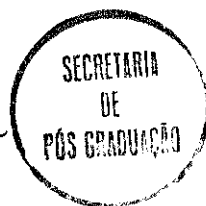


Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Vera Lúcia Correia Feitosa e aprovada pela Comissão Julgadora.



S. M. Recco-Pimentel 23/11/89

Vera Lúcia Corrêa Feitosa

**Alterações na estrutura cromossômica de  
*Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata*  
(Amphibia, Anura) provenientes do Morro  
do Ferro (MG), região com alta  
radioatividade natural**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Campinas  
1989

**Alterações na estrutura cromossômica de  
*Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata*  
(Amphibia, Anura) provenientes do Morro  
do Ferro (MG), região com alta  
radioatividade natural**

**“Todo começo é fácil. Difícil são os últimos degraus.”**

**Goethe**

**“Perseverar é um dos grandes segredos do êxito. Muitas coisas na vida dependem da continuidade, da perseverança que tudo alcança.”**

**Roque Schneider**

“Porque o Senhor dá a sabedoria para os retos, é escudo para os que caminham na sinceridade.

Guarda as veredas do juízo e conserva o caminho dos seus santos.

Então entenderás justiça, juízo e equidade, todas as boas veredas.

Porquanto a sabedoria entrará no teu coração, e o conhecimento será agradável a tua alma.

O bom siso te guardará e a inteligência te conservará.”

Provérbios de Salomão

À este Deus Maravilhoso, que pela infinita misericórdia me fez chegar ao fim da jornada em busca do conhecimento,

minha eterna Gratidão.

Aos meus pais,

Sra. Neuza Nunes Corrêa Feitosa e Sr. Manoel Mendes Feitosa, por terem proporcionado todas as condições para que eu chegasse até aqui, pela paciência de ajudar, sem perguntar porquê, pela minha formação moral, intelectual e profissional, dando-me carinho, dedicação, compreensão, muito amor e principalmente pelo *exemplo de vida*, meu especial agradecimento.

Para vocês Dedico este trabalho.

Ao meu irmão,

Carlos Alberto Corrêa Feitosa, pelo privilégio de poder chamá-lo de irmão e sobretudo pelo grande amor que nos une,

Ofereço.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel,

Orientadora deste trabalho,

Pela orientação científica, sem a qual não teria sido possível realizar esta tese, pelo carinho com que me recebeu e confiança em mim depositada, pela sua compreensão, pronta disposição à discussão e dedicação na transmissão dos conhecimentos sempre doados com muita paciência e amor. Pelas valiosas críticas e sugestões, que contribuíram de modo fundamental para o meu primeiro passo nos árduos e difíceis caminhos do mundo científico. Pelo incentivo, atenção, apoio, palavras de estímulo e carinho em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, e sobretudo pela nossa grande amizade, mútuo respeito e pelos bons momentos que desfrutamos nestes anos de convivência,

meu Sincero Agradecimento.

Aos meus familiares,

Pelo carinho e incentivo, apoio e inestimável amizade ao longo deste trabalho.

À memória de meu Avô,

Sr. Eliezer Silva Corrêa (Teté), pelo exemplo que foi de dedicação ao trabalho, honestidade e de amor à família.

Aos amados irmãos,

Das Igrejas Presbiteriana "Treze de Maio" (Aracaju, SE) e Presbiteriana de Nova Odessa (Nova Odessa, SP), pelas fervorosas orações, apoio, hospitalidade e amor que sempre dispensaram.

## Agradecimentos

De todas as redações para este trabalho considerei esta uma das mais difíceis, pela emoção em lembrar com carinho das pessoas que participaram durante estes anos da minha vida, e conseqüentemente deste trabalho e, em tentar agradecer a cada uma delas.

Estou especialmente grata a:

- Profa. Dra. Maria Luíza Silveira Mello, professora e coordenadora do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, pela transmissão segura e eficiente dos conhecimentos científicos, pelo seu laborioso desempenho na coordenação deste curso, pelas sugestões criteriosas deste trabalho durante a pré-Banca e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Adão José Cardoso, do Departamento de Zoologia da Unicamp, professor e amigo, pela colaboração na identificação do material e treinamento de campo para a coleta dos animais que permitiu em grande parte que este trabalho se realizasse e pelas valiosas sugestões dadas na pré-Banca.
- Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, do Departamento de Estatística da Unicamp, pela presteza com que realizou a análise estatística dos dados, em particular pela aceitação em participar da pré-Banca e sugestões que permitiram melhorar em muitos aspectos este trabalho.
- À Profa. Dra. Lúcia Furlan Wada, pela amizade, críticas e excelentes sugestões na leitura detalhada do manuscrito deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Jorge Jim, do Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas da UNESP de Botucatu, pelo



auxílio e fornecimento dos exemplares coletados em sua propriedade particular em Botucatu (SP).

- Ao Prof. Dr. Ângelo Luiz Cortellazzo, pelas discussões, sugestões que muito contribuíram para a elaboração da tese, pelo auxílio no uso do microcomputador, e amizade constante.
- À Profa. Dra. Carol H. Collins, do Departamento de Química Analítica da Unicamp, que gentilmente leu a parte da revisão da literatura referente a radiação, dando excelente contribuição.
- À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela amizade, sugestões e leitura do capítulo referente a "Conceitos Básicos Sobre Radiação".
- Ao Prof. Dr. Job Jesus Batista, do Departamento de Metalogênese e Geoquímica do Instituto de Geociências da Unicamp, pelos esclarecimentos referentes ao capítulo "Áreas com Alto Nível de Radioatividade Natural no Brasil" e preciosas sugestões.
- Ao Prof. Dr. Wilson da Silva Jardim, do Departamento de Química Analítica da Unicamp, e ao Sr. José Roberto Guimarães pelas análises das águas e sedimentos da lagoa e brejo do "Campus" desta Universidade, pelas sugestões e discussões.
- Ao Sr. Ariovaldo Antônio Gionetta, pela amizade e ajuda em muitas coletas de animais, como também agradeço a Luciano Mendes Castanho e José Perez Pombal Júnior, pelo auxílio prestado em parte do trabalho de campo.
- À Sra. Anna Gagliardi, Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia da Unicamp, pela colaboração valiosa na revisão das referências bibliográficas.

- Ao colega Hernandes Faustino Carvalho, pelo auxílio no uso do programa Energraph para a elaboração dos gráficos e pelas palavras de incentivo e amizade.
- À Srta. Carmen Sílvia Zickl e ao colega Marco Antônio Ferreira Randi, pelo auxílio prestado no uso do microcomputador e pela amizade.
- Ao Gilson Paulo Manfio, colega e amigo, pela eficiência no processamento do manuscrito ao microcomputador.
- À Sub-Comissão do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp pela concessão de Bolsa de Monitoria II.
- Ao Departamento de Biologia Celular, onde este trabalho foi realizado.
- Ao Governo do Estado de Sergipe, na pessoa do Dr. Antônio Carlos Valadares, pela autorização de afastamento de minhas funções no ensino de 2º Grau, durante todos estes anos.
- Ao Sr. Francisco Ângelo Mallatesta, pela amizade e ajuda técnica durante a realização da parte experimental deste trabalho.
- Aos Prof. Drs. Benedicto de Campos Vidal, Edson Rosa Pimentel e Mary Anne Heidi Dolder, pela atenção, palavras de carinho, estímulo e sobretudo pela amizade.
- Aos Professores do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, em especial a Profa. Dra. Maria Mendes Conceição e aos Profs. Drs. Francisco do Prado Reis e Arnaldo José Vasconcelos Palmeiras, pelos seus ensinamentos, apoio e incentivo durante a graduação e pela amizade constante.

- Aos queridos colegas e amigos Rosana de Souza A. Garcia, Maurício José L. V. do Amaral, José Antônio Novaes, Marly Magalhães Dantas, Sílvia Regina P. de Miranda, Sebastião Roberto Taboga e Helena Maura T. Silingardi, pelas críticas e sugestões, palavras de carinho e estímulo nos momentos mais difíceis, pela excelente convivência que tivemos e sobretudo pela amizade, que acredito, continuará existir.
- Aos Professores, demais colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular, e amigos, pelos ensinamentos transmitidos com muita dedicação, pela atenção que me dispensaram e o carinho com que sempre me trataram, pela amizade e apoio, auxílio técnico e pelos bons momentos que compartilhamos.
- À Srta. Marina M. Santos Filha, à colega Marly M. Dantas e ao casal Cecília e Marcos David Figueiredo de Carvalho, pessoas que moraram comigo durante o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e apoio emocional que deram.

Enfim, o meu muito obrigada a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão da Literatura</b>	<b>4</b>
2.1	Breve histórico da radiobiologia . . . X . . . . .	4
2.2	Conceitos básicos sobre radiação . . . X . . . . .	5
2.3	Unidades utilizadas no estudo das radiações . . . . .	8
2.4	Efeitos biológicos da radiação . . . X . . . . .	10
2.5	Áreas com alto nível de radioatividade natural no Brasil . . . . .	15
2.5.1	Morro do Ferro . . . . .	17
2.6	Efeitos biológicos da radiação natural elevada sobre os organismos . . . . . X . . . . .	21
2.7	Panorama geral referente aos anfíbios . . . . .	24
2.7.1	<i>Aplastodiscus perviridis</i> B. Lutz, 1950 . . . . .	26
2.7.2	<i>Hyla albopunctata</i> Spix, 1924. . . . .	27
2.8	Citogenética de Anuros . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>32</b>
3.1	Coletas . . . . .	32
3.2	Animais . . . . .	33

<b>4</b>	<b>Métodos</b>	<b>41</b>
4.1	Preparação do material . . . . .	41
4.2	Preparação das lâminas visando a obtenção de cromossomos metafásicos . . . . .	41
4.2.1	Por esmagamento de tecidos . . . . .	41
4.2.2	A partir da suspensão celular . . . . .	42
4.2.2.1	Do epitélio intestinal . . . . .	42
4.2.2.2	Dos órgãos tripsinizados . . . . .	42
4.2.2.3	Da medula óssea . . . . .	43
4.3	Colorações utilizadas . . . . .	44
4.3.1	Orceína lacto-acética . . . . .	44
4.3.2	Giemsa . . . . .	44
4.4	Exame do material . . . . .	45
4.5	Montagem dos cariótipos e análise morfométrica . . . . .	45
4.6	Análise estatística . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>48</b>
5.1	Cariótipos . . . . .	48
5.1.1	<i>H. albopunctata</i> . . . . .	48
5.1.2	<i>A. perviridis</i> . . . . .	48
5.2	Alterações cromossômicas estruturais . . . . .	58

	iii
<b>6 Discussão</b>	<b>87</b>
6.1 Cariótipos . . . . .	87
6.2 Alterações cromossômicas estruturais . . . . .	90
<b>7 Conclusões</b>	<b>99</b>
<b>8 Resumo</b>	<b>101</b>
<b>9 Abstract</b>	<b>103</b>
<b>10 Referências Bibliográficas</b>	<b>105</b>

# 1 Introdução

Nestas últimas duas décadas, com o aprimoramento e o emprego de técnicas adequadas, houve um grande impulso na citogenética, tanto em animais como em vegetais. Estudos citogenéticos têm contribuído sobremaneira para estabelecer relações filogenéticas entre espécies de muitos grupos e para se obter uma perfeita identificação dos cromossomos permitindo detectar-se, ao nível genômico, efeitos decorrentes da ação de inúmeros mutagênicos, como fármacos, defensivos agrícolas, aditivos alimentares, resíduos de atividades industriais e radiação (ALCÂNTARA-GOMES & CALDAS, 1969).

O emprego da radiação e o estudo biológico dos seus efeitos ajudou a esclarecer determinados fenômenos que ocorrem nos seres vivos, como mutações ao nível molecular e cromossômico. Os efeitos da radiação artificial nos seres vivos têm sido amplamente estudados, porém da natural são raros os trabalhos existentes na literatura. Tais estudos são possíveis em animais e vegetais que habitam regiões especiais do globo terrestre, as quais apresentam alto nível de radioatividade devido à presença no solo de uma porcentagem maior de elementos químicos radioativos. No Brasil existem algumas poucas áreas com essas características. Quatro destas regiões estão localizadas no Planalto de Poços de Caldas (MG). Uma delas, o Morro do Ferro, tem sido objeto de alguns estudos, especialmente geológicos. No que diz respeito aos efeitos biológicos da radiação natural daquela região a literatura é escassa. Destacam-se os estudos realizados por TAKAHASHI (1976), que encontrou um número significativo de quebras dos cromossomos meióticos de uma espécie de escorpião, *Tityus bahiensis*, que ocorre no Morro do Ferro; e por VASCONCELOS e colaboradores (1986), que detectaram a incorporação de elementos radioativos por vegetais cultivados (feijão, cenoura, batata e milho) em fazendas na vizinhança do Planalto de

### Poços de Caldas.

No entanto, nada se conhece a respeito de possíveis efeitos da radiação natural sobre as populações de anfíbios que habitam tais locais.

A população de anfíbios do Morro do Ferro foi amplamente estudada, do ponto de vista de comportamento reprodutivo, por CARDOSO (1986). Este autor verificou a ocorrência de 27 espécies de anuros no local, sendo que destas, 19 são mais frequentes e abundantes. Estes animais se reproduzem e vivem neste local, onde existem dois riachos permanentes e riachos temporários formados a partir de nascentes e pela drenagem das chuvas, presentes na face sul da encosta do morro, onde existem matas de galeria com vegetação exuberante típica de Mata Atlântica (CARDOSO, 1986; CARDOSO *et alii*, 1989). Portanto, são animais que passam a maior parte de suas vidas nesta região, o que faz com que recebam doses acumulativas de radiação.

Assim, a característica do Morro do Ferro de apresentar radioatividade natural das mais intensas do mundo, associada à vivência permanente desses anfíbios no local e ao conhecimento prévio das espécies lá existentes, tornaram esses animais um material adequado para o estudo em questão. Por outro lado, sabe-se que a ocorrência de quebras e falhas cromossômicas induzidas ou não por radiação é importante mecanismo evolutivo, uma vez que determina maior número de rearranjos cromossômicos, os quais representam maior potencial de diversificação nas populações. Assim, como já foi mencionado por CARDOSO (1986), a existência da alta radioatividade natural pode estar associada a mecanismos evolutivos e especiação, podendo interferir na composição Anuro-faunística da região.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, estudar a possível influência da radioatividade natural existente na região do Morro do Ferro sobre a estrutura cromossômica de anfíbios anuros.

Para tanto, foram escolhidas duas espécies não endêmicas exis-



tentes no Morro do Ferro, e cujo controle pudesse ser obtido o mais próximo possível em áreas de radioatividade natural consideradas "normais". Foram então estudadas as espécies *Aplastodiscus perviridis* (do Morro do Ferro, Botucatu e Serra da Bocaina) e *Hyla albopunctata* (do Morro do Ferro, Botucatu e Campinas), ambas pertencentes à família Hylidae.

No entanto, como inexiste na literatura o cariótipo de *A. perviridis*, e como A. J. CARDOSO (comunicação pessoal) identificou diferenças anatômicas e de canto entre as populações do Morro do Ferro e da Serra da Bocaina, região escolhida como controle, sugerindo não se tratar da mesma espécie, neste trabalho foram determinados os cariótipos de *A. perviridis* provenientes das três localidades em estudo.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Breve histórico da radiobiologia

O desenvolvimento da radiobiologia começou com a descoberta dos raios X, em 1895, por WILHELM CONRAD ROENTGEN (GROSCH & HOPWOOD, 1979; PRASAD, 1984; revisão em BLATTMANN, 1989).

Em 1896, HENRI BECQUEREL demonstrou a radioatividade natural verificando que sais de urânio emitiam radiações semelhantes aos raios X, capazes de impressionar chapas fotográficas e de ionizar gases. Dois anos após, PIERRE e MARIE CURIE deram ao fenômeno o nome de radioatividade e demonstraram que esta era característica de cada elemento, constatando que ocorria no rádio, polônio, tório e urânio. Alguns anos mais tarde, RUTHERFORD e SODDY explicaram o fenômeno da radioatividade verificando que os átomos não são estáveis, mas transmutam-se em outro elemento ao emitirem radiações (GROSCH & HOPWOOD, 1979; ROCHA, 1979).

A partir dos estudos dos mecanismos básicos da radiobiologia, puderam ser realizadas análises microscópicas do que ocorre na passagem da radiação e liberação de sua energia em objetos muito pequenos, como células ou parte delas. A energia liberada pode produzir ionização ou excitação dos átomos e, como consequência, quebras de moléculas com formação de íons e radicais livres altamente reativos. Estes, por sua vez, podem atacar moléculas de grande importância, como a do DNA, causando-lhes danos.

Nos 15 anos que se seguiram à descoberta dos raios X, os médicos trabalharam ativamente com os físicos no exame de corpos humanos, fazendo as primeiras aplicações da radiação para detecção de fraturas de ossos, utilizando desta forma a radiografia para diagnósticos (OKUNO *et*

*alii*, 1982). A descoberta da radiobiologia artificial e o desenvolvimento dos métodos de produção de radioisótopos, em grande escala, estimularam muitas pesquisas relativas ao estudo de sua aplicação em diferentes ramos da ciência, trazendo grandes progressos, na agricultura, indústria e principalmente na medicina (OKUNO *et alii*, 1982; revisões em ALPER & CRAMP, 1989; BLATTMANN, 1989).

## 2.2 Conceitos básicos sobre radiação

O termo radiação indica um fenômeno físico no qual a energia viaja através do espaço (GROSCH & HOPWOOD, 1979), ou ainda, é a energia emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto a outro sob a forma de um feixe de partículas elementares, núcleos atômicos ou ondas eletromagnéticas (OKUNO, 1988).

As radiações permitem a propagação da energia à distância sob várias formas e, geralmente, elas são classificadas em dois grupos principais: as radiações eletromagnéticas e as corpusculares ou particuladas. As primeiras são constituídas de ondas eletromagnéticas oscilantes, perpendiculares entre si, e se propagam no vácuo com velocidade constante de 300.000 km/s. Entre as ondas eletromagnéticas, em ordem crescente de frequência, estão as ondas de rádio, televisão, microondas, radiação infravermelha, luz visível, radiação ultravioleta, os raios X e gama. As radiações corpusculares ou particuladas são constituídas de feixes de partículas elementares ou núcleos atômicos, tais como: partículas alfa e beta, prótons, elétrons, nêutrons, mésons pi e deuteronos, entre outros (GROSCH & HOPWOOD, 1979; OKUNO *et alii*, 1982; OKUNO, 1988).

Dependendo do tipo de radiação, os mecanismos de sua interação com a matéria são diferentes.

As partículas alfa foram detectadas por RUTHERFORD em 1911, que posteriormente identificou-as como núcleos de hélio constituídos por dois prótons e dois nêutrons (PRASAD, 1984). Quando uma partícula alfa atinge a matéria, produz um número muito grande de ionizações locais. Na desintegração alfa, um núcleo emite com grande velocidade uma partícula alfa de carga positiva, reduzindo o valor de seu número de massa em quatro unidades, pois seu número atômico cai duas unidades e seu número de nêutrons em outras duas. As partículas alfa são emitidas principalmente nas desintegrações de elementos pesados, como o urânio, tório ou o polônio, e geralmente se fazem acompanhar de raios gama (FREIRE-MAIA, 1972; MOSCATI, 1988; ROCHA, 1979; OKUNO, 1988). A radiação alfa, por ser constituída de partículas muito grandes, tem baixo poder de penetração (MOSSMANN, 1979).

As partículas beta, identificadas por BECQUEREL, são emissões de elétrons de origem neutrônica (FREIRE-MAIA, 1972). Na desintegração de um núcleo radioativo através desta partícula, o núcleo emite um elétron, que pode ter carga elétrica positiva ou negativa. No primeiro caso, trata-se de uma desintegração beta mais (+), o número atômico decresce de uma unidade, indicando a transformação de um próton em um nêutron no núcleo. No segundo caso, a desintegração é beta menos (-), um dos nêutrons do núcleo se transforma em próton e o número atômico aumenta de uma unidade. Em nenhum dos casos, o número de massa se altera (MOSCATI, 1988). As partículas beta têm ionização bem menor que a das partículas alfa de igual energia, mas seu alcance é bem maior, num dado meio (OKUNO *et alli*, 1982; OKUNO, 1988).

Os raios gama são emissões de energia sem substrato material. Quando as partículas alfa e beta deixam o núcleo sem carregar consigo toda a energia que poderia ser levada, o novo núcleo fica em estado excitado e, mais tarde, expele essa energia em forma de raios gama (FREIRE-MAIA,

1972). Com a emissão gama, o núcleo apenas rearranja seus núcleons, não alterando, portanto, seu número atômico nem seu número de massa (MOSCATI, 1988). Por não possuir massa e ser extremamente energética, a radiação gama tem grande poder de penetração (MOSSMANN, 1979).

Além desta classificação, as radiações são consideradas em ionizantes e não-ionizantes.

A radiação é dita ionizante quando, na interação com os átomos e as moléculas do meio, arranca alguns de seus elétrons orbitais, geralmente da camada periférica do átomo. Em consequência, surgem pares iônicos, cada um formado por um íon positivo (átomo que perde um elétron) e um íon negativo (elétron acrescido ao átomo). Todas as partículas carregadas produzem ionização diretamente, quando possuem energia para tal. Já as partículas neutras e os fótons de raios X e gama, embora eles próprios não ionizem, produzem na interação com o meio partículas capazes de ionizar. Se o meio for o tecido orgânico, as ionizações podem resultar na quebra molecular; não havendo reparo pode iniciar-se um dano biológico (OKUNO, 1988). As radiações ionizantes de importância biológica são os raios X, raios gama, partículas alfa, partículas beta, os prótons, deutérons, núcleos pesados, nêutrons e os mésons pi negativos (MOSSMANN, 1979).

As radiações com comprimento de onda acima de 400 nm são consideradas radiações não-ionizantes, por não possuírem energia suficiente para retirar elétrons dos elementos quantitativamente mais importantes da matéria viva, tais como o carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (FREIRE-MAIA, 1972).

Desde os trabalhos pioneiros de MÜLLER e de STADLER (1927), tem-se constatado através de observações e de dados experimentais que as radiações ionizantes atuam em todos os seres vivos analisados, do vírus ao homem, modificando o comportamento químico dos átomos e moléculas ionizadas, podendo ocorrer como consequência, mutações gené-

ticas e modificações nas células vivas (FREIRE-MAIA, 1972).

### 2.3 Unidades utilizadas no estudo das radiações

Várias unidades já foram utilizadas no estudo das radiações.

No quadro abaixo estão indicadas as quatro unidades de radiação definidas pela Comissão Internacional de Medidas e Unidades Radiológicas (ICRU), como também aquelas que atualmente estão sendo usadas, recomendadas pelo Sistema Internacional de Unidades<sup>(\*)</sup>.

Identificação	Nome da unidade	Símbolo	Valor
Exposição à radiação	Coulomb <sup>(*)</sup>	C	1 C/kg = 3,876 R
	Roentgen	R	1 R = $2,58 \times 10^{-1}$ C/kg 1 R = 87,6 erg/g
Dose absorvida	Gray <sup>(*)</sup>	Gy	1 Gy = 100 rad
	Radiation Absorbed Dose	rad	1 erg = $10^{-2}$ rad
			1 eV = $1,6 \times 10^{-12}$ erg ou $1,6 \times 10^{-19}$ J
Dose equivalente	Sievert <sup>(*)</sup>	Sv	1 Sv = 100 rem
	Roentgen Equivalent Man	rem	
Radioatividade	Becquerel <sup>(*)</sup>	Bq	1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
	Curie	Ci	$3,7 \times 10^{10}$ /s ou $2,2 \times 10^{12}$ /min

(\*) = Recomendadas pelo Sistema Internacional de Unidades.

Em 1928, o Roentgen foi a primeira unidade a ser definida e representa uma unidade de exposição ainda utilizada, e equivale à quantidade de radiação X ou gama que forma, em 1 kg de ar, uma quantidade de eletricidade positiva ou negativa igual a  $2,58 \times 10^{-4}$  Coulomb de cada sinal. Atualmente, as convenções internacionais recomendam que a exposição seja expressa diretamente em C/kg, podendo-se calcular que 1 C/kg tenha valor aproximado de 3,876 R (ALCÂNTARA- GOMES, 1988a).

O rad (da expressão inglesa "radiation absorbed dose") é uma unidade ainda empregada e expressa a dose de radiação absorvida por 1 g de matéria que provoca a liberação de energia equivalente a 100 erg. A unidade que substitui o rad é o Gray (Gy), definido como a quantidade de radiação absorvida que provoca a liberação, em 1 kg de matéria, de uma energia igual a 1 J. Logo, 1 Gy é igual a 100 rad (ALCÂNTARA-GOMES, 1988a; revisão em BLATTMANN, 1989).

Uma outra unidade adotada pela ICRU até o ano de 1975 foi o rem (da expressão inglesa "roentgen equivalent man"), hoje substituído pelo Sievert (Sv). Quando a matéria viva absorve 1 Gy de raios X, a dose equivalente é de 1 Sv, que corresponde a 100 rem. Uma vez que os diversos tecidos que compõem o organismo têm radiosensibilidades diferentes, as doses equivalentes por eles recebidas podem ser corrigidas, o que leva à determinação da dose efetiva equivalente recebida pelo tecido (AAMODT, 1979; OKUNO *et alii*, 1982; ALCÂNTARA- GOMES, 1988a).

O Curie é a medida de radioatividade originalmente baseada na taxa de desintegração de 1 g de rádio, e atualmente definida como a quantidade de qualquer radionuclídeo capaz de produzir  $3,7 \times 10^{10}$  desintegrações por segundo ou  $2,22 \times 10^{12}$  desintegrações por minuto. Atualmente, a unidade recomendada para a medida da atividade de uma fonte é o Becquerel (Bq), que corresponde a uma desintegração por segundo. Portanto, 1 Ci vale  $3,7 \times 10^{10}$  Bq (AAMODT, 1979; OKUNO *et alii*, 1982; ALCÂNTARA-

GOMES, 1988a).

## 2.4 Efeitos biológicos da radiação

O desenvolvimento de lesão tecidual pela exposição à radiação é uma série complexa de fenômenos físicos, químicos e biológicos. A cadeia se inicia pelo processo físico de absorção da radiação ionizante, com a ionização ou excitação dos átomos, os quais provocam as reações químicas iniciais que são responsáveis pelas alterações de moléculas biologicamente importantes. Estas alterações moleculares produzem fenômenos biológicos, como efeitos letais, efeitos não letais e mutações.

Dentre as alterações mais importantes, as que ocorrem ao nível celular são: a desintegração dos cromossomos; o retardo do início da mitose, seguido de mitose anormal; inibição completa da mitose; morte das células após uma ou mais divisões; morte das células sem uma divisão intermediária (MOSSMANN, 1979).

Esses efeitos biológicos causados pela radiação podem se manifestar a curto ou a longo prazo.

Os efeitos a curto prazo ou agudos são aqueles observáveis em apenas horas, dias ou semanas após a exposição do indivíduo à radiação. Esses efeitos estão geralmente associados a altas doses de radiação, acima de 1 Sv (Sievert), recebidas por grandes áreas do corpo, num curto período de tempo. Dependendo da dose de radiação recebida e da condição de resistência do indivíduo exposto, o resultado final pode ser letal (MOSSMANN, 1979; OKUNO *et alli*, 1982).

Os efeitos a longo prazo ou tardios são os que surgem a partir de baixas doses de radiação absorvidas em um curto intervalo de tempo. Esses



efeitos podem ocorrer em indivíduos que sobreviveram aos efeitos agudos ou que foram expostos a doses inferiores às necessárias para produzir uma lesão aguda. A expressão da lesão dos efeitos tardios ocorre muitos meses ou anos após a exposição do indivíduo à irradiação (MOSSMANN, 1979; OKUNO *et alii*, 1982).

Os efeitos tardios podem ocorrer nos tecidos somáticos, bem como nos germinativos.

Os efeitos somáticos são aqueles que afetam diretamente o indivíduo exposto à radiação e não são transmitidos às gerações futuras. No ser humano, por exemplo, os efeitos somáticos principais são a indução da leucemia e outras neoplasias malignas, catarata e encurtamento inespecífico da vida. Esses efeitos dependem do tipo de radiação, da profundidade atingida (que está relacionada à energia da radiação e ao tipo de tecido irradiado), da área ou volume do corpo exposto, da dose total recebida e do tempo de irradiação (FREIRE-MAIA, 1972; OKUNO *et alii*, 1982).

Os efeitos tardios nos tecidos germinativos podem afetar o indivíduo, alterando sua capacidade de produzir descendentes normais.

Os efeitos genéticos foram inicialmente observados em 1927 por MÜLLER, que demonstrou através de experimentos com *Drosophila melanogaster* que os raios X induzem alterações permanentes denominadas de mutações, no material hereditário.

A maioria das mutações induzidas pela irradiação é recessiva em sua expressão, necessitando, desse modo, de algumas gerações para se expressarem (MOSSMANN, 1979; OKUNO *et alii*, 1982).

As mutações são geralmente divididas para fins de classificação em mutações gênicas e cromossômicas.

As mutações gênicas ou puntiformes consistem em modificações da seqüência de nucleotídeos em um determinado gene, resultando na perda

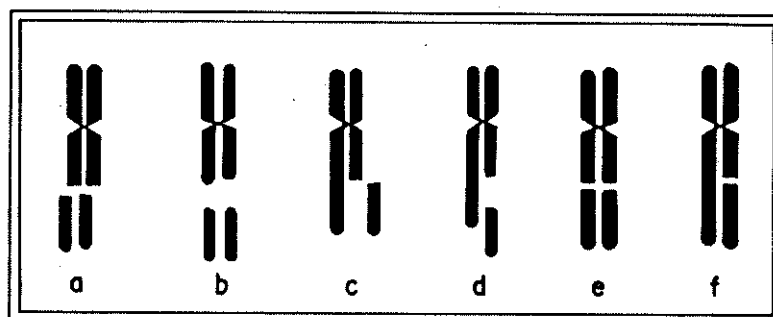
da atividade do produto por ele codificado, ou na sua alteração. Essas mutações não são visíveis por análise microscópica (ALCÂNTARA-GOMES & CALDAS, 1969).

As mutações cromossômicas conhecidas como aberrações podem ser incluídas em duas categorias: as aberrações numéricas e as estruturais. As aberrações numéricas são sub-classificadas em aneuploidias, quando o número de cromossomos do genoma fica alterado pela perda/ganho de um ou mais cromossomos formando múltiplos irregulares do genoma característico da espécie; e euploidias, quando ocorrem múltiplos inteiros do conjunto haplóide, como triploides ( $3n$ ), tetraploides ( $4n$ ) e assim por diante (THOMPSON & THOMPSON, 1981; BEIGUELMAN, 1982; GARDNER & SNUSTAR, 1986; CARVALHO, 1987).

As aberrações cromossômicas estruturais podem ser classificadas em deleção ou deficiência, duplicação; inversão e translocação, de acordo com a porção do cromossomo ou cromátide afetada e o número de roturas.

Quando os cromossomos são submetidos às técnicas de coloração rotineiras, além das alterações cromossômicas estruturais consideradas clássicas, aparecem as denominadas falhas e quebras. Estas discontinuidades são consideradas por alguns pesquisadores como decorrentes apenas de falhas de coloração (BLOOM, 1972), embora outros sustentem que as falhas devem ser incluídas entre as aberrações cromossômicas estruturais e que, se de fato não forem fraturas, devem ser pelo menos locais predispostos a tais lesões (BEIGUELMAN & PISANI, 1976). Segundo BEIGUELMAN (1982), na prática, costuma-se considerar como quebras as discontinuidades cromossômicas mais longas que a espessura de uma cromátide, ou aquelas em que os fragmentos distais estão deslocados em relação ao eixo cromossômico. As quebras podem ser cromatídicas, que afetam apenas uma cromátide, ou isocromatídicas, também denominadas cromossômicas, quando afetam as duas cromátides. As falhas são discontinuidades cro-

mossômicas que têm largura inferior à espessura de uma cromátide, mantendo as extremidades proximal e distal na mesma direção. O esquema abaixo representa esses tipos de alterações conforme definidos por BELGUELMAN (1982).



Esquema para a diferenciação das quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. a, b. quebra isocromatídica ou cromossômica; c, d. quebra cromatídica; e. falha isocromatídica ou cromossômica; f. falha cromatídica; (BELGUELMAN, 1982).

GAULDEN (1973), descreve que as aberrações cromossômicas podem ser induzidas pela radiação com dose de 10 rad ou menos, sendo de dois tipos gerais: as que ocorrem nos cromossomos após a mitose, mas antes da síntese do DNA (roturas do cromossomo), resultando no aparecimento de duas quebras nas cromátides irmãs; e as que ocorrem depois da síntese do DNA, mas antes da mitose (roturas da cromátide), e somente uma das moléculas evidenciará a lesão, ou seja, somente uma das células-filhas apresentará a quebra no cromossomo.

As células e tecidos do organismo não respondem de modo igual à radiação. Os radiobiologistas franceses BERGONIÉ e TRIBONDEAU, já em 1906, reconheceram essa sensibilidade diferencial das células à radiação e formularam uma lei, afirmando que a radiosensibilidade varia diretamente

com a atividade mitótica e inversamente com o grau de diferenciação morfológica e funcional. WALLACE & DOBZHANSKY (1979) afirmam que as células de um folículo capilar, por se dividirem continuamente, estão sujeitas a extensos danos por radiação, o que está de acordo com a lei anteriormente formulada. Por outro lado, de acordo com os pesquisadores franceses, as células diferenciadas, como as musculares e nervosas, por não se dividirem, seriam mais resistentes à radiação.

Essa lei pode ser empregada como guia geral para prever a sensibilidade das células à radiação, embora com cautela, pois existem células, como os linfócitos e os oócitos de mamíferos, que são muito radiosensíveis e, no entanto, não se dividem (MOSSMANN, 1979). Este autor, com base em dados de RUBIN & CASARETT (1968), considera que a sensibilidade relativa de células de mamíferos é elevada para as células hematopoiéticas, espermatogônias e células do epitélio intestinal; menos elevada para células precursoras da série hematopoiética; média para células endoteliais e fibroblastos; média baixa para células do epitélio hepático, renal, pancreático, tireóideo e supra-renal; e baixa para células do tecido muscular, para neurônios e eritrócitos.

Assim, a partir da demonstração realizada por MÜLLER (1927) de que os raios X induzem mutações, muitos cientistas se interessaram pelo efeito biológico produzido pelas radiações. Por esta razão é que biólogos, físicos, químicos e médicos têm se dedicado ao estudo e estão trabalhando juntos nessa área com a finalidade de obterem melhores resultados para o entendimento das modificações e injúrias causadas aos seres vivos pelas radiações.

## 2.5 Áreas com alto nível de radioatividade natural no Brasil

A vida na terra apareceu e evoluiu sob constante bombardeio de radiações, algumas oriundas do espaço e outras provenientes de substâncias radioativas do planeta. A partir do século XX, às fontes naturais de radiação somaram-se as produzidas pelo homem, tais como os raios X, as inúmeras aplicações médicas e industriais de radioisótopos e os contaminantes ambientais gerados pelas explosões nucleares. Assim sendo, os seres humanos estão permanentemente expostos a uma radiação de fundo, que é a soma da radiação natural com a artificial, e corresponde em média a uma dose equivalente de quase 2,5 mSv por ano (ALCÂNTARA-GOMES, 1988b).

O valor médio da radiação de fundo em locais habitados é 1,25 mSv ao ano e em regiões de alta radioatividade, como o Morro do Ferro, é de 131,4 mSv ao ano. Para altitudes de 3000 m a radiação é 20% superior à radiação ao nível do mar, isso porque a atmosfera se encarrega de atenuá-la (GROSCH & HOPWOOD, 1979; OKUNO *et alii*, 1982).

Cerca de 30 a 40% da radiação de fundo é devido aos raios cósmicos (OKUNO *et alii*, 1982). Nas rochas que compõem a crosta terrestre ocorrem diversos radionuclídeos, como o potássio-40 ( $^{40}\text{K}$ ), o rubídio-87 ( $^{87}\text{Rb}$ ) ou os átomos radioativos pertencentes às famílias do urânio-238 ( $^{238}\text{U}$ ), urânio-235 ( $^{235}\text{U}$ ) e do tório-232 ( $^{232}\text{Th}$ ). As doses de radiação provenientes desses radionuclídeos variam de local para local, dependendo da composição do solo e, geralmente, não chegam a ultrapassar 0,6 mSv ao ano, com exceção de algumas regiões, como por exemplo, Guarapari (ES) onde, em virtude da grande quantidade de areia monazítica rica em tório, a dose pode atingir algumas dezenas de mSv por ano. Mas, a principal fonte

de radiação de fundo está no próprio organismo vivo, e são os radionuclídeos como o  $^{40}\text{K}$ , hidrogênio-3 ( $^3\text{H}$ ), carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ) e principalmente alguns isótopos das famílias do  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e do  $^{232}\text{Th}$ , que podem penetrar no corpo através do ar inspirado, da água e dos alimentos ingeridos (ALCÂNTARA-GOMES, 1988b).

FREIRE-MAIA (1972) relata que a dose de radiação recebida pela gônada em regiões de radiação natural "normal" corresponde a cerca de 10 a 15  $\mu\text{R}$  por hora. Em um ano, a dose acumulada é igual a 0,1 R, o que dá aproximadamente 3 R em uma geração, isto é, num período de 30 anos. No entanto, em algumas áreas onde ocorre uma concentração maior de minerais radioativos, essa dose natural pode ser bastante elevada. No Brasil, essas regiões são encontradas no litoral sul do Estado do Espírito Santo; no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro e no Estado de Minas Gerais, locais conhecidos como possuidores de minerais altamente radioativos, o que confere, aos respectivos ambientes, uma intensidade de radiação de fundo superior ao normal. Estes locais de radiação natural elevada têm despertado muito interesse em diversas áreas de pesquisa.

Em 1948, FRAHYA fez referência à existência de minerais radioativos no Planalto de Poços de Caldas, mas somente em 1952, por determinações radiométricas é que foi constatada a presença de urânio (FRAHYA, 1962). O Planalto de Poços de Caldas possui uma radioatividade natural elevada devido à presença de inúmeras anomalias radioativas espalhadas ao longo do mesmo. Em algumas áreas, estas anomalias são bastante pronunciadas, apresentando diferentes tipos de minerais: o urânio encontra-se associado ao zircônio ou ao molibdênio, e o tório aos óxidos de ferro e manganês. As quatro maiores anomalias do Planalto são as do Campo do Agostinho, Campo do Cercado, Taguarí e Morro do Ferro (VASCONCELOS *et alii*, 1986).

Com a implantação do Programa Nuclear Brasileiro, foram in-

centivadas, em todo o território nacional, pesquisas sistemáticas de depósitos uraníferos. A primeira região a ser investigada foi o Planalto de Poços de Caldas, uma das maiores intrusões alcalinas do mundo (VASCONCELOS *et alii*, 1986), constituída por um destacado relevo delimitado por um maciço de rochas ígneas alcalinas pré-cambrianas, situado entre os estados de São Paulo e Minas Gerais, ocupando neste último a maior parte de sua área, cuja totalidade é aproximadamente de 800 km<sup>2</sup>. O Planalto tem uma altitude entre 1300 a 1600 m, destacando-se até 650 m sobre as áreas vizinhas. Seu relevo apresenta morros e colinas suavizadas, sendo mais elevado e acidentado no quadrante sudeste, onde o Morro do Ferro se situa (BJORNBERG, 1959; ELLERT, 1959; WEDOW, 1967; I.P.T., 1984; SCHOBENHAUS, 1984.).

### 2.5.1 Morro do Ferro

O Morro do Ferro (originalmente chamado de Morro Alto e Consulta), situa-se na área central do Planalto, distando cerca de 15 km ao sul da cidade de Poços de Caldas (I.P.T., 1984). É o ponto mais alto do Planalto, com 1541 m de altitude (CARDOSO, 1986). Esta colina, que é um exemplo notável de um vulcão intrusivo porém não explosivo, está inserida no relevo acidentado de aproximadamente 140 m sobre sua base e um diâmetro máximo de 1 km (WEDOW, 1967; I.P.T., 1984).

A partir de 1953, após a mineralização do tório e terras raras no Morro do Ferro, é que se desenvolveram estudos sistemáticos relacionados à radioatividade na área. A região radioativa cobre uma área de 0,35 km<sup>2</sup> e uma profundidade de 100 metros. O Morro do Ferro, talvez seja o maior depósito de tório conhecido no mundo. Muitos níveis de intensa radiação são encontrados em uma pequena área de 0,15 km<sup>2</sup>, sendo que o nível

médio é de 1,5 mR/h, chegando em algumas áreas em torno de 2 a 3 mR/h (ROSER & CULLEN, 1962a, 1962b). Esses valores foram confirmados por CULLEN (1977), que fez um levantamento detalhado da radioatividade do Morro do Ferro em 40 pontos de uma área com cerca de 273.000 m<sup>2</sup>. Os valores radiométricos encontrados variaram de 0,1 a 3,0 mR/h. Segundo FREIRE-MAIA (1972), a taxa de radioatividade nessa região é cerca de 20 a 30 vezes superior ao nível médio "normal", podendo chegar a ser 100 vezes maior naqueles pontos de radiação elevada. Através de reconhecimentos radiométricos terrestres e um levantamento aerocintilométrico do Planalto, comprovou-se que a radioatividade é devida, em maior parte aos elementos da série de desintegração do tório (<sup>232</sup>Th), ocorrendo também no local terras raras e urânio (FRAHYA, 1962).

Estudos mineralógicos mais recentes apresentados no quadro abaixo, mostram com detalhes os principais nuclídeos presentes na região.



## Nuclídeos da série do tório (Fonte: I.P.T., 1984).

Isótopo	Abundância Relativa Isotópica (%)	Meia-Vida	Radiação	Energia (meV)	Porcentagem
$^{232}\text{Th}$	100	$1,4 \times 10^{10}$ anos	alfa	4,01	76
				3,95	24
			gama	0,055	24
$^{228}\text{Ra}$	-	5,76 anos	beta	0,055	100
$^{228}\text{Ac}$	-	6,13 horas	beta	2,18	10,0
				1,85	9,6
				1,72	6,7
				1,11	53,0
			gama	0,64	7,6
				0,46	13
				0,058	53,0
				0,128	5,2
				0,184	< 1
$^{228}\text{Th}$	-	1,9 anos	alfa	5,42	71
				5,34	28
			gama	0,083	1,6
$^{224}\text{Ra}$	-	3,64 dias	alfa	5,68	94
				5,45	6
				5,19	0,4
			gama	0,241	3,7
$^{220}\text{Rn}$	-	55 seg	alfa	6,28	100
			gama	0,50	0,07

- cont.

Isótopo	Abundância Relativa Isotópica (%)	Meia-Vida	Radiação	Energia (meV)	Porcentagem
$^{216}\text{Po}$	-	0,16 seg	alfa	6,77	100
$^{212}\text{Pb}$	-	10,6 horas	beta	0,33	88
				0,57	12
			gama	0,176	< 1
				0,238	47
				0,300	3,2
$^{212}\text{Bi}$	-	60,5 min	beta	2,25	76
			alfa	6,086	9,8
				6,047	25,1
			gama c/ beta	1,81	1,0
				1,61	1,8
				1,03	2,0
				0,83	13
				0,72	7
			gama c/ alfa	0,040	2
				0,288	0,5
	0,46	0,8			
			(complexo)		
$^{212}\text{Po}$	-	$3,04 \times 10^{-7}$ seg	alfa	10,55	< 1
				8,785	99
$^{208}\text{Tl}$	-	3,1 min	beta	1,80	100
			gama	2,62	100
				0,86	12
				0,58	86
				0,51	23
$^{208}\text{Pb}$	52,3	estável	-	-	-

Neste quadro, observa-se a meia-vida da maioria dos elementos da série, que é muito curta quando comparada com a do  $^{232}\text{Th}$ , os diferentes radionuclídeos envolvidos no decaimento, os tipos de partículas associadas a cada uma delas, a energia emitida em meV e a porcentagem de energia com aquela intensidade.

DREW e EISENBUD (1966, 1970), estimaram em laboratório a dose anual de radiação alfa recebida por roedores das espécies *Zygodontomys lasiurus* e *Oryzomys rotticeps*, que vivem em buracos no Morro do Ferro, nos quais a concentração de nuclídeos da série do radônio-220 ( $^{220}\text{Rn}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  e  $^{212}\text{Bi}$ ), haviam sido investigadas previamente. Esses roedores foram expostos por 48 horas ao  $^{212}\text{Pb}$  que em condições controladas de laboratório podia ser inalado como  $^{220}\text{Rn}$  e como  $^{212}\text{Pb}$  ou ingerido como  $^{212}\text{Pb}$ . Os dados obtidos em laboratório indicaram que a exposição desses animais a uma concentração média de 27 nCi/l de  $^{220}\text{Rn}$  e 23 pCi/l de  $^{212}\text{Pb}$  no Morro do Ferro resulta em uma dose anual de exposição à radiação alfa muito alta, de cerca de 100 rad/ano no epitélio tráqueo-bronquial e cerca de 25 rad/ano no epitélio alveolar.

O Morro do Ferro tem se revestido de importância não só para estudos ao nível dos organismos vivos mas tem sido indicado como modelo natural que daria informações básicas para o estudo do problema e das conseqüências da armazenagem dos resíduos da indústria nuclear (FUJIMORI *et alli*, 1980).

## 2.6 Efeitos biológicos da radiação natural elevada sobre os organismos

Na literatura podemos encontrar uma vasta relação de experimentos realizados com radiação induzida desde *Drosophila melanogaster*

até o homem. Mas, os estudos sobre os efeitos da radiação natural elevada sobre os organismos vivos têm sido muito pouco abordados.

GENTRY e colaboradores (1959) realizaram uma análise em 1.242.744 crianças recém-nascidas no estado de New York, das quais 16.369 apresentaram malformações congênitas. Baseando-se em dados geológicos sobre os depósitos de minerais radioativos e os prováveis níveis de radioatividade natural em várias áreas, mostraram que a incidência de malformações congênitas nas crianças recém-nascidas era mais baixa (1,29%) em áreas pouco radioativas, maior (1,58%) em áreas com nível alto, e mais elevada (1,75%) nas áreas com os maiores níveis de radioatividade natural do Estado.

KRATCHMAN e GRAHN (1960, *apud* FREIRE-MAIA, 1972), também constataram que a freqüência de mortes por malformações congênitas estava correlacionada com o nível maior ou menor de radiação natural. Os autores não apresentam dados sobre a dosimetria dos locais estudados.

Uma outra investigação foi realizada por WESLEY (1960) revelando que a freqüência de malformações varia com a latitude geomagnética, a qual está relacionada com o fluxo energético dos raios cósmicos.

Em roedores, GRUNEBERG (1964) empreendeu uma série de observações em oito populações de ratos que viviam em uma faixa costal isolada no estado de Kerala (Índia), que apresenta alta taxa de radiação, comparando-os com animais da mesma espécie coletados também em oito populações de uma região com dose "normal" de radiação. Nenhuma diferença sistemática entre as duas amostras ou malformação grave de natureza óssea foi encontrada.

No Brasil, TAKAHASHI (1976) analisou uma população de escorpiões da espécie *Tityus bahiensis* do Morro do Ferro, e encontrou um número significativo de células meióticas com quebras cromossômicas em espermátocitos, quando comparado ao controle, concluindo assim que o

nível alto de radiação natural contribuiu claramente para o aumento da frequência de aberrações cromossômicas nesses animais.

Estudos realizados por PENNA-FRANCA e colaboradores (1968), sobre a radioatividade presente na dieta de populações humanas das regiões de Guarapari e Araxá, mostraram que os elementos de maior importância na contaminação alimentar daquelas localidades eram o  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$  e o  $^{229}\text{Th}$ . Na região de Guarapari, rica em areia monazítica, a produção local de alimentos era muito pequena e o conteúdo radioativo da dieta de suas populações estava praticamente dentro dos limites normais. No entanto, na região mineira de Araxá, onde a produção agrícola é elevada, verificou-se que 13% da população ingeria alimentos com uma radioatividade 5 vezes maior do que a média das regiões "normais".

Atualmente, pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) vêm realizando estudos radioecológicos no Planalto de Poços de Caldas, fazendo um levantamento dos teores de  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{210}\text{Pb}$  nos principais produtos agrícolas e nos respectivos solos de cultivo visando estimar doses de radiação na população humana. Nos principais produtos agrícolas cultivados no Planalto, como o feijão, a cenoura, o milho e a batata, as concentrações médias de  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{210}\text{Pb}$  encontradas foram equivalentes entre si, porém, os valores obtidos foram uma ordem de grandeza superiores aos provenientes de áreas de radioatividade natural "normal". Os autores concluíram serem estes radionuclídeos, presentes nos vegetais, importantes no que diz respeito à dose populacional por ingestão (VASCONELOS *et alii*, 1986).

O Morro do Ferro, constitui-se, portanto, em excelente região para estudos de efeito da radioatividade natural, tanto em plantas como em animais (LEI, 1985) e como mencionado por TAKAHASHI (1976), o estudo dos efeitos genéticos da radiação ionizante presente em fontes naturais representa uma oportunidade única para análise das conseqüências a

longo prazo da exposição à radiação.

## 2.7 Panorama geral referente aos anfíbios

Os anfíbios são derivados de um ancestral semelhante ao peixe, possivelmente do período Devoniano. São possuidores de alguns caracteres novos que os adaptaram à vida terrestre, como patas, pulmões, narinas comunicadas com a cavidade bucal e órgãos dos sentidos que podem funcionar tanto na água como no ar (STORER *et alii*, 1986).

Os anfíbios modernos são encontrados na maioria dos habitats, apresentam ampla distribuição geográfica e estão presentes em todos os continentes. A adaptação do grupo é notável, conquistando mesmo áreas desérticas, onde sobrevivem armazenando água em seus corpos em estado de hibernação dentro das tocas, nas quais existe relativa umidade (BLAIR, 1976). Vivem principalmente na água e em lugares úmidos sem salinidade. São comuns em regiões temperadas úmidas, mas a maioria é tropical. Em certas florestas tropicais representam o grupo mais abundante de vertebrados (STORER *et alii*, 1986).

A classe Amphibia está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepspondilis e Lissamphibia. A primeira e a segunda foram pioneiras sobre a Terra há cerca de 300 milhões de anos; e extinguiram-se após 200 milhões de anos. A terceira subclasse, Lissamphibia, apareceu no período do Jurássico, há cerca de 150 milhões de anos. Expandiu-se rapidamente e apresenta atualmente cerca de três mil espécies, distribuídas em três ordens: Anura (Salientia), onde estão incluídas as rãs, sapos e pererecas; Urodela (Caudata), contém as salamandras; e Apoda (Caecilia ou Gymnophiona), onde estão inseridas as cobras-cegas. Do total de espécies vivas, 85% são anuros, 10% urodelos e 5% ápodos (ALMEIDA, 1984).

A ordem Anura é a mais bem sucedida dos anfíbios, apresentando 77% de suas famílias com centro de distribuição tropical e 14% em áreas subtropicais do hemisfério Norte. São encontrados em quase toda a área ocupada pelos Urodelos e Apodas, excluídas as regiões de condições hibernais extremas do hemisfério Norte. São os únicos anfíbios presentes em regiões como o oeste da Índia, Madagascar, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e Ilhas do oeste e sudeste do Pacífico (SAVAGE, 1973).

Os anuros possuem cordas vocais na laringe que servem para emitir vocalizações, características para cada espécie (STORER *et alii*, 1986). As funções das vocalizações podem ser de atração de parceiro para a reprodução ou defesa de território (SCHITZ, 1973; SALTHER & MECHAM, 1974).

A família Hylidae é composta por aproximadamente 34 gêneros e mais de 400 espécies. Trinta destes gêneros e 350 espécies vivem nos trópicos americanos (DUELLMAN & TRUEB, 1985). Esta família é de ampla distribuição fazendo-se presente em todo o continente americano, Ásia Central e Oriental, Europa, e região noroeste da África (BATISTIC, 1986).

As pererecas estão inseridas nesta família. A maioria delas é menor do que 5 cm, mas algumas podem atingir até 14 cm de comprimento. Grande parte das pererecas apresentam discos "aderentes" expandidos em cada dedo usados para subir em árvores, barrancos e paredes. Apresentam ainda, odontóides no maxilar superior e cartilagem intercalar nos dedos (COCHRAN, 1955).

As duas espécies de anfíbios anuros utilizadas no presente trabalho, *Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata*, pertencem à família Hylidae.

### 2.7.1 *Aplastodiscus perviridis* B. Lutz, 1950

O holótipo procede da Fazenda do Bonito, na Serra da Bocaina, São José do Barreiro, SP.

Esta espécie ocorre nas regiões de altitude, próximo às serras litorâneas do sul e sudeste do Brasil, desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, além da Argentina (CARDOSO, 1986). Segundo BOKERMANN (1967), esses indivíduos cantam geralmente na vegetação porém podem ser encontrados também em alturas superiores a 3 ou 4 metros.

BOKERMANN (1967), analisou *A. perviridis* da Serra da Bocaina e verificou que o canto é constituído de uma única nota, repetida em grupos de 2 a 5, cerca de 25 a 30 vezes por minuto. No entanto, as observações feitas por CARDOSO (1989, comunicação pessoal) diferem das daquele autor. CARDOSO verificou que a vocalização de exemplares machos desta espécie da Serra da Bocaina ocorre em séries de 5 a 6 notas repetidas a intervalos regulares, enquanto na população do Morro do Ferro (CARDOSO, 1986), é constituída por notas isoladas emitidas a intervalos regulares.

Além dessas diferenças de canto, CARDOSO (1989, comunicação pessoal) verificou também que indivíduos da população da Serra da Bocaina apresentam tímpanos menores e ante-braços mais robustos do que os indivíduos do Morro do Ferro, o que levou à hipótese de que essas duas populações poderiam tratar-se de duas espécies distintas.



### 2.7.2 *Hyla albopunctata* Spix, 1924.

Espécie pertencente à família Hylidae, bem característica, típica das áreas abertas e com distribuição ampla por todos os Estados do Sudeste do Brasil, além do Paraná, Mato Grosso e norte da Argentina (CARDOSO, 1986). A cor é amarela-pardacenta ou castanha, às vezes com barras transversais sobre o dorso e região inguinal com pontuações brancas características.

## 2.8 Citogenética de Anuros

No início deste século, os estudos com anfíbios anuros eram principalmente sobre sistemática, havendo pouco interesse pela citogenética destes animais.

Com o avanço técnico-metodológico da citogenética animal, que teve um grande impulso a partir da década de 60, vários pesquisadores se interessaram pelo estudo cromossômico de anfíbios anuros, dentre estes SAEZ e BRUM (1960); OHNO e colaboradores (1964); BEÇAK (1967, 1968); BEÇAK e colaboradores (1966); MORESCALCHI (1967, 1968); BOGART (1970); BEÇAK e BEÇAK (1970, 1974); BEÇAK e RABELLO (1976); RUIZ e BEÇAK (1976); RUIZ e colaboradores (1980, 1981); HERRERO (1982); ZHENGAN e JIANWEN (1983), e outros.

Estudos cromossômicos têm se mostrado de grande utilidade no estabelecimento de relações filogenéticas para vários grupos de animais e plantas e no estudo comparativo dos cariótipos de diferentes espécies. Estes estudos podem não só esclarecer problemas de ordem sistemática, como também auxiliar no conhecimento dos mecanismos cromossômicos evoluti-

vos que se desenvolveram durante a especiação, pois alterações cariotípicas comumente acompanham a evolução de uma espécie.

BEÇAK (1967) relata que os indivíduos da mesma espécie geralmente apresentam apenas um cariótipo, ou seja, mesmo número e forma de cromossomos. A constância do cariótipo em cada espécie pode ser eventualmente utilizada, associada a outros parâmetros, para identificação sistemática, apesar de que espécies diferentes podem frequentemente apresentar cariótipos muito semelhantes, como é o caso, por exemplo, de *Bufo ictericus*, *B. crucifer* e *B. paracnemis*, com  $2n = 22$  cromossomos (BEÇAK, 1968), e de *H. arborea* e *H. regilla*, com  $2n = 24$  cromossomos (MORESCALCHI, 1965).

Por outro lado, existem espécies morfologicamente muito parecidas, como *H. brunnea* e *H. septentrionales*, consideradas inicialmente como uma única espécie. A análise cariotípica destas espécies foi muito elucidativa, pois demonstrou que a primeira apresenta o número de cromossomos  $2n = 34$  e a segunda  $2n = 24$ , além de outras diferenças na forma destes constituintes celulares (COLE, 1974).

De um modo geral, a variação no número de cromossomos é menor que a variação de sua morfologia. Em determinados grupos há constância de números embora haja variação de morfologia.

Muitas hipóteses relacionadas à origem e evolução de anfíbios puderam ser formuladas à luz dos conhecimentos relacionados à análise cromossômica. Com relação à família Hylidae, vários trabalhos relacionados a cariótipos de muitas espécies foram realizados com esta finalidade.

DUELLEMAN e COLE (1965) analisaram 32 espécies de hílideos e verificaram que a maior parte delas têm  $2n = 24$  cromossomos. Uma delas apenas, *Acris crepitans blanchardi*, com  $2n = 22$ , quatro com  $2n = 26$  e três com  $2n = 30$ . Posteriormente, DUELLEMAN (1967) analisou mais 27 espécies e identificou números cromossômicos de  $2n = 24, 26, 28$  e  $30$ . Estes

autores analisaram apenas o número através das metáfases I meióticas, não se reportando a nenhum aspecto morfológico dos cromossomos mitóticos.

BEÇAK (1968) e BEÇAK e BEÇAK (1970) analisaram 8 espécies desta família e verificaram também que o número diplóide de cromossomos variava de 22 a 30: *H. bulchella prasina*; *H. hayi*; *H. faber*; *H. multilínea* e *H. albomarginata*, que apresentaram  $2n = 24$ ; *H. albopunctata*,  $2n = 22$ ; *H. microps*,  $2n = 30$ ; e *Fritziana gaeldii*, com  $2n = 26$ . Algumas destas espécies, como *H. bulchella prasina* e *H. albomarginata* apresentaram um par, *H. faber* dois pares, *Fritziana gaeldii* três pares e *H. microps* quatro pares de cromossomos acrocêntricos. Estes autores notaram que esses cromossomos são mais numerosos nas espécies cujo número diplóide de cromossomos também é maior.

RABELLO (1970) estudou nove indivíduos da família Hylidae: *H. raniceps*; *Phrynohyas venulosa*; *H. crepitans*; *H. polytaenia*; *H. fuscomarginata* e *H. trachylorax* (sinônimo júnior de *H. fuscovaria*) apresentaram  $2n = 24$  cromossomos e *H. minuta*, *H. rubicundula* e *H. nana* apresentaram  $2n = 30$  cromossomos.

FORESTI (1972) analisou 23 espécies, representando 5 gêneros de anuros, pertencentes à família Hylidae. O número diplóide de cromossomos encontrado nestas espécies foi 24, 26 e 30. Como única exceção, encontrou  $2n = 32$  em *Hyla berthalutzae*. Foi verificado também pelo autor que as espécies com maior número de cromossomos apresentaram maior número de acrocêntricos.

BOGART (1973) defende a hipótese de um ancestral comum para os anuros que teria originado todos os gêneros atuais, com  $2n = 26$ , tendo em vista que em um grande número de famílias o número  $2n = 26$  está presente em vários gêneros, frequentemente associados às formas mais primitivas de cada uma delas. Portanto, é possível que este seja o número diplóide inicial a partir do qual as famílias modernas tenham

derivado conforme proposto por BOGART (BATISTIC, 1986).

O gênero *Hyla*, de distribuição mais ampla, aparentemente têm dois ramos cariotípicos,  $2n = 24$  e  $2n = 30$ , com evidências de representarem duas linhas filogenéticas distintas. Outros números conhecidos, como  $2n = 18$ ,  $2n = 20$ ,  $2n = 22$  e  $2n = 34$ , em *Hyla* são considerados derivações daqueles números modais (BATISTIC, 1986).

Baseado na evidência de que nos anuros o baixo número de acrocêntricos está associado, em geral, ao baixo número de cromossomos, BEÇAK (1967) e FORESTI (1972) propuseram que o processo de evolução de anuros possa ter ocorrido, para certas espécies relacionadas dentro de algumas famílias, através de uma redução do número cromossômico a partir do ancestral  $2n = 26$ , pelo mecanismo de fusão cêntrica, originando o grupo com 24 cromossomos. Por outro lado, através de fissão cêntrica poderia ter se originado o grupo com 30 cromossomos (BOGART, 1973). Em 1945, WICKBON (*apud* BEÇAK, 1968) já havia levantado a hipótese de que a fusão cêntrica pode ter ocorrido com relativa freqüência no desenvolvimento filogenético dos Anura. Este autor se baseou também no fato de que os maiores números diplóides de cromossomos foram encontrados nas formas mais primitivas, nas diferentes sub-ordens. Portanto, o mecanismo de fusão cêntrica permite explicar, em muitos casos, a variabilidade cariotípica de certas famílias de anuros, entre elas Hylidae. Atualmente, considera-se que a discrepância do número de cromossomos seria alcançada, em geral, por rearranjos cromossômicos que levam a sua diminuição ou aumento, podendo haver inclusive perda de segmentos durante o processo (BATISTIC, 1986).

Tais rearranjos podem ocorrer espontaneamente ou ser induzidos por inúmeros fatores, dentre os quais a radiação.

Com relação a cromossomos sexuais heteromórficos, são raras as espécies de Hylidae em que esses estão presentes. Em *H. arborea japonica*

foi relatado a presença de cromossomos do tipo XY, em que o X seria o submetacêntrico e o Y metacêntrico, com tamanhos diferentes entre si. Na prófase meiótica o Y apresentar-se-ia heteropicnótico (YOSIDA, 1957). No entanto, estes dados diferem dos de MORESCALCHI (1965), que também analisou esta espécie e não encontrou heteromorfismo cromossômico sexual. Portanto, esses dados são contraditórios e necessitam de confirmação.

Outro caso descrito na literatura refere-se a *Gastrotheca riobambae*, que apresentou o par 4 dimórfico, com o cromossomo Y maior do que o X e completamente heterocromático (SCHIMID *et alii*, 1983).

Um outro aspecto a ser considerado em relação aos cariótipos dos Hylidae analisados até o momento é que a maioria das metáfases em primeira divisão meiótica apresentam bivalentes em forma de anel, logo, com quiasma terminal (BEÇAK, 1968; RABELLO, 1970; FORESTI, 1972; ALMEIDA, 1984). MORESCALCHI (1968) considerou esta característica típica dos anuros mais evoluídos.

### 3 Material

#### 3.1 Coletas

As regiões de coleta estão identificadas geograficamente na figura 1. Foram realizadas 24 viagens, assim distribuídas: dezesseis para o Morro do Ferro, próximo à cidade de Poços de Caldas (MG) (Figuras 2 e 3); seis para Botucatu (SP) (Figura 4); e duas para "Recanto das Garrafas" (município de São José do Barreiro - SP) localizado no Km 26 da estrada de acesso ao Parque Nacional da Serra da Bocaina (Figura 5). Além destas, foram realizadas seis coletas no brejo da lagoa próxima ao "Campus" da UNICAMP (Campinas, SP) (Figuras 6 e 7). Todas as coletas foram realizadas à noite, e para isso contamos, em Botucatu, com a ajuda do Prof. Dr. Jorge Jim, do Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas da UNESP e nas demais localidades com a ajuda do Prof. Dr. Adão José Cardoso, do Departamento de Zoologia da UNICAMP e de membros de seu grupo.

As figuras de 2 a 7 mostram os ambientes com diferentes vegetações onde são encontrados os anfíbios estudados.

### 3.2 Animais

No presente trabalho foram utilizados 10 indivíduos adultos de *Aplastodiscus perviridis* e 10 de *Hyla albopunctata* da região do Morro do Ferro. Como controles de *A. perviridis* foram coletados 10 animais em Botucatu e 10 na Serra da Bocaina; como controles de *H. albopunctata* foram utilizados 9 exemplares provenientes do "Campus" da UNICAMP e 9 da região de Botucatu (Figuras 8 e 9). A nomenclatura adotada seguiu FROST (1985).

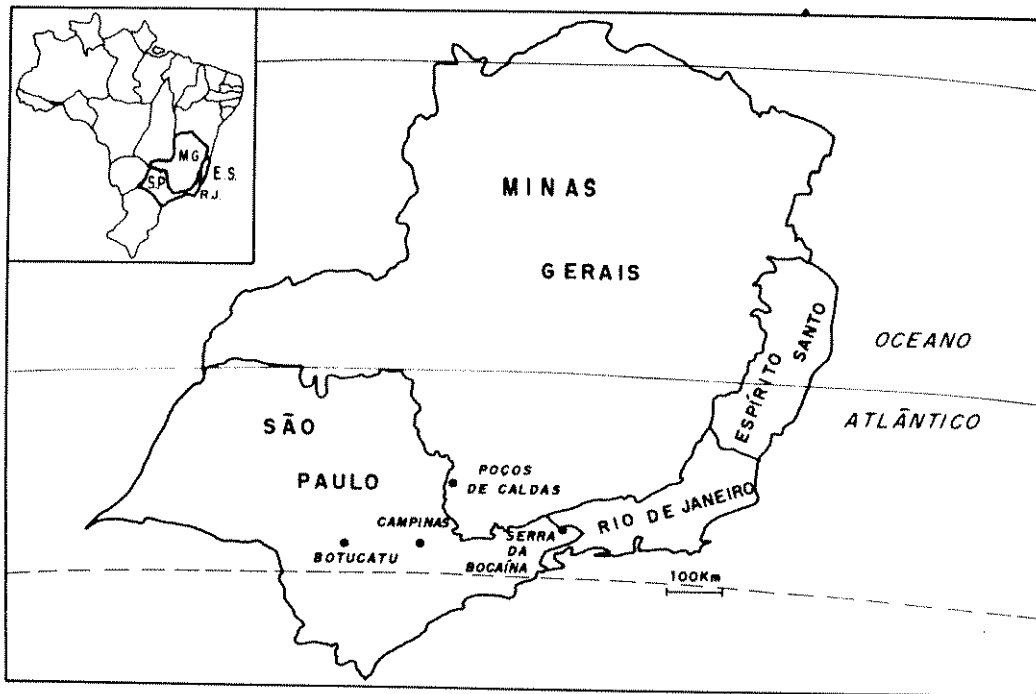


Figura 1. Mapa geográfico indicando os locais de coletas. Adaptado de SIMIELLI e BIASI (1988).





Figura 2. Vista geral de mata de galeria do Morro do Ferro (MG). (Foto A. J. Cardoso).

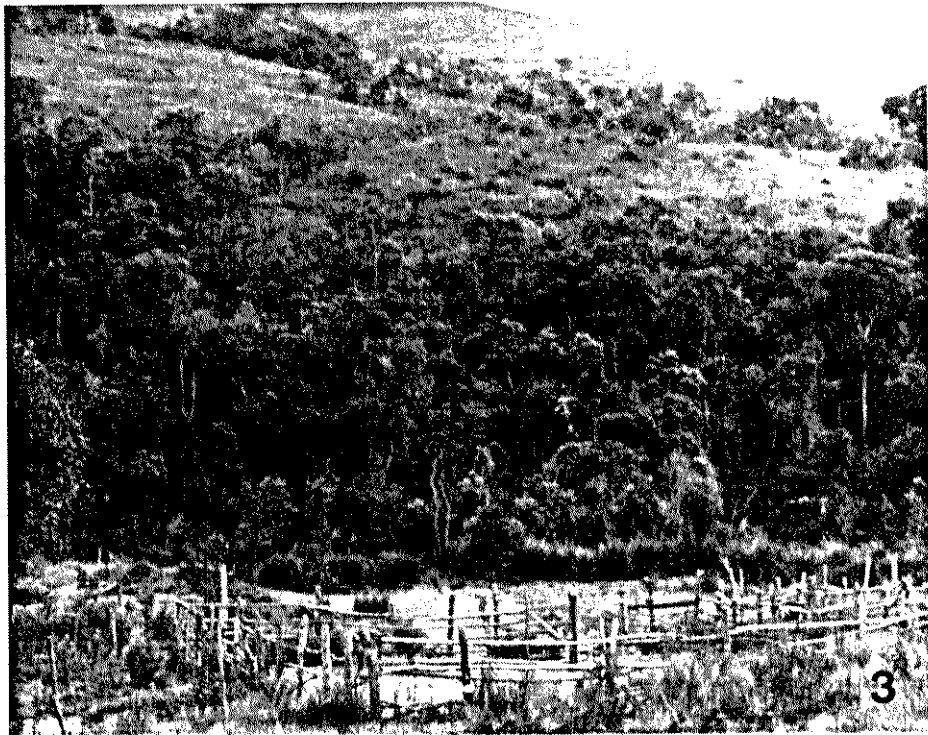


Figura 3. Área de brejo, com poças rasas e mata de galeria (ao fundo), no Morro do Ferro (MG), onde são encontrados *A. perviridis* e *H. albopunctata*. (Foto A. J. Cardoso).



Figura 4. Área de brejo com vegetação arbustiva, em Botucatu (SP), onde são encontrados *A. perviridis* e *H. albopunctata*.



Figura 5. Vista geral do ambiente de *A. perviridis* na Serra da Bocaina (SP).



Figura 6. Vista geral da lagoa do "Campus" da UNICAMP (Campinas, SP).



Figura 7. Vista geral do ambiente de *H. albopunctata* próximo à lagoa do "Campus" da UNICAMP (Campinas, SP).

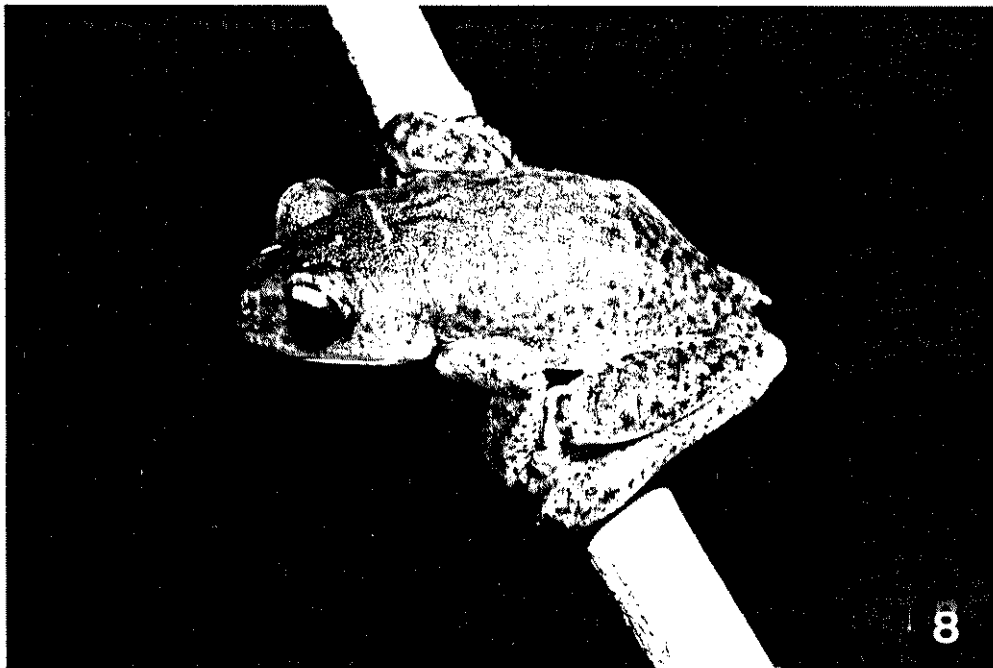


Figura 8. Macho de *A. perviridis*, ZUEC 7550, comprimento total 3,5 cm, procedente do Morro do Ferro (MG). (Foto A. J. Cardoso).



Figura 9. Macho de *H. albopunctata*, ZUEC 7546, comprimento total 6 cm, procedente do Morro do Ferro (MG). (Foto A. J. Cardoso).

A posição sistemática das espécies utilizadas é a seguinte: Classe: Amphibia; Ordem: Anura (Salientia); Sub-Ordem: Procoela; Família: Hylidae; Gêneros: *Aplastodiscus* e *Hyla*; Espécies: *Aplastodiscus perviridis* B. Lutz, 1950 e *Hyla albopunctata* Spix, 1824.

O material testemunho foi fixado em formol a 10% por um período de uma semana e depois conservados em álcool etílico a 70%. Os exemplares foram identificados individualmente e encontram-se depositados no Museu de História Natural da UNICAMP (ZUEC), conforme relação na tabela 1.

Alguns exemplares de *H. albopunctata* provenientes do Morro do Ferro e do "Campus" da UNICAMP não foram depositados como material testemunho devido à sua manipulação intensiva para retirada da medula óssea.

Tabela 1. Identificações e procedência dos exemplares estudados  
(ZUEC = Museu de História Natural da UNICAMP; DBC =  
Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP).

Espécies	Localidades	Número ZUEC	Número DBC	
<u>A. perviridis</u>	Morro do Ferro	7535 - 7537	11.01 - 11.03	
		7544 - 7545	11.06 - 11.07	
		7547 - 7550	11.10 - 11.13	
		7579	11.50	
	Botucatu	7543	11.05	
		7551 - 7558	11.14 - 11.21	
		7574	11.42	
	Serra da Bocaina	7542	11.04	
		7564 - 7568	11.22 - 11.26	
		7570 - 7573	11.35 - 11.40	
	<u>H. albopunctata</u>	Morro do Ferro	----	19.01 - 19.02
			7546	19.11
			----	19.12 - 19.13
			----	19.20
			7580	19.28 - 19.29
----			19.40	
----			19.41	
UNICAMP		7538 - 7541	19.05 - 19.08	
		----	19.09 - 19.10	
		7569	19.30	
		----	19.31 - 19.32	
Botucatu		7559 - 7563	19.22 - 19.26	
	7575 - 7578	19.33 - 19.36		

Os animais DBC 19.01 - 19.02; 19.12 - 19.13; 19.20; 19.28 - 19.29; 19.41 de H. albopunctata do Morro do Ferro e 19.09 - 19.10 e 19.31 - 19.32 da UNICAMP foram descartados.

## 4 Métodos

### 4.1 Preparação do material

Animais adultos receberam por injeção intraperitoneal uma solução aquosa de colchicina (Merck) a 1% na dosagem de 0,02 ml por grama de peso animal, cerca de 4 horas antes de serem sacrificados. Após isto, e sob narcose por éter, os animais foram sacrificados, abertos longitudinalmente e então, removidos o intestino, o baço, o esôfago, as gônadas (OHNO *et alii*, 1964) e a medula (SCHMID, 1978).

### 4.2 Preparação das lâminas visando a obtenção de cromossomos metafásicos

#### 4.2.1 Por esmagamento de tecidos

Os órgãos foram cortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm, os quais foram submetidos à ação hipotônica da água destilada gelada por 20 minutos, fixados em solução de Carnoy por 15 minutos e, a seguir, transferidos para o ácido acético a 50% por 15 minutos. Após isso, os fragmentos foram esmagados diretamente emorceína lacto-acética ou colocados sobre as lâminas com ácido acético a 50% e picados com lâmina de barbear Gillete. Os excessos foram retirados e os fragmentos pressionados entre lâmina e lamínula (OHNO *et alii*, 1964). Após o congelamento do material em nitrogênio líquido, a lamínula foi retirada com o auxílio de uma lâmina de

barbear e o material secado à temperatura ambiente.

#### **4.2.2 A partir da suspensão celular**

##### **4.2.2.1 Do epitélio intestinal**

Segmentos de intestino com cerca de 1 cm de comprimento foram abertos longitudinalmente, a fim de expor o epitélio e colocados em uma placa de Petri com 5 ml de uma solução de citrato de sódio a 0,9% por 15 minutos. Logo após, o material foi transferido para outra placa de Petri contendo uma solução de metanol/ácido acético glacial na proporção de 3:1 e as células epiteliais da parte interna do intestino foram removidas, raspando-se vigorosamente. Após 5 minutos de fixação, este material foi transferido para tubos de centrifuga, suspenso com pipeta Pasteur e centrifugado a 500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado de células foi ressuspenso delicadamente em 3 ml do mesmo fixador. O processo da centrifugação era novamente repetido caso a suspensão de células não estivesse límpida.

Após este tratamento, 2 a 3 gotas do preparado foram pingadas sobre lâminas geladas umedecidas em água destilada ou aquecidas na chama do bico de Bunsen e secadas ao ar à temperatura ambiente (KING & ROFER, 1976).

##### **4.2.2.2 Dos órgãos tripsinizados**

Fragmentos de intestino, baço e esôfago foram colocados numa placa de Petri contendo solução de Ringer para anfíbios e picados com



lâmina de barbear Gillete. Após isso, o material foi transferido para tubos de centrifuga contendo tripsina a 1% em solução de Ringer, por 30 minutos. Parte do material foi deixada à temperatura ambiente e parte foi colocada na estufa a 37° C (SCHMID *et alii*, 1987; C. G. ALMEIDA, comunicação pessoal). Após este tratamento estes preparados foram suspensos com pipetas Pasteur e centrifugados duas vezes a 1100 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em 8 ml do fixador metanol/ácido acético glacial na proporção de 3:1, e guardado na geladeira por 12-14 horas.

No dia seguinte, procedeu-se a uma nova centrifugação para troca de fixador. As lâminas foram preparadas pingando-se duas a três gotas dessa suspensão sobre lâminas geladas umedecidas com água destilada ou sobre lâminas aquecidas na chama do bico de Bunsen, e secadas ao ar (KING & ROFER, 1976).

#### 4.2.2.3 Da medula óssea

Após o sacrifício do animal, os ossos longos das patas foram retirados e a medula óssea foi removida com auxílio de uma seringa contendo 10 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075 M, e deixada nessa solução por 1 hora à temperatura ambiente. Após isso, procedeu-se à pré-fixação da suspensão de células adicionando-se 6 gotas de metanol/ácido acético glacial gelado na proporção 3:1. Depois de 5 minutos foram adicionados 2 ml do fixador à suspensão e esta homogeneizada levemente com pipeta Pasteur. A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado foi levemente ressuscitado em fixador e deixado por duas horas (SCHMID, 1978).

Após este tratamento, as lâminas foram preparadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.2.1.

### 4.3 Colorações utilizadas

#### 4.3.1 Orceína lacto-acética

Fragmentos de intestino, esôfago, baço e testículo foram colocados sobre lâmina com 1 a 2 gotas de orceína lacto-acética, picados com lâmina de barbear Gillete, deixados corar por 30 minutos e então esmagados entre lâmina e lamínula, sendo as lâminas seladas com esmalte de unha para posterior análise.

#### 4.3.2 Giemsa

Tanto os preparados obtidos por esmagamento de fragmentos de tecidos como os obtidos a partir das suspensões de células foram submetidos à hidrólise com HCl 1 N a 60° C durante 5 a 10 minutos (para o esmagamento das gônadas e os preparados de suspensão de células: 5 minutos; para os demais: 10 minutos). O tratamento hidrolítico foi interrompido com água destilada gelada, após o que as lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente.

Em seguida, os preparados foram corados com solução de Giemsa (Merck) a 2% em tampão fosfato 0,1 M a pH 6,8 por 30 minutos, lavados rapidamente em água destilada, secados à temperatura ambiente,

diafanizados em xilol por 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá.

#### 4.4 Exame do material

Todos os preparados foram analisados e fotografados com o auxílio de um fotomicroscópio Zeiss, utilizando-se filmes Panatomic-X (ASA 32) e Agfa Copex PAN (ASA 100).

As metáfases mitóticas foram analisadas quanto à morfologia dos cromossomos, tanto nos tecidos somáticos como nos germinativos. Os mesmos parâmetros foram também considerados para as metáfases I e II da meiose. As metáfases normais, bem como aquelas que apresentaram alterações cromossômicas foram selecionadas, marcadas, desenhadas ao microscópio e parte delas fotografadas.

As fotomicrografias foram utilizadas para documentação das alterações cromossômicas, montagem dos cariótipos e morfometria.

#### 4.5 Montagem dos cariótipos e análise morfométrica

O cariótipo de *A. perviridis* foi montado parcando-se os cromossomos homólogos que foram recortados das fotomicrografias e dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Para análise morfométrica dos cromossomos foram feitas medidas dos tamanhos relativos, índices centroméricos e relação de braço de cada cromossomo, obtidos diretamente de ampliações fotográficas de pelo menos 5 metáfases completas de cada um dos indivíduos (BEÇAK, 1967).

O tamanho relativo do cromossomo (TR), expresso em porcentagem, é a proporção entre o tamanho absoluto do cromossomo individual (TI) em relação ao tamanho total dos cromossomos de um complemento haplóide (TT):

$$TR = \frac{TI \times 100}{TT(n)}$$

O índice centromérico (IC) indica a posição do centrômero e é obtido pela proporção do braço menor (Bm) com o tamanho absoluto do cromossomo:

$$IC = \frac{Bm}{TI}$$

A relação de braços (RB) é função do centrômero, e é obtido pela razão do comprimento dos braços maiores (BM) do cromossomo pelos braços menores:

$$RB = \frac{BM}{Bm}$$

Foram convenencionados por BEÇAK (1967) os seguintes valores para a classificação dos cromossomos:

Morfologia	Relação dos Braços	índice centromérico
Acrocêntricos	$RB \geq 4$	$IC \leq 0,2$
Submetacêntricos	$4 \geq RB \geq 1,5$	$0,4 \geq IC \geq 0,2$
Metacêntricos	$RB \leq 1,5$	$IC \geq 0,4$

Os tamanhos relativos dos cromossomos e os índices centroméricos foram ainda utilizados para construção dos idiogramas.

## 4.6 Análise estatística

Para o cálculo das médias, desvios padrões, análises de variâncias e teste de SCHEFFÉ, os dados foram normalizados pela transformação angular de FISHER ( $\text{arc sen } \sqrt{\cdot}$ ). Para tanto foi utilizado o pacote SOC da EMBRAPA, versão 1.01, instalado em microcomputador IBM-PC compatível SCOPUS, no Laboratório de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação (IMECC) da Universidade Estadual de Campinas.

## 5 Resultados

### 5.1 Cariótipos

#### 5.1.1 *H. albopunctata*

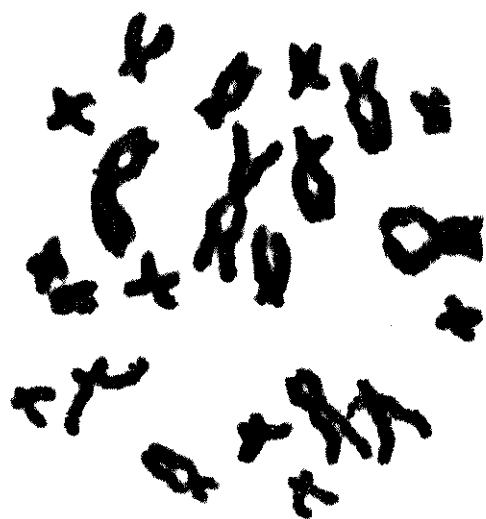
A análise das metáfases de vários exemplares desta espécie mostrou que os cariótipos dos indivíduos coletados nas localidades do Morro do Ferro, de Campinas e de Botucatu são semelhantes entre si (Figuras 10, 11 e 12). Os três cariótipos apresentados de exemplares de cada região exibem  $2n = 22$  cromossomos, com os pares 1, 7, 9 e 10 metacêntricos e os demais submetacêntricos. Nas figuras 11C e D, 12C e D, e 13C e D são mostradas as metáfases meióticas I e II, confirmando o número  $2n = 22$  cromossomos uma vez que exibem 11 bivalentes anelares na meiose I, indicando a presença de dois quiasmas terminais e portanto a ocorrência de pelo menos dois *crossing-over*.

#### 5.1.2 *A. perviridis*

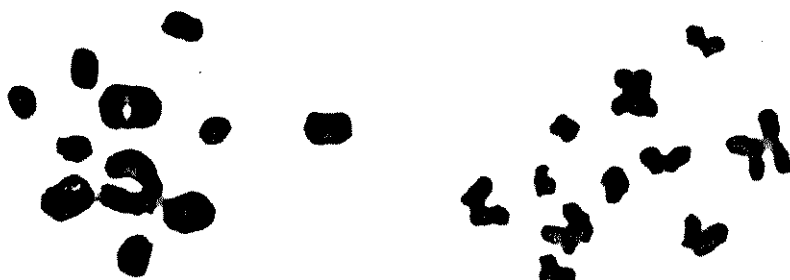
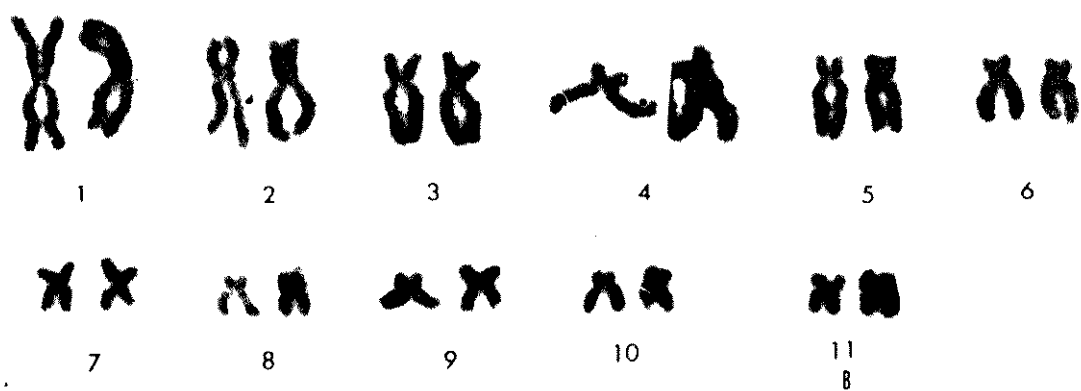
Foi determinada a constituição cromossômica de *A. perviridis* procedente do Morro do Ferro, Serra da Bocaina e Botucatu. O complemento diplóide da espécie é de 24 cromossomos (Figuras 13, 14 e 15). Os 12 pares cromossômicos, distribuídos nos cariótipos (Figuras 13 a 15) e no idiograma (Figura 16) em um gradiente de tamanho, são apresentados em ordem decrescente. As metáfases em meiose I (Figuras 13C, 14C e 15C) mostram os 12 bivalentes, sendo todos anelares, indicando a presença de quiasmas terminais. As metáfases em meiose II (Figuras 13D, 14D e 15D)

mostram os 12 cromossomos filhos.

Na tabela 2 estão sumarizadas as medidas do tamanho relativo, relação dos braços e índice centromérico. Cada par cromossômico foi classificado quanto à posição do centrômero baseado nos parâmetros citados anteriormente. Os dados apresentados na tabela 2 foram também utilizados para construção dos idiogramas. Os pares cromossômicos 1, 8, 9, 10, 11 e 12 apresentaram-se metacêntricos e os pares 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são submetacêntricos (Tabela 2, Figura 16). O par cromossômico maior, o número 1, representa 16,0% do genoma, enquanto o menor, o par 12, apenas 4,0%. Os dados obtidos para todos os parâmetros analisados foram muito semelhantes entre os indivíduos das três localidades para todos os cromossomos analisados (Tabela 2).



A



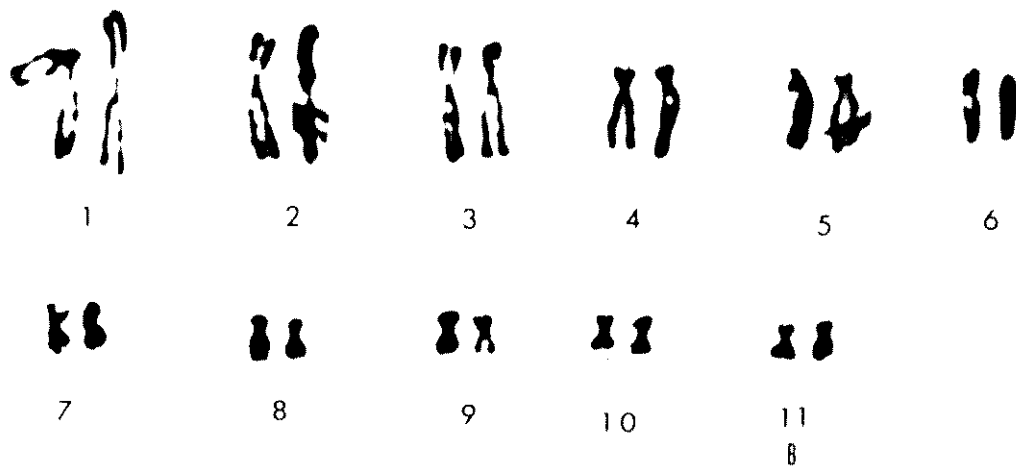
C

D

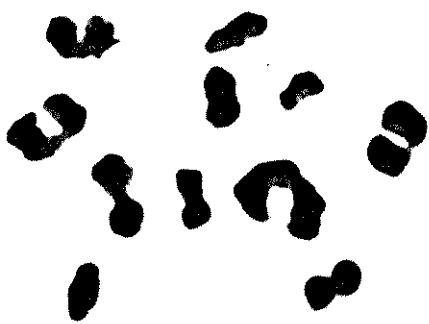




A



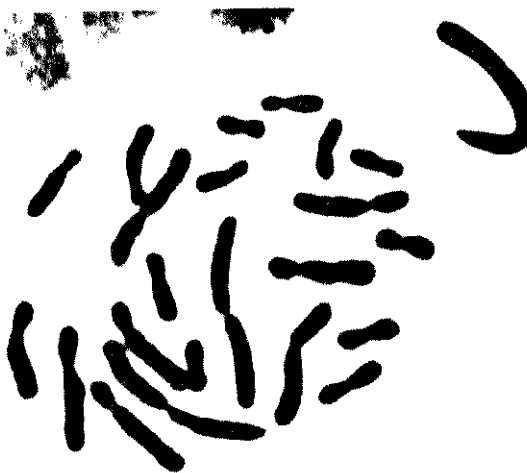
B



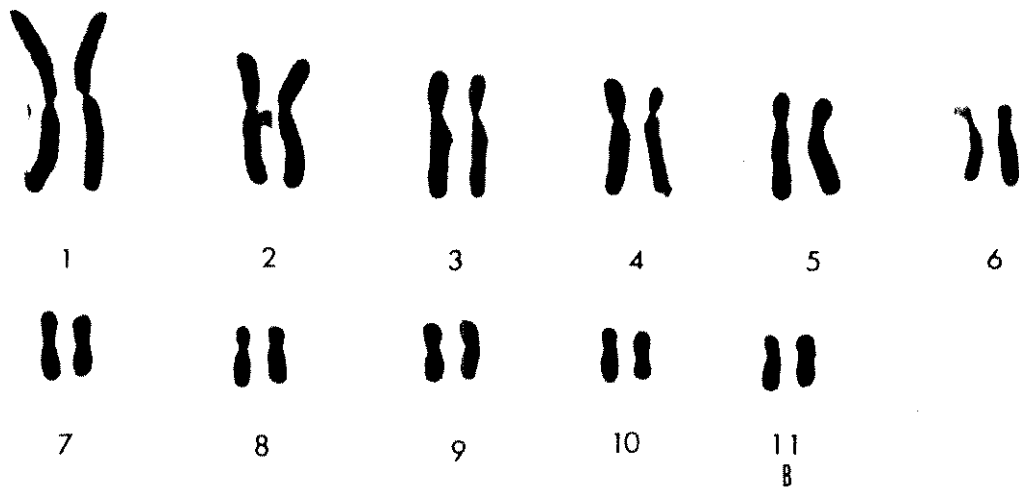
C



D



A



B

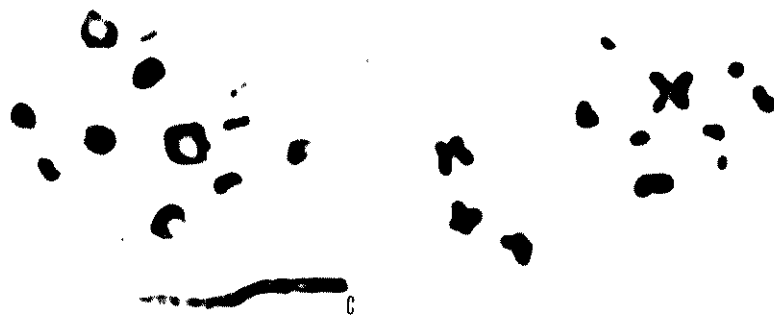
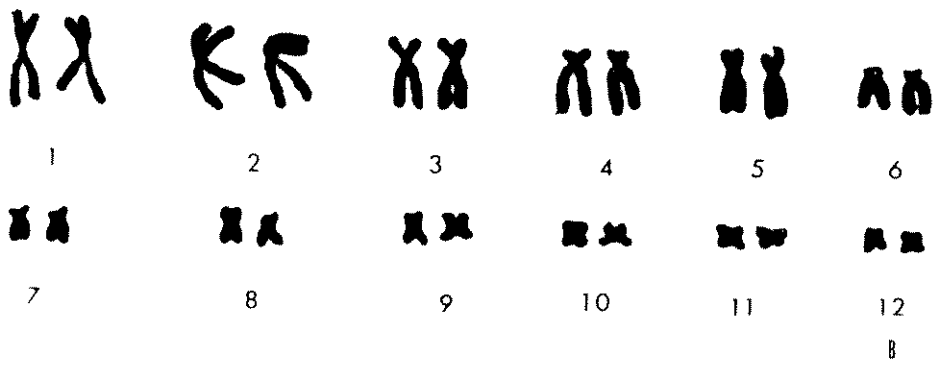


C

D



A

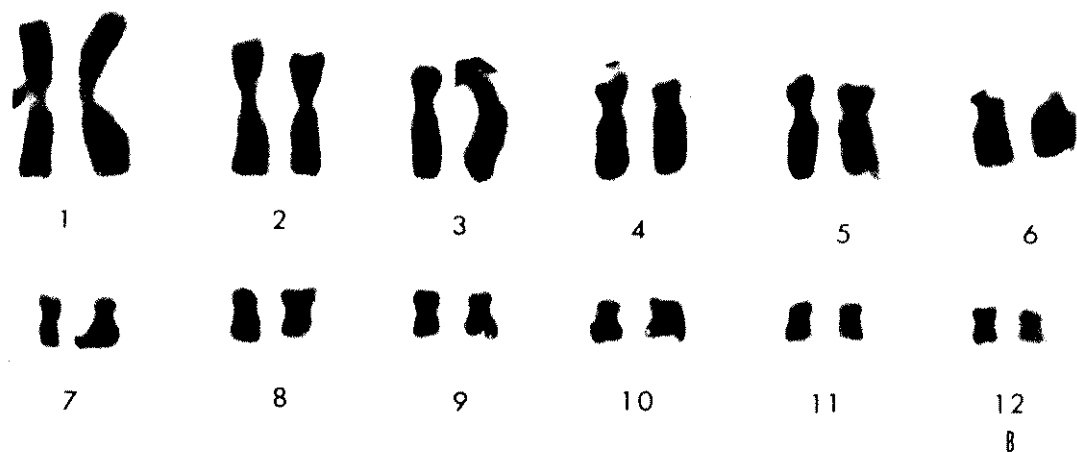


C

D



A



B

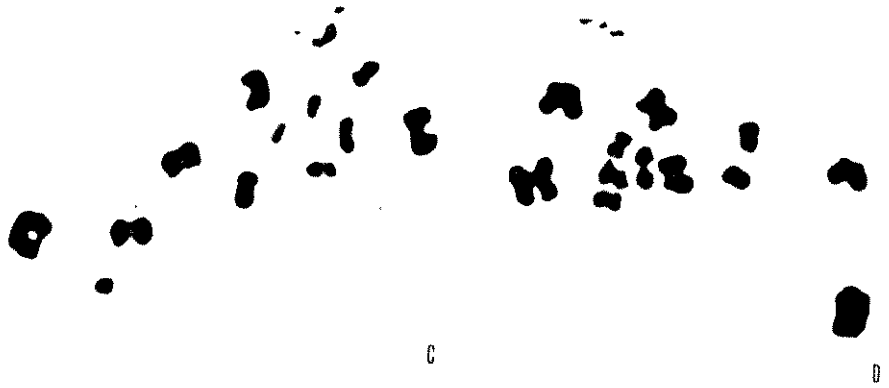
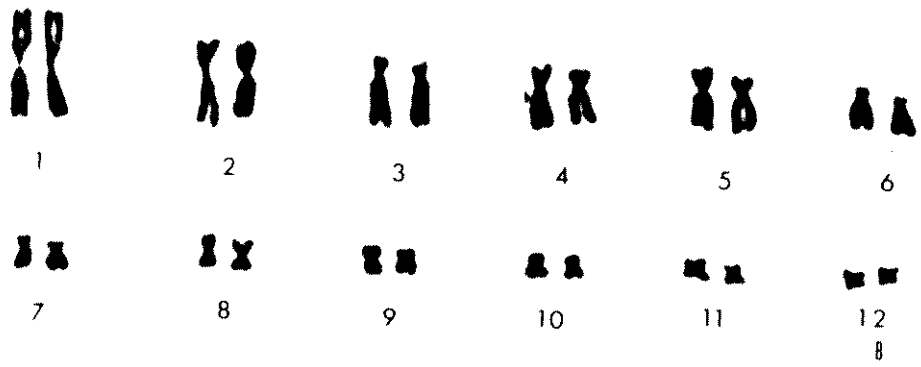


C

D



A



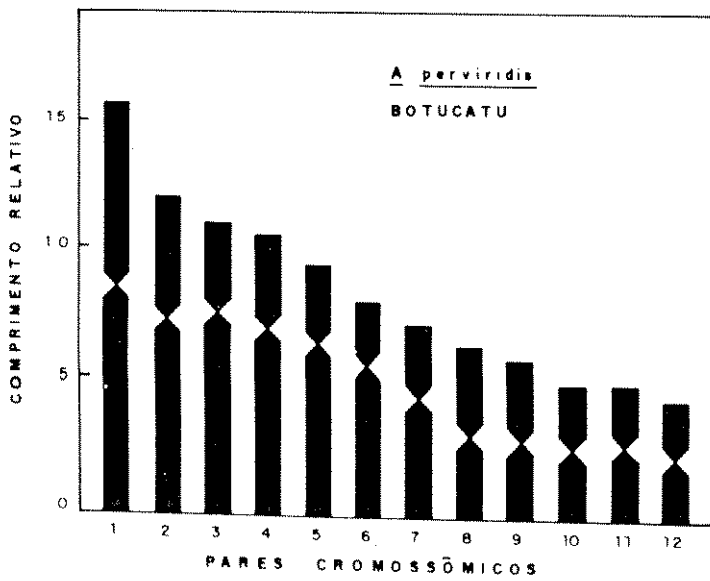
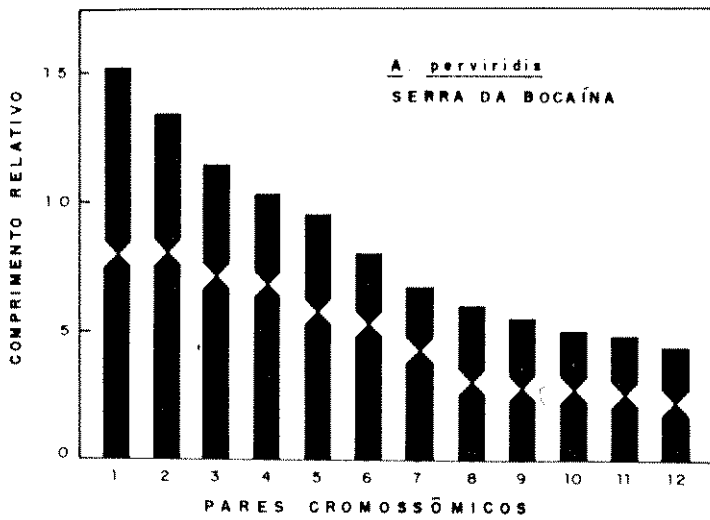
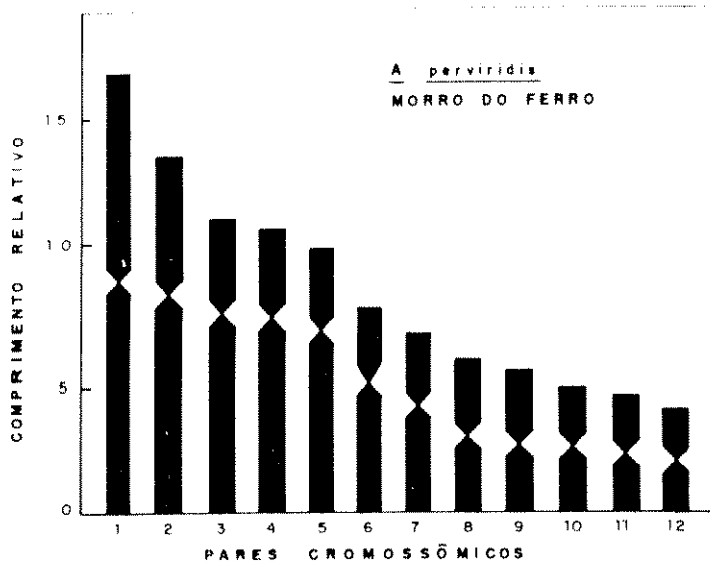
C

D

**Tabela 2.** Médias e desvios padrões das medidas cariotípicas de *A. peruviana* procedentes do Morro do Ferro (MF), Serra da Bocaina (SB) e Botucatu (BT). TR = tamanho relativo (X); RB = razão dos braços; IC = índice centromérico; PC = posição do centrômero; M = metacêntrico; SM = submetacêntrico.

Parâmetros/ Localidades	Números de pares cromossômicos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TR (X)	MF	16,8 ± 0,32	13,4 ± 0,95	10,9 ± 0,77	10,5 ± 0,81	9,7 ± 0,73	7,4 ± 0,51	6,5 ± 0,48	5,6 ± 0,43	5,3 ± 0,37	4,8 ± 0,47	4,5 ± 0,38	4,0 ± 0,23
	SB	15,2 ± 0,48	13,4 ± 0,29	11,4 ± 0,25	10,3 ± 0,22	9,5 ± 0,22	8,0 ± 0,16	6,7 ± 0,15	6,0 ± 0,24	5,5 ± 0,14	5,0 ± 0,08	4,8 ± 0,11	4,3 ± 0,12
	BT	15,7 ± 0,55	12,0 ± 0,97	11,0 ± 0,91	10,5 ± 0,82	9,4 ± 0,83	8,0 ± 0,68	7,1 ± 0,62	6,3 ± 0,60	5,8 ± 0,47	5,0 ± 0,50	4,9 ± 0,41	4,4 ± 0,47
RB	MF	1,3 ± 0,13	1,5 ± 0,20	2,0 ± 0,87	2,0 ± 0,48	2,0 ± 0,46	2,2 ± 0,51	1,8 ± 0,44	1,4 ± 0,32	1,3 ± 0,19	1,3 ± 0,19	1,2 ± 0,27	1,3 ± 0,22
	SB	1,0 ± 0,13	1,5 ± 0,16	1,7 ± 0,69	2,0 ± 0,86	1,6 ± 0,27	2,0 ± 0,58	1,6 ± 0,35	1,2 ± 0,22	1,3 ± 0,53	1,4 ± 0,50	1,3 ± 0,46	1,3 ± 0,46
	BT	1,0 ± 0,08	1,5 ± 0,15	2,0 ± 0,76	1,9 ± 0,28	1,9 ± 0,42	2,4 ± 0,67	1,7 ± 0,32	1,4 ± 0,38	1,5 ± 0,27	1,5 ± 0,23	1,2 ± 0,23	1,1 ± 0,19
IC	MF	0,49 ± 0,05	0,40 ± 0,03	0,33 ± 0,08	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,44 ± 0,09	0,48 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,48 ± 0,05	0,47 ± 0,08
	SB	0,48 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,37 ± 0,07	0,34 ± 0,07	0,39 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,48 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,06	0,48 ± 0,07
	BT	0,46 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,40 ± 0,06	0,49 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,47 ± 0,04
PC	MF	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
	SB	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
	BT	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M

**Figura 16.** Idiogramas elaborados a partir dos dados sumarizados na tabela 2, para as três populações de *A. peritridis* analisadas.





## 5.2 Alterações cromossômicas estruturais

Os tipos de alterações estruturais encontradas nas metáfases mitóticas dos indivíduos de *A. perviridis* e *H. albopunctata* provenientes do Morro do Ferro, Serra da Bocaina, Botucatu e UNICAMP estão representados esquematicamente na figura 17 e documentados nas figuras 18 a 57. Essas alterações foram agrupadas e classificadas como:

**compactação** : parcial em um braço; parcial nos dois braços; telomérica em um e nos dois braços; e centromérica (Figuras 17 a 19, 21 a 23, 25, 28, 38, 52 e 54 a 57):

**descompactação** : parcial em um e nos dois braços; telomérica; e centromérica (Figuras 17, 19 a 24, 37, 39, 40, 41, 43, 45, 47 a 51 e 57);

**quebras** : cromatídicas e isocromatídicas ou cromossômicas (Figuras 17, 18, 26 a 28, 45, 49, e 57);

**falhas** : cromatídicas e isocromatídicas ou cromossômicas (Figuras 17, 26, 44, 46 e 56);

**deleção** : cromatídica de um braço longo; isocromatídica ou cromossômica dos dois braços longos; e parcial (Figuras 17, 40, 42, 43 e 46);

**fragmentos acêntricos** : (Figuras 17, 26, 30, 32, 35, 36, 38, 40, 43 e 53);

**cromossomo dicêntrico** : (Figuras 17 e 29).

Para a distinção entre as alterações dos tipos quebras e falhas foi adotada a classificação proposta por BEIGUELMANN (1982). Em *H. albopunctata* notou-se também, embora não tenha sido feita uma análise da frequência, a presença de cromossomos com aspecto "espiralado", em geral associado àquelas metáfases que apresentaram cromossomos com diversos graus de descompactação ao longo de suas cromátides (Figuras 20, 26, 47 e 55) e com separação de cromátides apresentando quebra longitudinal na região centromérica (Figuras 27, 31, 32 e 54). Isto ocorreu especialmente nos animais provenientes do Morro do Ferro e em menor grau nos de Campinas.

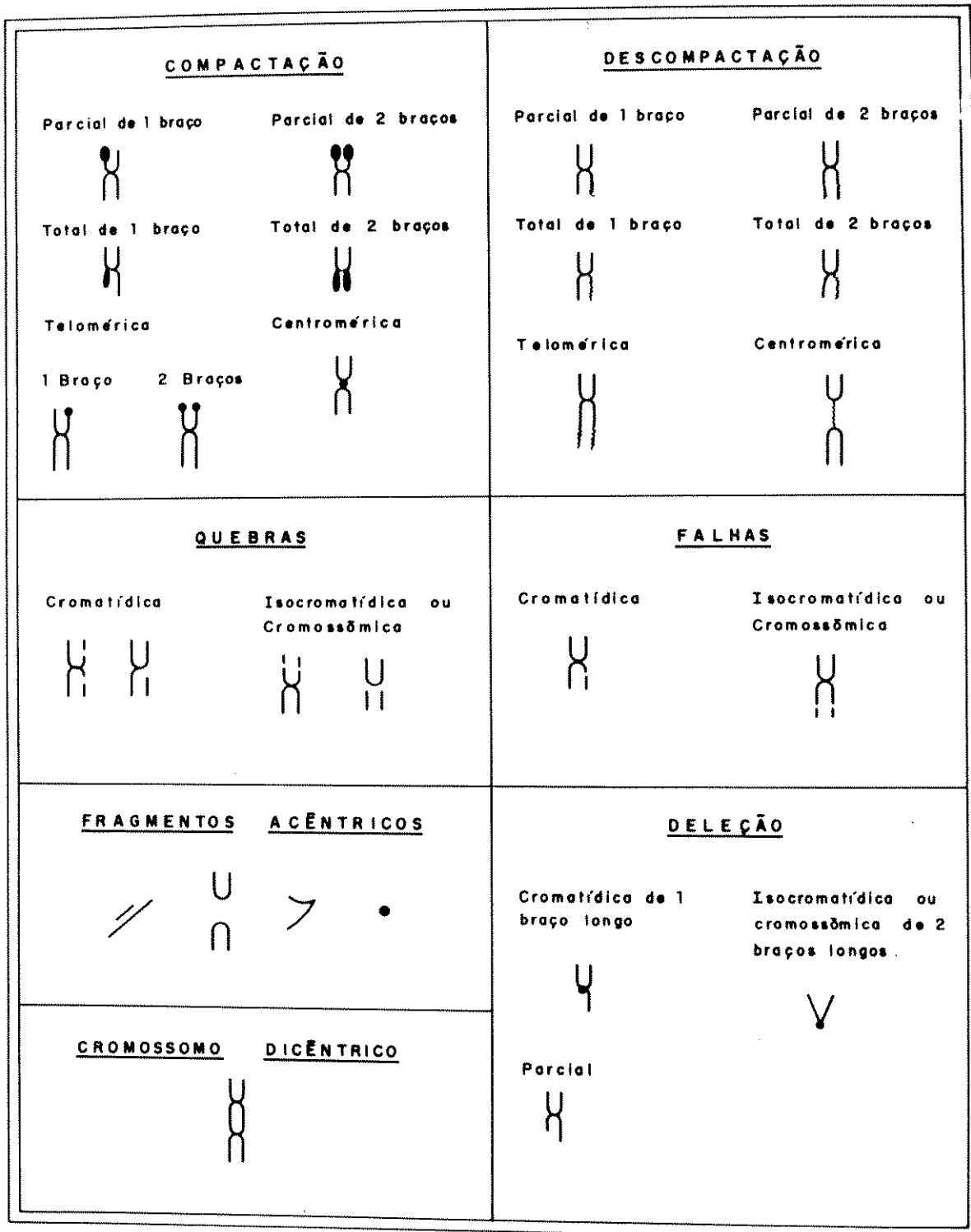
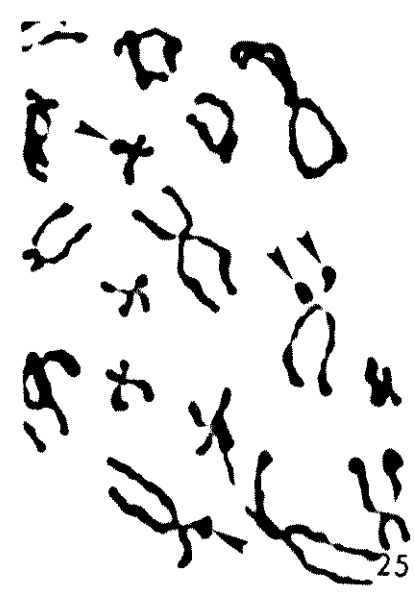
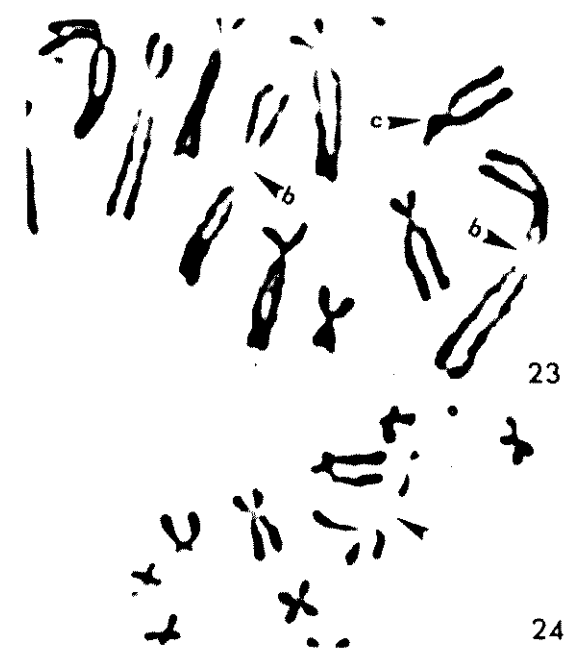
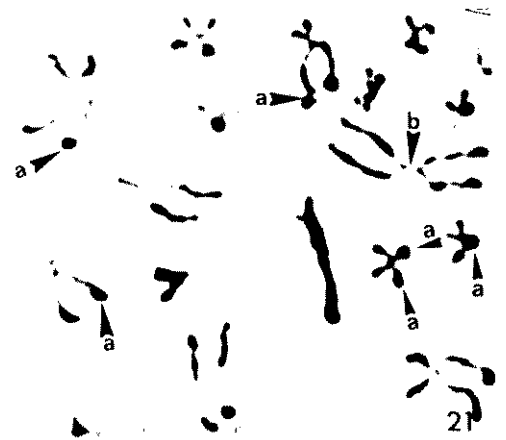
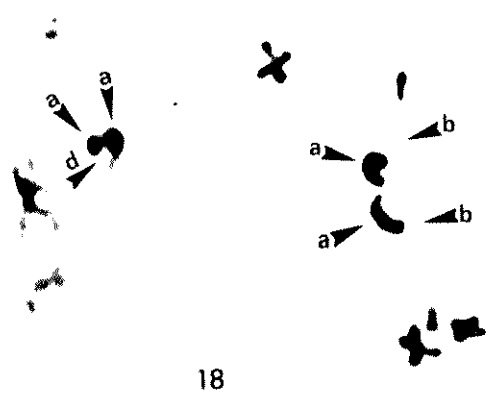
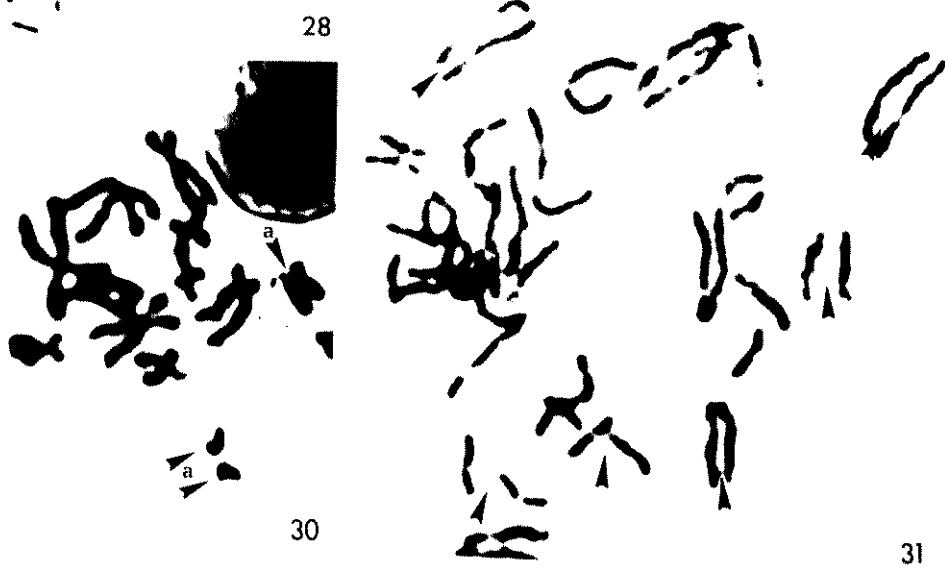
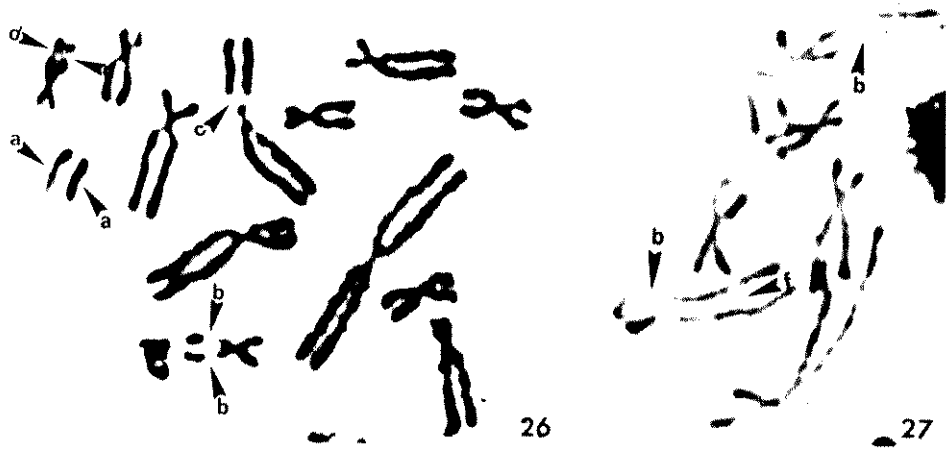
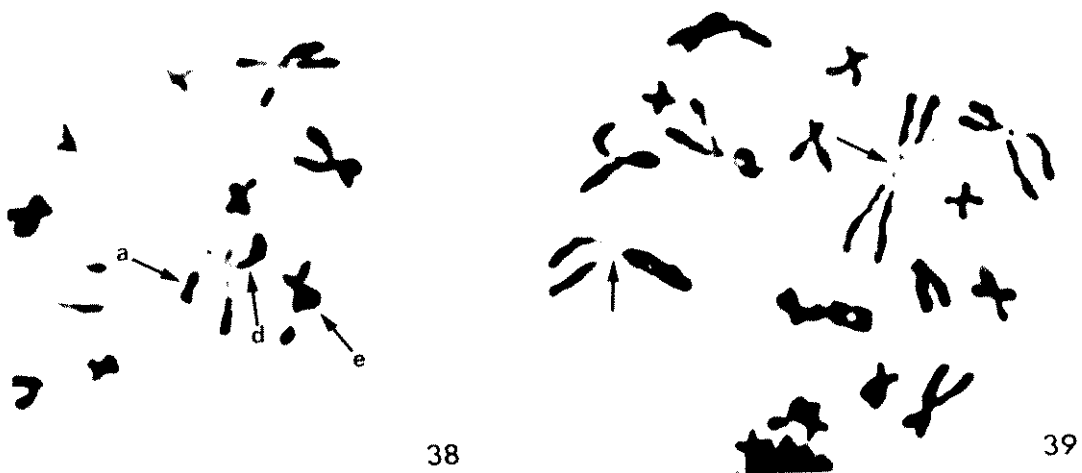
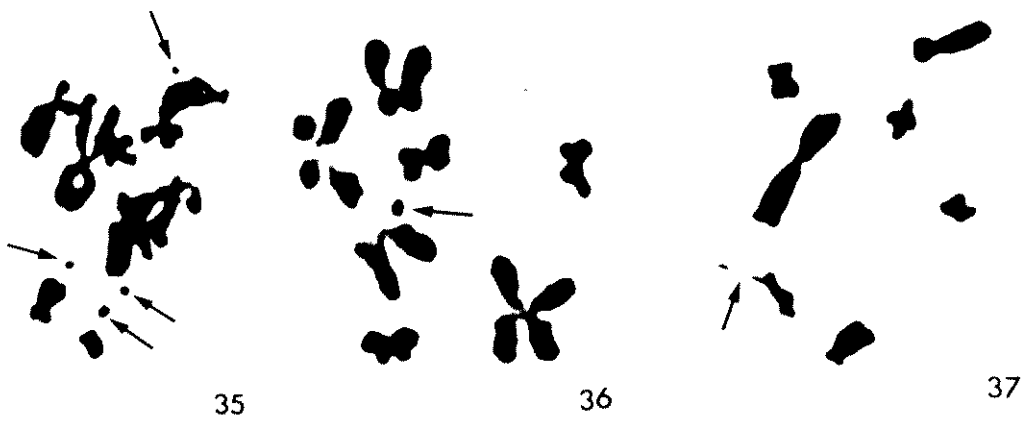
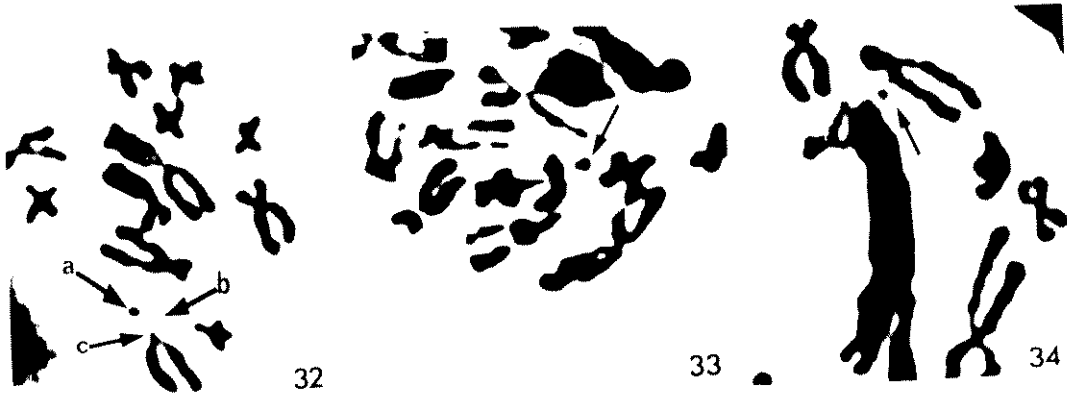


Figura 17. Representação esquemática dos tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas nas metáfases mitóticas dos indivíduos de *A. perviridis* e *H. albopunctata*.



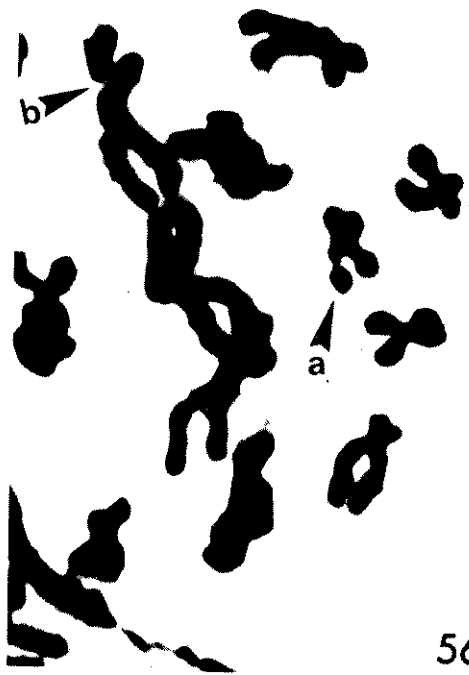
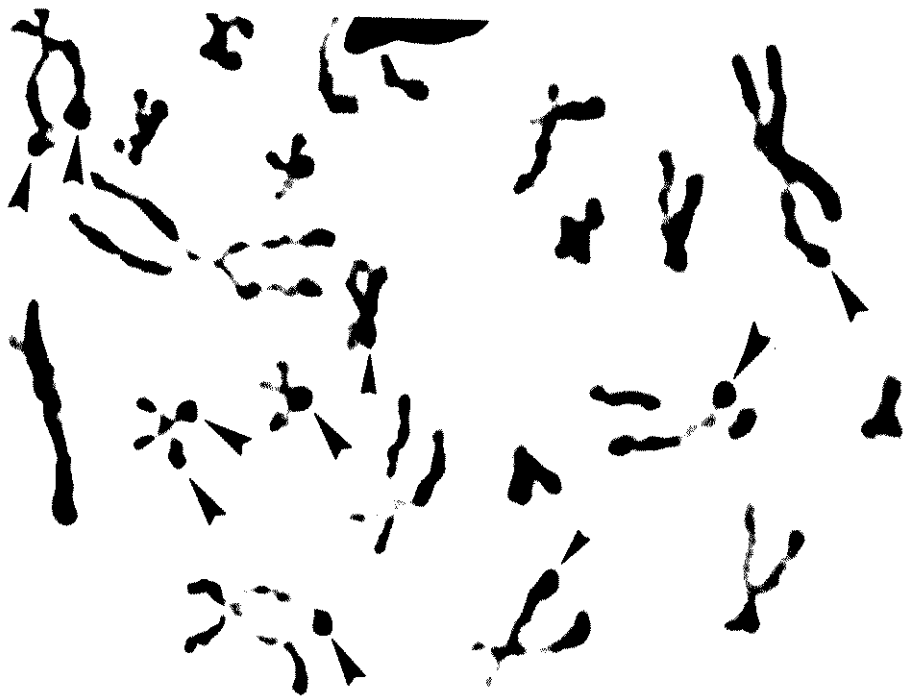












Na tabela 3 encontram-se os números de alterações cromossômicas para cada um dos tipos mencionados anteriormente, para as duas espécies estudadas. Pode-se observar que os 10 indivíduos analisados de *A. perviridis* do Morro do Ferro apresentaram um número notável de deleções parciais (108) e de fragmentos acêntricos (123). Por outro lado, não foi encontrado nenhum cromossomo dicêntrico ou cromossomo com descompactação telomérica em um ou nos dois braços cromossômicos. Nos controles de *A. perviridis* provenientes da Serra da Bocaina foram constatadas alterações que, além de serem em menor número, estavam restritas a alguns tipos específicos, sendo que as deleções parciais (6) e os fragmentos acêntricos (4) apareceram em maior número. Nos indivíduos controle da região de Botucatu destacou-se em maior número, apenas a presença de fragmentos acêntricos (13).

Em *H. albopunctata* proveniente do Morro do Ferro destacaram-se as alterações dos tipos: deleção parcial (135), fragmento acêntrico (53), deleção cromatídica (35), quebra cromatídica (32) e cromossomo com compactação parcial em um braço (20). Constatou-se também a presença de um cromossomo dicêntrico. Não foram detectados cromossomos com descompactação total nos dois braços, falhas cromatídicas e deleções isocromatídicas. Para os indivíduos da UNICAMP, surpreendentemente, observou-se um número maior de alterações do que em qualquer outro controle pela presença de deleções parciais (82), fragmentos acêntricos (41), quebras cromatídicas (11) e cromossomos com descompactação parcial em um braço (11). Nos indivíduos de Botucatu, as deleções parciais (13), deleções cromatídicas (9) e compactações teloméricas em um braço (8) foram as alterações que ocorreram com maior frequência (Tabela 3).

Analisando-se os totais referentes à soma das alterações encontradas por tipo nas duas espécies verifica-se que as deleções parciais (344) e os fragmentos acêntricos (235) ocorreram em maior número, seguidos pelas

deleções e quebras cromatídicas (65) e isocromatídicas (20), cromossomos com compactação telomérica em um e nos dois braços (34 e 39), parcial e total em um braço (36 e 20), cromossomos com descompactação parcial em um braço (28) e centromérica (20). Não foram detectados cromossomos em anel (Tabela 3).

Para verificar se algum método de preparo do material promoveu a obtenção de maior número de alterações do que os outros, uma comparação entre eles foi efetuada (Tabela 4). Os dados sugerem que os percentuais de metáfases alteradas foram semelhantes, apesar de não ter sido realizada a análise estatística.

Os dados apresentados na tabela 5 indicaram um maior número de metáfases com alterações em intestino e testículo onde se sabe que o índice mitótico é alto, e bem menor para medula óssea. No esôfago e baço não foi observada nenhuma metáfase alterada entre as poucas encontradas e analisadas. Apenas para *H. albopunctata* da UNICAMP a porcentagem observada foi maior em intestino (5,8%) do que em testículo (2,4%).

De forma geral encontram-se sumarizados na tabela 6 os resultados totais obtidos para as duas espécies estudadas quanto ao número e as frequências percentuais de metáfases mitóticas e meióticas analisadas que se apresentaram com alguma alteração. Nos animais provenientes do Morro do Ferro, 10,4% das 2.367 metáfases de *A. perviridis* e 10,5% das 2.201 metáfases de *H. albopunctata* apresentaram alguma alteração cromossômica, enquanto nos controles provenientes de Botucatu foram identificadas respectivamente para cada espécie 0,7% e 0,8%, e nos da Serra da Bocaina também 0,8%. Por outro lado, surpreendentemente, os animais coletados na UNICAMP apresentaram 3,3% de alterações.

Tabela 3. Número de alterações cromossômicas encontrados em *A. perviridis* e *H. albopunctata* provenientes do Morro do Ferro (MF), Serra da Bocaina (SB), Botucatu (BT) e "Campus" da UNICAMP (UNI).  
 P = parcial; T = total; B = braço; Te = telomérica; Ct = centromérica; Cr = cromatídica e Iso = isocromatídica.

Espécies	Local	Número de indivíduos analisados	Total de metafases analisadas	Compactação												Descompactação												Total de alterações	
				Te						Te						Te						Te							
				P1B	P2B	T1B	T2B	1B	2B	Ct	P1B	P2B	T1B	T2B	1B	2B	Ct	Cr	Iso	Cr	Iso	Cr	Iso	Cr	Iso	Cr	Iso		Cr
<i>A. perviridis</i>	MF	10	2.367	10	8	5	11	7	14	2	2	8	4	4	3	-	12	20	11	6	6	4	4	12	20	108	123	-	392
	SB	10	2.149	-	2	-	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	6	4	-	22
	BT	10	2.649	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	13	-	14
<i>H. albopunctata</i>	MF	10	2.281	20	8	12	3	11	17	8	9	1	3	-	3	3	3	32	1	-	-	1	35	-	135	53	1	361	
	UNI	09	2.271	5	-	3	-	6	3	6	11	2	-	-	-	-	4	11	8	-	-	-	9	-	82	41	-	191	
	BT	09	2.736	1	-	-	-	8	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	9	-	9	-	13	1	-	36
Total		58	14.373	36	18	20	16	34	39	18	28	7	7	3	3	3	5	20	65	20	7	5	65	20	344	235	1	1016	

**Tabela 4.** Número de metáfases com alterações por método de preparo de lâminas de A. perviridis e H. albopunctata provenientes do Morro do Ferro (MF); Serra da Bocaina (SB); Botucatu (BT) e "Campus" da UNICAMP (UNI).

Espécies	Local	Número de indivíduos analisados	Esmagamento		Suspensão de células		Número total de metáfases analisadas/ metáfases com alterações por método	
			Medula Ossea	Epitélio Intestinal	Fragmentos de intestino tripsinizados	37° C		
<u>A. perviridis</u>	MF	10	1.610/169 (10,50)	--	304/31 (10,20)	203/20 (9,85)	250/25 (10,00)	
	SB	10	1.245/10 (0,80)	--	313/2 (0,63)	236/2 (0,84)	355/3 (0,84)	
	BT	10	1.609/10 (0,62)	--	420/4 (0,95)	315/2 (0,63)	305/3 (0,98)	
<u>H. albopunctata</u>	MF	10	1.378/116 (8,42)	143/17 (11,90)	222/26 (11,71)	203/24 (11,82)	255/48 (18,82)	
	UNI	9	2.271/74 (3,26)	--	--	--	--	
	BT	9	1.589/10 (0,63)	--	453/1 (0,22)	312/1 (0,32)	382/11 (2,88)	

( ) = número percentual de metáfases alteradas.

Tabela 5. Número de metáfases com alterações por órgão e tecidos estudados de A. perviridis e H. albopunctata provenientes do Morro do Ferro (MF); Serra da Bocaina (SB); Botucatu (BT) e "Campus" da UNICAMP (UNI).

Espécies	Local	Número de indivíduos analisados	Número total de metáfases analisadas/ número de metáfases com alterações					
			Intestino	Testículo	Medula Ossea	Esôfago	Baço	
<u>A. perviridis</u>	MF	10	1.335/150 (11,23)	935/95 (10,16)	--	62/0 (0,0)	35/0 (0,0)	
	SB	10	1.153/12 (1,04)	941/5 (0,53)	--	35/0 (0,0)	20/0 (0,0)	
	BT	10	1.062/11 (1,03)	1.530/8 (0,52)	--	25/0 (0,0)	32/0 (0,0)	
<u>H. albopunctata</u>	MF	10	758/110 (14,51)	899/114 (12,68)	385/7 (1,81)	89/0 (0,0)	70/0 (0,0)	
	UNI	9	635/37 (5,82)	1.515/37 (2,44)	--	76/0 (0,0)	45/0 (0,0)	
	BT	9	1.135/5 (0,44)	1.423/18 (1,26)	--	90/0 (0,0)	88/0 (0,0)	

( ) = número percentual de metáfases alteradas.

**Tabela 6.** Totais de metáfases com alterações cromossômicas estruturais em A. perviridis e H. albopunctata das diversas regiões analisadas. MF = Morro do Ferro; SB = Serra da Boçaina; BT = Botucatu; UNI = "Campus" da UNICAMP; M = metáfases meióticas; F = frequência (%).

Espécies	Local	Número de indivíduos analisados	Metáfases analisadas							
			Mitóticas		Meióticas (MI e MII)		Totais			
			Total alterações	Com F	Total alterações	Com F	Total alterações	Com F		
<u>A. perviridis</u>	MF	10	1585	245	15,5	782	0	2367	245	10,4
	BT	10	1491	19	1,3	1158	0	2649	19	0,7
	SB	10	1392	17	1,2	757	0	2149	17	0,8
<u>H. albopunctata</u>	MF	10	1359	231	17,0	842	0	2201	231	10,5
	BT	09	1527	23	1,5	1209	0	2736	23	0,8
	UNI	09	1222	74	6,1	1049	0	2271	74	3,3

Nenhuma alteração foi detectada nos cromosomos das duas espécies estudadas, tanto na primeira como na segunda divisão meiótica. Assim sendo, as freqüências percentuais mostradas na tabela 6 dizem respeito às metáfases mitóticas. Se considerarmos apenas essas células no cálculo da freqüência das alterações verifica-se que *A. perviridis* e *H. albopunctata* do Morro do Ferro apresentaram 15,5% e 17,0% de suas metáfases alteradas em contrapartida a Botucatu, com 1,3% e 1,5%, respectivamente. No controle de *A. perviridis* da Serra da Bocaina detectou-se também uma freqüência baixa de 1,2%, enquanto no de *H. albopunctata* da UNICAMP, diferentemente dos outros três controles, foi de 6,1%.

Da análise de um total de 2.367 metáfases mitóticas e meióticas dos 10 indivíduos de *A. perviridis* do Morro do Ferro, verificou-se a presença de 135 metáfases mitóticas com uma alteração e 110 com duas ou mais alterações (Tabela 7). Por outro lado, nos controles o número de alterações foi bem menor em ambos os casos. Das 2.649 metáfases dos animais de Botucatu que foram analisadas, apenas 19 apresentaram alterações, sendo 9 metáfases com uma alteração e 10 com duas ou mais tipos. Nos animais da Serra da Bocaina, os resultados foram muito parecidos, pois dentre 2.149 metáfases apenas 17 continham alguma alteração, sendo que em 11 delas ocorreram apenas uma e em 6 duas ou mais (Tabelas 8 e 9).



Tabela 7. Análise cromossômica de *A. peruviridis* proveniente do Morro do Ferro. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Número dos indivíduos analisados		Metáfases analisadas																	
		Total					Com alterações estruturais					Total							
		Mt. mitóticas		Mt. meióticas			Com uma		Duas ou mais			Geral	Com alter.	F (%)					
S	t	T	I	II	T	S	t	T	MieII	T	S	t	T	MieII	T	Geral	Com alter.	F (%)	
11.1	122	20	142	110	39	149	10	5	15	0	0	5	10	15	0	0	291	30	10,3
11.2	60	43	103	51	60	111	5	5	10	0	0	5	1	6	0	0	214	16	7,5
11.3	50	56	106	41	24	65	2	2	4	0	0	5	2	7	0	0	171	11	6,4
11.6	92	30	122	41	22	63	13	5	18	0	0	5	5	10	0	0	185	28	15,1
11.7	50	64	114	17	24	41	16	2	18	0	0	12	4	16	0	0	155	34	21,9
11.10	56	48	104	35	12	47	5	2	7	0	0	3	2	5	0	0	151	12	7,9
11.11	25	86	111	20	48	68	7	6	13	0	0	2	6	8	0	0	179	21	11,7
11.12	20	175	195	56	49	105	1	3	4	0	0	1	8	9	0	0	300	13	4,3
11.13	274	50	324	21	19	40	25	5	30	0	0	10	5	15	0	0	364	45	12,4
11.50	95	169	264	70	23	93	8	8	16	0	0	2	17	19	0	0	357	35	9,8
Totais	844	741	1585	462	320	782	92	43	135	0	0	50	60	110	0	0	2367	245	10,4

**Tabela 8.** Análise cromossômica de *A. perviridis* da região de Botucatu. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Número dos indivíduos analisados	Metáfases analisadas													Total				
	Total			Com alterações estruturais			Total			Total								
	Mt. mitóticas			Com uma			Duas ou mais			Geral			Com alter. (%)					
S	t	T	S	t	T	MieII	T	S	t	T	MieII	T	Geral	Com alter.	F (%)			
11.05	57	50	107	13	10	23	2	0	0	0	0	0	1	0	0	130	3	2,3
11.14	68	72	140	21	8	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	169	0	0,0
11.15	92	46	138	96	15	111	1	0	0	0	0	0	2	0	0	249	3	1,2
11.16	52	75	127	12	23	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	162	0	0,0
11.17	75	31	106	15	22	37	1	0	0	0	0	0	1	0	0	143	2	1,4
11.18	69	55	124	26	18	44	0	1	0	0	0	0	0	1	0	168	2	1,2
11.19	85	105	190	42	20	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	252	0	0,0
11.20	117	126	243	458	25	483	2	0	0	0	0	0	2	0	0	726	4	0,5
11.21	88	42	130	168	68	236	1	1	0	0	0	0	2	1	0	366	5	1,4
11.42	74	112	186	43	55	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	284	0	0,0
Totais	777	714	1491	894	264	1158	7	2	0	0	0	0	8	2	10	2649	19	0,7

**Tabela 9.** Análise cromossômica de *A. perviridis* da Serra da Bocaina. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Número dos indivíduos analisados	Metáfases analisadas														Total		
	Com alterações estruturais														Total		
	Com uma				Duas ou mais				Geral		Com alter.		F (%)				
Mt. mitóticas		Mt. meióticas		Com uma		Duas ou mais		Geral		Com alter.		F (%)					
S	t	I	II	T	S	t	T	MieII	T	S	t	T	MieII	T	Geral	Com alter.	F (%)
11.4	58	42	100	4	2	6	1	0	0	1	0	1	0	0	106	2	1,9
11.22	33	281	314	139	50	189	0	4	0	1	1	2	0	0	503	6	1,2
11.23	56	76	132	5	10	15	1	0	0	0	0	0	0	0	147	1	0,7
11.24	33	80	113	20	18	38	1	0	0	0	1	1	0	0	151	2	1,3
11.25	20	88	108	153	65	218	0	2	0	0	1	1	0	0	326	3	0,9
11.26	51	70	121	14	16	30	0	0	0	0	0	0	0	0	151	0	0,0
11.35	60	50	110	41	24	65	1	0	0	0	0	0	0	0	175	1	0,6
11.38	30	72	102	35	25	60	0	0	0	0	0	0	0	0	162	0	0,0
11.39	43	75	118	21	15	36	1	0	0	0	1	1	0	0	154	2	1,3
11.40	50	124	174	70	30	100	0	0	0	0	0	0	0	0	274	0	0,0
Totais	434	958	1392	502	255	757	5	6	11	0	2	4	6	0	2149	17	0,8

Os resultados obtidos para *H. albopunctata* foram muito semelhantes aos de *A. perviridis*, tanto em relação aos animais provenientes do Morro do Ferro como aos de Botucatu. Os animais coletados na UNICAMP apresentaram uma frequência percentual relativamente maior que os demais controles, porém não confirmada pelo teste de SCHEFFÉ, embora bem inferior à do Morro do Ferro (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Nos animais controle de *A. perviridis* de Botucatu e da Serra da Bocaina ocorreu também uma certa variação do número de alterações encontradas nos indivíduos analisados, embora esta variação tenha sido bem inferior quando comparada à obtida para os animais do Morro do Ferro (Tabelas 7, 8, 9 e 13). A maior frequência de alterações (2,3%) foi encontrada para o indivíduo 11.05 de Botucatu (Tabela 8). Dados semelhantes foram encontrados para os indivíduos de *H. albopunctata* de Botucatu, com exceção do indivíduo 19.34, o qual apresentou uma frequência de metáfases alteradas maior (4,7%) em relação aos demais animais coletados na região (Tabela 11). No entanto, para os controles da UNICAMP, observou-se uma variação maior, desde um indivíduo (19.10) que não apresentou metáfases alteradas, até outro (19.32) em que a frequência de alterações foi de 14,9%. Este foi o único que apresentou uma frequência superior à menor frequência (7,2%) encontrada no Morro do Ferro. Foram constatados, ainda, dois indivíduos com frequências de 4,0% e 4,3%; um com 2,8% e dois com 2,4%. Estes indivíduos elevaram a frequência geral de metáfases alteradas para 3,3%, valor acima do encontrado nos outros controles (Tabela 12).

Foram analisadas um total de 2.201 metáfases de *H. albopunctata* do Morro do Ferro, 2.736 de Botucatu e 2.271 da UNICAMP, das quais respectivamente 121, 16 e 36 metáfases apresentaram uma alteração, e 110, 7 e 38 duas ou mais. Note-se que a elevação desse número de alterações nos animais da UNICAMP deveu-se principalmente a seis animais (19.05; 19.07; 19.08; 19.09; 19.30 e 19.32) (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

A análise de variância indicou serem estas diferenças entre os animais do Morro do Ferro e dos controles significativa ao nível de 1% (Tabela 13), o que foi confirmado pelo teste de SCHEFFÉ, utilizado para comparação das localidades duas a duas, para ambas as espécies.

Pôde-se notar, ainda, pelo cálculo das freqüências percentuais de alterações presentes nos indivíduos analisados (Tabelas 7 a 12) que ocorreram diferenças entre eles, sendo que para o Morro do Ferro houve uma variação de 4,3% a 21,9% nos indivíduos de *A. perviridis* (Tabela 7), e de 7,2% a 21,8% para *H. albopunctata* (Tabela 10).

Tabela 10. Análise cromossômica de *H. albopunctata* da região do Morro do Ferro. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Metáfases analisadas																		
Número dos indivíduos analisados	Com alterações estruturais																	
	Total																	
	Mt. mitóticas		Mt. meióticas		Com uma				Duas ou mais				Total					
S	t	T	I	II	T	S	t	T	MieII	T	S	t	T	MieII	T	Geral	Com alter.	F (%)
19.01	87	64	151	20	28	48	8	4	12	0	0	3	7	10	0	199	22	11,0
19.02	51	70	121	48	19	67	3	6	9	0	0	1	9	10	0	188	19	10,1
19.11	86	57	143	57	55	112	11	3	14	0	0	9	12	21	0	255	35	13,7
19.12	37	144	181	103	91	194	2	14	16	0	0	1	14	15	0	375	31	8,3
19.13	64	56	120	25	41	66	7	6	13	0	0	5	4	9	0	186	22	11,8
19.20	22	98	120	67	45	112	5	6	11	0	0	4	2	6	0	232	17	7,3
19.28	72	42	114	41	43	84	7	2	9	0	0	7	1	8	0	198	17	8,6
19.29	77	44	121	32	17	49	16	3	19	0	0	16	2	18	0	170	37	21,8
19.40	35	118	153	37	17	54	5	4	9	0	0	2	4	6	0	207	15	7,2
19.41	85	50	135	32	24	56	3	6	9	0	0	2	5	7	0	191	16	8,4
Totais	616	743	1359	462	380	842	67	54	121	0	0	50	60	110	0	2201	231	10,5

**Tabela 11.** Análise cromossômica de *H. albopunctata* da região de Botucatu. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Número dos indivíduos analisados	Metáfases analisadas																				
	Total																				
	Mt. mitóticas			Mt. meióticas			Com alterações estruturais			Com uma			Duas ou mais			Total					
	S	t	T	I	II	T	S	t	T	MieII	T	MieII	T	S	t	T	MieII	T	Geral	Com alter.	F (%)
19.22	28	82	110	122	80	202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	312	0	0,0
19.23	32	70	102	61	46	107	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	209	1	0,5
19.24	20	88	108	77	74	151	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	259	1	0,4
19.25	96	20	116	26	18	44	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	160	1	0,6
19.26	20	207	227	116	45	161	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	388	3	0,8
19.33	35	109	144	41	35	76	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	220	1	0,4
19.34	24	156	180	40	53	93	0	9	0	9	0	0	0	0	4	4	0	0	273	13	4,7
19.35	26	170	196	160	89	249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	445	0	0,0
19.36	30	314	344	52	74	126	1	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	470	3	0,6
<b>Totais</b>	<b>311</b>	<b>1216</b>	<b>1527</b>	<b>695</b>	<b>514</b>	<b>1209</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>2736</b>	<b>24</b>	<b>0,9</b>	

**Tabela 12.** Análise cromossômica de *H. albopunctata* do Campus da UNICAMP. Mt = metáfases; S = somática; t = testículo; M = metáfases meióticas; T = totais; F = frequência (%).

Número dos indivíduos analisados	Metáfases analisadas																			
	Total									Com alterações estruturais									Total	
	Mt. mitóticas			Mt. meióticas			Com uma			Duas ou mais			Geral	Com alter.	F (%)					
	S	t	T	S	I	II	T	S	t	T	S	t				T	MieII	T		
19.05	16	143	159	86	79	165	0	6	6	0	0	0	3	3	0	0	0	324	9	2,8
19.06	29	130	159	126	81	207	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	366	1	0,3
19.07	33	97	130	40	34	74	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	204	5	2,4
19.08	52	88	140	15	20	35	1	2	3	0	0	0	4	4	0	0	0	175	7	4,0
19.09	15	120	135	50	71	121	0	5	5	0	0	1	5	6	0	0	0	256	11	4,3
19.10	24	92	116	38	48	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	202	0	0,0
19.30	66	46	112	134	41	175	0	3	3	0	0	0	4	4	0	0	0	287	7	2,4
19.31	49	90	139	40	56	96	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	235	1	0,4
19.32	84	48	132	66	24	90	19	0	19	0	0	14	0	14	0	0	0	222	33	14,9
<b>Totais</b>	<b>368</b>	<b>854</b>	<b>1222</b>	<b>595</b>	<b>454</b>	<b>1049</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>38</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2271</b>	<b>74</b>	<b>3,3</b>



**Tabela 13.** Médias, desvios padrões e valor F das análises de variâncias para comparação do número de metáfases alteradas por indivíduo das diferentes localidades (os dados foram normalizados pela transformação angular de Fisher =  $\text{arc sen } x/\sqrt{x}$ ). MF = Morro do Ferro; SB = Serra da Bocaina; BT = Botucatu; UNI = "Campus" da UNICAMP; Mt = metáfases; S = somática; t = testículo.

Espécies	Mt alter.	Procedência				Análise de variância (F)
		MF	SB	BT	UNI	
<i>A. perviridis</i>	S 1	0,346 ± 0,133	0,072 ± 0,077	0,065 ± 0,072	---	26,73** > 5,49 = F <sub>2,27</sub> (0,99)
	S 2	0,265 ± 0,101	0,031 ± 0,065	0,068 ± 0,072	---	24,09** > 5,49 = F <sub>2,27</sub> (0,99)
	t 1	0,280 ± 0,123	0,027 ± 0,058	0,029 ± 0,061	---	28,80** > 5,49 = F <sub>2,27</sub> (0,99)
	t 2	0,314 ± 0,183	0,039 ± 0,053	0,029 ± 0,061	---	19,43** > 5,49 = F <sub>2,27</sub> (0,99)
<i>H. albopunctata</i>	S 1	0,116 ± 0,064	---	0,008 ± 0,013	0,027 ± 0,076	9,43** > 5,57 = F <sub>2,25</sub> (0,99)
	S 2	0,273 ± 0,118	---	0,045 ± 0,090	0,112 ± 0,153	8,76** > 5,57 = F <sub>2,25</sub> (0,99)
	t 1	0,270 ± 0,054	---	0,047 ± 0,084	0,091 ± 0,112	18,51** > 5,57 = F <sub>2,25</sub> (0,99)
	t 2	0,279 ± 0,106	---	0,024 ± 0,054	0,122 ± 0,122	16,25** > 5,57 = F <sub>2,25</sub> (0,99)

\*\* = altamente significativo.

As figuras 58 a 60 representam as freqüências percentuais de alterações encontradas para cada localidade em relação à freqüência percentual total de alterações encontradas nas três localidades. Assim, nas figuras 58A e B verifica-se que *H. albopunctata* e *A. perviridis* provenientes do Morro do Ferro contribuíram com a maior parte (69% e 86%, respectivamente) das alterações detectadas. As amostras controle de Botucatu e Serra da Bocaina contribuíram com uma freqüência em torno de 7% e apenas a freqüência da UNICAMP de *H. albopunctata* merece destaque por ter sido superior (25%) aos demais controles. Nas figuras 59 e 60 estão representados os percentuais de metáfases somáticas e testiculares com uma e com duas ou mais alterações, para as duas espécies das três localidades estudadas. Verifica-se que os animais provenientes do Morro do Ferro contribuíram, em todos os casos, com mais de 60% em relação ao total de alterações encontradas. Os controles de Botucatu e Serra da Bocaina representaram de 3% a 14%, enquanto para os animais da UNICAMP houve variação de 18% a 34%.

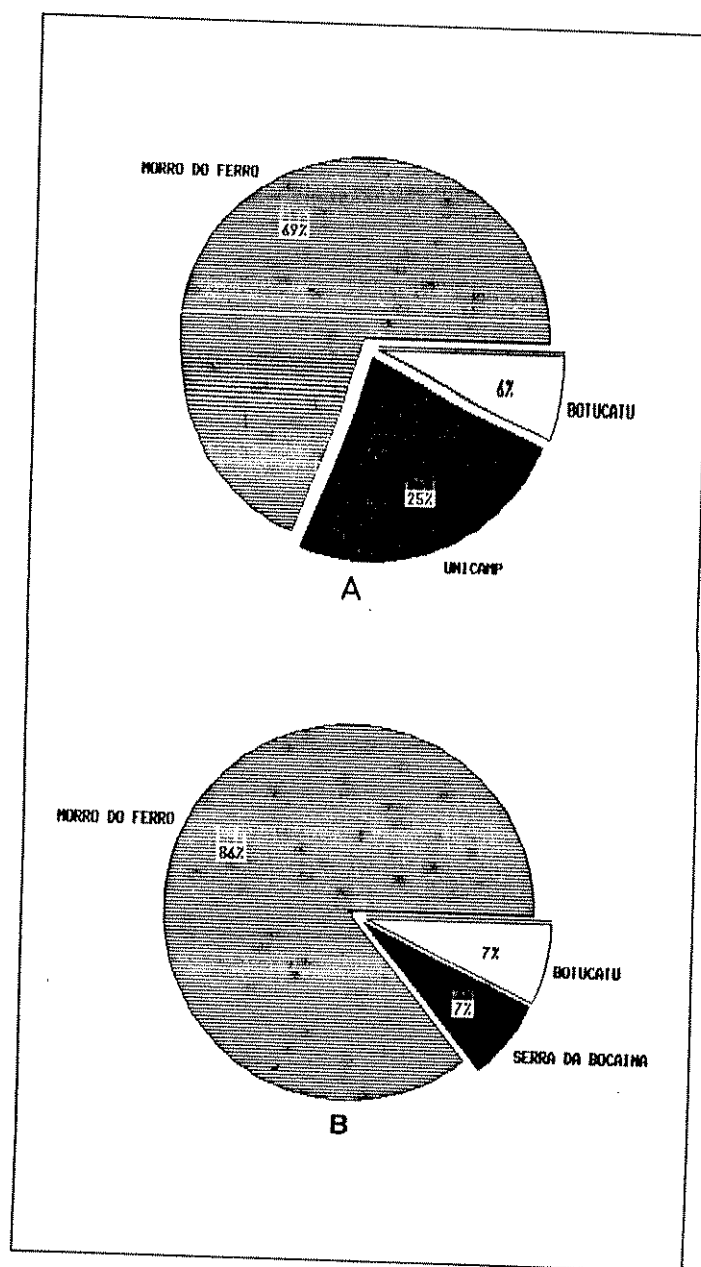
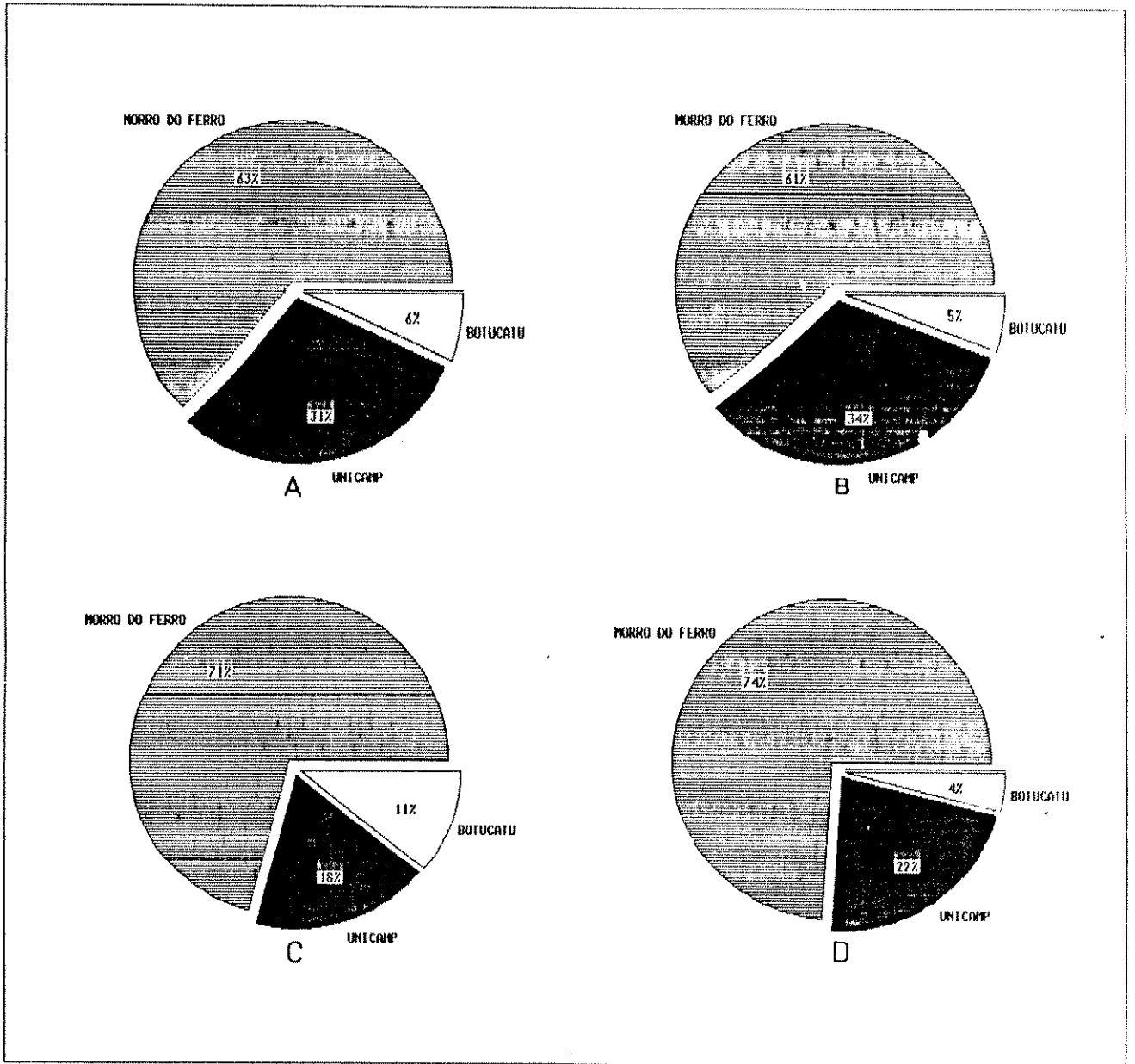


Figura 58. Distribuição dos totais percentuais de metáfases mitóticas com alterações de *H. albopunctata* (A) (n = 328) e de *A. perviridis* (B) (n = 281).



**Figura 59.** Distribuição dos percentuais de metáfases mitóticas somáticas (A e B) e testiculares (C e D) com uma (A e C) e com duas ou mais alterações (B e D) de *H. albopunctata*. Para A,  $n = 90$ ; B,  $n = 69$ ; C,  $n = 83$  e D,  $n = 86$ .

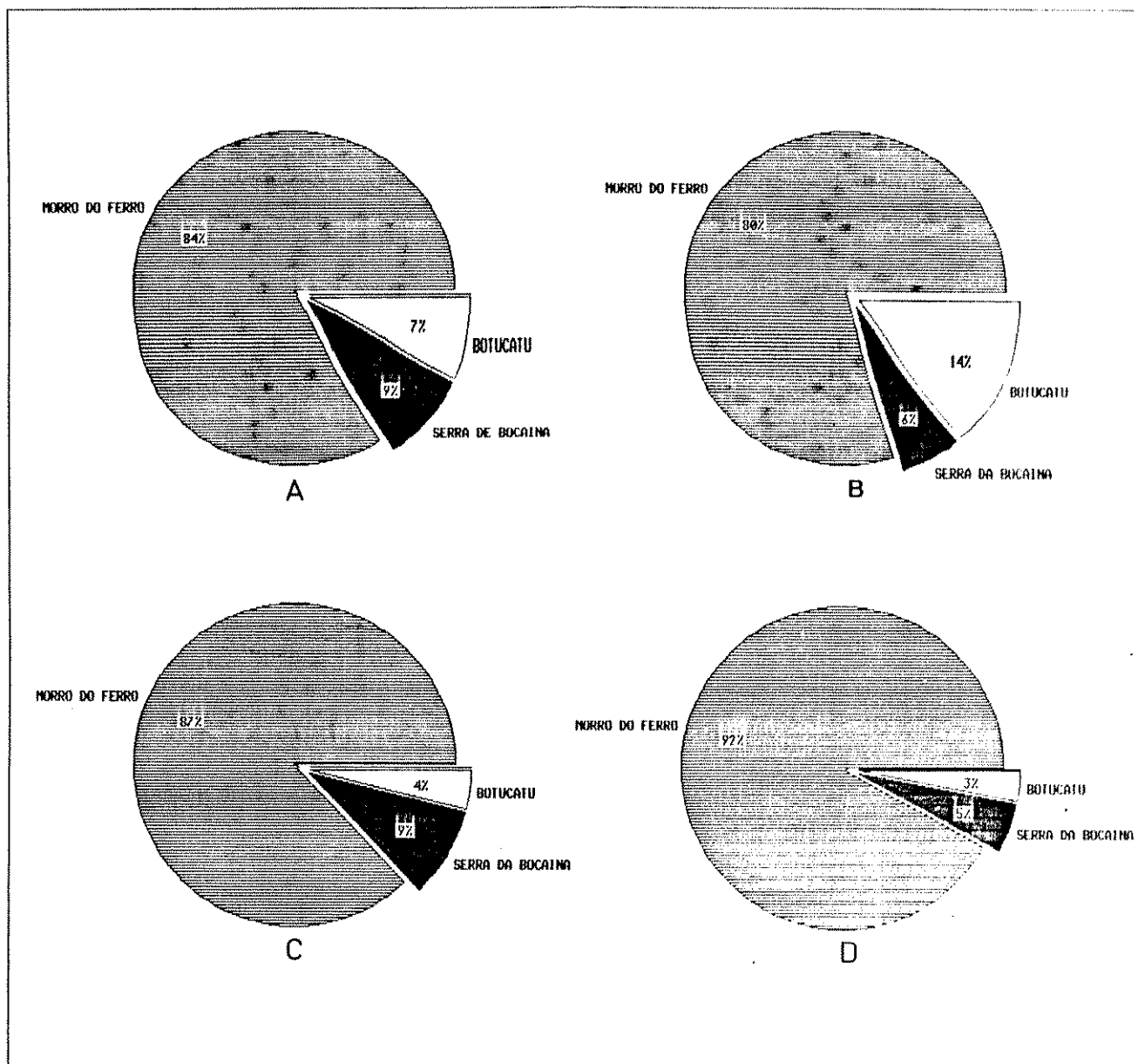


Figura 60. Distribuição dos percentuais de metáfases mitóticas somáticas (A e B) e testiculares (C e D) com uma (A e C) e com duas ou mais alterações (B e D) de *A. perviridis*. Para A, n = 104; B, n = 60; C, n = 51 e D, n = 66.

## 6 Discussão

### 6.1 Cariótipos

O cariótipo de *H. albopunctata* proveniente do Morro do Ferro, Botucatu e "Campus" da UNICAMP coincide com a descrição efetuada por BEÇAK (1967) para um indivíduo macho proveniente da cidade de Osasco (SP). Esta autora observou que o número diplóide desta espécie era de 22 cromossomos sendo que destes os pares 1, 7, 9 e 10 eram metacêntricos e os demais submetacêntricos. Não foram encontrados nesta espécie nenhum par de cromossomo acrocêntrico e também nenhum par mostrou-se dimórfico.

O fato dos cariótipos dos animais de Botucatu e de Campinas não apresentarem diferenças em relação ao Morro do Ferro, confirma que se tratam de populações da mesma espécie o que permitiu a utilização dos mesmos como controle para o auxílio do efeito da radiação natural destes animais.

Com relação a análise dos parâmetros morfométricos dos cariótipos de *A. perviridis* das três localidades estudadas neste trabalho pode ser observado uma grande semelhança entre os mesmos. As pequenas diferenças encontradas nas medidas, podem ser atribuídas a diferenças no grau de compactação desses cromossomos no momento do ciclo celular em que foram paralisados e/ou a pequenas distorções não significativas, devidas a alguma imprecisão dos instrumentos utilizados e também ao operador.

Neste caso, pela análise cariotípica realizada não se pode afirmar que as populações analisadas sejam de espécies diferentes, embora esta análise possa ser muito elucidativa quando outros parâmetros sistemáticos analisados não podem ser conclusivos, à semelhança do que ocorreu com *H. septentrionalis* e *H. brunnea*. Essas espécies morfologicamente muito

semelhantes, foram consideradas inicialmente como uma única espécie. No entanto, apresentaram cariótipos diferentes com números de cromossomos  $2n = 24$  e  $2n = 34$  respectivamente (COLE, 1974). Outro exemplo que demonstra a aplicabilidade da análise cariotípica foi observado em populações de *H. albosignata* de locais diferentes as quais apresentaram número de cromossomos  $2n = 22$  e  $2n = 18$  (BOGART, 1973; BATISTIC, 1986) dando indicações claras de que neste caso, há um processo de especiação ocorrendo provavelmente pela diminuição do número cromossômico (BATISTIC, 1986). Por outro lado, pelo fato dos cariótipos de *A. perviridis* das três localidades serem similares não se pode descartar a possibilidade de que a população do Morro do Ferro e a da Serra da Bocaina sejam de espécies diferentes. Há alguns casos descritos na literatura de espécies diferentes, como *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* e *B. crucifer*, que apresentam cariótipos idênticos (BEÇAK, 1968) e mesmo conteúdo de DNA por núcleo (SOMA, 1981). *Bufo marinus*, *B. calamita* e *B. pardalis* também apresentam o mesmo número de cromossomos ( $2n = 22$ ) e cariótipos similares, mas diferem no conteúdo de DNA e volume nuclear, sendo que as células de *B. pardalis* apresentam 55% a mais de DNA e o dobro do volume nuclear quando comparadas às células das outras espécies (GRIFFIN *et alii*, 1970).

Portanto, se essas populações estiverem desenvolvendo ou já tenham desenvolvido algum tipo de isolamento reprodutivo, apesar de serem morfológicamente muito assemelhadas, isto não está refletido em diferenças no cariótipo ou genoma, detectáveis pelos parâmetros citogenéticos utilizados neste trabalho.

A utilização de outros métodos de análise cromossômica, como banda C para regiões heterocromáticas e banda de prata para região organizadora do nucléolo, bem como medidas do conteúdo de DNA podem ajudar a lançar um pouco mais de luz sobre esta questão, somando argumentos a favor ou contra a hipótese de que estas populações possam se

tratar de espécies diferentes, ou de que estejam iniciando um processo de especiação.

A ausência de cromossomos sexuais detectáveis ao nível citogenético, característica esta do grupo ao qual *A. perviridis* e *H. albopunctata* pertencem, não é de surpreender uma vez que dentre as inúmeras espécies de Hylidae que tiveram seus cariótipos determinados apenas para *Gastrotheca riobambae* existem dados consistentes que confirmam a ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados (SCHMID *et alii*, 1983).

A diferenciação cromossômica sexual em muitos grupos de Anuros nem sempre tem se revelado apenas em termos da diferença de tamanho do par cromossômico, mas pode ocorrer também devido a diferenciações quanto à posição do centrômero, como o que ocorre por exemplo em *Eusophus migueli* (Leptodactylidae) (ITURRA & VELOSO, 1981), ou pela presença de heterocromatização de um ou de parte de um cromossomo de um determinado par, como é o caso de *Pyxicephalus adspersus* (Ranidae) (SCHMID, 1980; ENGEL & SCHMID, 1981) e *Rana esculenta* (Ranidae) (SCHEMPP & SCHMID, 1981). Esta heterocromatização ocorre, às vezes, acompanhada por diferença de tamanho do par cromossômico como em *P. delalandii* (Ranidae) (SCHMID, 1980) e *G. riobambae* (Hylidae) (SCHMID *et alii*, 1983).

A ausência de cromossomos acrocêntricos está de acordo com outros dados da literatura que relacionam este fato a um possível mecanismo de fusão cêntrica que teria ocorrido em várias espécies desta família, estando portanto associada ao baixo número de cromossomos presentes nestes indivíduos (WICKBOM, 1945 apud BEČAK, 1968; FORESTI, 1972; BOGART, 1973).

Portanto, *A. perviridis* e *H. albopunctata* se caracterizam por terem um número relativamente baixo de cromossomos ( $2n = 24$  e  $2n = 22$ , respectivamente), com ausência de acrocêntricos e de cromossomos sexuais.



diferenciados. Com base nesses dados pode-se colocar estas duas espécies no ramo filogenético de  $2n = 24$ , com origem a partir do ancestral  $2n = 26$ , se de fato a hipótese de BOGART (1973) estiver correta. Mecanismo evolutivo semelhante foi também sugerido para mamíferos (MATTHEY, 1957) e para *Drosophila* (PATTERSON & STONE, 1952).

## 6.2 Alterações cromossômicas estruturais

Através da análise das metáfases de células somáticas e da linhagem germinativa de indivíduos de *A. perviridis* e de *H. albopunctata* provenientes do Morro do Ferro, área de radiação natural elevada, pode-se verificar que estas células apresentaram alterações cromossômicas muito mais frequentes do que as de indivíduos das mesmas espécies da região de Botucatu, Serra da Bocaina e "Campus" da UNICAMP, onde o nível de radiação natural é considerado "normal".

As alterações cromossômicas presentes nos controles de *A. perviridis* da Serra da Bocaina e de Botucatu e de *H. albopunctata* de Botucatu apareceram em muito menor número, não sendo a diferença entre eles significativa. Poder-se-ia atribuir parte dessas alterações encontradas, como por exemplo as quebras, a danos causados por algum dos métodos de preparo das lâminas, embora a comparação dos percentuais de metáfases alteradas obtidos por cada método tenha mostrado valores muito próximos entre eles. Por outro lado, se houve o efeito de preparação nos controles, ele foi idêntico no material proveniente do Morro do Ferro, pois ambos foram processados da mesma maneira.

Por outro lado, os indivíduos de *H. albopunctata* do "Campus" da UNICAMP foram os únicos, dentre os controles, a apresentarem uma frequência aparentemente alta, porém não estatisticamente significativa,

quando comparada à dos demais controles. Considerando-se que esses animais foram coletados no brejo que circunda a lagoa da UNICAMP, onde durante muitos anos foi despejado todo o esgoto da Universidade e do Centro Médico, contendo compostos químicos usados tanto nos laboratórios das Unidades de ensino e pesquisa como no Hospital das Clínicas, podemos supor que entre eles pudesse ocorrer alguns com ação mutagênica, responsáveis pelas alterações encontradas.

Tentativas para a detecção química de algum(s) componente(s) em excesso que pudessem estar relacionados à presença das alterações foram efetuadas. No entanto, todas as análises da água e sedimento, provenientes da lagoa e do brejo, realizadas pela SANASA (Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento), pelo CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) e pelo Prof. Dr. Wilson da Silva Jardim, do Instituto de Química da UNICAMP, não revelaram valores anormais para qualquer um dos constituintes analisados. No entanto, a hipótese de que esses animais estiveram em contato com agentes mutagênicos na lagoa não pode ser descartada uma vez que os mesmos foram coletados durante os anos de 1987 e 1988, antes da construção do emissário de esgotos, e a água só foi analisada este ano, após o término da análise das metáfases de *H. albopunctata* das três localidades estudadas, estando o emissário de esgotos da UNICAMP já em funcionamento.

A presença de altas frequências de alterações cromossômicas nos indivíduos provenientes da região do Morro do Ferro está dentro do esperado uma vez que está amplamente relatado na literatura que radiações ionizantes elevadas causam mutações gênicas e/ou cromossômicas. A grande maioria destes trabalhos, no entanto, foram realizadas utilizando radiação induzida (OKUNO *et alii*, 1982; PRASAD, 1984; SAVAGE, 1989; WEISENBORN & STREFFER, 1989).

Com relação a efeitos da radiação natural, embora existam pou-

cos relatos na literatura, os resultados descritos são semelhantes aos encontrados neste estudo. Dentre estes trabalhos podemos citar o de TAKAHASHI (1976) que analisou metáfases de espermatócitos de escorpiões da espécie *Tityus bahiensis* e o de CARDOSO (1986) que efetuou uma análise preliminar em metáfases de *H. albopunctata*. Nos dois trabalhos acima referidos os indivíduos foram coletados na região do Morro do Ferro.

A análise dos resultados descritos na literatura demonstram que tanto a radiação natural quanto a induzida causam um aumento da frequência de alterações cromossômicas especialmente deleções, falhas e quebras.

Com relação às quebras, foi encontrado no presente trabalho, que um número considerável delas ocorreu adjacente à região centromérica (grande parte das quebras, falhas e deleções isocromatídicas e cromatídicas) que nestas espécies sabidamente contém heterocromatina, banda C positiva (FEITOSA & RECCO-PIMENTEL, dados não publicados).

Sítios mais sensíveis às alterações tem sido identificados em várias regiões dos cromossomos (HECHT & SUTHERLAND, 1984), inclusive na vizinhança de porções heterocromáticas em estudos de translocações espontâneas (DUTRILLAUX *et alii*, 1977; KATO, 1979) e induzidas por radiação (CERRANO & WOLFF, 1975). Pontos de quebra localizados preferencialmente sobre bandas heterocromáticas também tem sido detectadas (GILL *et alii*, 1980; SCHUBERT *et alii*, 1981). Associação de maior número de quebras àqueles cromossomos que carregam grandes quantidades de heterocromatina foi também demonstrado em *Secale cereale* (CERMENO & LACADENA, 1985).

A ocorrência de um grande número de cromossomos com porções compactadas e descompactadas nos indivíduos do Morro do Ferro sugere que a radiação atuou no grau de empacotamento da cromatina, provavelmente nas fases do ciclo celular anteriores à metáfase em que o empacotamento ocorre de forma progressiva, acelerando ou retardando o pro-

cesso. A radiação pode estar atuando de forma a modificar a conformação cromatínica como tem sido sugerido por diversos autores (MELLO, 1983; ALVARES-GARCIA, 1988). Esta alteração do grau de compactação poderia estar relacionada a uma tentativa de colocar em ação um genoma silente frente a determinadas condições de estresse que podem ocorrer em fases anteriores da divisão celular e que se mantiveram durante este processo, sendo possível detectá-las na metáfase. Alterações no grau de empacotamento cromatínico foram também observadas em *Triatoma infestans* submetido à radiação (ALVARES-GARCIA, 1988) e sob condições de jejum (MELLO, 1983, 1989; ANDRADE & MELLO, 1987; AMARAL & MELLO, 1989) e em *Rhynchosciara americana* submetidas a choques de temperatura (SIMÕES *et alii*, 1975) ou infectadas por microsporídeos (DIAS *et alii*, 1969).

Por outro lado, há possibilidade de que parte das alterações no grau de compactação cromossômica por efeito da radiação seja reversível, à semelhança do que foi encontrado nos cromossomos plumosos de espermátocitos de *Drosophila hydei* (HESS, 1965) e de oócitos maduros de *Pleurodeles poireti* (LOONES, 1979).

A diversidade de freqüência de alterações observada em diferentes tecidos, dentro de um mesmo indivíduo, encontra suporte na literatura existente principalmente nos trabalhos que associam o grau de diferenciação do tecido com sua sensibilidade à radiação. Desta forma os tecidos e órgãos analisados neste trabalho que apresentaram freqüência alta de alterações estão entre aqueles que sabidamente tem índice mitótico elevado. Segundo NACKERDIEN e colaboradores (1989), os fatores que mais influenciam a resposta dos órgãos e tecidos à radiação são a taxa de divisão, o grau de diferenciação celular e a fase do ciclo celular em que as células se encontram. Neste trabalho, o epitélio intestinal e o testículo apresentaram freqüências percentuais elevadas de alterações, muito próximas entre si, enquanto estas

foram poucas na medula óssea, baço e esôfago. No caso destes dois últimos órgãos a amostra de metáfases analisada foi muito pequena e da medula óssea apenas parte dos indivíduos do Morro do Ferro foram analisados, o que dificulta qualquer conclusão à respeito.

No caso de testículo, por não terem sido encontradas metáfases meióticas alteradas pode-se inferir que houve maior sensibilidade das espermatogônias e "aparentemente" nenhuma dos espermatócitos, se comparado aos tipos celulares pertencentes a outros órgãos e tecidos.

Por serem as espermatogônias, células muito sensíveis à radiação (ROCHA & HARBERT, 1979), grande parte delas pode não sobreviver frente aos danos causados pela radiação e morrer antes de entrar em meiose. Sabe-se que na espermatogênese o ciclo celular é muito rápido, ocorrendo a partir de pequeno número de espermatogônias "normais" que sobrevivem após um dano ou inibição de divisão celular. Assim, as alterações estruturais só podem ser facilmente identificadas nas espermatogônias que estão se dividindo por mitose, porque a maior parte destas, se alteradas, ou não sobrevivem ou são bloqueadas, não se encontrando dentre as células em metáfase da divisão meiótica, qualquer alteração.

Estudos sobre resposta de testículo à ação da radiação tem revelado um padrão básico de perda de células causado por morte celular e posterior recuperação, que é comum em insetos (SADO & OICHI, 1966) e em outros animais de laboratório (OAKBERG, 1971).

OAKBERG (1968) relata que em camundongos expostos à radiação a maioria das espermatogônias tipo A degenera quando chegam ao final da intérfase ou no início da prófase da primeira divisão pós-irradiação. Além disso, tem sido demonstrado que espermatócitos de camundongos em diferentes fases da meiose, têm resistência a doses de radiação, de intermediária a alta (OAKBERG & DIMINNO, 1960; MONESI, 1962; OAKBERG, 1968; 1975; SEARLE, 1974; GROSCHE & HOPWOOD, 1979). O

fato de não se encontrar alterações cromossômicas estruturais identificáveis ao microscópio óptico, não significa que mutações ao nível gênico ou ainda quebras e falhas muito pequenas não tenham ocorrido.

Metáfases com mais de uma alteração do mesmo tipo ou a combinação de tipos diferentes ocorreram com freqüência alta e em ambas as espécies, o que sugere um efeito bastante drástico da radiação. Estas, com mais de uma alteração, teoricamente têm menor chance de sobreviver e se ocorrerem em células como as espermatogônias, que são altamente sensíveis à radiação, a possibilidade dessas células degenerarem aumenta, o que se explica também de certa forma a ausência de espermatócitos com metáfases alteradas. A ausência de alterações detectáveis em espermatócitos (meiose) e a presença em espermatogônias e em outros órgãos (mitose) permite dizer que como consequência pode ocorrer prejuízo imediato aos indivíduos portadores da mesma e por outro lado representar um potencial de que alguma(s) se fixe(m), sendo transmitida(s) a outras gerações.

Além das diferenças na freqüência de alterações dentro do mesmo indivíduo, observadas em tecidos diferentes, verificou-se neste trabalho variação no número de alterações cromossômicas entre os indivíduos provenientes do Morro do Ferro.

Não foi possível correlacionar-se a freqüência dos cromossomos alterados com a dose de radiação recebida por animal, uma vez que não foi possível precisar-se a idade desses indivíduos, nem determinar-se a dose de radiação recebida por cada um deles. No entanto, esses anfíbios passam a maior parte de sua vida, senão toda, expostos à radiação natural e, uma vez que a reprodução ocorre no local, os girinos se desenvolvem em poças ou no riacho localizado na encosta do Morro e os adultos vivem na pequena mata que circunda o riacho também na base do Morro do Ferro. Esses animais adultos são capturados na fase de reprodução quando os mesmos são localizados na mata através do canto, pois emitem sons característicos

para atrair a fêmea. Da oviposição até o início da primeira estação reprodutiva de *H. albopunctata*, por exemplo, passa-se em média 18 meses (A. J. CARDOSO, comunicação pessoal). Portanto, pode-se afirmar que este seria o tempo mínimo que os animais capturados para este estudo ficariam expostos à radiação natural local.

Uma estimativa de dose feita em roedores do Morro do Ferro mostrou que eles recebem em média 3 R de radiação gama por ano (um mínimo de 1,03 R/ano e um máximo de 6,49 R/ano) (DREW & EISENBUD, 1970). Ainda em roedores, esses autores mostraram que a exposição a elementos da série do radônio 220 do Morro do Ferro, resulta em uma dose anual da radiação alfa de cerca de 100 rad/ano para o epitélio tráqueo-bronquial e cerca de 25 rad/ano para o epitélio alveolar.

Como os anfíbios podem ter hábitos terrestres ou arborícolas (pequenos arbustos) na fase adulta com baixa taxa de migração, e obrigatoriamente aquáticos na fase de girino, é possível que estes animais recebam uma dose tão alta ou maior que os roedores estudados, devido ao tempo que permanecem expostos a radiação.

As diferenças individuais encontradas, em termos de frequência de alterações poderiam ser explicadas pela diferença de tempo de exposição dos animais à radiação, em função de não se poder precisar a idade dos mesmos. Por outro lado, variações individuais já foram descritas em resposta a ação de diferentes doses de radiação em *Triatoma infestans* (ALVARES-GARCIA, 1988) e também sob efeito de outras condições de estresse como a ação tóxica de metais pesados (KUBRUSLY, 1984) e o jejum (ANDRADE & MELLO, 1987; AMARAL & MELLO, 1989), não se podendo descartar, portanto, o fator genotípico.

Dentre as alterações cromossômicas existentes, as quebras são consideradas como uma lesão primária das quais muitas outras alterações são derivadas (SAVAGE, 1989) e representam um potencial para a diversi-

ficção nas populações naturais.

A especiação é um processo que implica numa alteração gradual da composição genética das populações. As diferenças cariotípicas entre as espécies animais decorrem frequentemente de rearranjos e alterações estruturais que podem resultar em mudanças de forma e número dos cromossomos. Tal polimorfismo poderá se fixar no cariótipo e substituir o tipo original, se mantendo na população quando por exemplo, os dois tipos de cromossomos tem valores adaptativos diferentes em nichos ecológicos diversos (BEČAK, 1967).

Vários autores admitem que um mecanismo provável na evolução dos anuros seja a fusão cêntrica através de translocação recíproca entre dois acrocêntricos não homólogos. Isto ocorre após quebras junto ao centrômero de cada cromossomo, os quais se soldariam originando um único metacêntrico e um fragmento que se dissociaria. Além disso, os pedaços originados nas quebras cromossômicas tendem a se unir, o que pode acontecer entre pedaços de cromossomos diferentes. Esta nova união de partes de cromossomos não homólogos pode se configurar em translocações, duplicações de segmentos cromossômicos ou em inversões diversas, que podem simplesmente serem eliminadas ou serem fixadas na população conforme demonstrado por HSU & ARRIGHI (1968) em roedores.

Nos animais os rearranjos cromossômicos, com conseqüente mudanças de forma, parecem ter realmente desempenhado papel importante no processo evolutivo (BOGART, 1973). Em certas filogenias há evidências de processo de transformação de determinados segmentos cromossômicos de eucromáticos em heterocromáticos enquanto em outras ocorre perda ou acréscimo de segmentos originados por processos de quebra ou remanejamento (BATISTIC, 1986).

Assim sendo, a radiação natural como um agente promotor de quebras e rearranjos cromossômicos pode resultar em novas fórmulas ao



nível do DNA funcional, o que permitiria a tomada de novos rumos e oportunidades para a especialização, aumentando o potencial de adaptação das espécies. Desta forma poderia desempenhar papel importante do ponto de vista evolutivo de anfíbios e de outros grupos de animais que habitam as regiões com elevado grau de radiação natural.

## 7 Conclusões

- 7.1. Indivíduos de *A. perviridis* provenientes do Morro do Ferro, Serra da Bocaina e de Botucatu, apresentaram  $2n = 24$  cromossomos, sendo os pares 1, 8, 9, 10, 11 e 12 metacêntricos e os demais submetacêntricos. Não se observou a presença de cromossomos acrocêntricos.
- 7.2. O estudo das metáfases mitóticas de *A. perviridis* das três localidades, não mostrou evidências de pares cromossômicos heteromórficos que pudesse sugerir a presença de cromossomos sexuais.
- 7.3. A utilização de *A. perviridis* da Serra da Bocaina como controle pode ser considerada válida, uma vez que não foi encontrada diferença entre os diferentes cariótipos das três localidades que pudessem sugerir diferenças específicas entre as populações.
- 7.4. Os cariótipos de *H. albopunctata* procedentes do Morro do Ferro, "Campus" da UNICAMP e de Botucatu estão de acordo com o descrito por BEÇAK (1967), cujo número de cromossomos encontrado foi de  $2n = 22$  cromossomos.
- 7.5. As alterações cromossômicas encontradas foram as seguintes: compactação, descompactação, quebras, falhas, deleções, fragmentos acêntricos e cromossomo dicêntrico.
- 7.6. Os resultados obtidos sugerem que o alto nível de radiação natural da região do Morro do Ferro contribuiu para produzir alterações cromossômicas nos indivíduos das duas espécies, quando comparado aos animais de regiões de radiação natural "normal". As diferenças foram estatisticamente significativas.
- 7.7. As alterações foram encontradas exclusivamente nas metáfases mitóticas somáticas e testiculares, o que sugere um prejuízo imediato ao

indivíduo portador das mesmas.

- 7..8. Alguns indivíduos controles de *H. albopunctata* provenientes do "Campus" da UNICAMP apresentaram uma frequência maior de metáfases alteradas quando comparados aos controles de Botucatu, o que sugere que aqueles animais estiveram expostos à ação de algum mutagênico químico local, uma vez que os níveis de radiação no local são considerados normais.
- 7..9. Foram constatadas diferenças individuais na resposta aos altos níveis de radiação nas duas espécies. Sugere-se que possam ser devidas a diferenças genotípicas e/ou no tempo de exposição à radiação natural.
- 7..10. Foi observado que os métodos de preparo de lâminas utilizados não interferiram, aparentemente, no percentual de alterações encontradas.
- 7..11. Os órgãos e tecidos utilizados que apresentaram alta frequência de alteração são aqueles relatados na literatura como sendo mais sensíveis à radiação por apresentarem índice mitótico elevado.
- 7..12. Dentre as metáfases analisadas que apresentaram alterações, metade delas continham duas ou mais alterações, o que sugere um efeito bastante acentuado da radiação.
- 7..13. Compactação e descompactação, tanto de área eucromática como de área heterocromática, foram encontradas em grande número o que sugere uma tentativa de atividade gênica e/ou ação da radiação sobre algum componente da cromatina promovendo mudanças conformacionais, e retardando/acelerando a compactação cromatínica durante o ciclo celular.
- 7..14. O número significativo de quebras e deleções encontrado próximo à região centromérica sugere que possa se tratar de sítio com maior sensibilidade à radiação.

## 8 Resumo

O Morro do Ferro, situado no Planalto de Poços de Caldas (MG) é uma região que apresenta uma elevada radioatividade natural (131,4 mSv/ano), uma das mais intensas do mundo. Foi estudada neste trabalho a possível influência da radioatividade desta região sobre a estrutura cromossômica de duas espécies de anfíbios anuros, *Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata*. Como controles foram estudados *A. perviridis* das regiões de Botucatu (SP) e Serra da Bocaina (SP) e *H. albopunctata* provenientes de Botucatu e "Campus" da UNICAMP (Campinas, SP).

Diante da hipótese de que a população de *A. perviridis* do Morro do Ferro pudesse não se tratar da mesma espécie daquela da Serra da Bocaina, o cariótipo foi determinado também para a população desta localidade.

Os órgãos usados para análise citológica foram os testículos, intestino, baço, esôfago e medula óssea. As lâminas foram preparadas por métodos convencionais de esmagamento e suspensão de células.

Verificou-se que *A. perviridis* do Morro do Ferro, Botucatu e Serra da Bocaina apresenta um número diplóide de  $2n = 24$  cromossomos, e semelhança cariotípica entre as três populações.

Tanto *A. perviridis* como *H. albopunctata* apresentaram alterações classificadas como: compactação, descompactação, quebras, falhas, deleção, fragmentos acêntricos e cromossomo dicêntrico. Parte destas alterações provavelmente são decorrentes da alta radioatividade natural existente no Morro do Ferro.

Alguns animais de *H. albopunctata* do "Campus" da UNICAMP (Campinas) apresentaram uma freqüência de alterações relativamente superior à dos demais controles, o que foi atribuído à possível presença de algum mutagênico químico na lagoa onde os mesmos se desenvolveram e foram coletados.

Foram encontradas diferenças individuais entre os indivíduos das amostras de todos os locais estudados, possivelmente devido a diferenças genóticas inerentes a cada animal, idade e/ou dose de radiação recebida. Nos intestinos e nos testículos ocorreram maior número de alterações do que nos outros órgãos e tecidos analisados. Na linhagem germinativa apenas as espermatogônias apresentaram metáfases alteradas.

As alterações que apareceram com maior freqüência foram as deleções e quebras. Dessas um número relativamente grande ocorreu na vizinhança da heterocromatina centromérica.

As alterações encontradas representam um grande potencial de rearranjos cromossômicos, com conseqüências não só para a sobrevivência dos indivíduos mas, principalmente, para a diversificação nas populações naturais.

## 9 Abstract

Morro do Ferro, located in the Poços de Caldas Plateau in the State of Minas Gerais, has a radiation level as high as 131.4 mSv/year, suggesting one of the highest mean levels reported anywhere in the world. In this research the possible effect of the natural radiation in the Morro do Ferro on chromosomal structures was studied in two species of Anura Amphibia, *Aplastodiscus perviridis* and *Hyla albopunctata*. For *A. perviridis* the controls were collected in the Botucatu (SP) and Serra da Bocaina (SP) regions and for *H. albopunctata* in Botucatu (SP) and Campinas (SP).

Considering the hypothesis that the Morro do Ferro population of *A. perviridis* might not be the same species as that of Serra da Bocaina, the karyotypes of both were determined.

The chromosomes were obtained from the testicles, intestine, spleen, oesophagus and bone marrow. The slides were prepared by conventional squashing techniques and by cell suspensions.

The results showed that *A. perviridis* from Morro do Ferro, Serra da Bocaina and Botucatu presented the same diploid number  $2n = 24$  chromosomes and karyotypic similarity amongst the three populations.

The chromosomic alterations appearing in both species were characterized as: condensation, decondensation, breaks, faults, deletions, acentric fragments and dicentric chromosomes. The majority of these alterations could probably be attributed to the high level of natural radiation in Morro do Ferro.

The frequency of altered metaphases for some animais collected at UNICAMP (Campinas) was relatively higher than in the other controls. This was attributed to the presence of some mutagenic chemicals in the

lagoon where the animals developed and were collected.

Differences in the frequency of altered metaphases amongst the various individuals from all the localities studied were found. This was probably related to genotypic differences inherent to each animal and/or its age and radiation exposure.

As expected, in the intestine and testicles the number of altered metaphases was greater than in the other organs analysed. In the germinative cell lineage only the spermatogonia presented altered metaphases.

The compacted and decompacted chromosomic portions were those which showed the least drastic alterations, due to the possibility of reversion. Deletions and breaks were the more frequent alterations in both species, and a great number of these occurred in the centromeric heterochromatin neighborhood.

The types of alteration encountered represent an enormous potential for chromosomic rearrangements. These could bring about consequences not only for the individual itself, but principally in the diversification of the natural populations.

## 10 Referências Bibliográficas

- AAMODT, R. Radioproteção. In: ROCHA, A. F. G & HARBET, J. C. Medicina nuclear: bases. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. 312p.
- ALCÂNTARA-GOMES, R. Unidades utilizadas no estudo das radiações. *Ciên. Hoje*, 7(40 suppl.): 36, 1988a.
- ALCÂNTARA-GOMES, R. Radiação de fundo. *Ciên. Hoje*, 7(40 suppl.): 36, 1988b.
- ALCÂNTARA-GOMES, R. & CALDAS, L. R. Introdução à radiobiologia: Ação biológica das radiações. Rio de Janeiro, UFRJ, 1969. v.1-2.
- ALMEIDA, C. G. Aspectos biológicos e citogenéticos de *Hyla fuscovaria* (Amphibia-Anura). Campinas, 1984. 121p. Tese (Mestrado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- ALPER, T. & CRAMP, W. A. The role of repair in radiobiology. *Experientia*, 45(1): 1-144, 1989.
- ALVARES-GARCIA, R. S. Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Campinas, 1988. 104p. Tese (Mestrado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- AMARAL, M. J. L. V. & MELLO, M. L. S. Critical electrolyte concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals. *Cytobios*, 1989 (in press).



- ANDRADE, C. G. T. J. & MELLO, M. L. S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. *Rev. bras. Genet.*, 10(3): 449-57, 1987.
- BATISTIC, R. F. Aspectos citogenéticos da evolução de anuros. São Paulo, Instituto Butantan, 1986. 87p. (mimeografado).
- BEÇAK, M. L. Cariótipos e evolução cromossômica em Amphibia - Anura. Ribeirão Preto, 1967. 120p. Tese (Doutorado). USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of anura. *Caryologia*, 21(3): 191-208, 1968.
- BEÇAK, M. L. & BEÇAK, W. Further studies on polyploid amphibians (*Ceratophryidae*): III. Meiotic aspects of interspecific triploid hybrid: *O. cultripes* ( $2n = 22$ ), *O. americanus* ( $4n = 44$ ). *Chromosoma*, 31: 377-85, 1970.
- BEÇAK, M. L. & BEÇAK, W. Studies on polyploid amphibians karyotype evolution and phylogeny of the genus *Odontophrynus*. *J. Herpet.*, 8/4: 337-41, 1974.
- BEÇAK, M. L. & RABELLO, M. N. Further studies on polyploid amphibian. I. Mitotic and meiotic aspect. *Chromosoma*, 22: 192-207, 1976.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W. & RABELLO, M. N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual south american frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma*, 19: 188-93, 1966.
- BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982, 328p.

- BEIGUELMAN, B. & PISANI, R. C. B. Chromosomal aberration in leukocyte metaphases of leprosy patients under dapsons therapy. *Hansen. Int.*, 1: 53-60, 1976.
- BERGONIÉ, J. & TRIBONDEAU, L. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Compt. Rend.*, 143: 983, 1906.
- BJORNBERG, A. J. S. Rochas clásticas do planalto de Poços de Caldas. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. Univ. São Paulo, série Geo* 237(18): 65-123, 1959.
- BLAIR, W. F. The amphibian visual system: amphibians, their evolutionary history, taxonomy and ecological adaptations. Academic, 1976.
- BLATTMANN, H. Radiation effects on man and animals: radiation physics. *Experientia*, 45(1): 1-114, 1989.
- BLOOM, A. D. Induced chromosomal aberrations in man. *In: HARRIS, H. & HIRSCHHORN, K. Adv. Human Genet.*, 3: 99-172, 1972.
- BOGART, J. P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. *Cytogenetics*, 9: 369-83, 1970.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. *In: VIAL, J. L., ed. Evolutionary biology of the anurans.* Columbia Univ. Missouri Pr., 1973. p.337-49.
- BOKERMANN, W. C. A. Notas sobre cantos nupciais de anfíbios brasileiros. I. (Anura). *An. Acad. bras. Ci.*, 39(3/4): 441-3, 1967.

- CARDOSO, A. J. Utilização de recursos para reprodução em comunidades de anuros no sudeste do Brasil. Campinas, 1986. 211p. Tese (Doutorado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- CARDOSO, A. J.; ANDRADE, G. V. & HADDAD, C. F. B. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. *Rev. bras. Biol.*, 49(1): 241-9, 1989.
- CARVALHO, H. C. Fundamentos de genética e evolução. 3ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. 556p.
- CERMENO, M. C. & LACADENA, J. R. C-banding analyses of gamma-radiation induced chromosomal interchanges in rye. The role of C-heterochromatin in chromosome repatterning. *Chromosoma*, 91: 297-306, 1985.
- CERRANO, A. V. & WOLFF, S. Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin in the Indian muntjac. *Chromosoma*, 55: 361-9, 1975.
- COCHRAN, M. D. Frogs of south-eastern Brasil. *U. S. nat. Mus. Bull.*, 206: 1-76, 1955.
- COLE, C. J. Chromosome evolution in selected treefrogs including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla* and *Smilisca*). *Am. Mus. Novit.*, 2451: 1-10, 1974.
- CULLEN, T. L. Review of brasilian investigations in areas of high natural radioactivity. In: Symposium on Areas of High Natural Radioactivity, Poços de Caldas, 1977. Anais ... v.2.

- DIAS, M.; PAVAN, C. & BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian injections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angelae*. *Rev. bras. Biol.*, 29: 191-206, 1969.
- DREW, R. T. & EISENBUD, M. The natural radiation dose to indigenous rodents on the Morro do Ferro, Brazil. *Health Phys.*, 12: 1267-74, 1966.
- DREW, R. T. & EISENBUD, M. The pulmonary dose from  $^{220}\text{Rn}$  received by indigenous rodents on the Morro do Ferro, Brazil. *Radiat. Res.*, 42: 270-81, 1970.
- DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Syst. Zool.*, 16: 38-43, 1967.
- DUELLMAN, W. E. & COLE, C. J. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Syst. Zool.*, 14: 139-43, 1965.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. *Biology of amphibians*. New York, MacGraw Hill, 1985. 670p.
- DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J.; VIEGAS-PEGUIGNOT, E.; SHAISSON, G. Localization of chromatid breaks in Falconi's anemia, using three consecutive stains. *Humangenetik*, 37: 65-73, 1977.
- ELLERT, R. Contribuição à geologia do maciço alcalino de Poços de Caldas. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let. Univ. São Paulo, série Geo* 237(18): 1-64, 1959.
- ENGEL, W. & SCHMID, M. H-Y antigens as tool for the determination of the heterogametic in Amphibian. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 30: 130-6, 1981.

- FORESTI, F. Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura). Piracicaba, 1972. 80p. Tese (Mestrado). USP, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz".
- FRAHYA, R. Urânio e tório no planalto de Poços de Caldas. Rio de Janeiro, DNPN/DFPM, 1962.
- FREIRE-MAIA, N. Radiogenética humana. São Paulo, Edgard Blucher, 1972. 196p.
- FROST, D. R. Amphibians species of the world. Laurence, Alex, 1985.
- FUJIMORI, K.; SARDELA, I. A. & SCALLARI, R. Distribuição de anomalias radioativas no Morro do Ferro do complexo alcalino de Poços de Caldas, MG. In: Congresso brasileiro de Geologia, 31., Santa Catarina, 1980. Anais ... v.2, p.1140-49.
- GARDNER, E. J. & SNUSTAD, P. D. Genética. 7ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1986. 497p.
- GAULDEN, M. Genetics effects of radiation. In: \_\_\_\_\_ Medical radiation biology. Philadelphia, Saunders, 1973. 52p.
- GENTRY, J. T.; PARKHUST, E. & BULIN, G. V. An epidemiological study of congenital malformations in New York State. *Am. J. publ. Hlth*, 49: 1-122, 1959.
- GILL, B. S.; BURNHAM, C. R.; STRINGAM, G. R.; STOUT, J. T. & WINHEIMER, W. H. Cytogenetic anlysis of chromosomal translocations in tomato: preferential breakage in heterochromatin. *Can. J. Genet. Cytol.*, 22: 333-41, 1980.

- GRIFFIN, C. S.; SCOTT, D. & PAPWORTH, D. G. The influence of DNA content and nuclear volume on the frequency of radiation-induced chromosomal aberrations in *Bufo* species. *Chromosoma*, 30: 228-49, 1970.
- GROSCH, D. S. & HOPWOOD, L. E. **Biological effects of radiation.** 2ed. London, Academic, 1979. 338p.
- GRUNEBERG, H. Genetical research in a area of high natural radioactivity in south India. *Nature*, 204: 222-4, 1964.
- HECHT, F. & SUTHERLAND, G.R. Fragile sites and cancer breakpoints. *Can. J. Genet. Cytog*, 12: 179-81, 1984.
- HERRERO, P. Karyotypes of two Iberian Amphibians: *Rana iberica* (Anura: Ranidae) and *Triturus boscai* (Caudata: Salamandridae). *Herpetologica*, 38(4): 502-6, 1982.
- HESS, O. The effect of X-rays on the functional structures of the Y chromosome in spermatocytes of *Drosophila hydei*. *J. Cell. Biol.*, 25: 169-74, 1965.
- HSU, T. C. & ARRIGHI, F. E. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). I. Evolutionary trends in 20 species. *Cytogenetics*, 7: 417-46, 1968.
- I. P. T. - INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO Revisão da bibliografia sobre o Morro do Ferro, Poços de Caldas, MG. S.n.t., 1984. v.1, 152p. (Relatório nº 20993).
- ITURRA, P. & VELOSO, M. Evidence for heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Anura:Leptodactylidae). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 31: 108-10, 1981.
- KATO, H. Preferential occurrence of sister chromatid exchanges at heterochromatin/euchromatin junctions in the wallaby and hamsters chromosomes.

- mes. *Chromosoma*, 74: 307-16, 1979.
- KING, M. J & ROFER, R. Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma*, 54: 75-87, 1976.
- KUBRUSLY, F. S. Ação de cobre e mercúrio sobre a estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1984. 71p. Tese (Mestrado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- LEI, W. Thorium mobilization in a terrestrial environment. New York, PhD Dissertation, New York University, 1985. 414p.
- LOONES, M. T. *In vivo* effects of gamma-irradiation on the functional architecture of the lampbrush chromosomes in *Pleurodeles* (Amphibia, Urodela). *Chromosoma*, 73: 357-68, 1979.
- MATTHEY, R. Cytologie comparée systématique et phylogénie des Microtinae (Rodentia, Muridae). *Revue suisse Zool.*, 64: 39-71, 1957.
- MELLO, M. L. S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem. J.*, 15: 739-51, 1983.
- MELLO, M. L. S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. bras. Genet.*, 12(3): 485-98, 1989.
- MONESI, V. Relation between x-ray sensitivity and stages of the cell cycle in spermatogonia of the mouse. *Radiat. Res.*, 17: 809-38, 1962.
- MORESCALCHI, A. Il carredo cromossomico di *Hyla arborea arborea* (L) e di *Hyla regilla* Baiud and Girard: il problema dei cromosomi sessuali e l'evoluzione del cariotipo di *Hyla*. *Caryologia*, 18: 193-206, 1965.

- MORESCALCHI, A. The close karyological affinities between a *Ceratophrys* and *Pelobates* (Amphibia, Salientia). *Experientia*, 23(1071): 1-4, 1967.
- MORESCALCHI, A. Hypothesis on the phylogeny of the Salientia based on karyological data. *Experientia*, 24: 964. 1968.
- MOSCATI, G. A. A desintegração radioativa. *Ciên. Hoje*, 7(40 suppl.): 19-20, 1988.
- MOSSMANN, K. Efeitos biológicos das radiações. In: ROCHA, A. F. G & HARBET, J. C. *Medicina nuclear bases*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. 312p.
- MÜLLER, H. J. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84-7, 1927.
- NACKERDIEN, Z.; MICHIE, J.; & BOHM, L. Chromatin decondensed by acetylation shows an elevated radiation response. *Radiat. Res.*, 117: 234-44, 1989.
- OAKBERG, E. F. Radiation response of the testis. *Excerpta med. Int. Cong. Ser.*, 184: 1070-6, 1968.
- OAKBERG, E. F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.*, 169: 515-32, 1971.
- OAKBERG, E. F. Effects of radiation on the testis. In: HAMILTON, D. W. & GREEP, R. O., eds., *Male reproductive system*. Maryland, Williams & Wilkins, 1975. p.233-43.
- OAKBERG, E. F. & DIMINNO, R. L. X-ray sensibility of primary spermatocytes of the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2: 196-209, 1960.
- OHNO, S.; STENIUS, C.; CHRISTIAN, L. C.; BEÇAK, W. & BEÇAK, M. L. Chromosomal uniformity in the avian subclass Caronatae. *Chromosoma*,



15: 280-88, 1964.

OKUNO, E. Radiação ionizante. *Ciên. Hoje*, 7(40 suppl.): 20, 1988.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L. & CHOW, C. Física para ciências biológicas e biomédicas. São Paulo, Harper & How do Brasil, 1982.

PATTERSON, J. T. & STONE, W. S. Evolution in the genus *Drosophila*. New York, Macmillan, 1952.

PENNA-FRANCA, E.; FISMAN, M.; LOBÃO, N.; TRINDADE, H.; COSTA-RIBEIRO, C. & SANTOS, P. L. Radioatividade na dieta dos habitantes das regiões brasileiras de elevada radiação natural. *Inst. Biol. UFRJ*, 1968. p.7-136.

PRASAD, K. N. Handbook of radiobiology. Boca Raton, Fl., 1984.

RABELLO, M. N. I. Chromosomal studies in brasilian anurans. *Caryologia*, 23: 45-59, 1970.

ROCHA, A. F. G. Matéria e energia. In: ROCHA, A. F. G & HARBET, J. C. Medicina nuclear bases. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. 312p.

ROSER, F. & CULLEN, T. L. Radiation levels in selected regions of Brazil. *An. Acad. bras. Ci.*, 34(1): 23-35, 1962a.

ROSER, F. & CULLEN, T. L. Environmental radioactivity in high background areas of Brazil. Rio de Janeiro, Institute of Physics Pontifical Catholic University, 1962b.

RUBIN, P. & CASARETT, G. Clinical radiation pathology. Philadelphia, Saunders, 1968.

RUIZ, I. R. G. & BEÇAK, W. Further studies polyploid amphibians. V. C

- banding in diploid and tetraploid species of *Odontophrynus*. *Chromosoma*, 54: 69-74, 1976.
- RUIZ, I. R. G.; RONALDO, M. F. & BEÇAK, W. *In situ* localization of ribosomal genes in a natural triploid of *Odontophrynus*. *J. Hered.*, 71: 55-7, 1980.
- RUIZ, I. R. G.; SOMA, M. & BEÇAK, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 29: 84-98, 1981.
- SADO, T. & OISHI, K. Cytological evaluation of dose-rate effects of radiation on mutation frequency of silkworm gonads. Evidence of G2 accumulation of primary spermatogonia after acute irradiation. *Mut. Res.*, 3: 522-36, 1966.
- SAEZ, F. A. & BRUM, N. Chromosomes of South American Amphibians. *Nature*, 185: 945, 1960.
- SALTHER, S. N. & MECHAM, J. S. Reproduction and courtship patterns. In: LOFTS, B., ed. *Physiology of the amphibian*. New York, Academic, 1974. 521p.
- SAVAGE, J. M. The geographical distribution of frog: patterns and predictions. In: VIAL, ed. *Evolutionary biology of the anurans*. Columbia, Univ. Missouri Pr., 1973. p.351-445.
- SAVAGE, J. R. K. The production of chromosome structural changes by radiation. *Experientia*, 45(1): 1-114, 1989.
- SCHEMPP, W. & SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*, 83: 697-710, 1981.

- SCHITZ, A. Evolution of anuran mating calls: ecological aspects. *In*: VIAL, J. L., ed. *Evolutionary biology of the anurans*. Columbia, Univ. Missouri Pr., 1973. p.313-21.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleous organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-88, 1978.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiation ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura - Ranidae). *Chromosoma*, 80: 69-86, 1980.
- SCHMID, M.; HAAF, T.; GEILE, B. & SIMS, S. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 88: 69-82, 1983.
- SCHMID, M.; VITELLI, L. & BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma*, 95: 271-84, 1987.
- SCHOBENHAUS, C.; CAMPOS, D. A.; PERZE, G. R. & ASMUS, H. E. *Geologia do Brasil. Texto explicativo do mapa geológico do Brasil e da área oceânica adjacente incluindo depósitos minerais*. Brasília, DNPM, 1984.
- SCHUBERT, I.; MICHAELIS, A. & RIEGER, R. Effects of chromosome repair in *Vicia faba*. V. Influence of segment transpositions on maleic hydrazine specific aberration clustering in a heterochromatin containing chromosome region. *Biol. Zbl.*, 100: 167-79, 1981.
- SEARLE, A. G. Mutation induction in mice. *Adv. Radiat. Biol.*, 4: 131-209, 1974.

- SIMIELLI, M. E. & BIASI, M. Atlas geográfico escolar. São Paulo, Ática, 1988. p.18 e 30.
- SIMÕES, L. C. G.; AMABIS, J. M. & CESTARI, A. N. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciênc. Cult., S. Paulo*, 27: 159-61, 1975.
- SOMA, M. Variabilidade do conteúdo de DNA nuclear em alguns anfíbios Anura. São Paulo, 1981. 96p. Tese (Doutorado). USP, Instituto de Biociências.
- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C. & NYBAKKEN, J. W. Zoologia geral. 6ed. São Paulo, Nacional, 1986. 816p.
- TAKAHASHI, C. S. Cytogenetical studies on the effects of high natural radiations levels in *Tityus bahiensis* (Scorpiones, Buthidae) from Morro do Ferro, Brazil. *Radiat. Res.*, 67: 371-81, 1976.
- THOMPSON, J. S. & THOMPSON, M. W. Genética médica. 3ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981. 365p.
- VASCONCELOS, L. M. H.; AMARAL, E. C. L.; PENNA-FRANCA, E.; VIANNA, M. E. C. M. Concentrações de  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{210}\text{Pb}$  em produtos agrícolas cultivados nas circunvizinhanças da Mina e Usina de Urânio do planalto de Poços de Caldas, Minas Gerais. *Ciênc. Cult., S. Paulo*, 38(8): 1422-3, 1986.
- WALLACE, B. & DOBZHANSKY, T. Átomos de radiação. In: WALLACE, B. *Biologia social*. São Paulo, EDUSP, 1979. 216p.
- WEDOW Jr., F. The Morro do Ferro thorium and rare-earth ore deposit, Poços de Caldas District, Brazil. *Geol. Surv. Bull.*, 1185: 1-34, 1967.
- WEISSENBORN, U. & STREFFER, C. Analysis of structural and numerical

chromosomal aberrations at the first and second mitosis after X-irradiation of two-cell mouse embryos. *Radiat. Res.*, 117: 214-20, 1989.

WESLEY, J. P. Background radiation as the cause of fatal congenital malformations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2: 97-118, 1960.

YOSIDA, T. H. Sex chromosomes of the tree frog, *Hyla arborea japonica*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Serv. VI Zool.*, 13: 352-8, 1957.

ZHENGAN, W. & JIANWEN, Y. Karyotypic and C-banding analysis of *Rana amurensis*. *Acta zool. Sin.*, 29(1): 17-23, 1983.