26
2	27	2	27	2	27	2	27
3	28	3	28	3	28	3	28
4	29	4	29	4	29	4	29
5	30	5	30	5	30	5	30
6	31	6	31	6	31	6	31
7	32	7	32	7	32	7	32
8	33	8	33	8	33	8	33
9	34	9	34	9	34	9	34
10	35	10	35	10	35	10	35
11	36	11	36	11	36	11	36
12	37	12	37	12	37	12	37
13	38	13	38	13	38	13	38
14	39	14	39	14	39	14	39
15	40	15	40	15	40	15	40
16	41	16	41	16	41	16	41
17	42	17	42	17	42	17	42
18	43	18	43	18	43	18	43
19	44	19	44	19	44	19	44
20	45	20	45	20	45	20	45
21	46	21	46	21	46	21	46
22	47	22	47	22	47	22	47
23	48	23	48	23	48	23	48
24	49	24	49	24	49	24	49
25	50	25	50	25	50	25	50

Classe

- 0 células sem dano no DNA (cabeça grande e sem cauda)
- 1 células com pouca migração de DNA (cauda bem curta)
- 2 células com cabeça e cauda longa
- 3 células com cabeça bem pequena e uma longa e difusa cauda.

## ANEXO 2 – Artigo publicado