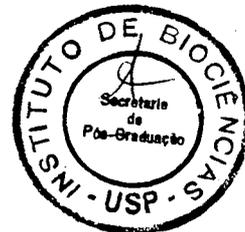


Biblioteca Universitária  
UFSC

ANGELA MARIA DE SOUZA BUENO

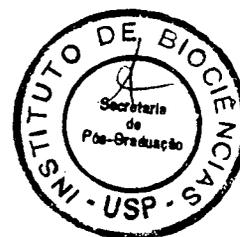


UTILIZAÇÃO DE ROEDORES SILVESTRES NO  
BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO *IN SITU*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP -  
SP, como parte dos requisitos para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Biológicas.  
Orientadora - Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay

SÃO PAULO  
1997

ANGELA MARIA DE SOUZA BUENO



UTILIZAÇÃO DE ROEDORES SILVESTRES NO  
BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO *IN SITU*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP -  
SP, como parte dos requisitos para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Biológicas.  
Orientadora - Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay



0.270.648-8

UFSC-BU



SÃO PAULO  
1997

Temos ouvido estas duas palavras, dependência e independência. Ambas são irreais: a realidade é a interdependência. Todos somos tão interdependentes uns dos outros, não somente um homem de outros homens, não somente uma nação de outras nações, mas árvores e homens, animais e árvores, os pássaros e o sol, a lua e os oceanos - tudo está entrelaçado. E a humanidade do passado nunca pensou sobre isto, que tudo é um cosmos.

Bhagwan Shree Rajneesh

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay, não só pela eficiente orientação, mas também pelo estímulo, confiança e acima de tudo pela amizade que tem me dispensado desde que nos conhecemos.

Ao Dr. Carlos Alberto Bragança Pereira, pela orientação, colaboração, estímulo, paciência e muito especialmente pela amizade.

Ao Dr. Ives Jose Sbalqueiro, pela colaboração indispensável na seleção dos pontos de coleta, na caracterização citotaxonômica, na identificação de polimorfismos e especialmente pela amizade.

Aos imprescindíveis colaboradores, excelentes colegas de trabalho e amigos Cátia Regina Silva e Marcos Antonio Loureiro, pelos inúmeros favores prestados.

Ao Sr. Reni Becker, pelo apoio indispensável junto à Prefeitura Municipal de Timbó - SC.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e à Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade.

À todos os amigos da Divisão de Genética, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - UFSC, por arcarem com parte do meu encargo junto àquela Instituição, sem o que este trabalho não poderia ter se tornado realidade.

Ao Dr. Luis Carlos Gomes Simões, pelo apoio junto ao Instituto de Biociências da USP.

Ao Roberto Gonzaga S. Palacios, pelo auxílio na editoração do texto

À FUNCITEC - SC, pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa concedida

À Dra. Jeanete M. S. Agostini pelo encorajamento, colaboração e amizade, mesmo em dias de chuva e na presença de cobras e ratos.

Ao meu querido amigo Juan Fernando Martinez Leal, pela presença diária, carinhosa e encorajadora nos últimos momentos, o que fez com que a carga final do trabalho se tornasse mais leve.

À Meire de Souza Bueno e ao João Dias Neto, pela gentileza em arcarem com meus encargos domésticos, sem o que tudo teria sido muito mais difícil.

Às minhas companheiras do dia-a-dia, em especial à Maria Sueli Garcia Fernandez, que contribuíram com sua companhia, solidariedade, paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos meus mestres e aos meus alunos.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

EPÍGRAFE.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MUTAGENICIDADE X GENOTOXICIDADE EM POPULAÇÕES NATURAIS.....	1
1.2 BIOMONITORAMENTO <i>IN SITU</i> .....	6
1.3 BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO <i>IN SITU</i> .....	9
1.3.1 Aberrações cromossômicas estruturais.....	11
1.3.2 Aberrações cromossômicas numéricas.....	12
1.3.3 Micronúcleos.....	14
1.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	17
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	24
3.2 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA.....	26
3.3 MÉTODO DE COLETA.....	29
3.4 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL.....	33
3.5 PREPARAÇÃO E ANÁLISE CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DE CÉLULAS ERITROPOIÉTICAS NA MEDULA ÓSSEA.....	34
3.5.1 Preparação direta de medula óssea.....	34
3.5.2 Preparação das lâminas.....	35
3.5.3 Coloração das lâminas.....	36

3.5.4	Análise do Material .....	36
3.6	PREPARAÇÃO E ANÁLISE CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO .....	37
3.6.1	Obtenção do material.....	37
3.6.2	Preparação das lâminas.....	37
3.6.3	Coloração das lâminas.....	38
3.6.3.1	Coloração com Feulgen .....	38
3.6.3.2	Coloração com Fast-Green ácido.....	38
3.6.4	Análise do material.....	39
3.7	PREPARAÇÃO CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E ÍNDICE MITÓTICO .....	39
3.7.1	Obtenção do material.....	39
3.7.2	Preparação das lâminas.....	40
3.7.3	Coloração das lâminas .....	41
3.7.3.1	Descoloração das lâminas.....	41
3.7.3.2	Coloração com Feulgen .....	42
3.7.4	Análise do material .....	42
3.8	DOCUMENTAÇÃO DO MATERIAL .....	43
3.8.1	Revelação dos filmes preto e branco .....	44
3.8.2	Cópia das fotos .....	44
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1	RESULTADOS DAS COLETAS .....	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DAS ESPÉCIES COLETADAS.....	48
4.3	RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS .....	48
4.3.1	<i>Akodon montensis</i> .....	56
4.3.2	<i>Oryzomys nigripes</i> .....	62
4.4	RESULTADOS DAS ANÁLISE DE PCE/NCE.....	68
4.4.1	<i>Akodon montensis</i> .....	68

4.4.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	69
4.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS .....	71
4.5.1 Comparações intraespecíficas alopátricas em <i>Akodon montensis</i> .....	71
4.5.2 Comparações intraespecíficas alopátricas em <i>Oryzomys nigripes</i> .....	75
4.5.3 Comparações interespecíficas simpátricas no Arrozal (Teste do $X^2$ ).....	79
4.5.4 Comparações interespecíficas simpátricas na Área de Preservação (Teste do $X^2$ ) .....	80
4.5.5 Comparações interespecíficas simpátricas na Área Industrial (Teste do $X^2$ ).....	81
4.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO .....	83
4.6.1 <i>Akodon montensis</i> .....	83
4.6.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	86
4.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO .....	89
4.7.1 <i>Akodon montensis</i> .....	89
4.7.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	90
4.7.3 Comparações interespecíficas simpátricas (Teste do $X^2$ ) .....	92
4.8 RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	95
4.8.1 <i>Akodon montensis</i> .....	98
4.8.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	101
4.9 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	104
4.9.1 <i>Akodon montensis</i> .....	104
4.9.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	107
4.9.3 Comparações interespecíficas simpátricas no Arrozal (Teste do $X^2$ ).....	111
4.9.4 Comparações interespecíficas simpátricas na Área de Preservação (Teste do $X^2$ ) .....	112
4.9.5 Comparações interespecíficas simpátricas na Área Industrial (Teste do $X^2$ ).....	113
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>116</b>

5.1 COMPARAÇÕES DOS ÍNDICES PROLIFERATIVOS DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA .....	118
5.1.1 PCE/NCE - Linhagem eritropoiética.....	118
5.1.2 IM (Índice Mitótico) - Linhagens eritro e mielopoieéticas .....	120
5.1.2.1 Comparações intraespecíficas alopátricas do IM .....	122
5.1.2.2 Comparações interespecíficas simpátricas do IM.....	125
5.2 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE PCEMNS, NCEMNS E SPMNS .....	127
5.2.1 <i>Akodon montensis</i> .....	130
5.2.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	131
5.3 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS.....	133
5.3.1 <i>Akodon montensis</i> .....	133
5.3.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	135
5.4 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS E ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS .....	136
5.4.1 <i>Akodon montensis</i> .....	136
5.4.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	137
5.5 COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS.....	137
5.6 DEDUÇÕES DA COMPARAÇÕES INTRA E INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS.....	138
5.7 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	140
5.7.1 <i>Akodon montensis</i> .....	140
5.7.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	143
5.8 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	148
5.8.1 <i>Akodon montensis</i> .....	148
5.8.2 <i>Oryzomys nigripes</i> .....	148

5.9 COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	149
5.10 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	151
6 CONCLUSÕES.....	152
ANEXO .....	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

## LISTA DE TABELAS

TABELA I	PRINCIPAIS AGROTÓXICOS APLICADOS NAS PLANTAÇÕES DE ARROZ DO MUNICÍPIO DE TIMBÓ-SC (SEGUNDO EPAGRI-CIDASC), SUA FUNÇÃO, GRUPO QUÍMICO E CLASSE TOXICOLÓGICA.....	26
TABELA II	RELAÇÃO DAS ESPÉCIES E DO NÚMERO DE EXEMPLARES DE ROEDORES SILVESTRES COLETADOS NA REGIÃO DE TIMBÓ-SC NO PERÍODO DE JUNHO DE 1993 A FEVEREIRO DE 1996.....	47
TABELA III	RELAÇÃO DAS ESPÉCIES E DO NÚMERO DE EXEMPLARES , POR ESPÉCIE E LOCAL DE COLETA, QUE COMPÕEM A AMOSTRA ESTUDADA .....	47
TABELA IV	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	56
TABELA V	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	57
TABELA VI	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	58
TABELA VII	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	59
TABELA VIII	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Akodon montensis</i> coletados NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	60

TABELA IX	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	61
TABELA X	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	62
TABELA XI	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	63
TABELA XII	FREQÜÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	64
TABELA XIII	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	65
TABELA XIV	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	66
TABELA XV	FREQÜÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	67
TABELA XVI	NÚMERO DE ANIMAIS OBTIDOS (PORCENTAGEM DO TOTAL DE ANIMAIS ANALISADOS), POR PONTO DE COLETA, DENTRO DE CADA FAIXA DE VALOR DA RAZÃO PCE/NCE , EM <i>Akodon montensis</i> .....	68

TABELA XVII	NÚMERO DE ANIMAIS OBTIDOS ( PORCENTAGEM DO TOTAL DE ANIMAIS ANALISADOS), POR PONTO DE COLETA, DENTRO DE CADA FAIXA DE VALOR DA RAZÃO PCE/NCE , EM <i>Oryzomy nigripes</i> ..... 69
TABELA XVIII	TOTAL DE ERITRÓCITOS COM MICRONÚCLEOS EM <i>Akodon montensis</i> ..... 72
TABELA XIX	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS ENTRE OS DIFERENTES TIPOS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Akodon montensis</i> (TESTE DO X <sup>2</sup> )..... 72
TABELA XX	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-TRICAS DOS TOTAIS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Akodon montensis</i> (TESTE DO X <sup>2</sup> ) ..... 74
TABELA XXI	TOTAL DE ERITRÓCITOS COM MICRONÚCLEOS EM <i>Oryzomys nigripes</i> ..... 75
TABELA XXII	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁ-TRICAS ENTRE OS DIFERENTES TIPOS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Oryzomys nigripes</i> (TESTE DO X <sup>2</sup> )..... 77
TABELA XXIII	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-TRICAS DOS TOTAIS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Oryzomys nigripes</i> (TESTE DO X <sup>2</sup> ) ..... 78
TABELA XXIV	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO ARROZAL (TESTE DO X <sup>2</sup> )..... 79
TABELA XXV	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO (TESTE DO X <sup>2</sup> )..... 80
TABELA XXVI	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA INDUSTRIAL (TESTE DO X <sup>2</sup> ) ..... 81

TABELA XXVII	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	83
TABELA XXVIII	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	84
TABELA XXIX	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL .....	85
TABELA XXX	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	86
TABELA XXXI	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	87
TABELA XXXII	ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	88
TABELA XXXIII	TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS OBSERVADAS ENTRE 2000 CÉLULAS ANALISADAS POR ANIMAL.....	89
TABELA XXXIV	COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DO ÍNDICE MITÓTICO PELOS TESTES ANOVA E $X^2$ .....	90
TABELA XXXV	TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS OBSERVADAS ENTRE 2000 CÉLULAS ANALISADAS POR ANIMAL.....	91
TABELA XXXVI	COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DO ÍNDICE MITÓTICO PELOS TESTES ANOVA E $X^2$ .....	91
TABELA XXXVII	COMPARAÇÃO INTERESPECÍFICA SIMPÁTRICA DO ÍNDICE MITÓTICO (TESTE DO $X^2$ ).....	92
TABELA XXXVIII	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	98
TABELA XXXIX	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	99
TABELA XL	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	100

TABELA XLI	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NO ARROZAL.....	101
TABELA XLII	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO .....	102
TABELA XLIII	FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	103
TABELA XLIV	TOTAL DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.	
TABELA XLV	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS EM <i>Akodon montensis</i> (TESTE DO $X^2$ ) .....	104
TABELA XLVI	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-TRICAS DAS FREQÜÊNCIAS DE CÉLULAS DANIFICADAS EM <i>Akodon montensis</i> , PELO TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR PROPORÇÕES EM CITOGENÉTICA .....	106
TABELA XLVII	TOTAL DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	107
TABELA XLVIII	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS (TESTE DO $X^2$ ).....	109
TABELA XLIX	RESULTADO DA COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DAS FREQÜÊNCIAS DE CÉLULAS DANIFICADAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> , PELO TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR PROPORÇÕES EM CITOGENÉTICA .....	110
TABELA L	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQÜÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NO ARROZAL (TESTE DO $X^2$ ) .....	111

TABELA LI	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO (TESTE DO $X^2$ ).....	112
TABELA LII	RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA ÁREA INDUSTRIAL (TESTE DO $X^2$ ) .....	113
TABELA LIII	RESULTADO DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS POLIPLÓIDES, PELO TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR PROPORÇÕES EM CITOGENÉTICA .....	113

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA.....	25
FIGURA 2 ESQUEMA DA LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA.....	28
FIGURA 3 ARROZAL TENDO AO FUNDO A MATA ONDE FORAM DISTRIBUÍDAS AS ARMADILHAS.....	30
FIGURA 4 ESTRADA PARA A ÁREA DE PRESERVAÇÃO. ....	30
FIGURA 5 ÁREA DE PRESERVAÇÃO - VISTA PARCIAL. ....	31
FIGURA 6 ÁREA INDUSTRIAL - VISTA PARCIAL DA MATA ÀS MARGENS DO RIO BENEDITO. ....	31
FIGURA 7 TRANSFERÊNCIA DO ANIMAL COLETADO, DA ARMADILHA PARA O “MOUSE-PACK”,NO LOCAL DE COLETA.....	32
FIGURA 8 REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS ARMADILHAS NOS PONTOS DE COLETA.....	34
FIGURA 9 CARIÓTIPO DE <i>Akodon montensis</i> (2N=24).....	49
FIGURA 10 CARIÓTIPO DE <i>Oryzomys nigripes</i> (2N=62).....	49
FIGURA 11 VARIAÇÕES CARIOTÍPICAS OBSERVADAS EM <i>Akodon montensis</i> .....	50
FIGURA 12 ERITRÓCITOS DE MEDULA ÓSSEA CORADOS COM GIEMSA. ....	52
FIGURA 13 ERITRÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO CORADOS COM FEULGEN/FAST-GREEN. ....	52
FIGURA 14 ERITRÓCITOS DE MEDULA ÓSSEA.....	53
FIGURA 15 ERITRÓCITOS DE MEDULA ÓSSEA.....	54
FIGURA 16 ERITRÓCITOS DE MEDULA ÓSSEA.....	55
FIGURA 17 COMPARAÇÃO DE PERCENTIS DE PCE/NCE EM <i>Akodon montensis</i> .....	70
FIGURA 18 COMPARAÇÃO DE PERCENTIS DE PCE/NCE EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	70
FIGURA 19 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Akodon montensis</i> .....	73

FIGURA 20	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Akodon montensis</i> .....	73
FIGURA 21	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	76
FIGURA 22	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	76
FIGURA 23	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO ARROZAL.....	82
FIGURA 24	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO.....	82
FIGURA 25	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA INDUSTRIAL.....	82
FIGURA 26	COMPARAÇÃO DE PERCENTIS DO ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	93
FIGURA 27	COMPARAÇÃO DE PERCENTIS DO ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	93
FIGURA 28	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DO ÍNDICE MITÓTICO EM <i>Akodon montensis</i> E <i>Oryzomys nigripes</i> .....	94
FIGURA 29	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DO ÍNDICE MITÓTICO.....	94
FIGURA 30	ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS EM <i>Akodon montensis</i> .....	96
FIGURA 31	ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	97

FIGURA	32	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> .....	105
FIGURA	33	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> .....	105
FIGURA	34	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	108
FIGURA	35	COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Oryzomys nigripes</i> .....	108
FIGURA	36	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> E <i>Oryzomys nigripes</i> DO ARROZAL.....	115
FIGURA	37	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> E <i>Oryzomys nigripes</i> DA ÁREA DE PRESERVAÇÃO.....	115
FIGURA	38	COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM <i>Akodon montensis</i> E <i>Oryzomys nigripes</i> DA ÁREA INDUSTRIAL.....	115

## RESUMO

Duas espécies simpátricas de roedores silvestres - *Akodon montensis* (2n=24) e *Oryzomys nigripes* (2n=62) foram avaliadas quanto a danos provocados por possíveis estressores químicos ambientais, com o objetivo de avaliar o desempenho dos parâmetros citogenéticos como biomarcadores. Os espécimens foram coletados em três áreas: duas expostas a impacto ambiental - Arrozal e Área Industrial - e a terceira em uma Área de Preservação Permanente, todas elas localizadas na Sub-Bacia IV do Médio Vale do Itajaí - município de Timbó - SC. Os resultados obtidos foram analisados através de comparações intraespecíficas simpátricas (CIS) e comparações interespecíficas alopátricas (CIA) dos seguintes parâmetros: 1) frequência de eritrócitos micronucleados na medula óssea e no sangue periférico, 2) frequência de células com aberrações cromossômicas e 3) 2 índices de avaliação de proliferação de células da medula óssea: relação entre eritrócitos jovens e maduros e índice mitótico. Em *A. montensis* as CIS revelaram: 1) a - Arrozal - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeitos genotóxico e citotóxico, agudo e crônico; b - Área de Preservação - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico fraco e crônico; c - Área Industrial - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico agudo e crônico e efeito citotóxico moderado, 2) possibilidade de presença de agentes que interferem no fuso de divisão, nas áreas expostas. Em *O. nigripes* as CIS revelaram: 1) a - Arrozal - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico moderado e crônico e efeito citotóxico agudo e crônico; b - Área de Preservação - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico moderado e acidental; c - Área Industrial - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico agudo e crônico, 2) a - Arrozal - possibilidade de ação de agentes clastogênicos e de agentes que interferem no fuso de divisão; b Área de Preservação - falta de evidência de atuação de agentes genotóxicos; c -Área Industrial - possibilidade de ação de agentes que interferem no fuso de divisão. As CIAs revelaram : 1) que, em todas as áreas estudadas, as 2 espécies diferiram quanto às frequências de eritrócitos micronucleados, sendo que em todas as comparações os resultados obtidos foram significativamente maiores em *O. nigripes*, com exceção da diferença não significativa de eritrócitos micronucleadas do sangue periférico na Área de Preservação, 2) para efeitos clastogênicos: a - Arrozal - frequências maiores em *O. nigripes*; b- Área de Preservação - diferenças não significantes; c - Área Industrial- frequências maiores em *A. montensis*, 3) para efeitos de agentes que interferem no fuso de divisão: a) Segregação Precoce - frequências maiores em *O. nigripes* das áreas expostas; b) Poliploidia - frequências maiores em *A. montensis* do Arrozal e da Área de Preservação e em *O. nigripes* da Área Industrial. Os resultados mostram que a utilização de pelo menos duas espécies e a análise simultânea de diferentes parâmetros citogenéticos permitem evidenciar e diferenciar o dano genotóxico induzido por agentes ambientais. Técnicas de citogenética molecular poderão aprimorar o método. As implicações da extensão das conclusões para populações humanas são evidentes.

## ABSTRACT

Two sympatric species of wild rodents (*Akodon montensis* -  $2n = 24$  e *Oryzomys nigripes* -  $2n = 62$ ) were evaluated for damage induced by potentially stressing environmental chemicals. The purpose was to evaluate the performance of cytogenetic endpoints as biomarkers. The specimens were collected from three areas, two of which - a Rice Field and an Industrial Area - were exposed to environmental impact and a third one, a Permanent Preservation Area. All sites are located at sub-basin IV of the Medium Valley of the Itajaí river, Timbó, State of Santa Catarina, Brasil. Intraspecific sympatric comparisons (ISC) and interspecific allopatric comparisons (IAC) were established using as endpoints: 1) frequency of micronucleated erythrocytes in bone marrow and peripheral blood; 2) frequency of cells with chromosomal aberrations; 3) young to mature erythrocyte ratio and mitotic index. The ISC for *A. montensis* showed: 1) a - in the Rice Field - possible occurrence of agents inducing genotoxic and cytotoxic effects, both acute and chronic; b - in the Preservation Area - possible occurrence of weak and chronic genotoxic agents; c - in the Industrial Area - possible existence of acute and chronic agents as well as of moderate cytotoxic ones; 2) possible occurrence of spindle poisons in the exposed areas. The ISC for *O. nigripes* showed: 1) a - in the Rice Field - possible action of agents causing moderate and chronic genotoxicity and acute and chronic cytotoxicity; b - in the Preservation Area - possible moderate and accidental genotoxic agents; c - in the Industrial Area - possible occurrence of acute and chronic genotoxic agents; 2) a - in the Rice Field - possible existence of clastogens and spindle poisons; b - in the Preservation Area - no evidence for genotoxic agents; c - in the Industrial Area - possible action of spindle poisons. The IAC showed that: 1) The two species differed significantly in the frequencies of micronucleated erythrocytes. As a rule, *O. nigripes* had the higher values; 2) for clastogenic effects: a - in the Rice Field - higher frequencies for *O. nigripes*; b - no significant differences in the Preservation Area; c - higher frequencies for *A. montensis* in the Industrial Area; 3) spindle poison effects: a - early chromosomal segregation : higher frequencies for *O. nigripes* in the exposed areas; b - poliploidy: higher frequencies for *A. montensis* in the Rice Field and Preservation Area and for *O. nigripes* in the Industrial Area. Results showed that the use of at least two species and the simultaneous analysis of several cytogenetic endpoints can detect and discriminate genotoxic effects of environmental agents. Molecular cytogenetic techniques may improve the method. The extension of the conclusions to human populations is possible.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MUTAGENICIDADE X GENOTOXICIDADE EM POPULAÇÕES SILVESTRES

Avaliar a exposição ambiental potencial a produtos químicos é de suprema importância para prevenir possíveis perigos por eles impostos à sobrevivência, desenvolvimento, reprodução e evolução dos organismos vivos. No entanto, as situações de aplicação e lançamento direto de substâncias químicas no ambiente (estressores químicos ambientais ou poluição química ambiental) também são dignas de preocupação, pelas mesmas razões já citadas, além da possibilidade da participação de organismos contaminados na cadeia alimentar onde o homem seja um possível consumidor.

Os estressores químicos ambientais exercem seus efeitos sobre organismos de uma determinada área (localidade). No entanto, tal como Fox (1995) fez questão de lembrar, embora se saiba que os poluentes afetam direta ou indiretamente os organismos individuais, em termos ecotoxicológicos, pode-se dizer que os poluentes são motivos de preocupação por causa dos efeitos que provocam nas populações e, indiretamente, nas comunidades e ecossistemas. Na verdade, pode-se dizer que eles só terão algum significado ecológico ou evolutivo importantes quando forem detectados a nível populacional.

Dieter (1993) colocou a seguinte dúvida: existem poluentes ou classes de poluentes específicos (tais como os estressores químicos ambientais aqui mencionados) que influenciam os processos evolutivos? A essa questão, Le Blanc (1994) respondeu da seguinte maneira: processos evolutivos respondem a qualquer pressão seletiva exercida na população, independente do mecanismo toxicológico responsável por ela.

Alguns efeitos provocados pela ação de estressores químicos sobre as populações, tais como alteração da produção primária, aumento da frequência de doenças e redução da diversidade, foram discutidos por Gray (1989). Esse autor salientou que métodos

de estudo que possibilitem a detecção precoce dos efeitos populacionais de estressores químicos ambientais devem ser os selecionados na avaliação de áreas supostamente contaminadas, a fim de evitar o agravamento da contaminação e suas consequências indesejáveis.

Com relação aos desafios impostos pelo ambiente ao material genético dos organismos, McClintock (1984) ressaltou que existem "choques" que um genoma deve enfrentar repetidamente e para os quais ele tem uma resposta já programada; ela lembrou, entretanto, que existem desafios imprevistos para os quais os genomas atuais não estão precisamente programados para responder de modo adequado. Apesar disso, salientou, esses desafios são percebidos e os genomas podem responder a eles de modo discernível, porém o fazem de uma maneira nunca vista anteriormente.

Pode-se dizer, então, que a poluição, em geral, pode representar um fator de estresse seletivo que conduz a mudanças mais ou menos desestabilizadoras da composição genética das populações a curto, médio ou longo prazo. Em especial, as genotoxinas ambientais (agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de induzir mutações e mudanças genéticas relacionadas em células vivas de organismos vivos) podem alterar diretamente o "pool" gênico. Uma mudança na constituição genética pode ser vantajosa para certas populações, mas pode ser uma desvantagem para outras, inclusive para o homem, por exemplo: 1) indução de resistência (pesticidas), 2) aumento da virulência de patógenos, 3) alterações dos limites de infestação de uma forma patogênica (procura por novos hospedeiros) ou o aparecimento de novos tipos de vírus e 4) mudanças repentinas nas relações parasita-hospedeiro e predador-presa, em outras palavras, aumento da instabilidade do ecossistema (Würglers e Kramers, 1992).

Perante o desafio de um estressor químico, as populações podem exibir quatro respostas diferentes: 1) em um extremo, não há resposta porque os indivíduos são resistentes ao estressor ou a exposição é muito rápida ou mínima; 2) no outro extremo, onde a população é extremamente sensível, ou a exposição é inexorável, há uma mortalidade total, resultando em extinção local; 3) sob condições de exposição crônica, o estresse pode ser acomodado por adaptação comportamental ou fisiológica, sem efeito aparente no crescimento, sobrevivência e reprodução; e 4) alternativamente, o estresse pode afetar

diferencialmente vários genótipos dentro da população, resultando em eliminação progressiva dos indivíduos sensíveis e numa mudança da estrutura genética da população ( Fox ,1995).

Reconhece-se atualmente que, apesar das diferenças de sensibilidade, os produtos genotóxicos podem danificar o material genético tanto de seres humanos como de outros organismos vivos. Nas populações silvestres, os efeitos adversos, decorrentes das alterações induzidas em células da linhagem germinativa, que conduzem a alterações na composição genética das populações, são de extrema importância para o ecossistema. As mudanças somáticas, porém, mesmo aquelas que conduzem à perda de indivíduos, não chegam a ser críticas em populações com um bom potencial de reprodução. Apesar disso, o monitoramento de mudanças genéticas em células somáticas (que por si só podem ser danosas) de organismos em seu habitat natural pode ser aplicado como indicador da presença indesejável de genotoxinas no ambiente.

Mutações espontâneas constituem a matéria prima para a evolução e especiação de todos os organismos vivos e têm permitido a sua sobrevivência e adaptação às mudanças ambientais, desde o surgimento da vida em nosso planeta. A ocorrência de alterações nas frequências de mutações, e de mudanças genéticas relacionadas, no "pool" gênico de espécies ou populações naturais, têm que ser avaliadas em relação ao "background" de mutações espontâneas.

Alguns exemplos bem conhecidos de seleção de fenótipos alterados (e conseqüentemente de genótipos), em resposta à poluição e ao estresse ambiental, são o melanismo em populações de mariposas, a resistência à contaminação por metais em plantas, a resistência a inseticidas em insetos e a resistência à malária em seres humanos. No entanto, a avaliação, em termos de significado ecológico, dos efeitos das genotoxinas em certos segmentos do ecossistema, não é uma tarefa fácil quando se trabalha com populações que sofrem pressão de seleção muito mais forte do que as populações humanas, como é o caso de populações silvestres ( Seiler,1982; Würglers e Kramers,1992).

Sabe-se que a evolução dos organismos ocorre em resposta a mudanças ambientais e, enquanto que as mudanças ambientais devidas à poluição são geralmente

reversíveis, as mudanças evolutivas são geralmente irreversíveis, conferindo ao ambiente uma herança que se estende além do destino do poluente no ambiente (LeBlanc,1994).

Existem atualmente muitas evidências sugerindo que as atividades antropogênicas em grande escala podem, indiretamente, alterar os sistemas-suporte da vida na Terra, rompendo processos genéticos, celulares e nutricionais essenciais (Fox,1995). Colborn (1995) afirmou que os poluentes de grande interesse são aqueles que afetam processos moleculares e celulares que regulam o desenvolvimento, funções endócrinas e imunológicas. Embora ele não tenha explicitado, fica claro que as genotoxinas podem e devem ser consideradas poluentes de grande interesse. Sob o ponto de vista particular da preservação do patrimônio gênico, pode-se afirmar que o lançamento dessas substâncias no ambiente merece nossa preocupação especial e deveria ser evitado porque:

1) Sob exposições maciças (implicando em grandes aumentos na frequência de mutações) podem ocorrer efeitos desestabilizadores, geneticamente baseados, na adaptabilidade, assim como efeitos diretamente tóxicos. Estes podem incluir efeitos em células germinativas que podem afetar a capacidade reprodutiva de muitas espécies e conseqüentemente conduzir a um aumento da instabilidade do ecossistema (Wurglers e Kramers,1992) .

2) Se, de um lado, aumentos mais modestos na frequência de mutações podem ser positivos, no sentido de aumentar a variabilidade genética e fornecer à população, a longo prazo, uma melhor chance de enfrentar situações de estresse futuras, de outro lado podem ser negativos, por aumentar a variabilidade genética de maneira rápida, o que pode, por exemplo, favorecer o aparecimento e dispersão de novos patógenos e conseqüentemente também contribuir para um aumento da instabilidade dos ecossistemas (Würglers e Kramers,1992) .

3) As mutações neutras, sem vantagem seletiva, podem ser fixadas na população e em seguida perdidas; se, contudo, o número dessas mutações exceder a capacidade da população de removê-las, um número crescente de tais mutações estará presente nessa população em qualquer momento. Assim, a introdução, por ação de genotoxinas, de um número elevado de mutações neutras, em segmentos populacionais do

ecossistema, poderá levar a desequilíbrios de sua composição genética cujas conseqüências não se pode prever, nem com relação à respectiva população, nem ao ecossistema como um todo (Seiler,1982).

4) A presença marcante de polimorfismos nas populações humanas tem sido revelada em todos os níveis de investigação, por exemplo, nos múltiplos sistemas de defesa orgânica contra agentes ambientais. A introdução descontrolada de genotoxinas no ambiente, sem dúvida aumenta a possibilidade de exposição humana a compostos desconhecidos, por fontes e rotas desconhecidas. Isso pode romper com o equilíbrio dos mecanismos de regulação gênica que controlam esses sistemas de defesa, alterando a susceptibilidade aos insultos ambientais. A ocorrência dessa situação indesejável não se restringe a nenhuma espécie em particular, mas é sua ocorrência na espécie humana que tem justificado o monitoramento do ambiente em busca de genotoxinas (Williams,1991; Würglers e Kramers,1992).

Deste modo, perante um agente mutagênico, que pode ser por exemplo um fator de poluição ambiental, podemos esperar diferentes freqüências e tipos de mutações entre os indivíduos a ele submetidos, sejam eles pertencentes à mesma espécie ou não. No entanto, para que as mutações possam desempenhar seu papel importante como fator evolutivo é preciso que tanto a freqüência como os tipos de mutações por célula, por indivíduo não destruam o potencial das células reterem estas alterações, que representam a matéria prima a ser aproveitada oportunisticamente pela seleção natural durante o processo de evolução, que ocorre em escala de tempo geológica.

Sendo assim, fica claro que embora as mutações sejam imprescindíveis para a manutenção da vida no nosso planeta, não podemos pensar que quanto mais mutações melhor porque, se assim fosse, não teríamos as terríveis conseqüências de uma guerra ou de um acidente nuclear (Awa,1983; Natarajan *et al.*,1991; Ramalho *et al.*, 1991).

Em resumo pode-se dizer que, em termos evolutivos, a variabilidade genética, originada através das mutações, é crítica e forma a base para a sobrevivência da vida no planeta, com suas inerentes necessidades de respostas adaptativas aos novos desafios ambientais (Williams,1991). No entanto, a amplitude do impacto que os mutagênicos podem

causar (se é que causam algum) no equilíbrio e variabilidade peculiares de um ecossistema, é um assunto bastante polêmico e Seiler (1982) salientou a necessidade de serem realizados novos experimentos “ a fim de tirar esta ciência - mutagênese ecológica - da infâmia da pura especulação e transformá-la numa disciplina científica digna de confiança”.

## 1.2 - BIOMONITORAMENTO *IN SITU*

Em seu sentido original, a palavra monitoramento significa “medida contínua de uma variável no tempo”, e freqüentemente inclui comparações entre registros antigos e atuais de, por exemplo, pressão atmosférica, umidade, radioatividade, entre outros. Na esfera do saneamento ambiental e ocupacional há o conceito de monitoramento ambiental, ou seja, medidas de exposições externas a agentes do ar, alimento, água. Essas medidas incluem avaliações de concentrações, quantidades, e intensidades (tanto contínua como descontinuamente), assim como de freqüências e durações das exposições. Além desses, há o conceito de monitoramento biológico (biomonitoramento), ou seja, medidas de exposições internas através da análise de um espécimen biológico (ex., um tecido alvo). Devido às suas características metodológicas, esse tipo de monitoramento não pode ser realizado continuamente, mas deve ser feito num determinado momento e, se for possível, em momentos subseqüentes (Zielhuis,1978). Às vezes, o termo biomonitoramento contínuo é empregado no sentido de esclarecer que repetidas avaliações têm sido feitas, em diferentes momentos ( Schulte,1995).

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos para desenvolver sistemas eficientes de detecção de genotoxinas no solo, ar, água e outros compartimentos do ambiente.

Monitorar os tipos e as quantidades de tóxicos que estão constantemente entrando no ambiente é, como salientou Root (1990), uma tarefa desanimadora. Apesar de todos os métodos analíticos disponíveis, coletar amostras suficientes no tempo certo continua sendo um obstáculo significante para os cientistas ambientais. No entanto, quando os

produtos químicos perigosos entram no ambiente, eles são absorvidos pelos organismos que ali vivem e esses organismos podem, portanto, ser considerados como biomonitores. Níveis subletais acumulados dentro de seus tecidos podem fornecer uma medida da poluição integrada num determinado período de tempo, eliminando assim a necessidade de amostragem contínua e permitindo uma melhor e mais rápida avaliação de danos ambientais antes que eles possam vir a ter conseqüências sérias e indesejáveis para os seres humanos, de um lado, e para o ecossistema como um todo, de outro.

Fica claro, do exposto acima, que para monitorar um determinado ambiente, ou parte dele, pode-se, em resumo, fazer uso de duas estratégias :

1) a mais clássica - monitoramento ambiental - que consiste em obter partículas do ar, da água ou do solo (parâmetros externos de exposição), preparar um extrato orgânico e investigá-lo em laboratório usando testes rotineiros de avaliação de genotoxicidade ou análise química;

2) a outra - o biomonitoramento - que consiste em “procurar” por efeitos genotóxicos em animais ou plantas - biomonitores - que podem estar expostos *in situ* no ambiente natural, isto é, sem a necessidade de preparo de concentrações anteriores ou procedimentos de extrações do meio (De Flora *et al.*, 1991 ; Würigler e Kramers, 1992).

Essa “procura” é feita em tecidos-alvo, ou seus análogos - os espécimens de Zielhuis (1978) - através da análise de um marcador biológico de exposição ou biomarcador, que é selecionado de acordo com o que se pretende avaliar (Verbeck, 1995).

Marcadores biológicos são indicadores de eventos significantes que ocorreram em partes inacessíveis do corpo ( ex., fígado e órgãos em desenvolvimento) e que podem ser medidos em tecidos acessíveis , como o sangue (Sexton, 1995). Eles podem integrar exposições via múltiplas rotas (inalação, oral, dérmica), múltiplas fontes ( ar do ambiente doméstico, do local de trabalho, dieta, água) e por todos os padrões de exposição (passado, atual, intermitente, contínuo). Até que ponto o marcador documenta os períodos específicos de exposição depende da farmacocinética do produto químico e da persistência do marcador na amostra biológica avaliada (espécimen), persistência essa que é função da taxa de renovação da amostra e dos processos de reparo (Perera e Whyatt, 1994).

A fim de justificar a necessidade de se realizarem estudos empíricos nos ecossistemas, Kimball e Levin (1984) salientaram que, embora a compreensão do modo como produtos químicos afetam o ecossistema seja essencial, tal objetivo pode ser proibitivamente caro no regime de testar produto por produto, e ressaltam a importância do estudo de espécies residentes, ecologicamente apropriadas para o teste biológico. Essas espécies podem ser escolhidas respeitando-se alguns critérios pré-estabelecidos tais como, as economicamente importantes, as recreacionalmente importantes, os grupos de espécies crípticas para a manutenção da estrutura e funcionamento do ecossistema, entre outros. No entanto, como também salientaram esses autores, não se deve esquecer o fato de que qualquer espécie tem seu valor intrínseco e a perda de qualquer uma delas contribui para o empobrecimento biótico.

Além disso, como ressaltou Kendall apud Sandhu e Serres (1989), o uso da vida silvestre na avaliação dos efeitos genotóxicos de dejetos perigosos fornece um método efetivo para determinar a ecotoxicidade, pois representa um sistema de advertência precoce do impacto potencial para a saúde humana. Colborn (1995) sugeriu que os efeitos observados nestas populações, desde o nível celular até o populacional, deveriam ser parte integrante da avaliação de risco ou dano à saúde humana.

Cairns Jr. (1980) fez algumas ressalvas com relação ao emprego do termo monitoramento, no monitoramento biológico, mas, apesar disto, ele tem sido amplamente utilizado como sinônimo de "procura" ou avaliação de efeitos biológicos adversos decorrentes, principalmente, de atividades antropogênicas. Berge apud Sandhu e Serres (1989), entre outros, descreveu e ressaltou a utilidade do monitoramento toxicológico *in situ* para quantificar os efeitos ecológicos de dejetos perigosos, sem no entanto ter-se preocupado com a relevância ou não das "questões semânticas" anteriormente levantadas por Cairns Jr. (1980) e outros.

Outros termos empregados na literatura <sup>1(1)</sup>, tais como Mutagênese Ecológica (Seiler, 1982), Genética Toxicológica (Margolin, 1988), Ecogenética (Williams, 1991),

---

<sup>1</sup> **Ecogenética** - derivada da farmacogenética, dá ênfase às doenças resultantes das interações entre o material genético e os estímulos ambientais. **Ecogenotoxicologia** - se preocupa principalmente com os problemas que os danos genéticos induzidos podem trazer para a manutenção da integridade do ecossistema, da qual dependem a sobrevivência e reprodução das populações. **Genética Toxicológica** - ciência que estuda a indução de danos herdáveis ao material genético por vários agentes tóxicos de interesse. **Mutagênese Ecológica** - estudo dos efeitos dos mutagênicos químicos ambientais em populações silvestres.

Ecogenotoxicologia (Würglers e Kramers,1992) referem-se, especificamente, a uma ciência, emergente no Brasil, cuja preocupação ou objeto de estudo é a qualidade ambiental, no que diz respeito ao comprometimento ou não do material genético dos organismos vivos, expostos a impacto ambiental, provocado por genotoxinas impropriamente lançadas ao meio ambiente, como consequência de diferentes atividades humanas, sejam esses organismos de vida aquática, terrestre ou mesmo a própria espécie humana.

Algumas populações de animais silvestres são membros do mesmo deme, assim como subpopulações humanas. Portanto, a investigação de “danos” quimicamente induzidos nessas populações silvestres pode ajudar a identificar riscos potenciais para as subpopulações humanas e, além disso, as evidências obtidas por critérios epidemiológicos podem auxiliar os administradores ambientais a determinar se uma ação preventiva ou reparadora deve ser iniciada (Fox,1991).

Quando se quer avaliar danos irreversíveis, suspeitos ou reconhecidamente patogênicos, resultantes de interação tóxica, tanto num tecido alvo como em algum análogo, pode-se utilizar um dos marcadores biológicos de efeito. Nesta categoria estão os biomarcadores citogenéticos, entre eles as aberrações cromossômicas (AC) e os micronúcleos (MN) (Perera e Whyatt,1994; Albertini,1994).

### 1.3 BIMONITORAMENTO CITOGENÉTICO *IN SITU*

Os estudos das alterações citogenéticas, tanto *in vivo* como *in vitro*, principalmente na segunda metade do século XX, tornaram claro que elas podem resultar da ação de diferentes tipos de genotoxinas, através de vários mecanismos, nem todos já totalmente elucidados.

A suspeita inicial de que essas alterações pudessem estar associadas com transformações malignas é atualmente inquestionável. Na verdade a relação, já estabelecida, entre alterações citogenéticas específicas e tumorigênese é que tem justificado as avaliações

genotóxicas dos novos produtos químicos industriais, farmacêuticos e terapêuticos, antes de seu lançamento para o consumo (Tucker e Preston, 1996).

Além disso, os dados de toxicidade citogenética também têm sido utilizados tanto para monitoramento ambiental (ex. Hadnagy e Seemayer, 1991; Kligerman *et al.*, 1993) como para o biomonitoramento de populações humanas (ex. Rabello *et al.*, 1975; Agostini *et al.*, 1996) ou de outras espécies (ex. Cristaldi *et al.*, 1991; Bueno *et al.*, 1992), expostas a supostas condições de genotoxicidade.

Particularmente com relação ao biomonitoramento citogenético de populações humanas, Piña-Calva *et al.* (1991) salientaram que uma vez que as aberrações cromossômicas são marcadores biológicos não específicos, pois diversos tipos de exposição conduzem ao mesmo "endpoint", elas podem ser consideradas como biomarcadores adequados para indicar perigos potenciais à saúde, num ambiente alterado por diversas fontes de poluição. Por outro lado, se levarmos em consideração que os perigos citados por Piña-Calva *et al.* (1991) podem afetar não só a saúde dos indivíduos, mas também a capacidade de reprodução e sobrevivência das populações a eles expostas, comprometendo assim a integridade dos ecossistemas (Würgler e Kramers, 1992), estaremos realçando o papel da determinação de frequências de aberrações cromossômicas como um excelente método de avaliação - biomonitoramento - de danos citogenéticos *in situ*.

Nas avaliações citogenéticas dos efeitos genotóxicos ambientais *in vivo*, com mamíferos não humanos, o tecido que se tem mostrado mais prático para as análises é a medula óssea (MO), na qual se podem estudar as frequências de células eritropoiéticas interfásicas micronucleadas e de células eritropoiéticas e mielopoiéticas metafásicas com aberrações cromossômicas (estruturais e numéricas). Além disso, a observação de que eritrócitos micronucleados não são seletivamente removidos da circulação periférica de camundongos (MacGregor *et al.*, 1980) estimulou a avaliação da frequência de eritócitos micronucleados no sangue periférico e Hayashi *et al.* (1994) sugeriram que esse estudo é igualmente aceitável nas espécies em que o baço não elimina as células micronucleadas em circulação.

Embora atualmente os métodos disponíveis para a avaliação de danos citogenéticos provocados por clastógenos ambientais já estejam bem padronizados e sejam rotineiramente empregados em seres humanos e em outros organismos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* ( Dean e Danford,1984; Adler, 1984; Ribeiro,1991; Varella-Garcia, 1991; Rabello-Gay e Almeida,1991; Parry, 1996 ), por outro lado, ainda não existem protocolos padronizados, referendados e recomendados para a detecção específica de aberrações cromossômicas numéricas, embora muito esforço esteja sendo empregado nesse sentido (Adler, 1993; Warr *et al.*,1993; Natarajan,1993; Bishop *et al.*, 1996; Parry, 1996; Parry *et al.*, 1996).

### 1.3.1 Aberrações cromossômicas estruturais

Os tipos e as frequências de aberrações cromossômicas estruturais dependem da fase do ciclo celular afetada e do tipo de lesão induzida no DNA, que por sua vez depende da natureza do agente (Natarajan e Obe,1986; Carrano e Natarajan,1988; Therman e Susman, 1996). As classes de aberrações cromossômicas que são normalmente observadas e consideradas nas análises microscópicas, e as relações entre elas, foram descritas em detalhes por Savage (1975) e algumas delas, aqui consideradas, são exemplificadas nas Figuras 30 e 31.

Todos os tipos de aberrações cromatídicas podem ser detectadas em cromossomos corados convencionalmente; porém, nem todos os tipos de aberrações estruturais podem ser assim detectadas, e a detecção de alguns rearranjos estáveis, como, por exemplo, inversões ou translocações recíprocas, depende de colorações cromossômicas especiais, tais como métodos de bandamento ou os métodos mais recentes de coloração baseados em fluorescência (Tucker e Preston, 1996).

Nos casos da determinação de frequências de aberrações cromossômicas, utilizando métodos *in vivo* ou *in vitro*, é importante que as preparações citogenéticas sejam

conduzidas num período de tempo em que as células estejam no seu primeiro ciclo mitótico pós-tratamento, pois as células portadoras de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, fragmentos acêntricos e outros rearranjos assimétricos) tendem a morrer em função de perdas de DNA. Por outro lado, no biomonitoramento citogenético *in situ*, os organismos a serem avaliados estão expostos continuamente a uma mistura de agentes genotóxicos, e tanto a eliminação de células com aberrações cromossômicas que comprometem sua viabilidade, como sua produção, também estão ocorrendo de modo contínuo. Em vista disso, nesse tipo de abordagem, a coleta de material de medula-óssea, para análise citogenética, pode ser feita a qualquer momento pois, a não ser que tenha ocorrido um esgotamento medular, nesse tecido sempre existirão células portadoras de danos cromossômicos recém-ocorridos, sejam eles de natureza instável ou estável.

### 1.3.2 Aberrações cromossômicas numéricas

Ao contrário da indução de mutações de ponto e das aberrações cromossômicas estruturais, onde o alvo das interações químicas é o DNA, a manutenção do número cromossômico normal durante as divisões mitótica e meiótica depende da fidelidade da replicação e da exata segregação dos cromossomos para as células-filhas. Esses eventos dependem do funcionamento de todos os componentes do ciclo celular e de algumas atividades metabólicas específicas da divisão celular que incluem: 1) síntese e montagem dos microtúbulos e a formação do fuso de divisão; 2) síntese, divisão e funcionamento dos centríolos e corpúsculos polares; 3) montagem e funcionamento das proteínas do cinetócoro e do DNA centromérico; 4) ligação e movimento dos cromossomos no fuso; 5) estrutura e funcionamento da membrana celular; 6) citocinese. A compreensão exata da importância de cada um desses fatores e das interações entre eles ainda é motivo de intensos estudos. (Adler,1993; Parry e Sors,1993; Sbrana *et al.*,1993; Mitchell *et al.*, 1995; Parry *et al.*,1996).

Especificamente as aneuploidias podem resultar de diferentes mecanismos que incluem mal-segregação dos cromossomos, rompimento do fuso, desassociação dos microtúbulos, inativação dos centríolos, etc., os quais podem tanto ocorrer espontaneamente, como ser induzidos por agentes aneugênicos ambientais e ocupacionais (Natarajan, 1993).

Warr *et al* (1993) sugeriram que, se um composto induz a ruptura da integridade do fuso, o que leva a um atraso da divisão celular e acúmulo de metáfases, os cromossomos das células sob essa experiência prolongada de divisão podem separar suas cromátides, mesmo na ausência de um fuso bipolar funcional, entrar numa nova interfase, e dar origem a células poliplóides (tetraplóides).

Por outro lado, Mitchell e cols. (1995) sugeriram que os mecanismos responsáveis pela poliploidia espontânea e induzida, em mamíferos, são inteiramente diferentes. Na poliploidia espontânea, que dá origem a células com números cromossômicos que são múltiplos exatos do lote haplóide (normalmente tetraplóides), a endomitose ou a fusão nuclear em células binucleadas são os mecanismos envolvidos mais prováveis. Na poliploidia induzida, onde as células resultantes apresentam números cromossômicos que são múltiplos quase-exatos do lote haplóide, problemas no fuso (cinetócoros, centríolos, microtúbulos e proteínas associadas) ou na membrana é que devem ser os mecanismos envolvidos mais importantes, e o autor sugere que a denominação mais adequada para as células resultantes nesse caso seria heteroplóide ou quase-poliplóide.

Embora não existam dificuldades para a identificação de células poliplóides com os métodos citogenéticos tradicionais, o mesmo não pode ser dito para o caso de células aneuplóides, em aneuploidias não constitucionais. Uma dificuldade importante na determinação da frequência de células aneuplóides, nesses casos, é que, em preparações convencionais, somente as células hiperdiplóides são normalmente consideradas pois os decréscimos nos números cromossômicos são frequentemente tidos como problemas de preparação das lâminas. Em vista disso, a determinação da frequência de células aneuplóides tem dependido do desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de citogenética molecular, de modo semelhante ao que ainda acontece com a determinação da frequência de alguns rearranjos estruturais, já mencionados anteriormente (Tucker e Preston, 1996).

### 1.3.3 Micronúcleos

O teste do micronúcleo é um método citogenético simples baseado na contagem de pequenos núcleos no citoplasma de células recém-formadas. Os micronúcleos surgem de fragmentos cromatídicos ou cromossômicos, ou ainda de cromossomos inteiros, originados por indução de agentes clastogênicos ou aneugênicos respectivamente, que não foram incorporados aos núcleos das células-filhas durante a divisão celular. A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, em algum momento do ciclo de vida das células-mães (Carrano e Natarajan,1988).

Os micronúcleos só podem, então, ser observados em células que se dividem e devido a isso o teste do micronúcleo *in vivo*, em células da medula óssea de mamíferos, foi padronizado e tem sido a versão mais amplamente empregada do mesmo (Hayashi *et al.*,1994; CSGMT,1995).

Nos camundongos os eritrócitos imaturos resultantes da eritropoiese - eritrócitos policromáticos (PCE) - permanecem na medula óssea cerca de 12-24 h e depois passam para a circulação onde ficam por um período de tempo semelhante e vão gradualmente amadurecendo até se transformarem em eritrócitos normocromáticos (NCE), os quais permanecem em circulação por cerca de um mês (Mavournin *et al.*,1990).

A coloração azulada dos PCE, em preparações coradas com Giemsa, é devida à grande quantidade de RNA ribossômico em seu citoplasma, e permite diferenciá-los dos NCE, que na mesma preparação se coram em rosa, como pode ser verificado na Figura 12.

Ainda de acordo com Mavournin *et al.* (1990), o período que deve transcorrer entre a absorção pelo animal (camundongo) de um agente mutagênico, sua metabolização, complementação dos estágios finais do ciclo de divisão, eliminação do núcleo do eritroblasto, e o aparecimento dos micronúcleos nos PCE da MO, é no mínimo de 6 h, incluindo os atrasos que podem ocorrer no ciclo de divisão. Cerca de 12-24 h depois da absorção os PCE presentes na medula óssea correspondem aos descendentes das células que

foram expostas ao agente antes da divisão celular, enquanto que os PCE pré-existentes se movem para a circulação periférica e se transformam em NCE. Desse momento em diante, os PCE micronucleados (PCEMN) vão lentamente sendo transformados em NCE micronucleados (NCEMN). O nível de produção contínua de PCEMN e NCEMN depende da persistência do agente, das lesões do DNA, das taxas combinadas de formação e perdas de aberrações cromossômicas e da taxa de recuperação do ciclo celular. Havendo interrupção da ação do agente, a frequência de PCEMN deve voltar à taxa antiga. A variação da frequência de células micronucleadas é uma função complexa de muitos fatores, e o tempo preciso para a observação da frequência máxima induzida não pode ser previsto para um produto específico. Na maioria dos casos, o pico ocorrerá por volta das 24-60 h depois do tratamento.

Em princípio, se a exposição é contínua, ou se tratamentos repetidos são continuados por um período de tempo suficiente, um estado de equilíbrio (ou pseudo-estado de equilíbrio) deveria ser alcançado, no qual a frequência de células micronucleadas no compartimento de interesse (medula óssea ou sangue periférico) torna-se constante quando a taxa de entrada de células micronucleadas num compartimento for compensada pela perda de tais células. O tempo estimado para que se estabeleça uma frequência de equilíbrio para PCEMN na medula-óssea e sangue periférico de camundongos, levando em consideração os tempos previstos para o término da eritropoiese nessa espécie é de dois e três dias respectivamente, depois do tratamento com o agente mutagênico (Cole *et al.*, 1981). De acordo com os mesmos critérios, o tempo estimado para a frequência de equilíbrio para NCEMN no sangue periférico é de cerca de 35 dias depois da exposição. Uma vez alcançado o equilíbrio, este é mantido por longos períodos de tempo (MacGregor *et al.*, 1990).

Algumas vantagens da estimativa da frequência de células micronucleadas ser feita no sangue periférico, ao invés de na medula óssea, foram citadas por Schelegel e MacGregor(1984): 1) a preparação da amostra é simples e rápida; 2) não há necessidade de sacrificar os animais para obter as amostras; 3) várias amostragens podem ser feitas a partir do mesmo animal; 4) podem-se realizar análises retrospectivas durante testes de toxicidade; e 5) existe a possibilidade de avaliação de danos citogenéticos cumulativos, uma vez que os eritrócitos micronucleados permanecem em circulação por algum tempo.

O grupo de trabalho liderado por Hayashi ( Hayashi *et al.*, 1994) chegou ao consenso de que a análise quantitativa de eritrócitos jovens micronucleados (PCEMN), tanto na medula óssea, como no sangue periférico de espécies em que o baço não tem capacidade de remover as células micronucleadas, conforme demonstrado em camundongos por MacGregor *et al.* (1980), é um método perfeitamente aceitável de avaliação de danos genotóxicos. Além disso, com base nos resultados de Schlegel e MacGregor (1982), o mesmo grupo de trabalho considerou aceitável a análise de células maduras -NCEMN - quando a duração da exposição sob investigação não exceder o período de duração da vida das NCE.

Na Figura 13 pode-se observar o aspecto de eritrócitos micronucleados do sangue periférico (SPMN) , corados com o método Feulgen/Fast-Green.

O mesmo que foi dito anteriormente, sobre a irrelevância do momento da coleta de material da medula óssea para o estudo da frequência de aberrações cromossômicas, em organismos expostos continuamente à ação de genotoxinas, pode também ser dito sobre a coleta de material de medula óssea ou sangue periférico para a aplicação do teste do MN.

Com relação à sua aplicabilidade para a avaliação de genotoxicidade, Tice *et al.* (1994) afirmaram que o teste de aberrações cromossômicas *in vivo* , na medula óssea, só não deve ser aplicado quando houver evidência suficiente de que os produtos que se quer analisar, ou seus metabólitos, não alcançam a medula óssea. O mesmo pode, sem dúvida, ser dito para o teste do micronúcleo (CSGMT, 1995). Em vista disso, prosseguir nessa abordagem, justificando a extensão dessa aplicação no biomonitoramento citogenético *in situ*, seria totalmente contrário ao princípio científico da parcimônia.

#### 1.4 Proliferação Celular

Uma proliferação celular que ocorre depois de necrose (mortalidade celular induzida por agentes citotóxicos) é chamada de proliferação celular “regenerativa” ou “compensatória”, enquanto que uma proliferação que ocorre após a ação de agentes não citotóxicos é chamada de proliferação celular “induzida por agente mitogênico” (Tomatis,1993). A proliferação celular promovida por agentes citotóxicos é crônica, enquanto que a produzida por agentes mitogênicos apesar de intensa num determinado momento, é transitória. Tanto a proliferação celular regenerativa como a induzida por mitogênicos representam o efeito de agentes carcinogênicos (Jones *et al.*,1996).

Embora esse assunto, isto é, o papel da proliferação celular na carcinogênese, não faça parte dos objetivos deste estudo, sua menção foi feita a fim de ressaltar que a importância das avaliações quantitativas da proliferação celular vai além da razão principal pela qual elas foram aqui realizadas na dimensão do biomonitoramento citogenético *in situ*, ou seja, a verificação da citotoxicidade ou não dos agente ambientais nas células da medula óssea dos roedores silvestres estudados.

Essa verificação, nesse tipo de estudo, é de suma importância uma vez que os dois biomarcadores aqui empregados, aberrações cromossômicas e micronúcleos, somente poderão ser visualizados microscopicamente nas células descendentes daquelas que sofreram as lesões no DNA. Portanto, alterações do índice proliferativo dessas células, induzidas por qualquer um dos dois agentes citados anteriormente, poderão comprometer a interpretação dos resultados dos parâmetros citogenéticos aqui utilizados como medida de danos genotóxicos causados por agentes ambientais. Em experimentos com animais de laboratório, espera-se que após a exposição a uma substância química resulte alguma toxicidade, e essa de fato pode fornecer uma indicação valiosa do efeito da substância na medula óssea mas, se nesses casos uma toxicidade excessiva é indesejável ( Mavourmin *et al.*, 1990), o mesmo pode ser dito para o biomonitoramento citogenético *in situ*.

Os parâmetros aqui empregados para a avaliação da proliferação celular de células da medula óssea de roedores silvestres foram o índice mitótico (contagem de células

metafásicas entre 2000 células analisadas), nas preparações para análise da frequência de células com aberrações cromossômicas, e a razão PCE/NCE, nas preparações para análise da frequência de eritrócitos micronucleados.

Apesar da importância do estudo desses parâmetros (Jones *et al.*, 1996), Adler (1984) alertou para o fato de que, nas preparações de medula óssea, realizadas para a avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, a variedade de tipos celulares é tão grande (por ex. células da linhagem eritropoiética e mielopoiética) que a avaliação do índice mitótico nesse tipo de material pode tornar-se não significativo. Tice *et al.* (1994) também alertaram para o fato de que a grande variabilidade, interanimal e interexperimento, observada no índice mitótico da medula óssea, pode tornar difícil a interpretação dos dados obtidos com esse parâmetro.

A avaliação do índice mitótico pode também, por outro lado, revelar a ação de agentes que promovem atraso ou interrupção da mitose. Nesse sentido, Sbrana *et al.* (1993) sugeriram que um aumento do índice mitótico, depois da exposição a uma substância química, indica o acúmulo de mitoses, o que revela distúrbios do funcionamento do fuso. Leopardi *et al.* (1993) demonstraram que todos os produtos que induzem aneuploidia em células somáticas também alteram a progressão do ciclo celular, embora o contrário não seja verdade, uma vez que nos experimentos realizados com algumas substâncias (ex. tiabendazol) houve prolongamento do ciclo celular sem ocorrência de aneuploidia. Além disso, Warr *et al.* (1993) sugeriram que produtos que levam a um atraso da divisão celular e acúmulo de metáfases, podem dar origem a células tetraplóides.

Por outro lado, Adler (1984) reforçou a importância da avaliação da razão PCE/NCE nas preparações de medula óssea para a análise da frequência de células micronucleadas e propôs um valor normal esperado de 1:1, enquanto que Gollapudi e Mac Fadden (1995) estimaram uma frequência esperada de 50-60% de PCEs entre o total de eritrócitos da medula óssea. Adler (1984) também colocou que, se por um lado, aumentos de NCE podem significar efeitos citotóxicos (a morte das células jovens ou a depressão da proliferação da medula seriam as causas do desvio) por outro, aumentos de PCE podem significar uma atividade de proliferação regenerativa devida à depressão medular anterior. Além disso, Heddle *et al.* (1983) consideraram que uma proporção muito reduzida de PCEs

pode ser consequência tanto da interrupção da produção de PCE como da invasão da medula óssea por sangue periférico, como resultado de esgotamento medular e Adler (1984) sugeriu que, em situações experimentais, uma razão PCE/NCE menor que 25% deveria ser evitada.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A preocupação mundial com os efeitos das atividades humanas sobre o ambiente, entre outras ações, justificou a realização da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD), a Rio-92, onde foram assinados os mais importantes acordos ambientais globais da história da humanidade.

No Brasil, uma avaliação das ações realizadas após a CNUMAD foi recentemente realizada, num encontro chamado Rio 92 Cino Anos Depois ou Rio + 5 (Cordani *et al.*, 1997).

De fato, apesar dos esforços e compromissos assumidos na CNUMAD, o noticiário diário, escrito e falado, demonstra que muito pouco tem sido feito quanto ao efetivo controle de impactos ambientais<sup>(1)</sup>, a diminuição da pobreza e ao uso sustentável de recursos naturais, no mundo todo.

Especificamente no que tange a proteção da biodiversidade na Federação Brasileira, Fonseca (1997) cita que um dos objetivos propostos pela CNUMAD foi a identificação dos componentes da biodiversidade, seu monitoramento e identificação de ameaças à sua integridade, além da organização e manutenção de bases de dados. Após a realização da conferência, as iniciativas em relação à biodiversidade tiveram avanços significativos, embora “exista um longo caminho a percorrer”. Esse mesmo autor coloca que dificuldades, tais como recursos financeiros escassos, com sinais de declínio, e falta de programas de conscientização pública sobre a importância do tema, o que dificulta o impulsionamento de políticas mais agressivas por parte dos agentes governamentais, são causas de um descompasso que é agravado pela progressiva deterioração do patrimônio biológico do país.

---

<sup>1</sup> No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (no seu artigo 1º da Resolução do CONAMA nº 1, de 23/01/86) “Considera impacto ambiental qualquer alteração das propriedades físicas, químicas ou biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam” 1) a saúde, segurança e o bem estar da população; 2) as atividades sociais e econômicas; 3) a biota; 4) as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; 5) a qualidade dos recursos ambientais”. (Custódio, 1991)

Ciente de toda essa situação, e trabalhando numa instituição pública federal, que tem como um de seus objetivos desenvolver pesquisas, pretendeu-se, com o tipo de abordagem aqui adotada, e com os recursos obtidos pelo laboratório de citogenética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) através do FUNCITEC (SC), contribuir com dados modestos, mas significativos, para a identificação de parte dos efeitos indesejáveis - danos citogenéticos em células da medula óssea de roedores silvestres - decorrentes de dois tipos de atividades humanas essenciais para a sobrevivência de nossa espécie, ou seja atividade industrial e de agricultura, na Sub- Bacia do Rio Benedito na Bacia do Rio Itajaí-Açu (Figura 1).

A seleção dessa região teve como base os critérios estabelecidos num seminário do Plano de Manejo Ambiental da Sub-Bacia do Rio Benedito (Projeto Itajaí I), realizado em Rodeio (SC) em 1991, com a participação de diversos segmentos da comunidade regional, como prefeitos, vereadores, madeireiros, agricultores, professores dos ensinos de primeiro e segundo grau e pesquisadores de três universidades catarinenses: FURB (Universidade Regional de Blumenau), UNIVALI ( Universidade do Vale do Itajaí) e UFSC, onde foram também definidos os objetivos específicos do referido projeto (Caubet e Frank, 1993). Um desses objetivos foi a elaboração de um diagnóstico de poluição ambiental da região, com o qual pretendemos contribuir com os dados aqui levantados.

A relevância econômica do Vale do Itajaí dentro do Estado de Santa Catarina tem sido reconhecida tanto a nível estadual como nacional e até mesmo internacional, pois estão ali localizadas não só indústrias de grande porte, dos mais variados tipos, como também são ali cultivados diferentes produtos importantes no consumo alimentar e também na indústria de alimentos.

Em vista disto não é difícil observar-se na região o impacto ambiental conseqüente das atividades antrópicas desordenadas, tais como o desmatamento e o comprometimento dos recursos hídricos. No entanto, a conseqüência imediata mais grave, que vem inclusive despertando o interesse das atividades governamentais para a necessidade de estudos de análise ambiental na região, são as enchentes e as ameaças de enchentes, que não só colocam em risco milhares de vidas humanas, como também são uma ameaça constante ao seu desenvolvimento sócio-econômico

A bacia do Rio Itajaí-Açu abrange uma área de 15 mil quilômetros quadrados, inteiramente localizada no Estado de Santa Catarina, com uma população de cerca de 1 milhão de habitantes. Esta área está distribuída por 49 municípios, sendo Blumenau o pólo geoeconômico da região.

A bacia se encontra quase que inteiramente em região de Mata Atlântica que abriga, no Vale do Itajaí, um grande número de espécies endêmicas nada ou pouco estudadas. Segundo Klein, citado por Caubet e Frank (1993, p.7) da mata têm sido explorados, indiscriminadamente, o palmito (*Euterpe edulis*), com fins alimentares, a canela sassafrás (*Ocolea pretiosa*) para as indústrias farmacêuticas e de química fina, e diversas espécies de madeira de lei entre as quais a mais abundante é a canela preta (*Ocotea catharinensis*). O "capoeirão", um estágio desenvolvido de sucessão ecológica, tem sido também intensamente explorado para finalidade energética.

A caça da fauna nativa tem sido usada como complemento alimentar desde a época da colonização e a carne da caça continua sendo comercializada clandestinamente, apesar de ser considerada crime (Caubet e Frank, 1993).

Devido à natureza e intensidade diferentes das atividades humanas em áreas de agricultura e áreas industriais, dois tipos de ambientes antropogênicos, é de se esperar que eles estejam sujeitos aos diferentes tipos de impacto provocado pelos diferentes tipos de estressores neles lançados. Por exemplo, o uso direto de pesticidas está concentrado em regiões de agricultura, enquanto que o uso de fenóis e clorafenóis está ligado a atividades urbanas e industriais (Bro-Rasmussen e Lokke, 1984). Colborn (1995) ressaltou que avaliações globais, abrangentes e balanceadas, tanto retrospectivas como prospectivas, dos efeitos causados pelos produtos químicos lançados no ambiente, são imperativas.

No sentido de avaliar como e quanto possíveis estressores químicos ambientais podem estar interferindo no material genético das populações de roedores silvestres das áreas objeto deste estudo - Arrozal, Área de Preservação e Área Industrial, do Município de Timbó- Vale do Itajaí / SC (Figura 2), foi aqui adotado o método ecogenotoxicológico - biomonitoramento citogenético *in situ* - através de comparações de células com aberrações cromossômicas e micronúcleos e do índice mitótico.

Esse tipo de biomonitoramento já foi empregado por diferentes pesquisadores, utilizando diferentes sistemas, em diferentes partes do mundo (por ex.: Cristaldi *et al.*, 1990,1991; Rubes *et al.*, 1992; Bueno *et al.*, 1992; Alay *et al.*, 1994; Marques, 1994; Vargas *et al.*, 1996; Ieradi *et al.*, 1996) mas, apesar disso, pode-se dizer que essa metodologia ainda é subutilizada, embora os problemas ambientais sejam globais e do conhecimento de todos.

Outros objetivos foram: comparar os resultados obtidos pelos diferentes parâmetros citogenéticos para a avaliação de danos genotóxicos e analisar a diferença de sensibilidade, das espécies estudadas, ao impacto provocado pelas genotoxinas ambientais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A região selecionada para este estudo está localizada na sub-bacia IV do médio Vale do Itajaí-SC, a qual é constituída pelos rios Cedro e Benedito, que juntos são afluentes do Rio Itajaí e abrange o município de Timbó (Figura 1). Esta região foi escolhida devido à sua localização, suas atividades agrícolas e industriais e também devido ao apoio de infraestrutura do então Secretário do Meio Ambiente de Timbó, Sr. Reni Becker.

Nesta região estão localizadas várias indústrias que, segundo informações da Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Timbó, lançam seus efluentes nos rios da região (Anexo). Dados sobre a natureza dos produtos que estão sendo lançados nos rios não são disponíveis e apenas pode-se deduzir quais sejam pela natureza da atividade industrial. Quanto à agricultura, a principal atividade é a do cultivo de arroz irrigado; nas proximidades, existem também plantações de fumo, cebola, milho e batata em menores proporções.

A Tabela I apresenta informações - fornecidas pela Secretaria Municipal de Agricultura - EPAGRI-CIDASC-Timbó-SC - sobre os principais agrotóxicos usados nas plantações de arroz do município. Apesar destas informações oficiais, informações pessoais, obtidas junto aos agricultores, revelam também a utilização de propanil - nome comercial Satanil E e similares - um herbicida constituído de tiocarbamatos e cloroanilida que pertence à classe toxicológica III.

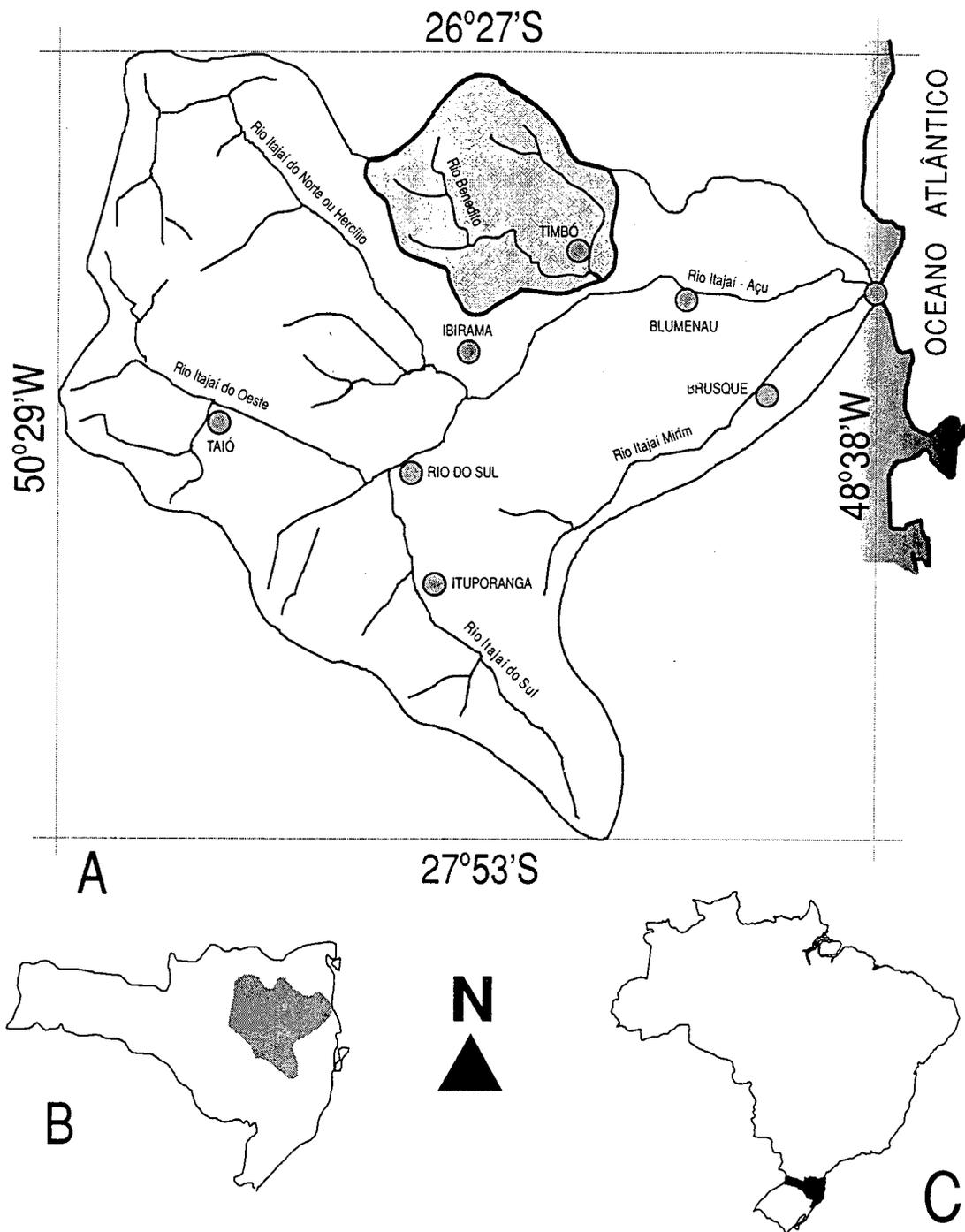


Figura 1 Localização Geográfica

- (a) - Localização da Sub-Bacia do Rio Benedito na Bacia do Rio Itajaí-Açu.
- (b) - Localização da Bacia do Rio Itajaí-Açu no Estado de Santa Catarina.
- (c) - Localização do Estado de Santa Catarina no Brasil

TABELA I - PRINCIPAIS AGROTÓXICOS APLICADOS NAS PLANTAÇÕES DE ARROZ DO MUNICÍPIO DE TIMBÓ-SC (SEGUNDO EPAGRI-CIDASC), SUA FUNÇÃO, GRUPO QUÍMICO E CLASSE TOXICOLÓGICA.

Nome técnico	Nome comercial	Classe	Classe toxicológica <sup>1</sup>
Propanil	Stam F-34 Surcapur Br Propantin CNDA	Herbicida derivado do cloroanilida	III
Oxadiazon	Ronstar 25E e similares	Herbicida do grupo dos Oxadiazoles	III
Carbofuran	Furadan 5G e Carbofuran 5%	Inseticida-Nematicida - grupo dos carbamatos	I
Glifosato	Roundup	Herbicida sistêmico derivado da glicina - organofosforado	IV

1- Classificação toxicológica (Skalitz e Polack, 1991)

- I - altamente tóxico ao homem
- II - medianamente tóxico ao homem
- III - pouco tóxico ao homem
- IV - praticamente não tóxico ao homem

### 3.2 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

No município de Timbó-SC, as atividades industriais e de agricultura ficam situadas em regiões distintas.

A Área Industrial está localizada próxima ao centro de Timbó, às margens do Rio Benedito, no bairro de Arapongas, com fácil acesso à rodovia. As atividades de agricultura ficam mais espalhadas, porém, a maior concentração de plantações de arroz está situada no bairro de Tiroleses (Figura 2).

Com base nestas características foram selecionados os três pontos de coleta abaixo descritos:

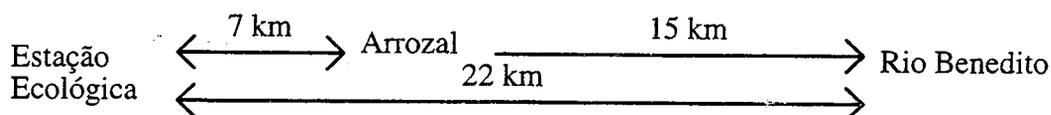
(A) Arrozal - Tiroleses-Timbó-SC. Neste ponto as coletas foram feitas num capoeirão (resto de mata Atlântica) localizado logo atrás de uma faixa de plantação de arroz.

Ponto selecionado para avaliação genotóxica dos agrotóxicos utilizados no cultivo do arroz (Figura 3).

(B) Área de Preservação - Rio Fortuna-Timbó-SC. Este ponto foi tombado como uma área de preservação permanente pela Lei nº 1328 de 11 de dezembro de 1991 pela Prefeitura Municipal de Timbó e abriga a nascente do Rio Fortuna. Este ponto foi selecionado para o biomonitoramento citogenético de organismos não expostos diretamente a poluentes ambientais e comparação com os outros dois (Figuras 4 e 5).

(C) Área Industrial- Arapongas-Timbó-SC. Neste ponto, as coletas foram feitas num capoeirão localizado às margens do Rio Benedito, a aproximadamente 3 km abaixo da Área Industrial. Além dos rejeitos industriais, o Rio Benedito também recebe os rejeitos domésticos e os provenientes das atividades de agricultura, já que ele corta toda a região (Figura 6).

As distâncias entre os pontos, medidos pela estrada, podem ser assim esquematizadas:



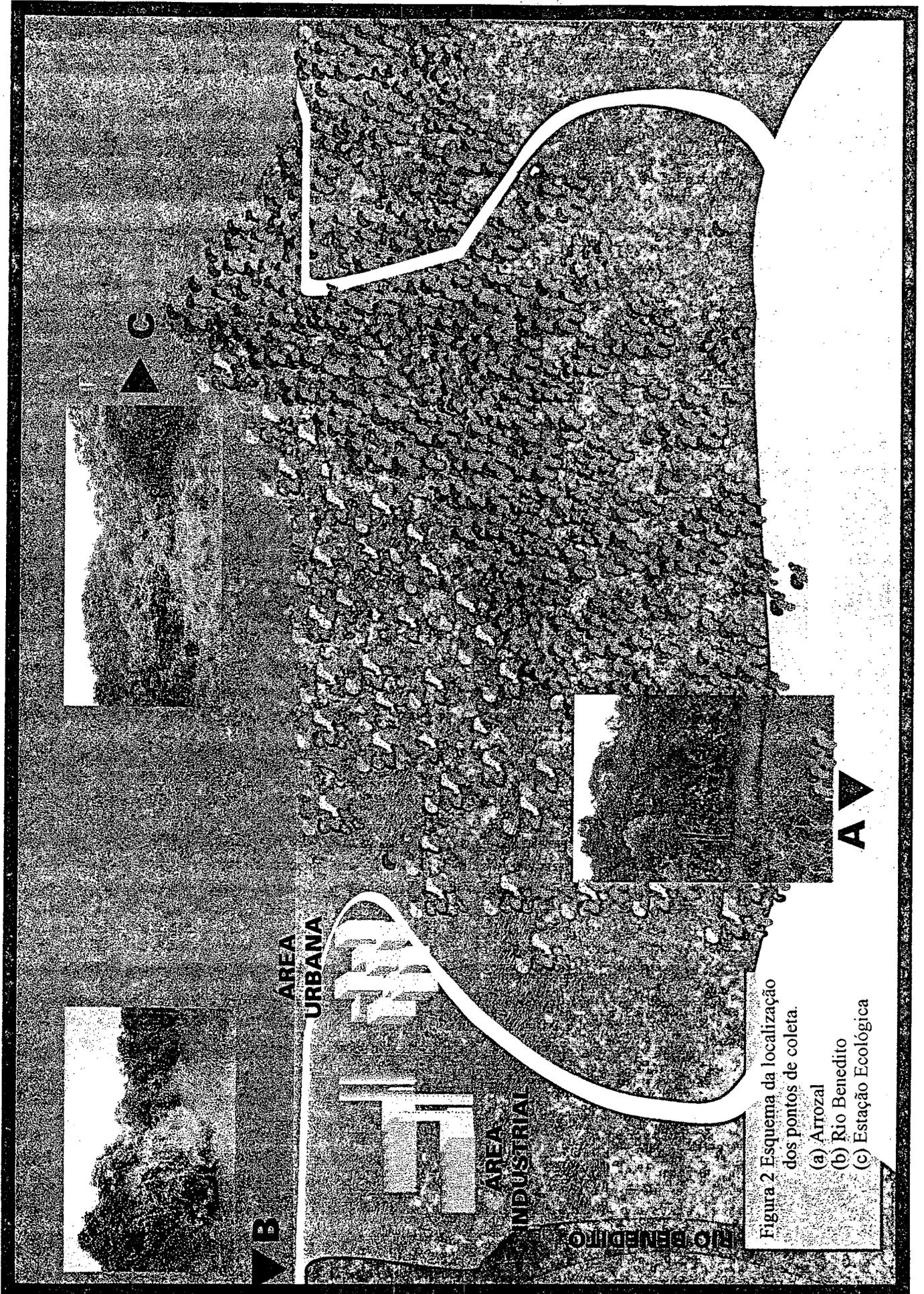


Figura 2 Esquema da localização dos pontos de coleta.

- (a) Arrozal
- (b) Rio Benedito
- (c) Estação Ecológica

### 3.3 MÉTODO DE COLETA

Nos três pontos de coleta foram estabelecidos transectos lineares de 200 metros cada, da borda para o centro da mata, onde a cada 10 metros foram distribuídas duas armadilhas de arame, tipo gaiola, nas dimensões 26x15x10 cm, num total de 40 armadilhas por ponto de coleta (Figura 8). As iscas utilizadas nas armadilhas foram rodela de milho verde untadas com pasta de amendoim (Amendocrem).

Uma vez distribuídas, as armadilhas ficaram no campo 4 noites consecutivas, tendo sido revisadas todas as manhãs, a fim de recolher os animais coletados e substituir as iscas, quando necessário.

Todos os animais coletados foram transferidos das armadilhas para "mouse-packs" contendo serragem, água e ração (Figura 7) e assim acondicionados foram transportados para o laboratório do Colégio Estadual Rui Barbosa (Timbó-SC), onde foram feitas as preparações citológicas preliminares tanto para o estudo das frequências de micronúcleos como de aberrações cromossômicas. O tempo transcorrido entre a coleta do animal e o seu preparo para a análise citológica foi no máximo de 24 horas.

Os animais utilizados nas análises das frequências de micronúcleos e aberrações cromossômicas foram os mesmos.

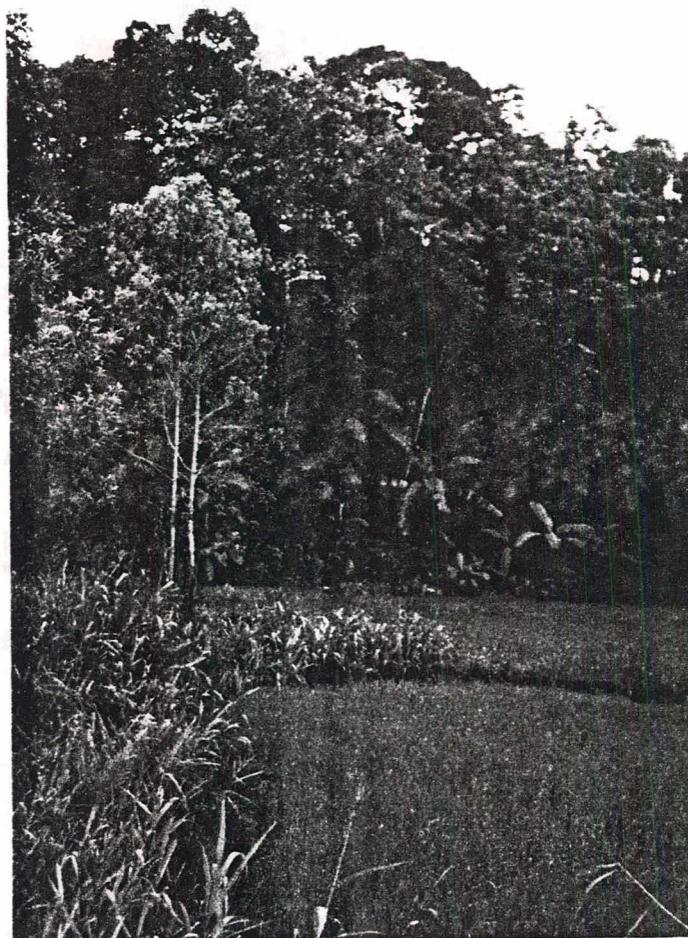


Figura 3 - Arrozal tendo ao fundo a mata onde foram distribuídas as armadilhas.



Figura 4 - Estrada para a Área de Preservação. Abaixo, no fundo, pode-se ver a região dos arrozais.



Figura 5 - Área de Preservação - vista parcial da mata onde os animais foram coletados.

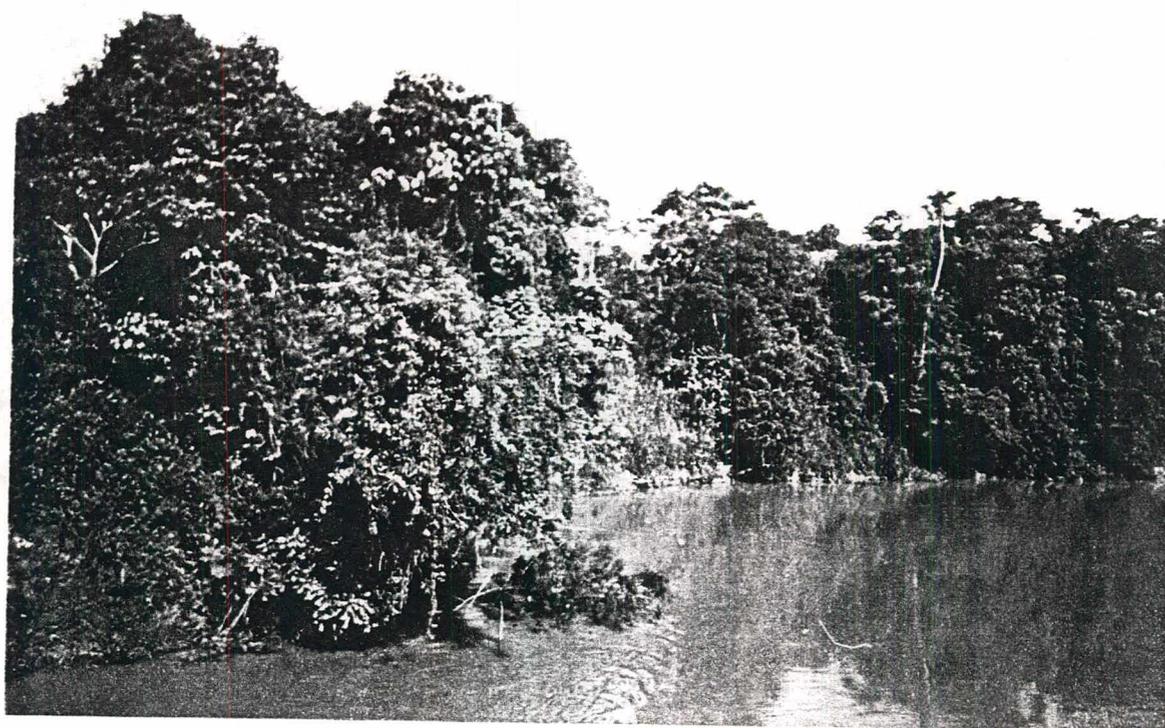


Figura 6 - Área Industrial - vista parcial da mata, às margens do Rio Benedito e abaixo da Área Industrial, onde os animais foram coletados.



Figura 7 - Transferência do animal coletado, da armadilha para o "mouse-pack", no local de coleta.

### 3.4 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

Não há registros anteriores sobre a diversidade e densidade de roedores silvestres na região, de modo que a seleção das espécies, para o biomonitoramento citogenético *in situ*, foi posterior ao trabalho de coleta e, portanto, posterior à seleção dos pontos.. Para tanto, estabeleceram-se os seguintes critérios: a) amplitude de distribuição, que incluísse os três pontos selecionados; b) densidade populacional suficiente para formar a amostra pretendida - 10 animais de cada espécie por ponto - ao longo de um ano e c) simpatria.

Com base nesses critérios e nos resultados obtidos nas coletas (Tabela II), foram selecionadas para o estudo as seguintes espécies: *Akodon montensis* (2n=24; Figura 9) e *Oryzomys nigripes* (2n=62; Figura 10), espécies amplamente conhecidas do ponto de vista citogenético.

A utilização de duas espécies simpátricas no biomonitoramento citogenético *in situ* tem como objetivo revelar se existe ou não diferença de sensibilidade quanto aos efeitos genotóxicos dos poluentes ambientais, o que poderá refletir-se a médio ou longo prazo numa alteração do índice de diversidade local.

É importante salientar que, havendo informação prévia sobre a diversidade e a demografia de roedores silvestres de uma região, os pontos poderão ser melhor escolhidos, a amostra pretendida ser melhor estipulada e o esforço de coleta ser menos dispendioso, tanto em termos de sacrifício de animais, como de tempo e dinheiro.

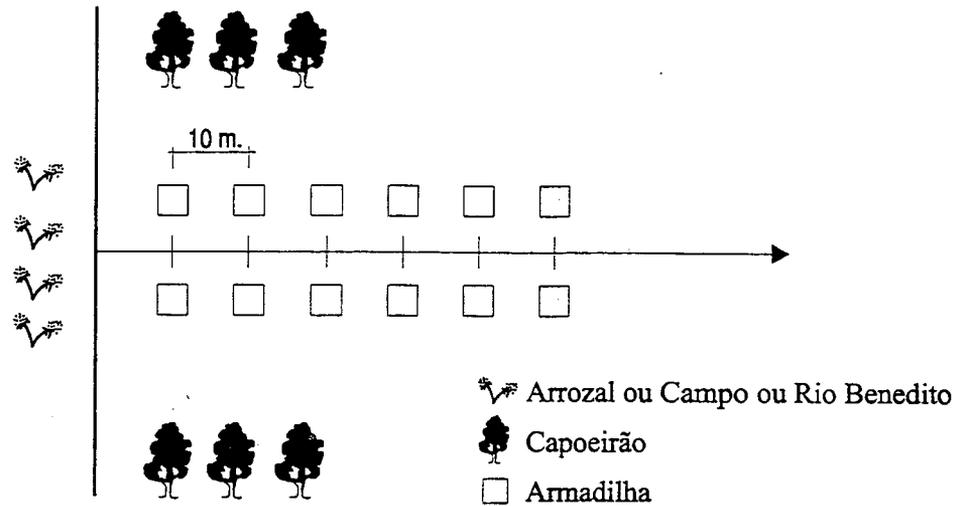


Figura 8. Representação da distribuição das armadilhas nos pontos de coleta.

### 3.5 PREPARAÇÃO E ANÁLISE CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS ERITROPOIÉTICAS MICRONUCLEADAS NA MEDULA ÓSSEA

#### 3.5.1 Preparação direta da medula óssea

Em todos os animais, as preparações para o estudo da frequência de micronúcleos em células da medula óssea foram feitas de acordo com a seqüência sugerida por Schmid (1975), modificada de acordo com o roteiro abaixo:

1. Após o sacrifício do animal retirar as tíbias<sup>(1)</sup> seccionar as epífises e, por meio de uma seringa contendo 5 ml de soro bovino fetal, transferir o material da medula diretamente a um tubo de centrífuga.
2. Ressuspender gentilmente o material até a homogeneização total do material colhido.
3. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
4. Retirar o sobrenadante e homogeneizar as células com o soro restante.
5. Preparar as lâminas.

### 3.5.2 Preparação das lâminas

As lâminas foram lavadas com sabão neutro, enxaguadas em água destilada, fervidas com HCl 0,2 N, novamente enxaguadas em água destilada e colocadas para secar na estufa. Após secas foram guardadas em caixas de lâminas.

Utilizando-se as lâminas limpas foram preparados 5 esfregaços para cada animal com o material previamente ressuspendido.

Após 24 horas de secagem ao ar, as preparações foram fixadas em metanol por 10 minutos e novamente deixadas secar ao ar. Depois de secas, as lâminas foram guardadas em caixas apropriadas até o momento de serem coradas para a análise microscópica.

---

<sup>1</sup> uma vez que o mesmo animal foi também utilizado para o estudo das frequências de aberrações cromossômicas (AC) utilizou-se os fêmures para AC e as tíbias para MN.

### 3.5.3 Coloração das lâminas

A coloração foi feita com o corante Giemsa diluído em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8 na proporção de 1:20 durante 8-10 minutos. Logo após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante e deixadas secar ao ar.

### 3.5.4 Análise do material

A análise foi feita em microscópio óptico comum a uma resolução de 10x100.

Foram analisadas 400 eritrócitos policromáticos e 400 eritrócitos normocromáticos em cada lâmina, num total de 2000 eritrócitos de cada tipo, somando um total de 4000 eritrócitos para cada animal.

Foram consideradas: a) as frequências de eritrócitos jovens micronucleados (PCEMN), b) as frequências de eritrócitos maduros micronucleados (NCEMN), c) as frequências de células mortas (CM), ou seja, PCE e NCE com mais de três micronúcleos e d) a razão PCE/NCE, estimada a partir da contagem de PCE entre as primeiras 100 NCE observadas em cada lâmina.

### 3.6 PREPARAÇÃO E ANÁLISE CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO

#### 3.6.1 Obtenção do material

Uma vez que os animais utilizados neste estudo foram sacrificados para obtenção do material de medula óssea, o sangue periférico foi obtido através de punção cardíaca.

Para a punção, utilizou-se uma seringa de 1 ml, heparinizada, com a qual foi retirado entre 0,1 a 0,5 ml de sangue de cada animal.

#### 3.6.2 Preparação das lâminas

O procedimento de limpeza das lâminas é o mesmo descrito anteriormente.

Utilizando-se as lâminas limpas, foram preparados 5 esfregaços de cada animal, com o sangue obtido na punção cardíaca.

Após 24 horas de secagem ao ar, as preparações foram fixadas em metanol por 10 minutos e novamente deixadas secar ao ar. Depois de secas as lâminas foram guardadas em caixas apropriadas até o momento de serem coradas para a análise microscópica.

### 3.6.3 Coloração das lâminas

A coloração foi feita utilizando-se a reação Feulgen seguida da coloração com o corante Fast-Green ácido, conforme o roteiro abaixo:

#### 3.6.3.1 Coloração Feulgen

1. Colocar os esfregaços, previamente fixados, em HCl 5 N, a temperatura ambiente, durante 20 minutos.
2. Retirar do HCl 5 N e lavar em água corrente por 10 minutos e secar ao ar.
3. Depois de secar, colocar no reativo de Schiff por pelo menos 60 minutos.
4. Retirar do reativo de Schiff e lavar rapidamente, lâmina por lâmina, em água corrente.
5. Secar ao ar.

#### 3.6.3.2 Coloração com Fast-Green ácido

As lâminas previamente coradas com Feulgen foram colocadas por 1 minuto numa solução de Fast-Green ácido (0,1 g de Fast-Green diluído em 100 ml de ácido acético 1%), em seguida lavadas em dois banhos de água destilada e secas ao ar.

### 3.6.4 Análise do material

Foram analisados<sup>2</sup> 1000 eritrócitos por lâmina num total de 4000 eritrócitos por animal.

A análise foi feita em microscopia óptica comum numa resolução de 10x100.

## 3.7 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E ÍNDICE MITÓTICO

### 3.7.1 Obtenção do material

De todos os espécimens foram feitas preparações diretas da medula óssea, segundo a metodologia de Ford e Hamerton (1956), modificada de acordo com o roteiro abaixo:

1. Injetar, intraperitonealmente, 1 ml de solução de colchicina a 0,1% para cada 100 g de peso animal.
2. Após 1 ou 2 horas sacrificar o animal.

---

<sup>2</sup> É importante salientar que todas as análises citológicas foram feitas em teste cego, ou seja, a identificação da espécie e do local de coleta só foi feita após o material ter sido analisado

3. Retirar os fêmures, seccionar as epífises e, por meio de uma seringa, transferir o material da medula diretamente a um tubo de centrífuga utilizando solução hipotônica (KCl 0,075 M) a temperatura ambiente.
4. Ressuspender gentilmente o material e manter na solução hipotônica por 10 minutos.
5. Centrifugar a 800 rpm por 5 minutos.
6. Retirar o sobrenadante e proceder à fixação, adicionando, lentamente, 5 ml de fixador Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético); ressuspender e centrifugar 5 minutos.
7. Trocar o fixador por 3 vezes, no mínimo, conforme a etapa nº 6.
8. Após a última centrifugação, e conforme a concentração do precipitado, deixar 1 ml do fixador para a preparação das lâminas.

### 3.7.2 Preparação das lâminas

As lâminas limpas (conforme descrição do item 3.5.2), que seriam utilizadas nas preparações de material para análise cromossômica, foram guardadas na geladeira em álcool absoluto.

Em cada lâmina ainda molhada de álcool foram pingadas duas a três gotas do material previamente ressuspendido (item 3.7.1) e, em seguida, o material foi "incinerado", a fim de diminuir os resíduos gordurosos. Foram preparadas 5-6 lâminas por animal.

### 3.7.3 Coloração das lâminas

A coloração convencional foi feita conforme descrição do item 3.5.3.

Havendo necessidade de diferenciar entre artefatos de coloração e fragmentos procedeu-se a descoloração do material previamente tratado com Giemsa e a recoloração com a reação de Feulgen conforme a descrição abaixo.

#### 3.7.3.1 Descoloração das lâminas

Para retirar a coloração com Giemsa as lâminas foram mergulhadas por 1-2 minutos numa solução contendo 99 ml de álcool 70° e 1 ml de HCl 1 N e a seguir lavadas em álcool 70°.

Após este procedimento as lâminas foram deixadas secar ao ar.

### 3.7.3.2 Coloração com Feulgen<sup>3</sup>

1. Colocar as lâminas descoradas conforme o item anterior em HCl 5 N, a temperatura ambiente, durante 20 minutos.
2. Retirar do HCl 5 N, lavar em água corrente por 10 minutos e secar ao ar.
3. Depois de secas, colocar no reativo de Schiff por pelo menos 60 minutos.
4. Retirar do reativo de Schiff e lavar rapidamente em água corrente.
5. Secar ao ar.

### 3.7.4 Análise do material

Foram analisadas 100 células por animal (20 por lâmina) para a determinação da frequência de aberrações cromossômicas.

Foram consideradas as frequências de células portadoras dos seguintes tipos de aberrações cromossômicas estruturais, classificadas de acordo com Savage (1975): quebras e "gaps" cromatídicos, quebras e "gaps" cromossômicos e fragmentos acêntricos.

---

<sup>3</sup> a) Todo o material foi preparado do modo acima descrito até a etapa 3.7.2, num laboratório localizado em Timbó-SC. Após a fixação, o material foi transferido para um isopor contendo gelo e, assim acondicionado, foi transportado para o Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética da UFSC, onde ficou armazenado em "freezer" e foi preparado gradativamente.

b) Após sacrificado, cada animal recebeu uma etiqueta para identificação na qual constam as seguintes informações: a) n<sup>o</sup> do animal; b) sexo; c) data da coleta; d) local de coleta; e) identificação taxonômica e f) peso. Os animais utilizados estão sendo preservados em "freezer" e vêm sendo taxidermizados na medida do possível. Todos os animais taxidermizados fazem parte da coleção de mamíferos do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC.

Além dessas, foram consideradas: a) as frequências de células com pelo menos um cromossomo apresentando segregação precoce do centrômero, b) as frequências de células poliplóides e c) as frequências de células danificadas, ou seja, células que apresentavam seu material nuclear visivelmente diferente dos padrões normais interfásicos ou de alguma etapa da divisão mitótica (Figuras 30 e 31).

Para a determinação do índice mitótico foram analisadas 2000 células por animal (500 por lâmina).

### 3.8 DOCUMENTAÇÃO DO MATERIAL

Todas as células consideradas aberrantes com relação ao seu conteúdo cromossômico foram fotografadas. Tanto a discriminação final das aberrações como a quantificação das mesmas foram feitas com base na comparação do material fotografado e na análise microscópica.

As fotos das placas metafásicas foram feitas em aumento de 1000x, num microscópio de fotografia Olympus BH-2.

Para as fotos preto e branco utilizou-se o filme Agfa Copex-Pan AHU-TRI 13, com o exposímetro (Olympus) ajustado para ASA 12, ajuste de exposição 2,0, reciprocidade 4 e filtro verde.

Para as fotos coloridas utilizaram-se filmes Kodak ou Fuji ASA 100 revelados comercialmente.

### 3.8.1 Revelação dos filmes preto e branco

Os filmes foram revelados com o revelador D-72 preparado como segue:

Solução estoque - 3 g de Elon ou Metol, 45 g de Sulfito de Sódio Anidro, 12 g de Hidroquinona, 80 g de Carbonato de Sódio e 2 g de Brometo de Potássio diluídos em 500 ml de água destilada (40°C). Depois da diluição, completar com água destilada até 1 litro e guardar em frasco escuro na geladeira (mínimo 5°C).

Solução de trabalho - solução estoque diluída em água destilada na proporção de 1:1, a 18°C durante 8 minutos. Deve ser preparada na hora e descartada após mudar de cor.

A fixação foi feita em fixador Kodak comercial por 5 minutos e a lavagem final do negativo em água corrente foi feita durante 15-20 minutos.

### 3.8.2 Cópia das fotos

As cópias foram feitas num ampliador da marca Ranger com uma objetiva Astron 50 mm.

Utilizou-se o papel profissional Kodabrome Print F3 (Kodak), revelado com Dektol (Kodak) e fixado com o mesmo fixador do filme.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação estatística entre as populações intra e interespecíficas, com respeito aos totais de células com micronúcleos e aberrações cromossômicas, foi aplicado o teste do  $X^2$ , que leva em consideração o tamanho da amostra, sem no entanto levar em consideração as diferenças individuais. Quando a frequência de um determinado evento na população foi muito baixa (considerada um evento raro), foi utilizado o  $X^2$  condicional para a comparação de modelos de Poisson (Pereira, 1991).

Por outro lado, quando as variações interindividuais foram consideradas relevantes, usou-se o teste ANOVA para comparação das populações. A desvantagem deste teste é que o número de células por indivíduo não é levado em consideração, o que é justamente o oposto do teste do  $X^2$  usado, o qual não considera as variações entre indivíduos.

Para a visualização das diferenças entre as populações, emparelhou-se os percentis das 3 populações, de acordo com a ordem do percentil, e o resultado foi apresentado em gráficos de percentis. Por exemplo, na Figura 18 (Comparação de Percentis de PCE/NCE em *O. nigripes*), o valor de 0,8 na abscissa significa que 80% dos indivíduos de *O. nigripes* da Área de Preservação apresentam uma razão PCE/NCE menor do que 0,5 e que 20% apresentam um razão PCE/NCE entre 0,6 e 0,5. Por outro lado, 80% dos indivíduos do Arrozal apresentam uma razão PCE/NCE menor que 0,8% e os demais 20% uma razão entre 0,8 e 0,9.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DAS COLETAS

A Tabela II apresenta os resultados obtidos nas coletas feitas de junho de 1993 a fevereiro de 1996, período em que a maior parte dos animais aqui estudados foram coletados; no entanto, nem todos os exemplares que constam dessa tabela puderam ser incluídos nas análises, ou pelo fato das preparações citológicas não terem ficado boas, ou pelo fato de não ter sido possível analisar todos os parâmetros em um mesmo animal, como foi nosso propósito inicial.

Além disso, apesar de todas as tentativas feitas, durante o período acima mencionado, para coletar outros exemplares de *Oryzomys nigripes* no Arrozal, a fim de completar a amostra pretendida, outros quatro exemplares dessa espécie, dois coletados em dezembro de 1992 (RT 06 e 12) e dois coletados em janeiro de 1993 (RT 66 e 73), foram incluídos nas análises, embora não tenha sido possível analisá-los quanto a todos os parâmetros desejados.

Assim sendo, a Tabela III mostra a quantidade de animais analisados, dentre as espécies escolhidas (de acordo com os critérios discriminados no item 3.3), nos pontos selecionados.

TABELA II- RELAÇÃO DAS ESPÉCIES E DO NÚMERO DE EXEMPLARES DE ROEDORES SILVESTRES COLETADOS NA REGIÃO DE TIMBÓ-SC NO PERÍODO DE JUNHO DE 1993 A FEVEREIRO DE 1996

Espécie (n <sup>o</sup> cromossômico)	Local de coleta	Quantidade de animais
<i>Akodon montensis</i> (2n=24)	Arrozal	13
	Á. Preservação	13
	Á.Industrial	14
<i>Akodon nigrita</i> (2n=52)	Arrozal	3
	Á. Preservação	2
	Á.Industrial	1
<i>Oryzomys nigripes</i> (2n=62)	Arrozal	5
	Á. Preservação	13
	Á.Industrial	10
<i>Delomys sublineatus</i> (2n=72)	Á.Preservação	1

TABELA III - RELAÇÃO DAS ESPÉCIES E DO NÚMERO DE EXEMPLARES , POR ESPÉCIE E LOCAL DE COLETA, QUE COMPÕEM A AMOSTRA ESTUDADA

Espécie	Arrozal	Área de Preservação	Área Industrial
<i>Akodon montensis</i>	13	12	13
<i>Oryzomys nigripes</i>	8	11	10

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DAS ESPÉCIES COLETADAS

Todas as espécies de roedores coletadas, nos três locais de estudo, são características de Mata Atlântica e bem conhecidas do ponto de vista citogenético.

A caracterização citotaxonômica das espécies coletadas, assim como a descrição dos polimorfismos observados, foi feita pelo Dr. Ives José Sbalqueiro, do Departamento de Genética da UFPr. Sendo assim, as Figuras 9, 10, 11A, 11B e 11C foram elaboradas no laboratório do Dr. Sbalqueiro a partir de material previamente analisado no laboratório de citogenética da UFSC e posteriormente encaminhado a Curitiba para a caracterização citotaxonômica e diagnóstico definitivo das variações cariotípicas observadas.

As Figuras 9 e 10 mostram os cariótipos de *A. montensis* e *O. nigripes* respectivamente, as duas espécies incluídas nas análises deste estudo.

Em alguns espécimens de *Akodon montensis* foram observadas algumas alterações cariotípicas secundárias e alguns polimorfismos numéricos que estão ilustrados nas Figuras 11A,B e C.

#### 4.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS

As Tabelas IV a XV apresentam os dados quantitativos obtidos nas análises do material proveniente de medula óssea e sangue periférico, para a determinação das frequências de células micronucleadas. As Figuras 12-16 representam ilustrações do material estudado.

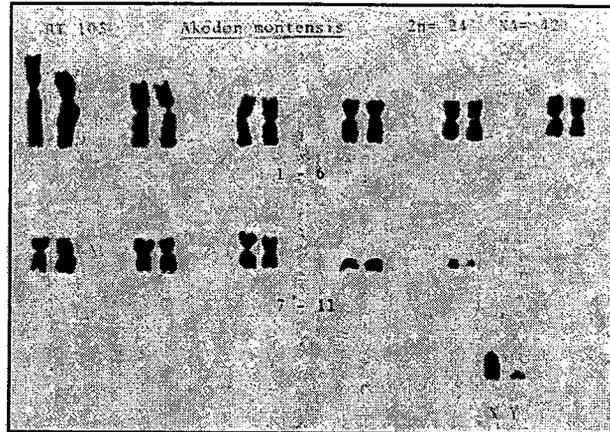


Figura 9 Cariótipo de *Akodon montensis* ( $2n = 24$ )

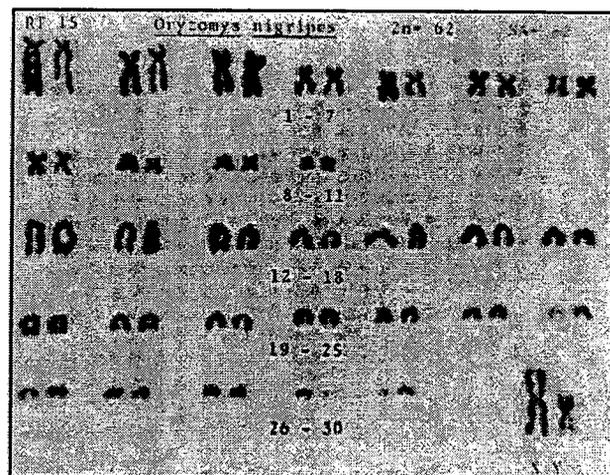


Figura 10 Cariótipo de *Oryzomys nigripes* ( $2n = 62$ )

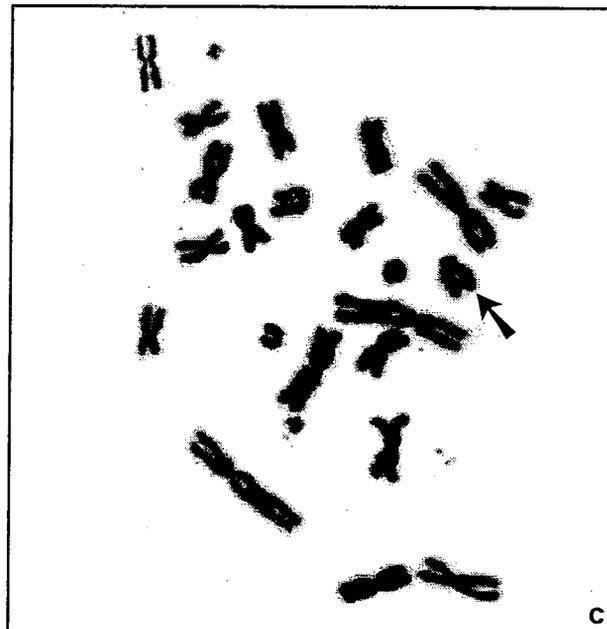
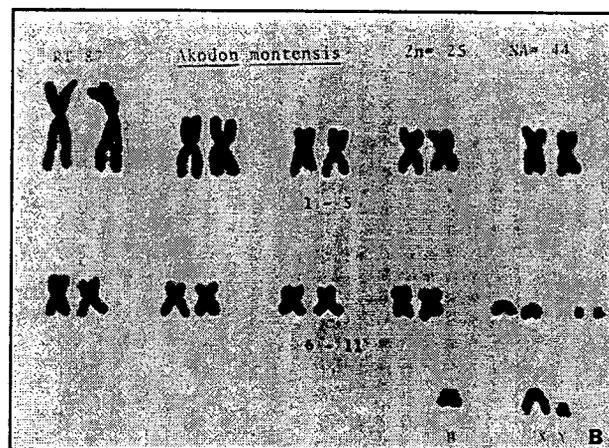
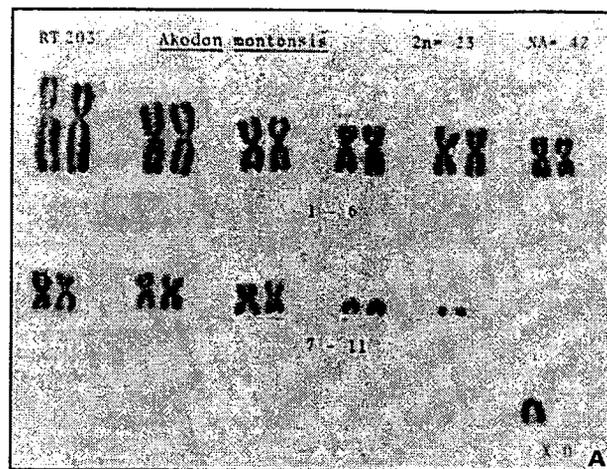


Figura 11 Variações cariotípicas observadas em *Akodon montensis*  
 A -  $2n = 23$  (X0);  
 B -  $2n = 25$  (B);  
 C -  $2n = 24$  (seta: cromossomo X com braço P "grande")

As Figuras 12 e 13 mostram o material de medula óssea corado com Giemsa e sangue periférico corado com Feulgen/Fast-Green, respectivamente.

As Figuras 14 e 15 têm o objetivo de demonstrar que algumas granulações observadas em células da medula óssea coradas com Giemsa, que poderiam ser confundidas com restos de material nuclear, por não apresentarem refringência diferente deste, não coram com Feulgen. Estas granulações têm ampla ocorrência nas células de alguns animais, daí nossa preocupação em tentar caracterizar sua natureza. Com a metodologia aplicada, podemos afirmar que tais estruturas não contêm DNA.

Sempre que houve dúvida quanto à real natureza das granulações citoplasmáticas observadas, optou-se por descorar o material inicialmente corado com Giemsa e corar novamente utilizando o método Feulgen/Fast-Green. Deste modo, as Figuras 16.1 e 16.2 mostram que muitas vezes este procedimento confirma a natureza dos micronúcleos, apesar do seu pequeno tamanho.

A Figura 16.3 mostra o padrão de material nuclear disperso no citoplasma de eritrócitos que foram incluídos na amostra como células mortas. É interessante notar que esse padrão, embora relativamente frequente em células da medula óssea, foi observado em apenas quatro das 246000 células de sangue periférico analisadas.

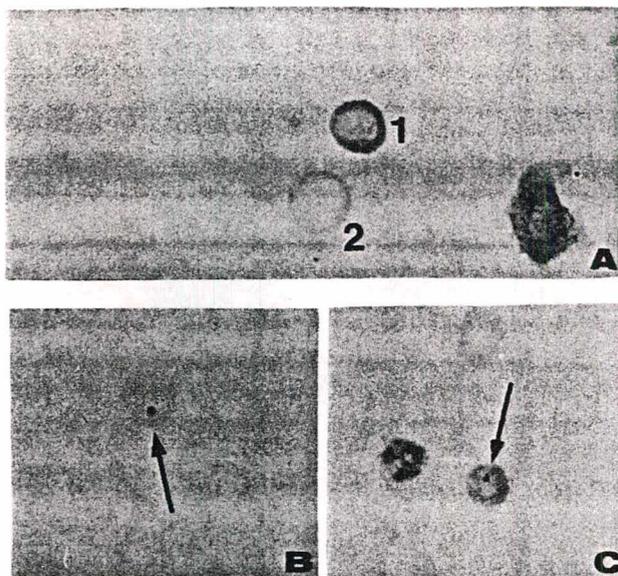


Figura 12 - Eritrócitos de medula óssea corados com Giemsa.

- A - 1 - Célula Policromática (PCE)
- 2 - Célula Normocromática (NCE)
- B - Célula Normocromática Micronucleada (NCEMN)
- C - Célula Policromática Micronucleada (PCEMN)

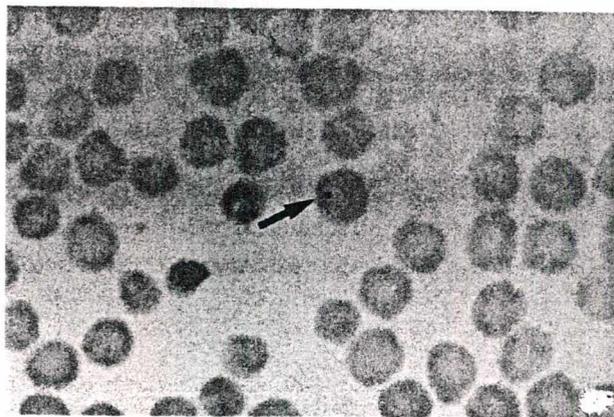


Figura 13 - Eritrócitos de sangue periférico corados com Feulgen/Fast-Green. A seta aponta uma célula micronucleada.

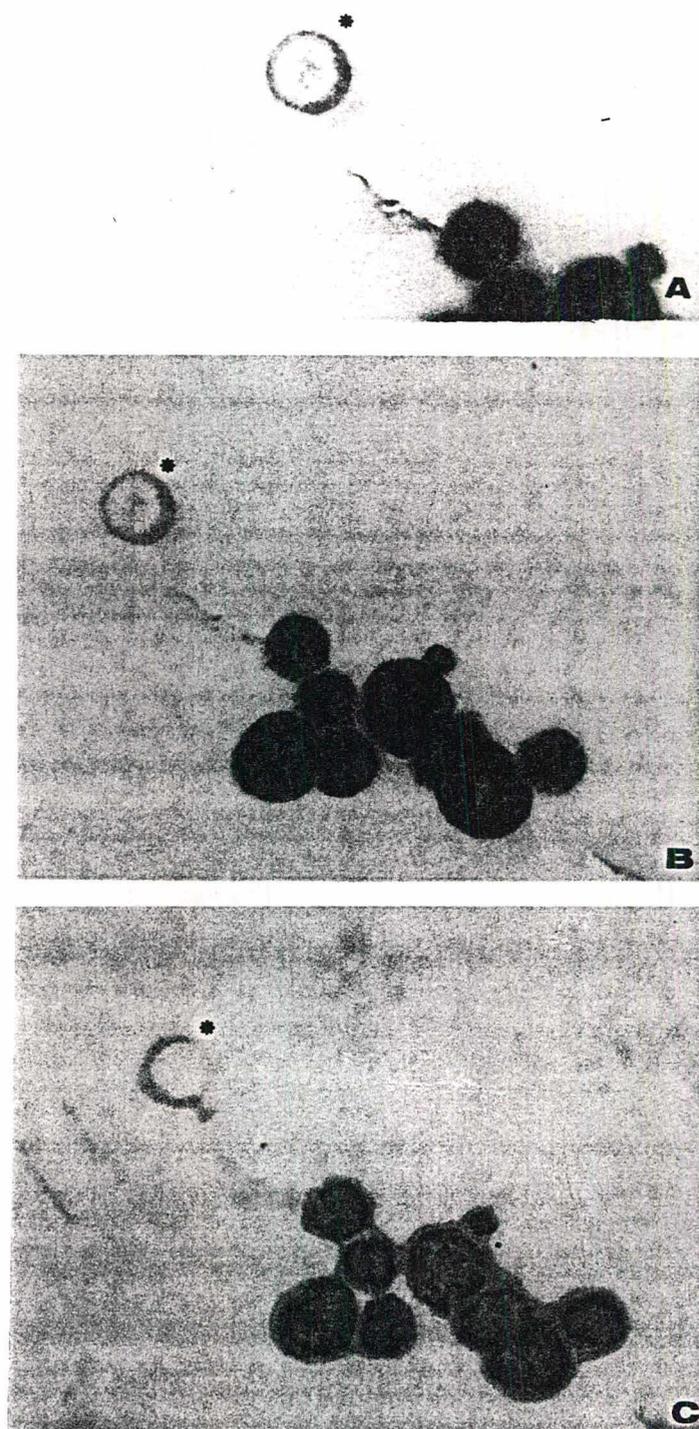


Figura 14 - Eritrócitos de medula óssea.

A - Eritrócito de medula óssea corado com Giemsa.

B - Mesmo material de A, em foto colorida.

C - Mesmo material de A, corado com Feulgen/Fast-Green. Note-se que as granulações das células indicadas pelos asteriscos não correspondem a material nuclear.

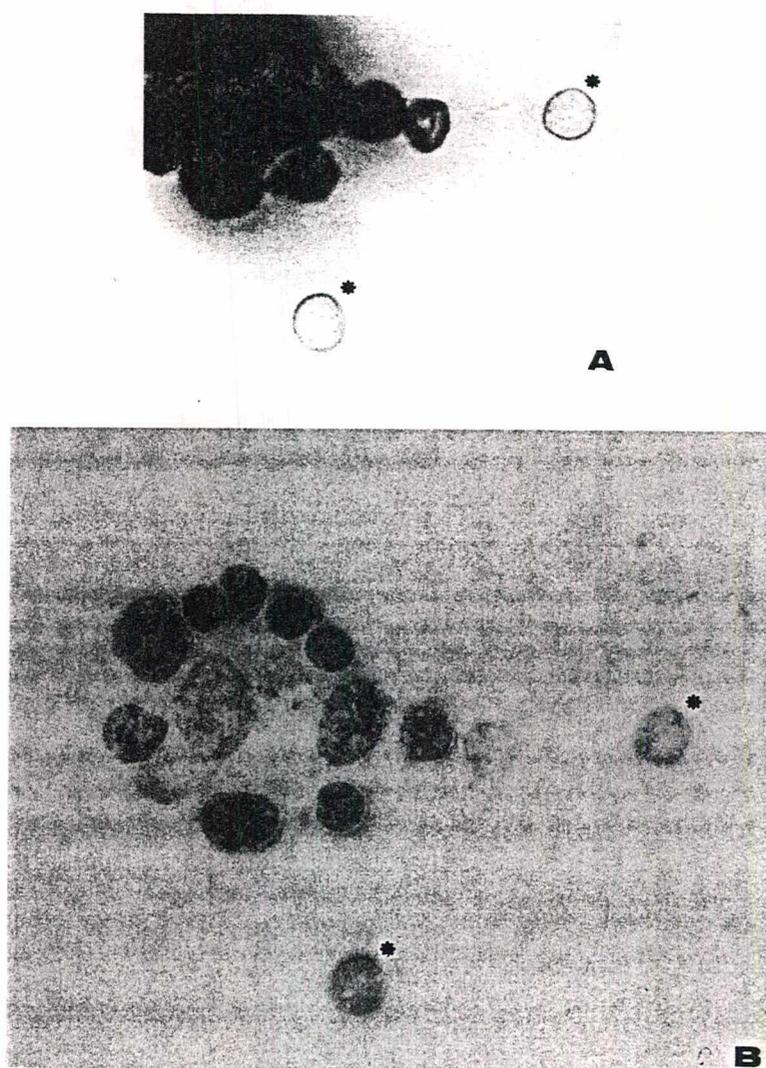
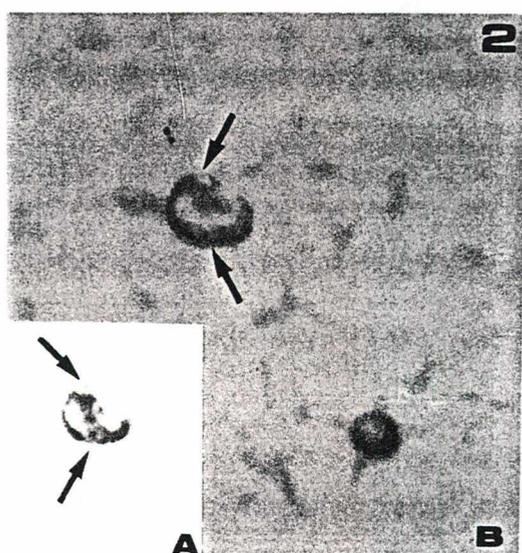
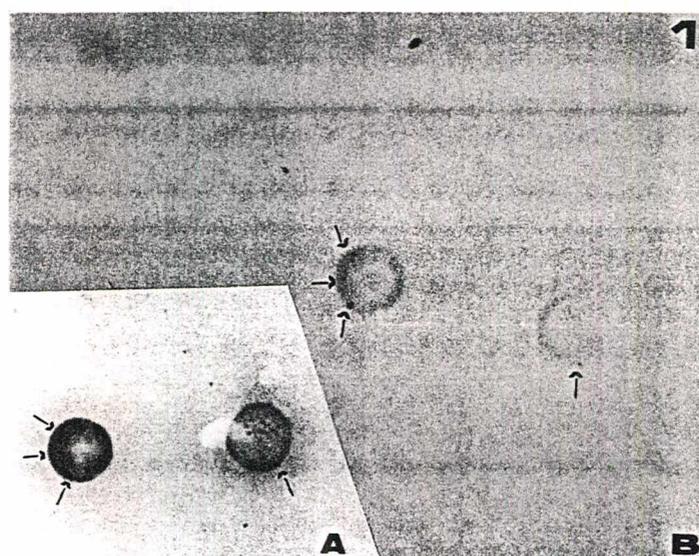


Figura 15 - Eritrócitos de medula óssea.

- A - Material corado com Giemsa. Os asteriscos mostram células com granulações que podem ser confundidas com micronúcleos.
- B - Material corado com Feulgen/Fast-Green. Os asteriscos mostram que as granulações observadas em A não correspondem a material nuclear.



3



Figura 16 - Eritrócitos de medula óssea. As setas apontam micronúcleos.  
 1A, 2A - Material corado com Giemsa.  
 1B, 2B - Mesmo material de A corado com Feulgen/Fast-Green.  
 3 - Célula morta - Célula com vários micronúcleos.

4.3.1 *Akodon montensis*

TABELA IV - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Akodon montensis* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT174	27/06/93	0,86	1977	23	1987	13	23
RT176	27/06/93	0,31	1992	8	1981	19	2
RT187	27/06/93	0,83	1987	13	1997	3	0
RT188	27/06/93	0,58	1983	17	1998	2	0
RT197	28/06/93	0,31	1994	6	1996	4	0
RT202	28/06/93	0,9	1986	14	1991	9	0
RT204	29/08/93	1,75	1988	12	1985	15	1
RT206	29/08/93	1,24	1976	24	1993	7	6
RT209	23/10/93	0,64	1995	5	1996	4	0
RT210	23/10/93	1,05	1993	7	1990	10	2
RT212	24/10/93	1,2	1988	12	1992	8	6
RT235	5/05/94	0,39	1986	14	1993	7	0
RT236	5/05/94	0,27	1991	9	1998	2	1
TOTAL			25836	164	25897	103	41

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (BEG-UFSC).

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

TABELA V - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT177	27/06/93	0,19	1993	7	1985	15	5
RT193	28/06/93	0,52	1991	9	1997	3	0
RT201	28/06/93	0,50	1999	1	1998	2	0
RT203	29/08/93	0,31	1992	8	1993	7	0
RT222	24/03/94	0,68	1994	6	1994	6	0
RT223	24/03/94	0,53	1994	6	1996	4	0
RT226	4/05/94	0,45	1988	12	1984	16	0
RT227	4/05/94	0,28	1997	3	1996	4	0
RT228	4/05/94	0,99	1994	6	1997	3	12
RT229	4/05/94	0,27	1995	5	1998	2	0
RT244	8/02/96	0,31	1992	8	1989	11	0
RT245	8/02/96	0,57	1986	14	1991	9	0
TOTAL			23915	85	23918	82	17

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

TABELA VI - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT199	28/06/93	0,37	1994	6	1993	7	22
RT207	29/08/93	1,31	1990	10	1994	6	0
RT216	25/10/93	1	1989	11	1995	4	0
RT217	25/10/93	0,9	1990	10	1992	8	0
RT219	12/12/93	0,56	1991	9	1992	8	0
RT220	12/12/93	0,45	1983	13	1993	7	0
RT224	26/03/94	0,63	1991	9	1996	4	0
RT225	26/03/94	0,46	1994	6	1995	5	0
RT230	4/05/94	0,27	1999	1	1998	2	0
RT234	5/05/94	0,45	1998	2	1994	6	0
RT238	4/01/95	0,37	1976	24	1982	18	0
RT239	4/01/95	0,98	1983	17	1983	17	0
RT240	4/01/95	0,65	1967	33	1983	17	0
TOTAL			25849	151	25891	109	22

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

TABELA VII - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE  
PERIFÉRICO DE *Akodon montensis* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN/4000	TCM
RT174	M	21	1
RT176	M	35	0
RT187	M	17	0
RT188	M	12	0
RT197	M	17	0
RT202	F	16	0
RT204	M	12	0
RT206	M	29	0
RT209	M	12	0
RT210	M	30	0
RT212	F	13	0
RT235	F	55	0
RT236	F	40	0
TOTAL	9M/4F	309	1

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de eritrócitos com micronúcleos entre 4000 eritrócitos analisados por animal.

TCM - total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos).

M- macho

F-fêmea

TABELA VIII - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE *Akodon montensis* coletados NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN/4000	TCM
RT177	M	34	0
RT193	M	20	0
RT201	M	35	0
RT203	F	24	0
RT222	F	33	0
RT223	F	39	0
RT226	M	26	0
RT227	M	25	0
RT228	M	32	0
RT229	M	28	0
RT244	M	34	0
RT245	M	12	0
TOTAL	9M/3F	342	0

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de eritrócitos com micronúcleos entre 4000 eritrócitos analisados por animal.

TCM - total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos).

M- macho

F-fêmea

TABELA IX - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN	TCM
RT199	F	19	0
RT207	M	23	0
RT216	F	15	0
RT217	M	20	0
RT219	F	31	0
RT220	F	14	2
RT224	M	41	0
RT225	M	28	0
RT230	F	29	0
RT234	M	30	0
RT238	M	37	0
RT239	F	37	0
RT240	M	44	0
TOTAL	7M/6F	368	2

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de eritrócitos com micronúcleos entre 4000 eritrócitos analisados por animal.

TCM - total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos).

M- macho

F-fêmea

4.3.2 *Oryzomys nigripes*TABELA X - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT06*	12/12/92	0,81	1981	19	1983	17	10
RT12*	13/12/92	0,44	1985	15	1986	14	24
RT66*	20/01/93	0,51	1978	22	1969	31	3
RT73*	20/01/93	0,48	1996	4	1994	6	0
RT194	28/06/93	0,43	1982	18	1990	10	0
RT205	29/08/93	0,85	1989	11	1987	13	75
RT241	12/11/95	0,59	1967	33	1980	20	10
RT242	12/11/95	0,67	1979	21	1990	10	18
TOTAL			15857	143	15879	121	140

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

\* - espécimens não incluídos na análise da frequência de eritrócitos micronucleados do sangue periférico.

TABELA XI - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT172	27/06/93	0,21	1971	29	1977	23	15
RT175	27/06/93	0,69	1956	44	1949	51	0
RT179	27/06/93	0,26	1985	15	1993	7	1
RT182	27/06/93	0,8	1976	24	1979	21	1
RT184	27/06/93	0,4	1992	8	1991	9	0
RT185	27/06/93	0,59	1984	16	1991	9	14
RT196	28/06/93	0,41	1975	25	1980	20	0
RT208	23/10/93	1,37	1994	6	1993	7	1
RT213	24/10/93	2,16	1988	12	1976	24	0
RT214	24/10/93	1,35	1996	4	1985	15	16
RT215	24/10/93	0,84	1989	11	1976	24	42
TOTAL			21806	194	21790	210	90

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

TABELA XII - FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS NORMO E POLICROMÁTICOS, COM E SEM MICRONÚCLEOS, NA MEDULA ÓSSEA DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL <sup>a</sup>	Data coleta	PCE/NCE	PCE	PCEMN	NCE	NCEMN	CM
RT166 *	26/06/93	0,18	1977	23	1991	9	0
RT178	27/06/93	0,18	1976	24	1984	16	2
RT181	27/06/93	0,66	1980	20	1982	18	10
RT189	28/06/93	0,36	1970	30	1990	10	1
RT190	28/06/93	0,2	1986	14	1983	17	35
RT192	28/06/93	0,37	1981	19	1979	21	0
RT221	12/12/93	0,52	1990	10	1987	13	9
RT231	4/05/94	0,25	1980	20	1994	6	32
RT232	5/05/94	0,86	1989	11	1996	4	0
RT233	5/05/94	0,62	1990	10	1993	7	1
TOTAL			19819	181	19879	121	90

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

PCE - eritrócitos policromáticos sem micronúcleos.

NCE - eritrócitos normocromáticos sem micronúcleos.

PCE/NCE - razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos

PCEMN - eritrócitos policromáticos com micronúcleos.

NCEMN - eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

CM - células mortas (PCE e NCE com mais de 3 micronúcleos).

\* - espécimen não incluído na análise da frequência de eritrócitos micronucleados do sangue periférico.

TABELA XIII - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN/4000	TCM
RT194	F	59	0
RT205	M	36	0
RT241	M	24	0
RT242	M	4	0
TOTAL	3M/1F	123	0

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de eritrócitos com micronúcleos entre 4000 eritrócitos analisados por animal.

TCM - total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos).

M- macho

F- fêmea

TABELA XIV - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN/4000	TCM
RT172	M	34	0
RT175	M	11	0
RT179	M	15	0
RT182	M	32	0
RT184	F	29	0
RT185	F	18	0
RT196	F	83	0
RT208	M	24	0
RT213	M	55	0
RT214	F	25	0
RT215	M	21	0
TOTAL	7M/4F	347	0

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de eritrócitos com micronúcleos entre 4000 eritrócitos analisados por animal.

TCM - total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos).

M- macho

F-fêmea

TABELA XV - FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL <sup>a</sup>	SEXO	TCMN/4000	TCM
RT178	F	24	0
RT181	M	51	0
RT189	F	20	0
RT190	M	89	0
RT192	F	64	1
RT221	F	26	0
RT231	M	60	0
RT232	F	44	0
RT233	F	32	0
TOTAL	3M/6F	410	1

a - código de identificação do animal na coleção de roedores silvestres do Departamento de BEG-UFSC.

TCMN - total de células com micronúcleos entre 4000 células analisadas por animal.

TCM - total de células mortas.

M- macho

F-fêmea

#### 4.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PCE/NCE

##### 4.4.1 *Akodon montensis*

TABELA XVI - NÚMERO DE ANIMAIS OBTIDOS ( PORCENTAGEM DO TOTAL DE ANIMAIS ANALISADOS), POR PONTO DE COLETA, DENTRO DE CADA FAIXA DE VALOR DA RAZÃO PCE/NCE , EM *Akodon montensis*

PCE/NCE	ARROZAL	Á. PRESERVAÇÃO.	Á.INDUSTRIAL.
< 0,25	-	1 (8%)	1 (8%)
0,25 - 0,5	4 (30%)	5 (42%)	5 (40%)
0,5 - 1,0 (esperado)	5 (40%)	6 (50%)	6 (44%)
> 1,0	4 (30%)	-	1 (8%)

As análises da Figura 17 e da Tabela XVI revelam que em *A. montensis* do Arrozal 4 animais ( aproximadamente 30% da amostra) apresentaram uma razão PCE/NCE entre 0,25 e 0,5, outros 4 animais (30%) apresentaram uma razão maior do que 1,0 e os demais (40%) apresentaram uma razão dentro do esperado de acordo com Adler(1984) e Gollapudi e Mac Fadden (1995).

Na Área de Preservação um animal (8%) apresentou uma razão PCE/NCE menor que 0,25, outros 5 animais (42%) apresentaram uma razão entre 0,25 e 0,5 e os demais animais (50%) apresentaram uma razão dentro do esperado.

Na Área Industrial um animal (8%) apresentou uma razão PCE/NCE menor que 0,25, 5 animais (40%) apresentaram uma razão entre 0,25 e 0,5, 6 animais (44%) apresentaram uma razão PCE/NCE dentro do esperado e um animal (8%) apresentou uma razão maior do que 1,0.

#### 4.4.2 - *Oryzomys nigripes*

TABELA XVII - NÚMERO DE ANIMAIS OBTIDOS ( PORCENTAGEM DO TOTAL DE ANIMAIS ANALISADOS), POR PONTO DE COLETA, DENTRO DE CADA FAIXA DE VALOR DA RAZÃO PCE/NCE , EM *Oryzomy nigripes*

PCE/NCE	ARROZAL	Á. PRESERVAÇÃO	Á.INDUSTRIAL
< 0,25	-	1 (9%)	3 (30%)
0,25 - 0,5	3 (37,5%)	3 (27%)	3 (30%)
0,5 - 1,0 ( esperado)	5 (62,5%)	4 (37%)	4 (40%)
> 1,0	-	3 (27%)	-

As análises da Figura 18 e da Tabela XVII revelam que em *O. nigripes* do Arrozal 3 animais (37,5%) apresentaram uma razão PCE/NCE entre 0,25 e 0,5 e os demais (62,5%) apresentaram uma razão dentro do esperado.

Na Área de Preservação um animal (9%) apresentou uma razão PCE/NCE menor que 0,25, 3 animais (27%) apresentaram uma razão entre 0,25 e 0,5, 4 animais (37%) apresentaram uma razão dentro do esperado e 3 animais (27%) apresentaram uma razão maior do que 1,0.

Figura 17 - Comparação de Percentis de PCE/NCE em *A. montensis*

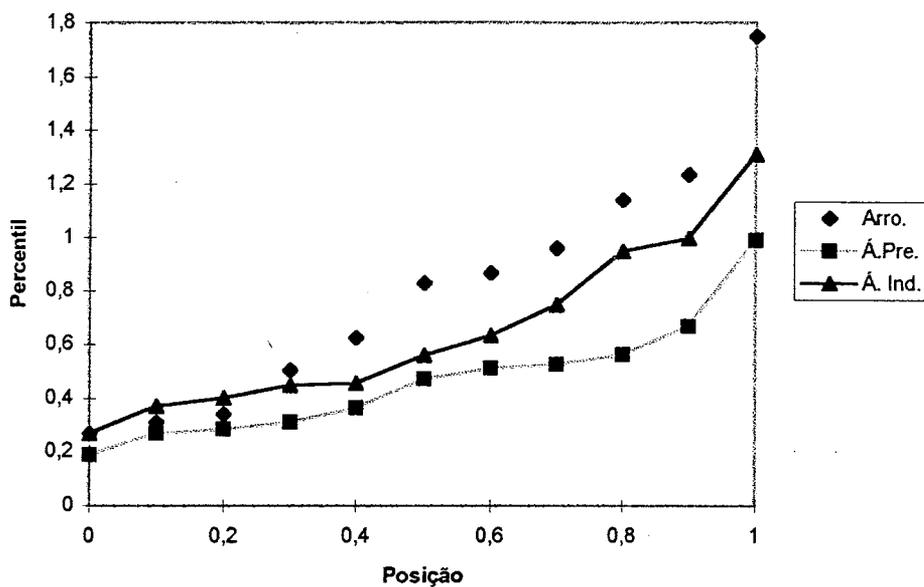
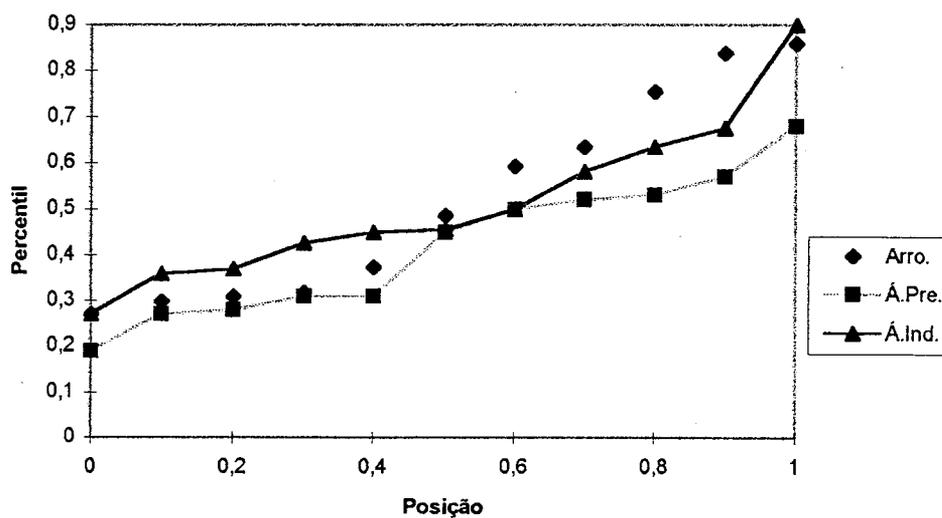


Figura 18 - Comparação de Percentis de PCE/NCE em *O. nigripes*



Na Área Industrial 3 animais (30%) apresentaram uma razão PCE/NCE menor que 0,25, 3 animais (30%) apresentaram uma razão entre 0,25 e 0,5 e os outros 4 animais (40%) apresentaram uma razão dentro do esperado.

#### 4.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS

As Tabelas XVIII e XXI apresentam os totais de células micronucleadas por parâmetro analisado, considerados nas análises estatísticas.

As comparações intraspecíficas simpátricas (Tabelas XIX e XXII), intraspecíficas alopátricas (Tabelas XX e XXIII ) assim como as comparações interespecíficas simpátricas ( Tabelas XXIV a XXVI) das frequências de células micronucleadas foram feitas pelo teste do  $X^2$ .

Uma vez que foram analisados 4000 eritrócitos por animal na medula óssea (2000 PCE e 2000 NCE) e no sangue periférico (não discriminados), e como as células do sangue periférico são as provenientes da medula óssea, somaram-se os totais de PCEMN e NCEMN a fim de comparar com os totais de SPMN.

##### 4.5.1 Comparações intraespecíficas alopátricas em *Akodon montensis*

Na Tabela XVIII são reapresentados os totais de células com micronúcleos, por local de coleta, a fim de facilitar a leitura das Tabelas XIX e XX , onde são apresentados os resultados das análises estatísticas.

Com o mesmo objetivo, nas Figuras 19 e 20 pode-se observar a distribuição do total de células micronucleadas, por tipo e por local de coleta .

TABELA XVIII - TOTAL DE ERITRÓCITOS COM MICRONÚCLEOS EM *Akodon montensis*

LOCAL DE COLETA	TOTAL ANIMAIS	PCEMN	NCEMN	CM	SPMN
ARROZAL	13	164	103	41	321
Á. PRESERVAÇÃO	12	85	82	17	342
Á. INDUSTRIAL	13	151	109	22	368

TOTAL ANIMAIS - Total de animais analisados por ponto de coleta.

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

TABELA XIX - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS ENTRE OS DIFERENTES TIPOS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM *Akodon montensis* (TESTE DO  $X^2$ )

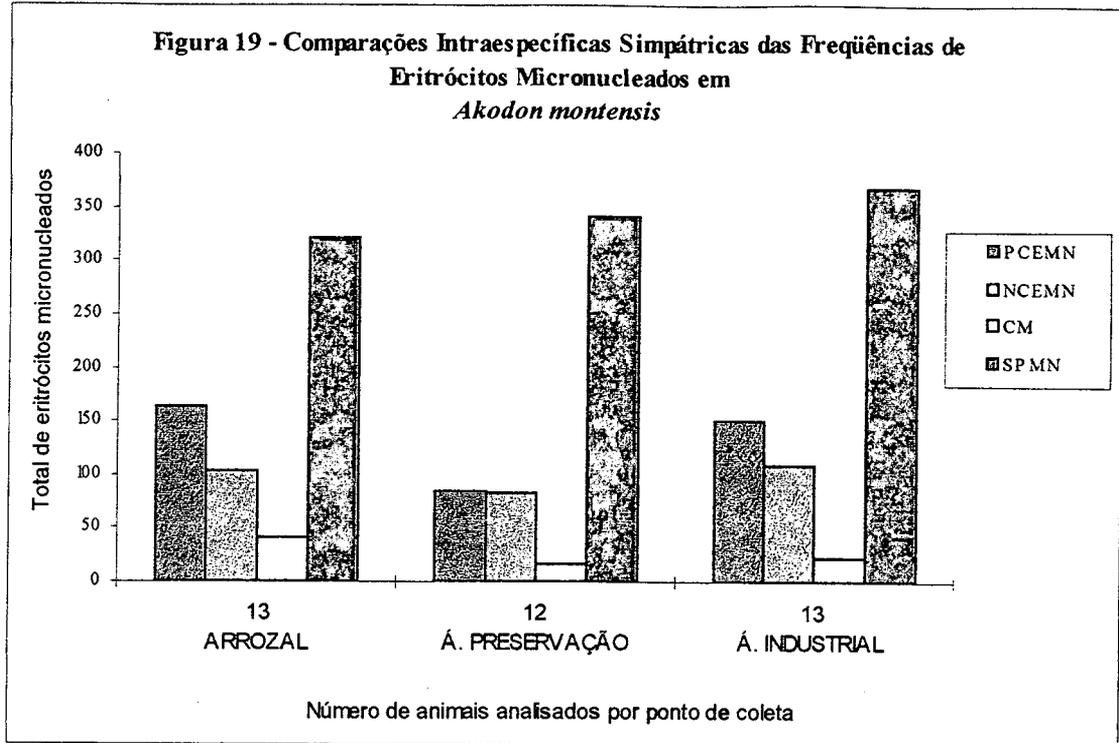
<i>Akodon montensis</i>	PCEMN x NCEMN		(PCEMN + NCEMN) x SPMN	
Arrozal	$X^2 = 13.66$	$p = 0.00021$	$X^2 = 4.9$	$p = 0.0268$
Área de Preservação	$X^2 = 0.04$	$p = 0.9495$	$X^2 = 59.52$	$p = 1.210 \cdot 10^{-14}$
Área Industrial	$X^2 = 6.71$	$p = 0.00958$	$X^2 = 17.01$	$p = 3.718 \cdot 10^{-5}$

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea

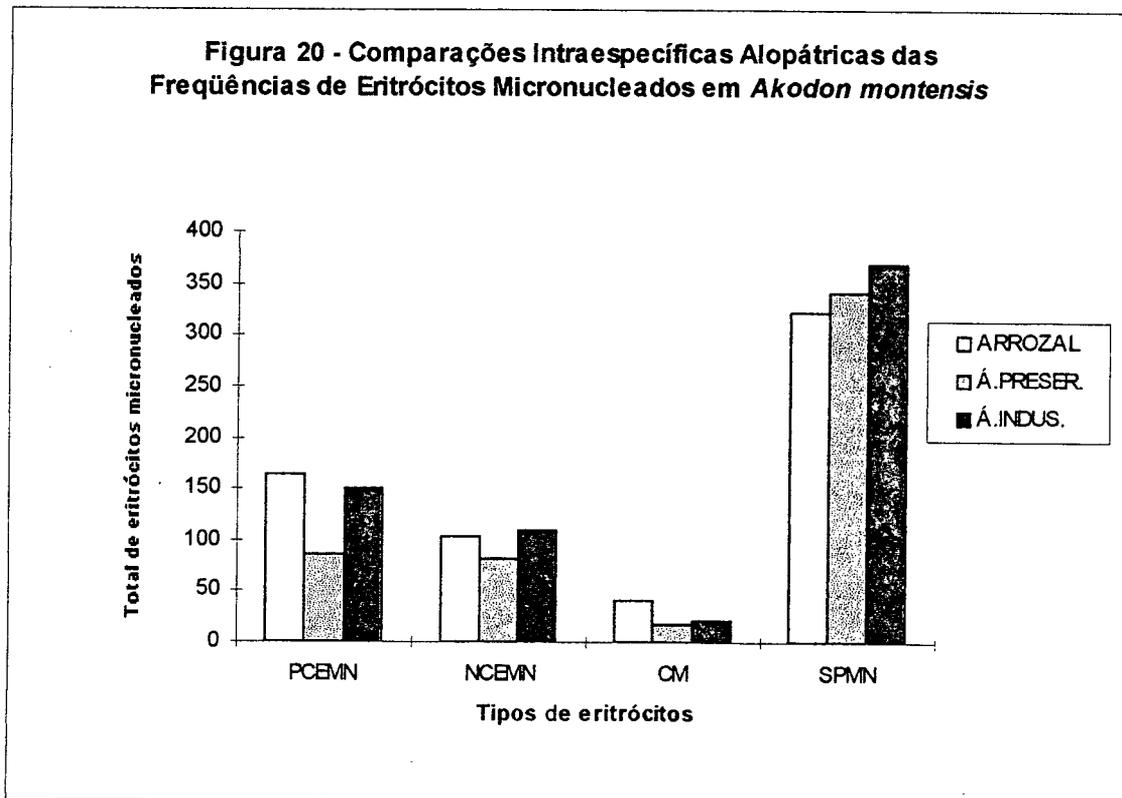
NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

**Figura 19 - Comparações Intraespecíficas Simpátricas das Frequências de Eritrócitos Micronucleados em *Akodon montensis***



**Figura 20 - Comparações Intraespecíficas Alopátricas das Frequências de Eritrócitos Micronucleados em *Akodon montensis***



A análise da TABELA XIX revela que : 1) as frequências de células PCEMN e NCEMN diferiram significativamente entre si no Arrozal e na Área Industrial (são maiores em PCEMN - ver TABELA XVIII ) e 2) as frequências somadas de PCEMN e NCEMN diferiram significativamente de SPMN., tendo sido maiores nesta última em todos os pontos de coleta.

TABELA XX - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM *Akodon montensis* (TESTE DO  $X^2$ )

PARÂMETRO	LOCAIS COMPARADOS	$X^2$	P
PCEMN	ARROZAL x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0,53$	0.46660686
	ARROZAL + Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 19,48$	$5.8881 \cdot 10^{-5}$
NCEMN	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 1,66$	0.43517806
CM	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 10,48$	0.00530026
	Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0,304$	0.58144774
SPMN	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 51,17$	$7.371 \cdot 10^{-12}$
	Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0,008$	0.92828721

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

A análise dos resultados da Tabela XX revela: 1) que a frequência de PCEMN foi significativamente menor na Área de Preservação do que nas outras duas áreas; 2) que não houve diferença significativa entre as frequências de NCEMN nas três áreas; 3) que a frequência de CM foi significativamente maior no Arrozal e 4) que a frequência de SPMN foi significativamente menor no Arrozal.

#### 4.5.2 Comparações intraespecíficas alopatricas em *Oryzomys nigripes*

Na Tabela XXI são reapresentados os totais de eritrócitos com micronúcleos, por ponto de coleta, a fim de facilitar a leitura das Tabelas XXII e XXIII, onde são apresentados os resultados das análises estatísticas.

Também com o mesmo objetivo, nas Figuras 21 e 22 pode-se observar a distribuição do total de células micronucleadas, por tipo e por local de coleta.

TABELA XXI - TOTAL DE ERITRÓCITOS COM MICRONÚCLEOS EM *Oryzomys nigripes*

LOCAL DE COLETA	TOTAL ANIM.	PCEMN	NCEMN	CM	SPMN
ARROZAL	8 ( 4 SPMN)	143	121	140	123
Á. PRESERVAÇÃO	11	194	210	90	347
Á. INDUSTRIAL	10 ( 9 SPMN)	181	121	90	410

TOTAL ANIM. - Total de animais analisados por ponto de coleta.

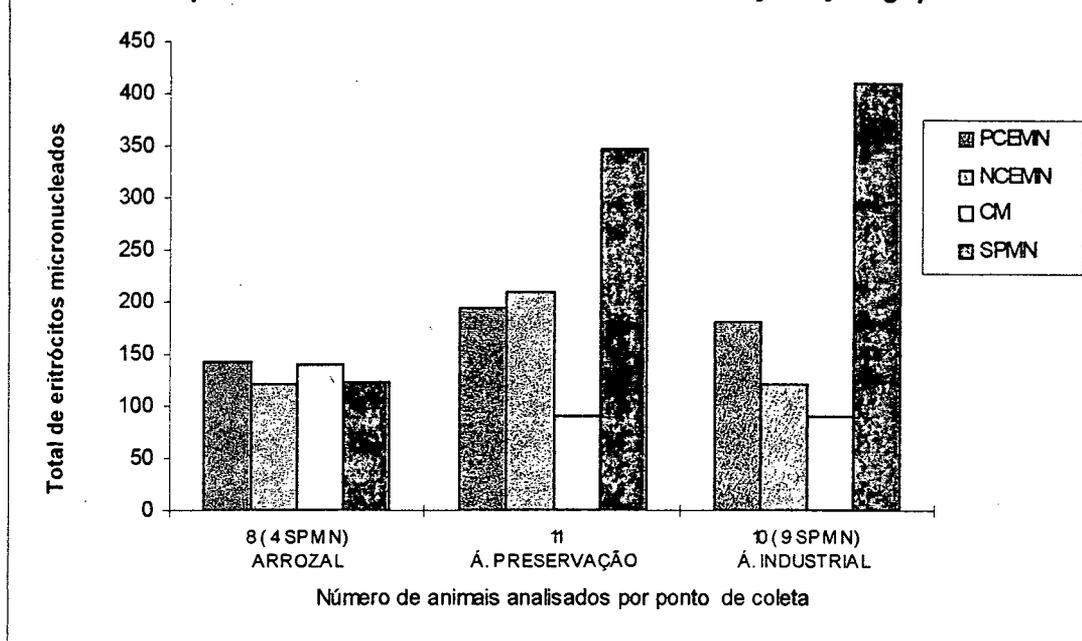
PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

**Figura 21 - Comparações Intraespecíficas Simpátricas das  
Frequências de Eritrócitos Micronucleados em *Oryzomys nigripes***



**Figura 22 - Comparações intraespecíficas Alopátricas das  
Frequências de Eritrócitos Micronucleados em *Oryzomys nigripes***

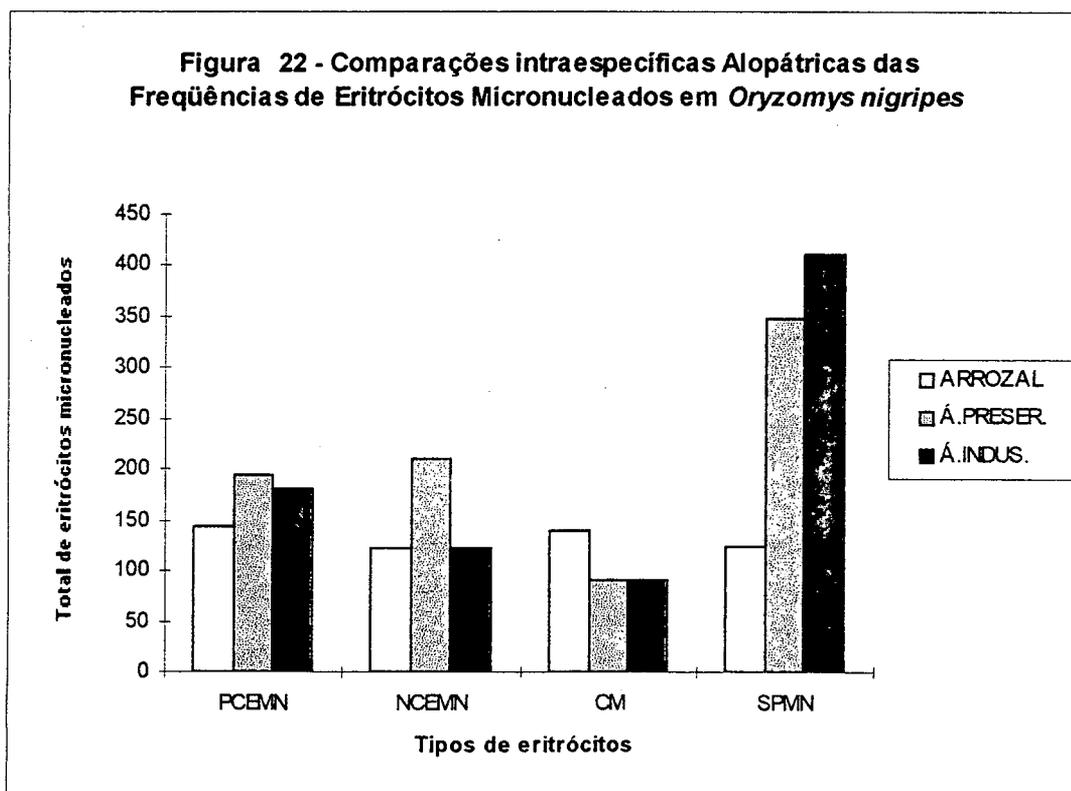


TABELA XXII - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁ-  
TRICAS ENTRE OS DIFERENTES TIPOS DE ERITRÓCITOS  
MICRONUCLEADOS EM *Oryzomys nigripes* (TESTE DO  $X^2$ )

<i>Oryzomys nigripes</i>	PCEMN x NCEMN	(PCEMN + NCEMN) x SPMN
Arrozal	$X^2 = 1.8$ $p = 0.179$	$X^2 = 0.4$ $p = 0.5270$
Área de Preservação	$X^2 = 0.62$ $p = 0.4310$	$X^2 = 4.24$ $p = 0.0394$
Área Industrial	$X^2 = 11.74$ $p = 0.000611$	$X^2 = 29.24$ $p = 6.3945 \cdot 10^{-8}$

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

A análise da TABELA XXII revela que: 1) as frequências de PCEMN e NCEMN apenas diferiram significativamente entre si na Área Industrial ; 2) as frequências de PCEMN e NCEMN somadas não diferiram significativamente da frequência de SPMN no Arrozal; 3) as frequências de PCEMN e NCEMN somadas diferiram significativamente da frequência de SPMN na Área de Preservação, com um resultado menor que o esperado observado em SPMN e 4) as frequências de PCEMN e NCEMN somadas diferiram significativamente da frequência de SPMN na Área Industrial, com um resultado maior que o esperado observado em SPMN.

TABELA XXIII - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-  
TRICAS DOS TOTAIS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS EM  
*Oryzomys nigripes* (TESTE DO  $X^2$ )

PARÂMETRO	LOCAIS COMPARADOS	$X^2$	P
PCEMN	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0,0043$	0.99785231
NCEMN	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 16,875$	0.00021659
	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 4,02$	0.04496372
CM	Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0,3563$	0.55056834
	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 40,4844$	$1.9819 \cdot 10^{-10}$
SPMN	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 31,0939$	$1.7703 \cdot 10^{-7}$
	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 0,0582$	0.80936387

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

A análise dos resultados da Tabela XXIII revela: 1) diferença não significativa entre as frequências de PCEMN nas três áreas; 2) frequência significativamente maior de NCEMN na Área de Preservação; 3) frequência significativamente maior de CM no Arrozal e 4) frequência significativamente maior de SPMN na Área Industrial.

4.5.3 Comparações interespecíficas simpátricas no Arrozal ( Teste do  $X^2$  )TABELA XXIV - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NO ARROZAL ( TESTE DO  $X^2$  )

<i>A. montensis</i> X <i>O. nigripes</i>	PCEMN	NCEMN	CM	SPMN
$X^2$	9,52	23,93	117,9	5,82
VALOR DE P (GL=1)	0,002032446	$9,99028 \cdot 10^{-7}$	$1,82354 \cdot 10^{-27}$	0,015844946

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

4.5.4 Comparações interespecíficas simpátricas na Área de Preservação ( Teste do  $X^2$  )TABELA XXV - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO ( TESTE DO  $X^2$  )

<i>A. montensis</i> X <i>O. nigripes</i>	PCEMN	NCEMN	CM	SPMN
$X^2$	52,35	67,46	56,4	1,75
VALOR DE P (GL=1)	$4,64399 \cdot 10^{-13}$	$2,15005 \cdot 10^{-16}$	$5,91304 \cdot 10^{-14}$	0,185876809

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

4.5.5 Comparações interespecíficas simpátricas na Área Industrial ( Teste do  $X^2$  )TABELA XXVI - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS NA ÁREA INDUSTRIAL ( TESTE DO  $X^2$  )

<i>A. montensis</i> X <i>O. nigripes</i>	PCEMN	NCEMN	CM	SPMN
$X^2$	16,32	7,74	61,88	26,66
VALOR DE P (GL=1)	$5,34964 \cdot 10^{-6}$	0,00540108	$3,65038 \cdot 10^{-5}$	$2,42592 \cdot 10^{-7}$

PCEMN - Total de eritrócitos policromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos policromáticos analisados na medula óssea.

NCEMN - Total de eritrócitos normocromáticos micronucleados entre 2000 eritrócitos normocromáticos analisados na medula óssea.

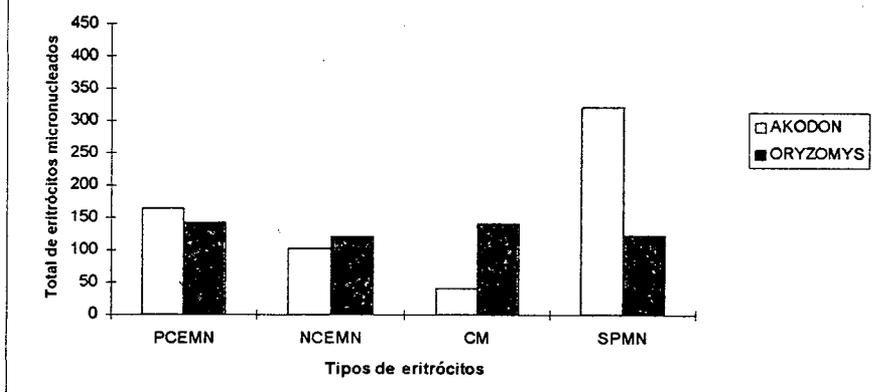
CM - Total de células mortas (eritrócitos com mais de 3 micronúcleos) entre os 4000 eritrócitos (PCEMN e NCEMN) analisados na medula óssea.

SPMN - Total de eritrócitos micronucleados, entre 4000 eritrócitos analisados, no sangue periférico.

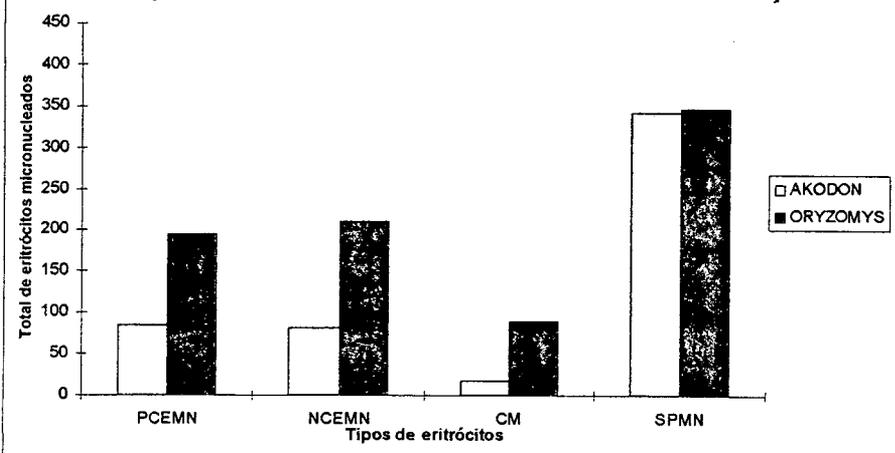
Nas Figuras 23 a 25 pode-se observar as comparações das frequências de eritrócitos micronucleados entre *A. montensis* e *O. nigripes*, por tipo de célula e local de coleta.

A análise dos resultados apresentados nas Tabelas XXIV, XXV e XXVI revela que as frequências de PCEMN, NCEMN, CM e SPMN foram significativamente diferentes entre *Akodon montensis* e *Oryzomys nigripes* nas três áreas de estudo, sendo que em todas as comparações os resultados obtidos foram maiores do que o esperado em *O. nigripes*, com exceção de SPMN da Área de Preservação, onde a diferença observada não foi significante.

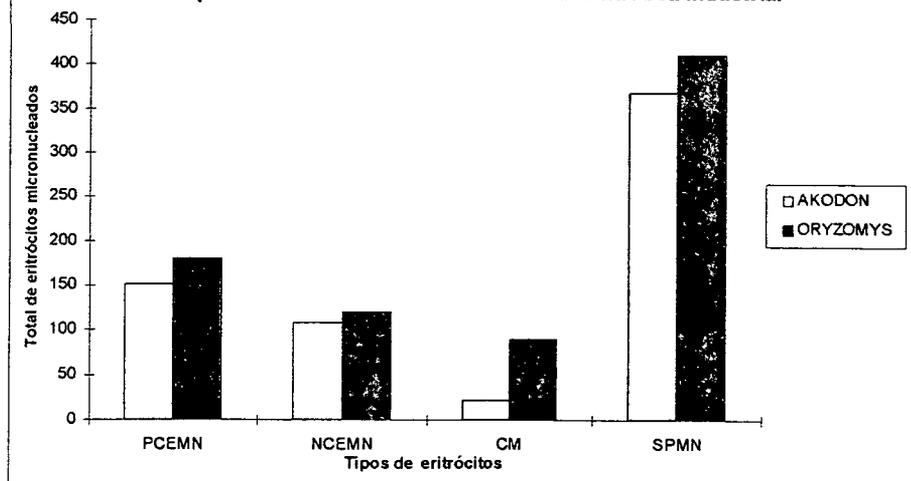
**Figura 23 - Comparações Interspecíficas Simpátricas das  
Frequências de Eritrócitos Micronucleados no Arrozal**



**Figura 24 - Comparações Interspecíficas Simpátricas das  
Frequências de Eritrócitos Micronucleados na Área de Preservação**



**Figura 25 - Comparações Interspecíficas Simpátricas das  
Frequências de Eritrócitos Micronucleados na Área Industrial**



#### 4.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO

##### 4.6.1 *Akodon montensis*

TABELA XXVII - ÍNDICE MITÓTICO EM *Akodon montensis* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT174	06/93	45	2,25
RT176	06/93	112	5,6
RT187	06/93	80	4,0
RT188	06/93	53	2,65
RT197	06/93	58	2,9
RT202	06/93	69	3,45
RT204	08/93	17	0,85
RT206	08/93	44	2,2
RT209	10/93	39	1,95
RT210	10/93	98	4,9
RT212	10/93	71	3,55
RT235	05/94	84	4,2
RT236	05/94	80	4,0

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

TABELA XXVIII - ÍNDICE MITÓTICO EM *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT177	06/93	31	1,55
RT193	06/93	19	0,95
RT201	06/93	26	1,3
RT203	08/93	54	2,7
RT222	03/94	22	1,1
RT223	03/94	35	1,75
RT226	05/94	30	1,5
RT227	05/94	46	2,3
RT228	05/94	21	1,05
RT229	05/94	27	1,35
RT244	02/96	45	2,25
RT245	02/96	32	1,6

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

TABELA XXIX - ÍNDICE MITÓTICO EM *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT199	06/93	75	3,75
RT207	08/93	44	2,2
RT216	10/93	82	4,1
RT217	10/93	40	2,0
RT219	12/93	74	3,7
RT220	12/93	63	3,15
RT224	03/94	42	2,1
RT225	03/94	56	2,8
RT230	03/94	57	2,85
RT234	05/94	51	2,55
RT238	05/94	54	2,7
RT239	01/95	68	3,4
RT240	01/95	52	2,6

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

4.6.2 - *Oryzomys nigripes*TABELA XXX - ÍNDICE MITÓTICO EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT06	12/92	48	2,45
RT12	12/92	54	2,77
RT66	01/93	102	5,37
RT73	01/93	23	1,16
RT194	06/93	18	0,9
RT205	08/93	32	1,6
RT241	11/95	58	2,9
RT242	11/95	63	3,25

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

TABELA XXXI - ÍNDICE MITÓTICO EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT172	06/93	45	2,25
RT175	06/93	55	2,75
RT179	06/93	84	4,2
RT182	06/93	26	1,3
RT184	06/93	49	2,45
RT185	06/93	60	3,0
RT196	06/93	95	4,75
RT208	10/93	61	3,05
RT213	10/93	62	3,1
RT214	10/93	72	3,6
RT215	10/93	29	1,45

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

TABELA XXXII - ÍNDICE MITÓTICO EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL	Data de Coleta	Valor Obtido*	Porcentagem
RT166	06/93	67	3,46
RT178	06/93	94	4,7
RT181	06/93	46	2,3
RT189	06/93	77	3,85
RT190	06/93	48	2,4
RT192	06/93	49	2,45
RT221	12/93	60	3,0
RT231	05/94	89	4,45
RT232	05/94	50	2,5
RT233	05/94	77	3,85

\* - Total de metáfases observadas entre 2000 células

#### 4.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO

##### 4.7.1 *Akodon montensis*

A Tabela XXXIII mostra os totais de células metafásicas por animal e por local de coleta a fim de facilitar a leitura da Tabela XXXIV.

TABELA XXXIII- TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS OBSERVADAS ENTRE 2000  
CÉLULAS ANALISADAS POR ANIMAL

<i>Akodon montensis</i>	TOTAL DE ANIMAIS	TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS
ARROZAL	13	863
ÁREA DE.PRESERVAÇÃO	12	400
Á. INDUSTRIAL	13	771

TABELA XXXIV - COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DO ÍNDICE MITÓTICO PELOS TESTES ANOVA E  $X^2$

<i>A. montensis</i> / IM	ARRO. X A. PRESER. X A. INDUS.	ARRO. X A. INDUS.	A. PRESER. X A. INDUS.
ANOVA	P = 0.000166		
$X^2$ (P)	136,657 (2,115.10 <sup>-30</sup> )	5,019 (0,0250706489)	87,8738 (6,97667.10 <sup>-21</sup> )

ARRO. - Arrozal  
 Á. PRESER.- Área de Preservação  
 Á. INDUS. - Área Industrial

A Tabela XXXIV revela que, tanto pelo teste do  $X^2$ , como pelo ANOVA, o índice mitótico (IM) foi significativamente diferente entre as três populações. Usando a partição do  $X^2$  concluiu-se que o IM foi significativamente maior no Arrozal e menor na Á. de Preservação.

A figura 26 mostra as diferenças dos IM entre as 3 populações de *A. montensis*. Fica claro da análise desta Figura que na população da Área de Preservação os IM foram os mais baixos enquanto que na do Arrozal foram os mais altos.

#### 4.7.2 - *Oryzomys nigripes*

A Tabela XXXV mostra os totais de células metafásicas por animal e por local de coleta a fim de facilitar a leitura da Tabela XXXVI.

TABELA XXXV - TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS OBSERVADAS ENTRE 2000  
CÉLULAS ANALISADAS POR ANIMAL

<i>Oryzomys nigripes</i>	TOTAL DE ANIMAIS	TOTAL DE CÉLULAS METAFÁSICAS
ARROZAL	8	398
Á.PRESERVAÇÃO	11	638
Á. INDUSTRIAL	10	657

TABELA XXXVI - COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DO ÍNDICE  
MITÓTICO PELOS TESTES ANOVA E  $X^2$

<i>O. nigripes</i> / IM	ARRO X Á.PRESER X Á. INDUS.	Á.PRESER X Á.INDUS.	ARRO X Á.PRESER
ANOVA	P = 0.06209		
$X^2$ (P)	18,870 (7,9788.10 <sup>-5</sup> )	4,883 (0,027122442)	5,629 (0,017665708)

ARRO - Arrozal.

Á. PRESER.- Área de Preservação.

Á. INDUS. - Área Industrial.

A Tabela XXXVI revela que embora no teste ANOVA a significância entre os diferentes índices mitóticos não tenha sido alta ( $0,5 < P < 0,1$ ), no teste do  $X^2$ , que leva em conta o tamanho da amostra, essa diferença foi altamente significativa. Usando a partição do  $X^2$  concluiu-se que o IM foi significativamente maior na Á. Industrial e menor no Arrozal.

A Figura 27 mostra as diferenças dos IM entre as 3 populações de *O. nigripes*. Verifica-se nesta Figura que, apesar de existir uma diferença significativa na variação do IM entre as populações, esta é menos conspícua do que entre as populações de *A. montensis*

(Figura 26). Apesar disto, a análise da Figura 27 deixa claro que, em *O. nigripes*, os menores IM ocorreram no Arrozal e os maiores na Área Industrial.

#### 4.7.3 Comparações interespecíficas simpátricas (Teste do $X^2$ )

TABELA XXXVII - COMPARAÇÃO INTERESPECÍFICA SIMPÁTRICA DO ÍNDICE MITÓTICO (TESTE DO  $X^2$ )

<i>A. montensis</i> X <i>O. nigripes</i>	$X^2$	P
ARROZAL	19,23	$1,16 \cdot 10^{-5}$
ÁREA DE PRESERVAÇÃO	81,05	$2,20 \cdot 10^{-19}$
ÁREA INDUSTRIAL	4,71	0,029

A Tabela XXXVII e as Figuras 28 e 29 revelam que *Akodon montensis* e *Oryzomys nigripes* diferem entre si quanto ao IM em todas as áreas estudadas. As frequências de células metafásicas obtidas foram maiores do que as esperadas em *O. nigripes* na Á. de Preservação e Á. Industrial e em *A. montensis* no Arrozal.

Figura 26 - Comparação de Percentis do Índice Mitótico em *A. montensis*

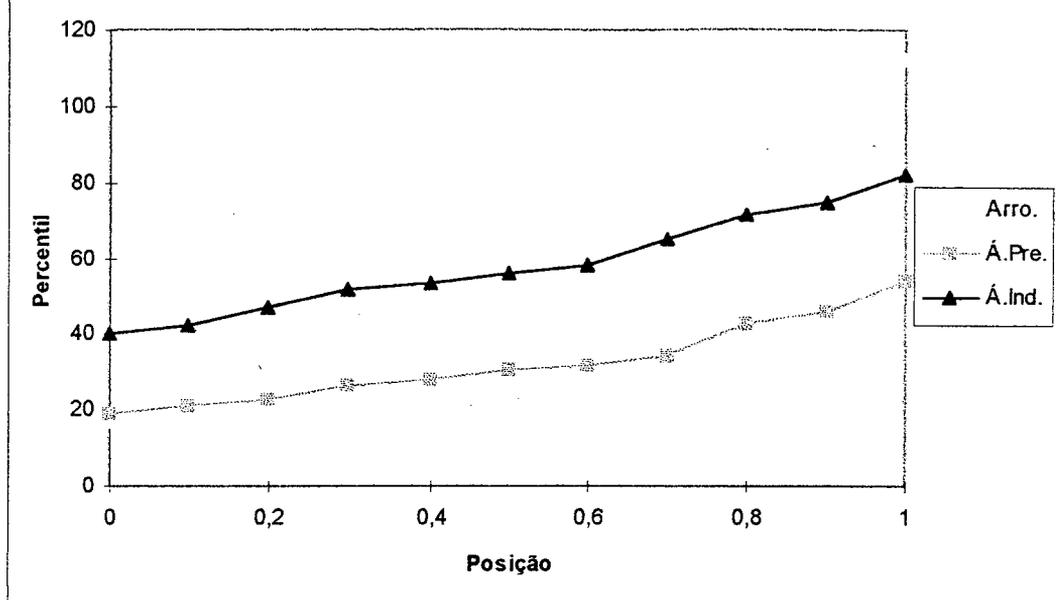
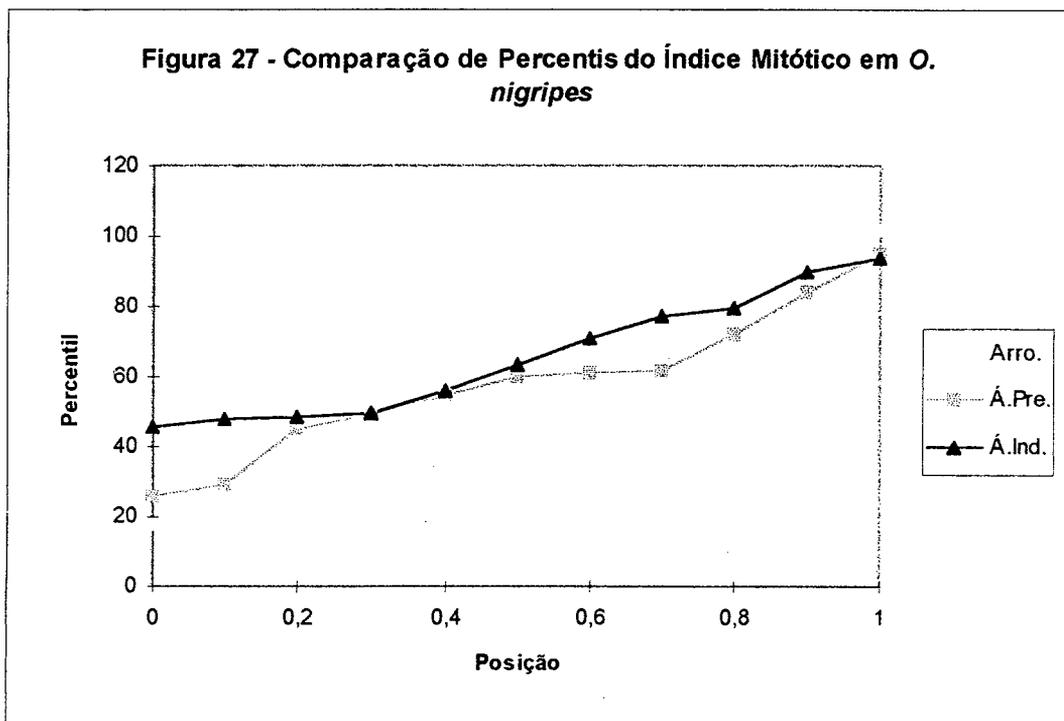
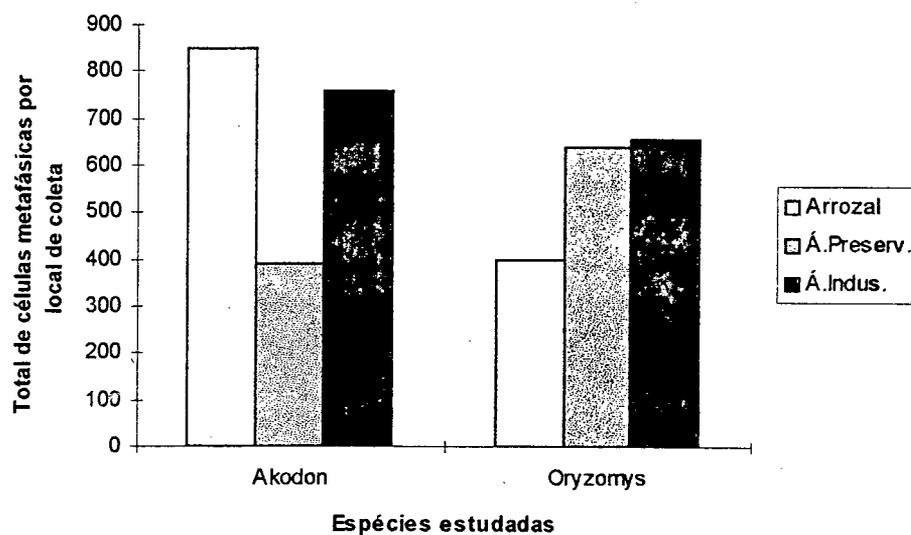


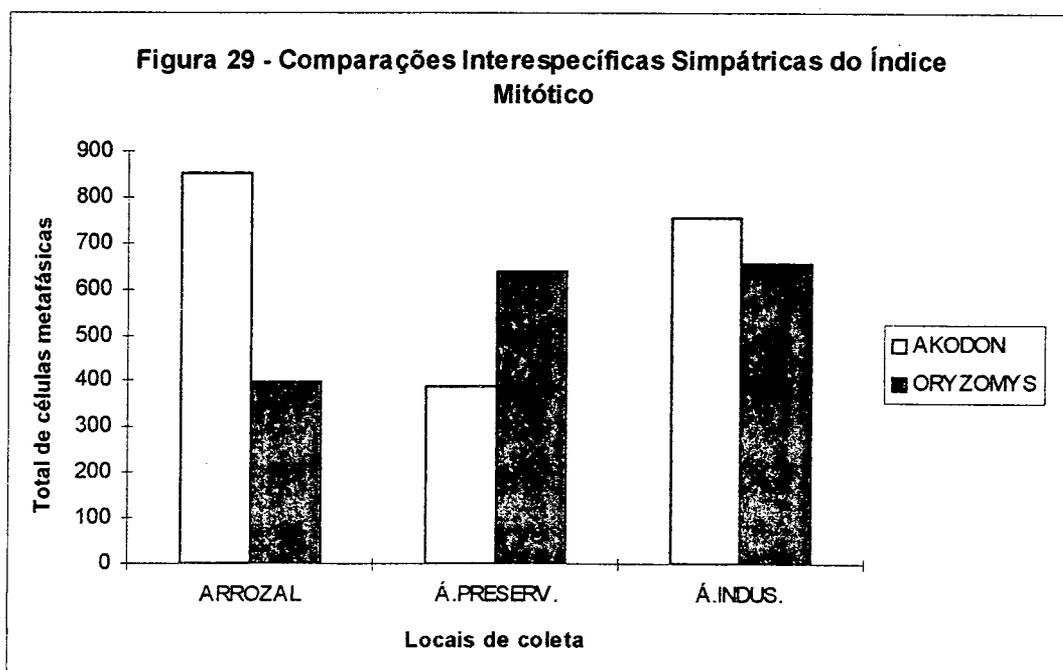
Figura 27 - Comparação de Percentis do Índice Mitótico em *O. nigripes*



**Figura 28 - Comparações Intraespecíficas Alopátricas do Índice Mitótico em *A. montensis* e *O. nigripes***



**Figura 29 - Comparações Interespecíficas Simpátricas do Índice Mitótico**



#### 4.8 RESULTADOS DAS ANÁLISES CITOLÓGICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

O total de células com os diferentes tipos de aberrações cromossômicas consideradas está apresentado nas Tabelas XXXVIII a XLIII

Os tipos de aberrações observadas nas duas espécies estudadas estão exemplificadas na Figuras 30 e 31.

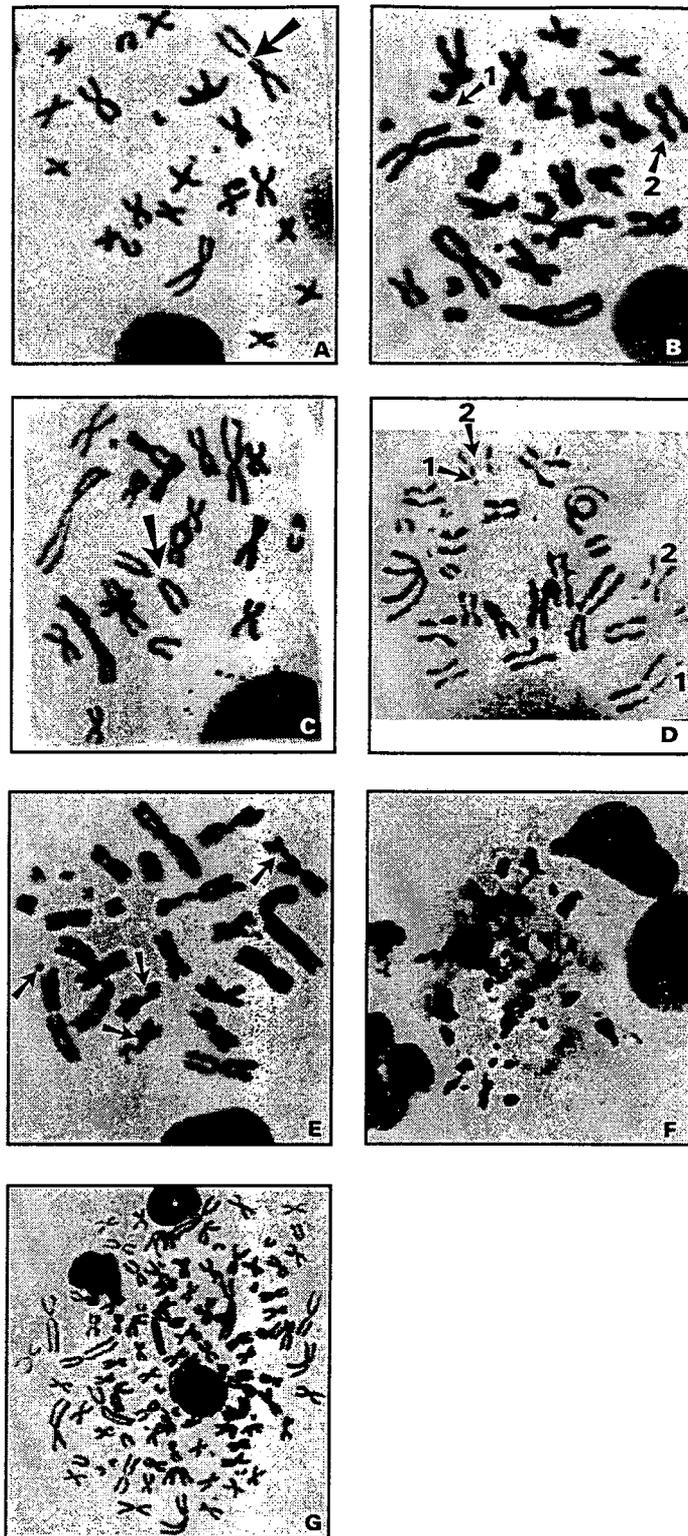


Figura 30 Aberrações cromossômicas observadas em *Akodon montensis*.

- A - Gap cromossômica
- B - 1 - Quebra cromatídica  
2 - Segregação precoce
- C - Quebra cromossômica
- D - 1 - Quebra cromatídica  
2 - Segregação precoce
- E - Múltiplas quebras
- F - Célula danificada
- G - Poliplóide

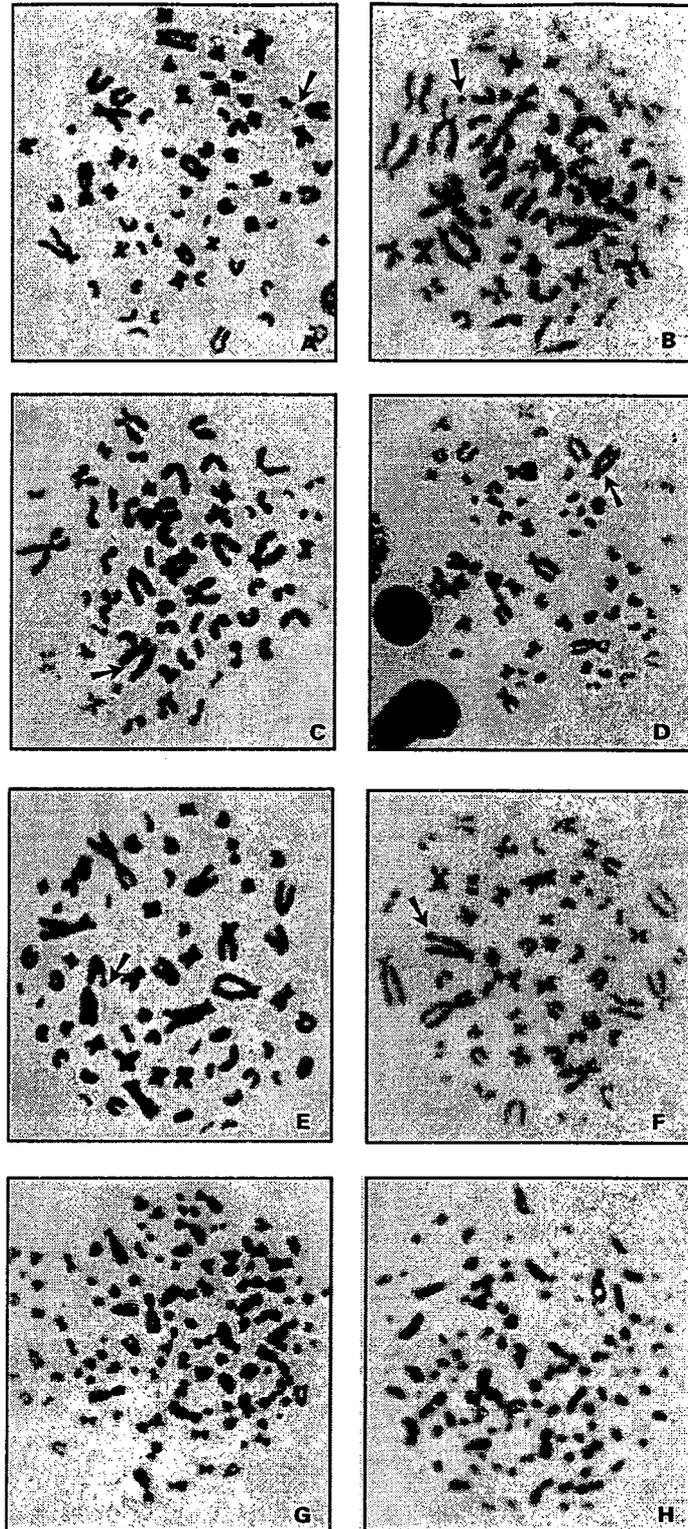


Figura 31 Aberrações cromossômicas observadas em *Oryzomys nigripes*.

- A - fragmento
- B - Quebra cromatídica
- C - Segregação precoce
- D - Gap cromatídica
- E - Quebra cromatídica
- F - Quebra cromatídica
- G - Poliploidia
- H - Célula danificada

4.8.1 *Akodon montensis*TABELA XXXVIII - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM *Akodon montensis* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL	QCMTD	QCMSM	FRAG.	GCMTD	GCMSM	POLI.	DANI.	SEGR.PREC.
RT174	1		1	1				
RT176	1			1		1		1
RT187				1				
RT188	7(14)*	1	2(1duplo)				3	2
RT197	1			2		3		
RT202	1		1	1		2		2
RT204	1		1	1		3		
RT206			2	1				2
RT209								
RT210	1			1		1		5
RT212	1					3		
RT235	6	3	1	1	1	2	2	
RT236	1	2		1	1	1		
TOTAL	21	6	8	11	2	16	5	12

QCMTD- quebra cromatídica.

QCMSM- quebra cromossômica..

GCMTD- gap cromatídico.

GCMSM- gap cromossômico.

FRAG.- fragmento acêntrico.

SEGR.PREC.- segregação precoce.

POLI.- poliploidia.

DANI.- célula danificada

\* - 1 cél. com 2, 1 cél. com 3, uma cél. com 4 e uma cél. com 5 (14 QCMTD).

\*\*- fêmea com um dos X heteromórfico.

TABELA XXXIX - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSÔMICAS EM *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL	QCMTD	QCMSM	FRAG.	GCMTD	POLI	DANI.	SEGR.PREC	OUTROS
RT177	1		2	3			4	
RT193	5	1		4				
RT201	1			1	2			
RT203	2			1	3		1	2n=23(XO)
RT222				1	1			2n=25(B)
RT223	2	1		2	4		4	
RT226	1				1			
RT227	3			3				
RT228	1			1			1	2n=25(B)
RT229			1	1	1	1	2	2n=25(B)
RT244	2(1+2)*							
RT245	1		2		6			
TOTAL	19	2	5	17	18	1	12	

QCMTD- quebra cromatídica..

QCMSM-quebracromossômica..

GCMTD-gap cromatídico.

FRAG.-fragmento acêntrico.

SEGR.PREC.- segregação precoce.

POLI- poliploidia

DANI.- célula danificada

\* - uma célula com 1 e outra com 2 quebras cromatídicas.

(B) - cromossomo supranumerário.

TABELA XL - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS  
EM *Akodon montensis* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL	QCMTD	QCMSM	FRAG.	GCMTD	POLI.	DANI.	SEGR.PREC.	OUTROS
RT199	1	1	2	2				
RT207	1			1		3		2n=25(B)
RT216	1	1	1	3				
RT217	2 (1 cel.c/2)*		1	3	2		1	
RT219	4		2	3	1	1	2	2n=25(B)
RT220	2				1		4	X*
RT224			1				1	2n=25(XXY?)
RT225	2			2	1		1	
RT230			1		1			
RT234	6			1			1	X*
RT238	3			3				2n=25(B)
RT239	1	1						2n=25(B)
RT240	1				2			
TOTAL	24	3	12	18	8	4	10	

QCMTD- quebra cromatídica.

QCMSM- quebra cromossômica.

GCMTD- gap cromatídico.

FRAG.- fragmento acêntrico.

SEGR.PREC.- segregação precoce.

POLI.- poliploidia.

DANI.- célula danificada.

X\* - fêmea com um dos X heteromórfico.

(B) - cromossomo supranumerário.

\* - 2 quebras cromatídicas na mesma cromátide.

4.8.2 *Oryzomys nigripes*TABELA XLI - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NO ARROZAL

ANIMAL	QCMTD	QCMSM	FRAG.	GCMTD	POLI.	DANI	SEGR.PREC
RT 06	5		2	3			
RT 12	3**	1	4	1			6
RT 66	10		2	6	1		1
RT 73	3			2		8	1
RT194	3			1			2
RT205	1					1	1
RT241	5			3	1		7
RT242	1				1	1	9
TOTAL	31	1	8	16	3	10	27

QCMTD - quebra cromatídica.

QCMSM - quebra cromossômica.

GCMTD - gap cromatídico..

FRAG. - fragmento acêntrico

SEGR.PREC.- segregação precoce

POLI.- poliploidia.

DANI. - célula danificada..

\*\* - 1 célula com 4 quebras cromatídicas.

TABELA XLII - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO

ANIMAL	QCMTD	FRAG.	GCMTD	POLI	SEGR.PREC.
RT172	2	1			4
RT175	1	1	2		
RT179	1	1			
RT182		1	1		
RT184	5	1	3		
RT185	1	3	1		
RT196	7		2		
RT208				2	3
RT213	1		1	1	
RT214	1		2	1	3
RT215			3		1
TOTAL	19	8	15	4	11

QCMTD- quebra cromatídica..

GCMTD- gap cromatídico.

FRAG.- fragmento acêntrico.

SEGR.PREC.- segregação precoce

POLI.- poliploidia.

TABELA XLIII - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM *Oryzomys nigripes* COLETADOS NA ÁREA INDUSTRIAL

ANIMAL	QCMTD	FRAG.	GCMTD	POLI.	DANI.	SEGR. PREC.
RT166	3	2	3	2		
RT178		1		1		
RT181						
RT189		1	1			5
RT190	1			1		
RT192	1			3	1	
RT221	2		3	1		5
RT231	2			7		3
RT232	2	2				
RT233	3	1	1			6
TOTAL	14	7	8	15	1	19

QCMTD - quebra cromatídica.  
 GCMTD - gap cromatídico.  
 FRAG.- fragmento acêntrico.  
 SEGR. PREC. - segregação precoce.  
 POLI. - poliploidia.  
 DANI. - célula danificada.

#### 4.9 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

##### 4.9.1 *Akodon montensis*

Na Tabela XLIV são reapresentados os totais de células com aberrações cromossômicas, por local de coleta, a fim de facilitar a leitura das Tabelas XLV, XLVI e L a LIII, onde são apresentados os resultados das análises estatísticas.

As Figuras 32 e 33 mostram a distribuição das frequências de células com aberrações cromossômicas, por área de estudo e por tipo respectivamente.

TABELA XLIV - TOTAL DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

LOCAL DE COLETA	TOTAL ANIM.	S/GAP	C/GAP	SEG. PREC.	POLI	CÉL. DANI.
ARROZAL	13	35	48	12	16	5
Á. PRESERVAÇÃO	12	26	43	12	18	1
Á. INDUSTRIAL	13	39	57	10	8	4

TOTAL ANIM. - Total de animais analisados por ponto de coleta (100 células por animal).

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG.).

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

POLI. - Total de células poliplóides.

CÉL. DANI. - Total de células danificadas

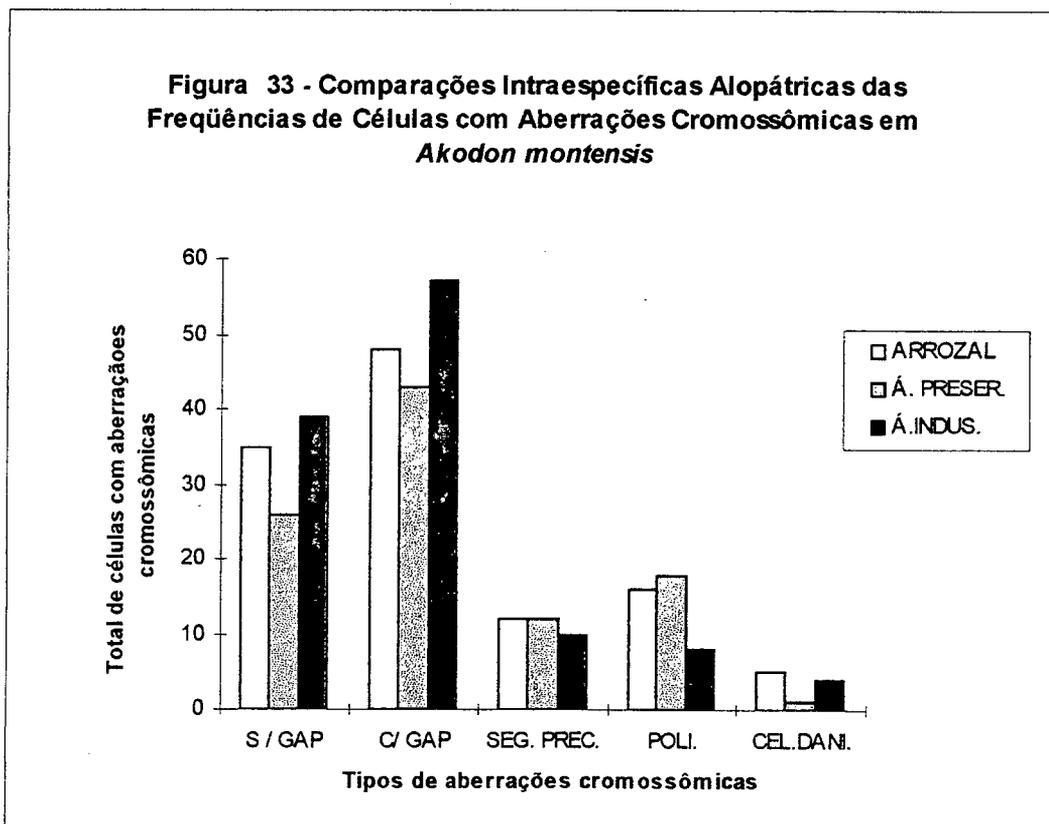
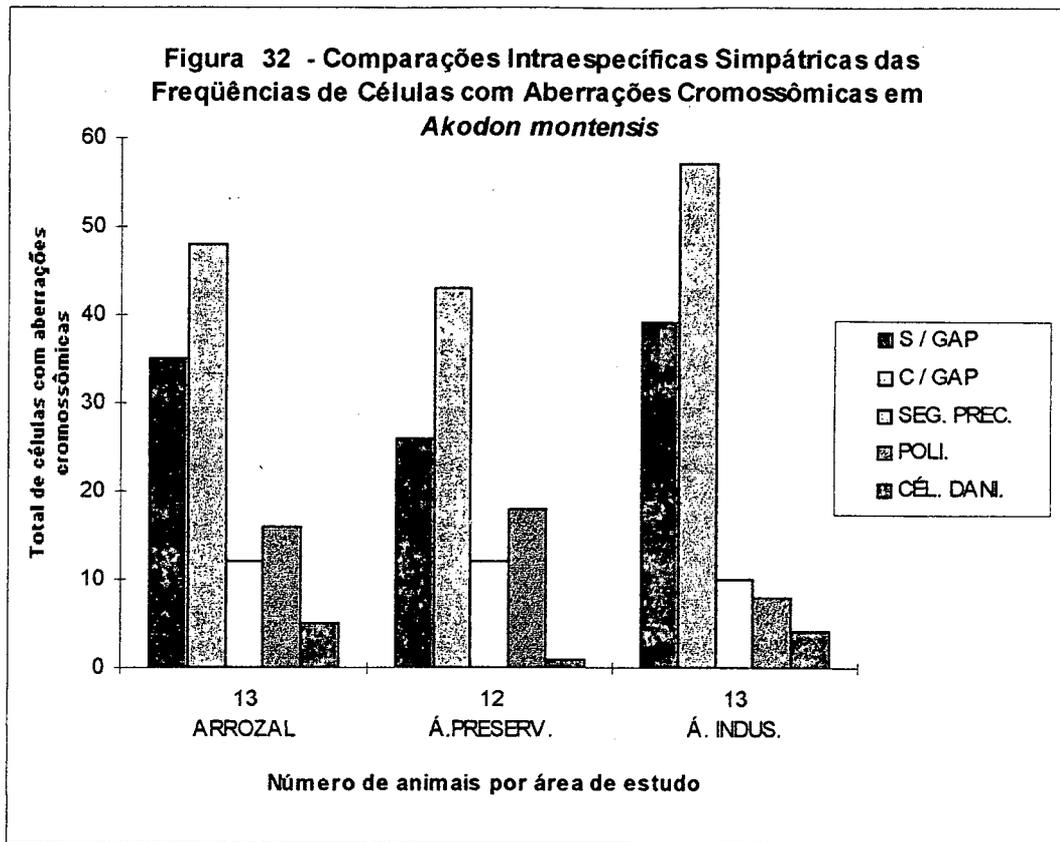


TABELA XLV - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-  
TRICAS EM *Akodon montensis* (TESTE DO  $X^2$ )

PARÂMETRO	LOCAIS COMPARADOS	$X^2$	P
S / GAP	ARROZAL + Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 1.685$	0.4306326
C / GAP	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 1,252$	0.53472644
SEG. PREC.	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 0.3678$	0.832019
POLIPLOIDIA	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 4.614$	0.03171198

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap.

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps.

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

POLI. - Total de células poliplóides.

TABELA XLVI - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁ-  
TRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS DANIFICADAS EM  
*Akodon montensis*, PELO TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR  
PROPORÇÕES EM CITOGENÉTICA

LOCAIS COMPARADOS	P
ARROZAL x ÁREA INDUSTRIAL	$P > 0,25$
ARROZAL + Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$P = 0.127$

Os dados das Tabelas XLV e XLVI revelam que as frequências de células com aberrações cromossômicas em *Akodon montensis* não foram significativamente diferentes entre as três áreas de estudo.

#### 4.9.2 *Oryzomys nigripes*

Na Tabela XLVII são rerepresentados os totais de células com aberrações cromossômicas, por local de coleta, a fim de facilitar a leitura das Tabelas XLVIII, XLIX e L a LIII, onde são apresentados os resultados das análises estatísticas.

As Figuras 34 e 35 mostram a distribuição das frequências de células com aberrações cromossômicas, por área de estudo e por tipo respectivamente.

TABELA XLVII - TOTAL DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

LOCAL DE COLETA	TOTAL ANIM.	S / GAP	C / GAP	SEG. PREC.	POLI.	CÉL.DANI.
ARROZAL	8	40	56	27	3	10
Á. PRESERVAÇÃO	11	27	42	11	4	0
Á. INDUSTRIAL	10	21	29	19	15	1

TOTAL ANIM. - Total de animais analisados por ponto de coleta (100 células por animal).

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap (QCMTD + QCMSM + FRAG.).

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

POLI. - Total de células poliplóides.

CÉL. DANI. - Total de células danificadas.

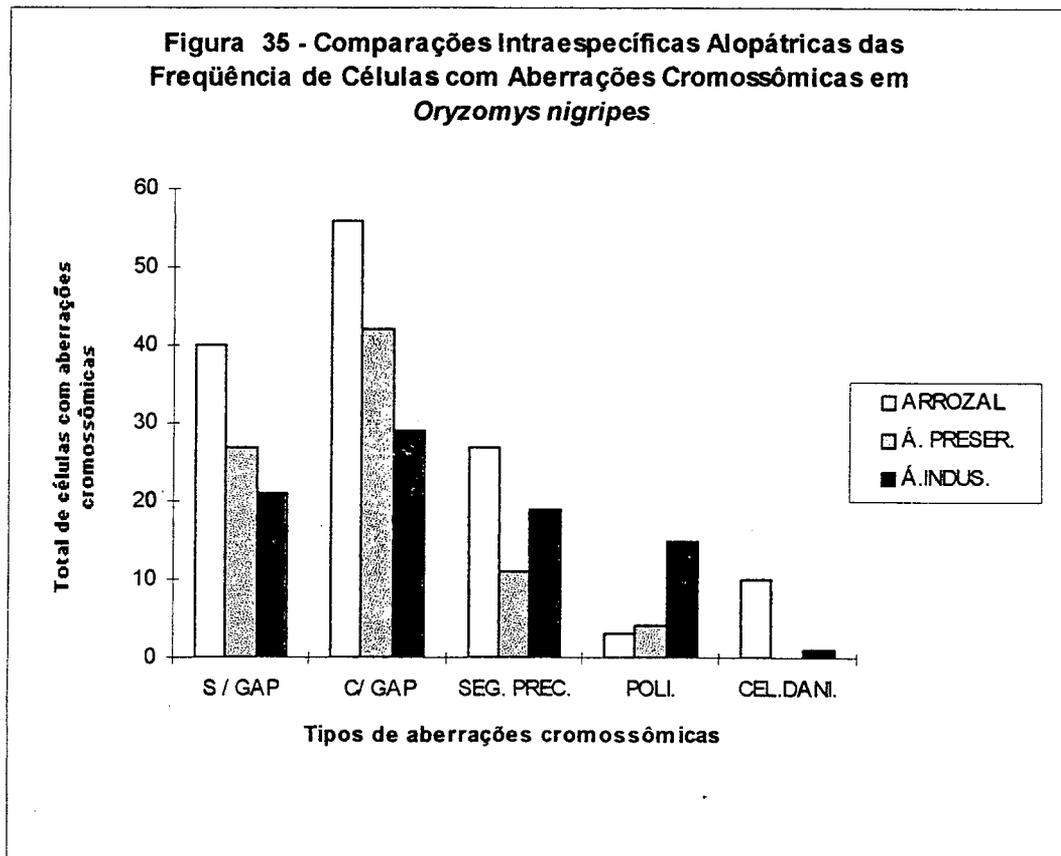
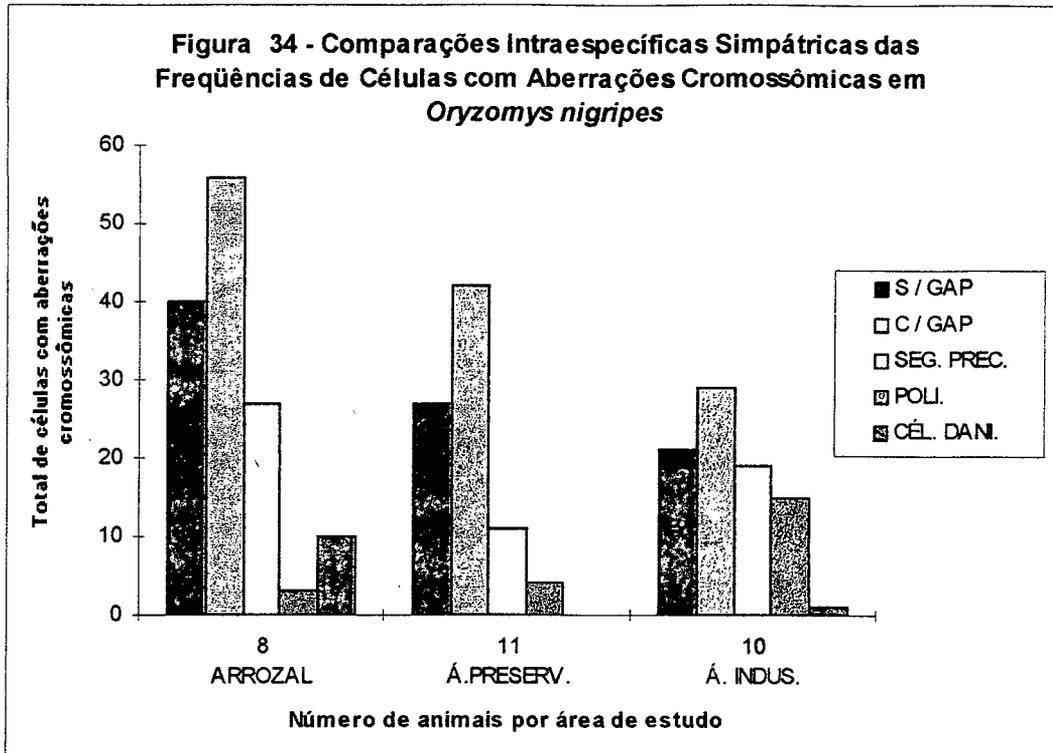


TABELA XLVIII - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS (TESTE DO  $X^2$ )

PARÂMETRO	LOCAIS COMPARADOS	$X^2$	P
S / GAP	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 14.8078$	0.00060887
	Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 0.3339$	0.5633716
C / GAP	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 16.4908$	0.00026246
	Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 1.4110$	0.23489061
SEG.PREC.	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 13.11295$	0.00142089
	Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 2.89$	0.08913094
POLIPLOIDIA	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO x Á. INDUSTRIAL	$X^2 = 10.92$	0.0042535
	ARROZAL x Á. PRESERVAÇÃO	$X^2 = 0.0018$	0.96615878

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap (QCMTD + QCMSM + FRAG.).

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

TABELA XLIX - RESULTADO DA COMPARAÇÃO INTRAESPECÍFICA ALOPÁTRICA DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS DANIFICADAS EM *Oryzomys nigripes*, PELO TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR PROPORÇÕES EM CITOGENÉTICA

LOCAIS COMPARADOS	P
ARROZAL x Á. INDUSTRIAL x Á. PRESERVAÇÃO	0.00012984

A análise dos resultados da Tabela XLVIII revela que as frequências de células com aberrações cromossômicas (com e sem gaps) e de células com pelo menos um cromossomo apresentando segregação precoce foram significativamente maiores no Arrozal. Já a frequência de células poliplóides foi significativamente maior na Área Industrial.

A Tabela XLIX revela que os dados obtidos para os totais de células danificadas são significativamente maiores no Arrozal.

4.9.3 Comparações interespecíficas no Arrozal (Teste do  $X^2$ )TABELA L - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FRE-  
QUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NO ARROZAL  
(TESTE DO  $X^2$ )

ARROZAL	S/GAP	C/GAP	CEL. DANI.	SEG.PREC.
<i>A. montensis X O. nigripes</i>				
$X^2$	7,09	10,34	3.28	15,64
P	0,007751525	0,00130178	0.070128939	$7,66167.10^{-6}$

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap (QCMTD + QCMSM + FRAG.).

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

CÉL. DANI. - Total de células danificadas

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

4.9.4 Comparações interespecíficas na Área de Preservação (Teste do  $X^2$ )TABELA LI - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA ÁREA DE PRESERVAÇÃO (TESTE DO  $X^2$ )

A. PRESERVAÇÃO	S/GAP	C/GAP	CÉL. DANL.	SEG.PREC.
<i>A. montensis X O. nigripes</i>				
$X^2$	0,19	0,07	0,9	0
P	0,662916618	0,79133678	0,342781718	1

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap (QCMTD + QCMSM + FRAG.).  
 C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

CÉL. DANL. - Total de células danificadas

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

4.9.5 Comparações interespecíficas na Área Industrial ( Teste do  $X^2$  )TABELA LII - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FRE-  
QUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA ÁREA  
INDUSTRIAL (TESTE DO  $X^2$ )

Á. INDUSTRIAL	S/GAP	C/GAP	CÉL. DANI.	SEG.PREC.
<i>A. montensis X O. nigripes</i>				
$X^2$	1,7	3,2	2,08	5,64
P	0,192288075	0,073638283	0,149240242	0,017555208

S / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias sem gap (QCMTD + QCMSM + FRAG.).

C / GAP - Total de células com aberrações cromossômicas primárias incluindo os gaps (QCMTD + QCMSM + FRAG. + GCMTD + GCMSM).

CÉL. DANI. - Total de células danificadas

SEG. PREC. - Total de células com segregação precoce de algum cromossomo.

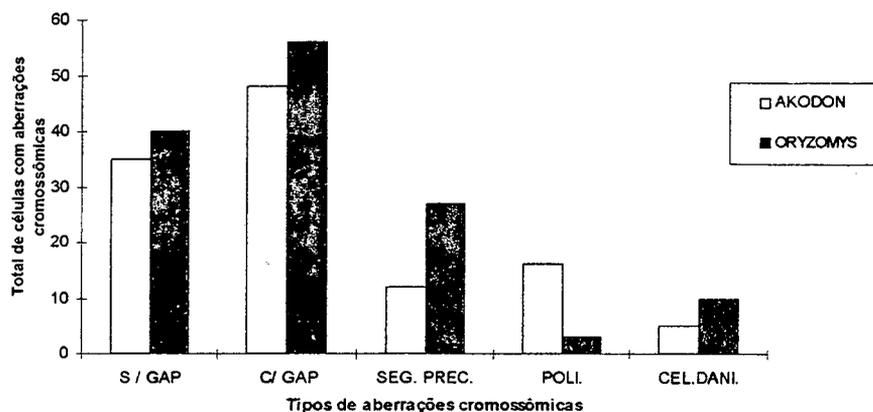
TABELA LIII - RESULTADO DAS COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRI-  
CAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS POLIPLÓIDES, PELO  
TESTE ESTATÍSTICO PARA COMPARAR PROPORÇÕES EM  
CITOGENÉTICA

<i>A. montensis X O. nigripes</i>	P
ARROZAL	0,033465
Á. PRESERVAÇÃO	0,003993
Á. INDUSTRIAL	0,0295

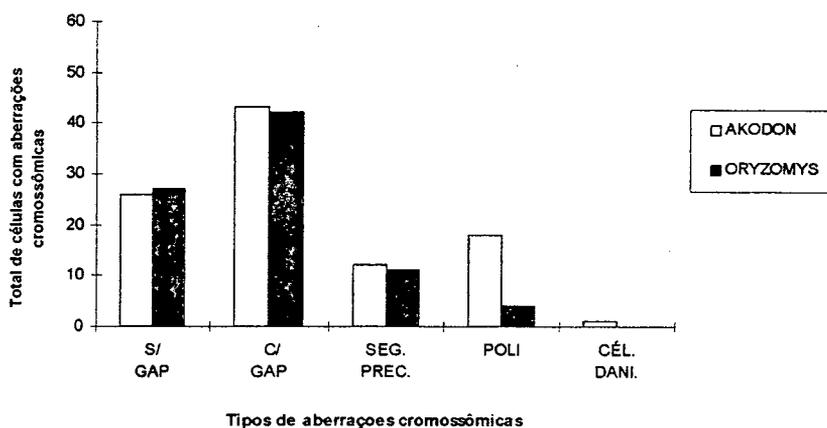
Nas Figuras 36 a 38 pode-se observar as comparações das frequências de células com aberrações cromossômicas entre *A. montensis* e *O. nigripes*, por tipo de aberração cromossômica e local de coleta.

A análise das Tabelas L, LI, LII e LIII, revela: 1) que as frequências de células com aberrações cromossômicas (com e sem gaps) e de células danificadas foram significativamente maiores em *Oryzomys nigripes* no Arrozal, não tendo sido observada diferença significativa entre as duas espécies, nas demais áreas; 2) que a frequência de células com pelo menos um cromossomo apresentando segregação precoce foi significativamente maior em *Oryzomys nigripes* apenas na Área Industrial e 3) as frequências de células poliplóides foram significativamente maiores em *Akodon montensis* tanto no Arrozal como na Área de Preservação, enquanto que na Área Industrial a maior frequência significativa foi observada em *Oryzomys nigripes*.

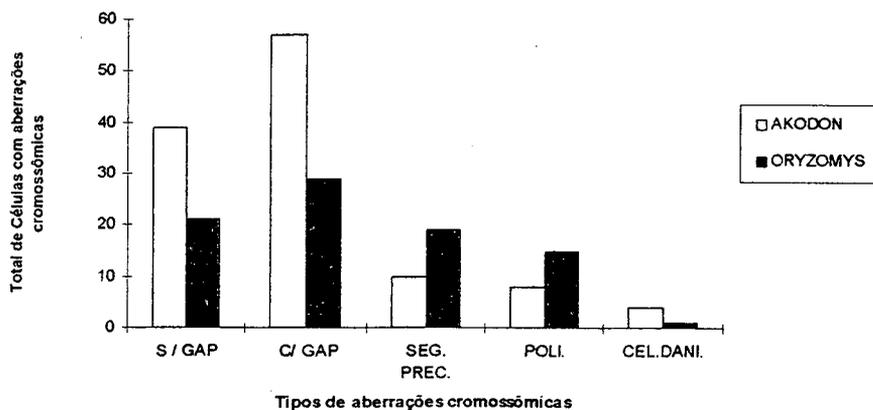
**Figura 36 - Comparações Interspecificas Simpátricas das  
Frequências de Células com Aberrações Cromossômicas em *A.  
montensis* e *O. nigripes* do Arrozal**



**Figura 37 - Comparações Interspecificas Simpátricas das  
Frequências de Células com Aberrações Cromossômicas em *A.  
montensis* e *O. nigripes* da Área de Preservação**



**Figura 38 - Comparações Interspecificas Simpátricas das  
Frequências de Células com Aberrações Cromossômicas em *A.  
montensis* e *O. nigripes* da Área Industrial**



## 5 DISCUSSÃO

Antes de iniciar a discussão sobre os resultados aqui apresentados é importante lembrar que o objetivo de um trabalho desta natureza, o biomonitoramento citogenético *in situ*, é sobretudo avaliar se, no meio ambiente alterado por ação humana, seja para a industrialização, agricultura ou urbanização, o material genético dos organismos que ali vivem está sendo danificado em consequência da introdução de possíveis agentes genotóxicos. Os resultados obtidos com tal metodologia, embora relevantes, não pretendem, por si só, exercer a função de um diagnóstico ou prognóstico ambiental, nem de uma avaliação ambiental e nem tampouco orientar um plano ambiental. Eles podem, entretanto, contribuir como indicadores dentro de uma abordagem mais abrangente que inclua outros tipos de avaliações de impacto ambiental.

A fim de atingir o objetivo acima descrito foi preciso, em primeiro lugar, identificar regiões de onde se pudessem obter tanto amostras de populações expostas a impacto ambiental, como de populações não expostas, provenientes de regiões com o mínimo de interferência humana, para se estabelecer as comparações.

Ocorre que no processo de alteração ambiental, principalmente por ação humana, podem ser caracterizados pelo menos três momentos: 1) o “antes”, 2) o “durante” e 3) o “depois”. Embora esta colocação seja óbvia, sua citação tem como objetivo reforçar a noção de que as complexas redes de interrelações de uma comunidade são bastante diferentes nos três momentos.

Pode - se, por exemplo, considerar o “antes” como um ecossistema estável, onde as interações estão ocorrendo de um modo dinâmico e harmônico, permitindo a atuação dos mecanismos de adaptação e dos mecanismos de auto-superação do ecossistema, levando-o à homeostase.

O “durante” pode ser considerado como o período no qual, em geral por interferência brusca do homem, as espécies, o meio físico e todas as interrelações previamente estabelecidas entre eles, vão passar por um intenso processo de transformação, que vai alterar mais ou menos drasticamente a homeostase anterior. Dependendo de algumas características desta etapa, tais como intensidade, duração, sinergia e reversibilidade, as características do terceiro momento serão obviamente diferentes.

O processo de transformação supra citado causará um impacto ambiental e normalmente levará a uma nova situação de homeostase, aqui considerado como “depois”.

Normalmente, a ruptura de relações ambientais pré-estabelecidas produz impactos negativos. Porém pode-se admitir que existam casos que podem representar a introdução de novas relações ambientais resultando num impacto positivo. Deste modo pode-se dizer que os impactos ambientais afetam a estabilidade pré-existente dos ciclos ecológicos fragilizando-a ou fortalecendo-a (Macedo, 1991).

Fica claro, portanto, que o ideal para alcançar o objetivo aqui proposto seria obter, para a amostra da população não exposta, animais provenientes de uma região com as características do “antes”, ou seja, de um ecossistema estável, onde as alterações cromossômicas encontradas representassem apenas o resultado do processo seletivo natural de todas as populações, e não da ação de alterações ambientais antropogênicas. Porém, na grande maioria do nosso território, e principalmente na área deste estudo, é difícil (senão impossível) localizar e identificar uma região com tais características. Em vista disso, optou-se por selecionar uma região aparentemente não sujeita a interferências que pudessem estar causando impacto ambiental negativo, região esta que é mantida como uma Área de Preservação Permanente pela Prefeitura Municipal de Timbó.

De modo semelhante ao que foi descrito acima, e por ser importante que as populações expostas estivessem em regiões sob impacto ambiental no momento da obtenção das amostras, foram delimitados pontos de coleta em regiões sob impacto visível - poluição por dejetos industriais, na Área Industrial, e por agrotóxicos na região do Arrozal. No entanto, não foi possível avaliar se esses locais estavam no “durante” ou no “depois”. Em outras palavras, essas populações estavam supostamente num momento agudo de

relacionados com a adaptação das diferentes populações de uma espécie ou de espécies diferentes, em diferentes locais.

Nas amostras obtidas nos três pontos de coleta, a análise da razão PCE/NCE revelou que a grande maioria dos animais apresentou uma razão dentro do índice esperado pela literatura (Adler, 1984; Gollapudi e Mac Fadden, 1995), ou próximo dele, o que demonstra que, em populações silvestres, pode-se encontrar animais apresentando diferentes “estados proliferativos” para essa linhagem celular. Além disso, pode-se dizer que, os resultados obtidos com os parâmetros citogenéticos analisados em células dessa linhagem não estão comprometidos.

Nas áreas expostas (Arrozal e Área Industrial), pode-se pensar que a suposta contaminação ambiental, por diferentes produtos químicos, por exemplo do solo, água e vegetação, a que os animais estão expostos, provavelmente de modo contínuo, seja a responsável pelos efeitos citotóxicos neles observados. Na Área de Preservação não se tem motivos para suspeitar do mesmo tipo de contaminação nos compartimentos ambientais acima mencionados. Por outro lado, não temos como descartar a possibilidade de contaminação do ar, que obviamente pode estar ocorrendo nas outras áreas, e que também pode estar contribuindo para os efeitos observados. Somado a isso, fatores confundentes, inevitáveis quando se trata de populações naturais, tais como parasitoses, deficiência nutricional, intoxicações, entre outros, que em situações experimentais seriam controlados, podem aqui também ter contribuído para os “desvios” encontrados.

Além disso, pode-se dizer que os resultados de PCE/NCE, nas populações aqui estudadas, permitem deduzir que os efeitos citotóxicos, que sem dúvida estão ocorrendo nos locais de estudo, não devem estar comprometendo sua sobrevivência, já que a maioria dos animais avaliados apresentou, nessas células, ou um “índice proliferativo” dentro do esperado, ou está se recuperando de efeito citotóxico anterior. De modo particular, a não observação de efeitos citotóxicos em *O. nigripes* do Arrozal, nessa linhagem celular, pode tanto ser devida a ausência de agentes citotóxicos locais para essa espécie, como pode ser devida à mortalidade dos animais sob seus efeitos. A discriminação entre essas duas possibilidades não pode ser feita apenas com base na análise desse parâmetro.

Em situações onde existam informações que permitam discriminar entre as duas possibilidades acima, os dados obtidos através desse parâmetro poderiam tornar-se importantes para avaliar a adaptabilidade das populações aos diferentes ambientes.

No biomonitoramento citogenético *in situ* de roedores silvestres (*Clethrionomys glareolus* Schreb.) provenientes de áreas contaminadas com  $^{137}\text{Cs}$ , devido ao acidente de Chernobyl, Cristaldi *et al.* (1991) verificaram um aumento significativo da razão PCE/NCE do local menos contaminado para o mais contaminado, além de um aumento significativo e proporcional na frequência de células micronucleadas (PCEMN) do local menos para o mais contaminado. Por outro lado, Ieradi *et al.* (1996) analisando *Mus domesticus* silvestres, expostos a poluição urbana por tráfego, observaram um decréscimo significativo na razão PCE/NCE de animais obtidos de áreas menos contaminadas para mais contaminadas, e um efeito inverso para a frequência de células micronucleadas (PCEMN e NCEMN).

Nenhum dos autores supra citados comentou sobre o significado dos resultados obtidos para a razão PCE/NCE. No entanto, em vista do fato de que se tratam de espécies diferentes, submetidas a diferentes tipos de contaminação ambiental, tanto um aumento como um decréscimo de PCE/NCE pode significar efeito citotóxico, no primeiro caso por regeneração e no segundo caso por efeito agudo. Portanto, a comparação desses dados não só deixam claro que eles não são contraditórios, mas que a interpretação dos resultados terá que ser feita com bastante critério, caso a caso, a fim de evitar erros.

### 5.1.2 IM - Linhagens Eritro e Mielopoiética

Atualmente sabe-se que a determinação da frequência de células metafásicas entre o total de células observadas, ou seja o índice mitótico (IM), numa população celular homogênea, submetida à um agente mutagênico, pode revelar tanto efeitos citotóxicos

agudos, que podem ser letais para as células, levando à redução do IM, como efeitos de proliferação celular regenerativa (após efeito citotóxico agudo) ou de atraso das divisões celulares (provocados por agentes que interferem com a regulação do ciclo celular normal), ambos levando à elevação do IM. Esses efeitos podem ser provocados por ação de determinados agentes químicos ou físicos, em determinadas doses, ou ainda pelas condições físico-químicas do meio em que as células se encontram. Esses agentes podem ou não interferir no material genético da célula e, apenas com a estimativa do IM, não é possível discriminar sua natureza ou modo de ação ou seja, se a ação está ocorrendo no núcleo, no citoplasma ou em ambos (Adler, 1984).

Sabe-se também, que as alterações observadas em medidas da capacidade proliferativa das células, tal como o IM, representam apenas a superfície do total de alterações que as células podem estar sofrendo no seu complexo sistema de controle do ciclo de divisão normal, em determinadas condições, num determinado momento. Na verdade, embora atualmente a compreensão de diversos mecanismos que regulam o ciclo celular já sejam conhecidos, muitos estudos ainda estão em andamento a fim de melhorar nossa compreensão sobre esse assunto (Nasmyth, 1996).

A avaliação do IM, paralelamente aos testes citogenéticos *in vitro*, onde a população celular é homogênea, é de suma importância principalmente para a verificação de possíveis efeitos citotóxicos das substâncias e doses testadas e das condições físico-químicas do meio de cultura, que podem interferir de modo indesejável nos resultados dos biomarcadores citogenéticos.

Nos testes citogenéticos *in vivo*, utilizando material proveniente da medula óssea, a população celular analisada não é homogênea, pois nas preparações existem misturas de células de diferentes linhagens, tais como células das linhagens eritro e mielopoiética. Nesse caso, com o teste sendo realizado em animais de laboratório, supostamente em condições físicas e ambientais controladas, pode-se pensar que, além da possível diferença de sensibilidade entre as diferentes linhagens celulares, e da variabilidade genética inerente à espécie em estudo, apenas os efeitos das substâncias e doses testadas é que podem refletir numa variabilidade interindividual, intraexperimento, dos valores desse parâmetro. Nesse tipo de abordagem, apesar das dificuldades de interpretação dos resultados, já salientadas por Tice

*et al.* (1994), a determinação do IM é importante tanto para se ter certeza de que a substância-teste está agindo na medula-óssea, como para evitar que as avaliações de danos citogenéticos sejam realizadas em condições extremas de citotoxicidade no sistema em estudo (medula óssea) o que, como no caso anterior, pode interferir de modo indesejável nos resultados dos biomarcadores citogenéticos.

Por outro lado, no biomonitoramento citogenético *in situ*, as alterações observadas no IM podem refletir a variabilidade genética inerente às espécies em estudo, os efeitos confundentes de fatores tais como , parasitoses, deficiências nutricionais, intoxicações, entre outros, além dos efeitos que se quer avaliar, pelas mesmas razões apontadas para as abordagens anteriores, ou seja, a citotoxicidade provocada por agentes ambientais em células da medula óssea. Além disso, nesse caso, o IM pode revelar a variação interpopulacional dos efeitos anteriormente mencionados, o que representa uma extensão de sua aplicação em relação às outras abordagens. Em vista disso, fica claro que, embora a interpretação desse parâmetro, no biomonitoramento citogenético *in situ*, apresente maiores dificuldades do que nos casos anteriores, ela expressa a medida exata da capacidade proliferativa das células da medula-óssea dos animais da espécie em estudo, no seu meio ambiente, num determinado momento.

#### 5.1.2.1 Comparações intraespecíficas alopatricas do IM (Tabelas XXXIV e XXXVI; Figuras 26 e 27)

A avaliação interindividual e interpopulacional do IM (ANOVA) teve como objetivo mostrar a diferença de susceptibilidade dos diferentes indivíduos, das diferentes populações de uma espécie, ao impacto ambiental de cada área, sobre esse parâmetro. Se há variação significativa, entre as diferentes populações intraespecíficas, pode-se deduzir que essa variabilidade permite à espécie enfrentar as diferentes pressões ambientais capazes de interferir com a capacidade proliferativa das células das linhagens eritro e mielopoiética da

medula-óssea, nas áreas avaliadas. Por outro lado, quando não há variação significativa, pode-se pensar que a espécie terá menores possibilidades de responder à diversidade do impacto ambiental sobre esse parâmetro, na sua área de dispersão, o que a torna mais susceptível à ele.

Neste estudo, verificou-se uma diferença significativa na comparação intraespecífica alopátrica do IM em *Akodon montensis* (Tabela XXXIV e Figura 26), mas não em *Oryzomys nigripes* (Tabela XXXVI e Figura 27). Esse fato sugere que, na presença de agentes capazes de interferir com a proliferação da medula, nos locais de estudo, *O. nigripes* estará em maior risco de sofrer as conseqüências dos danos citotóxicos na medula óssea do que *A. montensis*.

A comparação do total de células metafásicas obtidas entre as populações ( $X^2$ ), teve como objetivo mostrar as diferentes pressões ambientais sofridas, pelas diferentes populações intra e interespecíficas em estudo, na proliferação das células das linhagens eritro e mielopoiética da medula óssea, na área avaliada.

Com relação a essa avaliação, pode-se dizer que em situações experimentais controladas, numa comparação entre populações exposta e controle, ambas da mesma espécie e linhagem, a observação de um IM maior na população exposta do que na controle, poderá ser interpretado tanto como sendo devido a proliferação regenerativa como a atraso no ciclo de divisão, nas referidas linhagens celulares da medula óssea dos indivíduos dessa população. Por outro lado, um IM menor na população exposta revela efeito citotóxico agudo nas células da medula óssea dos indivíduos dessa população. Portanto, nos dois casos, é possível estimar se está ocorrendo citotoxicidade ou não, nas células das linhagens eritro e mielopoiética da medula óssea dos indivíduos da população exposta, sob o efeito do produto e da dose empregados na avaliação.

Quando essa mesma avaliação é realizada entre populações naturais diferentes, da mesma espécie (comparação intraespecífica alopátrica), expostas a diferentes tipos de impacto ambiental, a observação de um IM maior numa população A do que numa população B pode sugerir que: a) Os indivíduos da população A ou estão sofrendo uma proliferação regenerativa (recuperação de efeito citotóxico anterior) ou um atraso do seu

ciclo de divisão normal, mais intensos do que os indivíduos da população B. Nos dois casos pode-se pensar que existam no ambiente agentes interferindo significativamente com a capacidade proliferativa das células das linhagens eritro e mielopoietica da medula óssea dos indivíduos que ali vivem; b) Os indivíduos da população B ou estão sofrendo efeito citotóxico mais forte do que os indivíduos da população A ou não estão, como os indivíduos da população A, sofrendo alteração na sua capacidade proliferativa de células das referidas linhagens celulares da medula-óssea. A discriminação entre essas duas possibilidades terá que se basear na análise de parâmetros adicionais. Além disso, se nessa avaliação não for observada diferença significativa entre as populações A e B, esse fato demonstrará que não há diferença entre os ambientes, no que diz respeito à presença ou não de agentes capazes de interferir com a capacidade proliferativa das células das linhagens eritro e mielopoietica da medula óssea dos indivíduos que ali vivem.

Ainda, se numa comparação intraespecífica alopátrica, realizada entre uma população A exposta, e uma população B supostamente não exposta, observar-se um IM maior em A do que em B pode-se sugerir que o impacto ambiental, na região da população A, está interferindo na capacidade reprodutiva das células das linhagens eritro e mielopoietica da medula óssea dos indivíduos dessa população, no sentido de provocar ou proliferação regenerativa, ou atraso no ciclo de divisão normal dessas células, e o IM observado nos indivíduos de B deve ser o normal para a espécie.

Se ocorrer o contrário, ou seja, o IM da população B for maior do que o da população A, pode-se sugerir que o impacto ambiental nos indivíduos de A está tendo um forte efeito citotóxico sobre as células das linhagens eritro e mielopoietica da medula-óssea dos indivíduos dessa população, e o IM observado nos indivíduos de B deve ser o normal para a espécie.

Em vista do exposto acima, e dos resultados obtidos para *Akodon montensis* - Tabela XXXIV e Figura 26 - verifica-se que, nas comparações intraespecíficas alopátricas nessa espécie, as células das linhagens eritro e mielopoieticas estavam proliferando significativamente mais no Arrozal do que nas outras áreas e que o menor IM ocorreu na Área de Preservação. Esses resultados permitem dizer que nas áreas expostas existiam agentes citotóxicos, e que esses atingiram a medula óssea embora não seja possível identificar

se a razão do maior IM seja devido a regeneração ou atraso do ciclo de divisão dessas células. Já o resultado observado na Área de Preservação, deve ser devido à ausência de efeitos citotóxicos na medula óssea dos animais dessa espécie, nessa área.

Do mesmo modo, a análise da Tabela XXXV e da Figura 27 permite dizer que o IM significativamente menor em *Oryzomys nigripes* do Arrozal, do que das outras áreas, pode estar revelando forte efeito citotóxico sobre as células das linhagens eritro e mielopoiética da medula óssea dos indivíduos dessa espécie, nesse local. Já o IM significativamente maior na Área Industrial do que nas outras áreas, pode estar revelando proliferação regenerativa ou atraso da divisão celular das células das linhagens eritro e mielopoiética da medula óssea dos indivíduos dessa espécie, nesse local.

Na Área de Preservação, embora o IM seja, em média, maior em *O. nigripes*, do que em *A. montensis*, pode-se sugerir que os valores do IM nessa área estejam dentro dos padrões normais de cada espécie. Isso permite supor que, nessa área, nas duas espécies, as células não estavam se dividindo pouco, mas apenas estavam se dividindo menos do que em algumas áreas expostas.

#### 5.1.2.2 Comparações interespecíficas simpátricas do IM (Tabela XXXVII; Figuras 28 e 29)

No biomonitoramento *in situ*, em áreas supostamente não expostas, são as comparações interespecíficas simpátricas do IM que poderão dar uma indicação das diferenças potenciais das capacidades proliferativas das células das linhagens eritro e mielopoiéticas da medula óssea entre as espécies. Quando, por outro lado, essa comparação é realizada entre populações naturais simpátricas, de espécies diferentes, supostamente expostas a impacto ambiental, a observação de um IM maior na população de uma espécie A do que na população de uma espécie B pode sugerir que: a) Na população da espécie A a proliferação está sendo maior, ou aí está ocorrendo um maior atraso do ciclo de divisão do

que na população da espécie B, o que revela uma maior susceptibilidade de A aos agentes ambientais; b) A população da espécie B apresenta ou uma proliferação regenerativa menor, ou não está sofrendo atraso do seu ciclo de divisão. Tanto no primeiro como no segundo caso, pode-se pensar que o efeito seja devido à menor susceptibilidade da espécie B aos agentes ambientais, porém no primeiro caso, pode-se também pensar em falta de condições de recuperação do IM, o que representaria, na verdade, uma maior susceptibilidade aos agente ambientais. A discriminação entre essas duas possibilidades terá que se basear na análise de outros parâmetros. Ainda se, nessa avaliação, não for observada diferença significativa entre as espécies, este fato demonstrará susceptibilidade equivalente das duas espécies aos agentes ambientais e, esse resultado, por si só, não permitirá deduzir nada com relação a ação ou não de agentes citotóxicos ambientais.

A comparação interespecífica alopátrica entre *Akodon montensis* e *Oryzomys nigripes* revelou para *O. nigripes* IM significativamente maiores nas Áreas Industrial e de Preservação e menor no Arrozal.

Admitindo-se, conforme foi proposto no item anterior, que os IM da Área de Preservação podem ser considerados normais para cada espécie, pode-se agora supor que o IM de *O. nigripes* é naturalmente mais alto do que o de *A. montensis*. Em vista disso, e dos resultados obtidos nas comparações interespecíficas das populações das áreas expostas, pode-se dizer que: a) Em *O. nigripes* as células das linhagens eritro e mielopoiéticas são muito mais sensíveis do que em *A. montensis* aos efeitos citotóxicos dos agentes ambientais do Arrozal; b) Em *A. montensis* as células dessas linhagens são mais sensíveis do que em *O. nigripes* aos efeitos citotóxicos da Área Industrial.

## 5.2 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE PCEMN, NCEMN E SPMN

MacGregor *et al.* (1990) propuseram que em camundongos ou em ratos esplenectomizados, expostos repetida ou continuamente à um agente genotóxico, depois de um certo período de tempo, as frequências de PCEMN na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) devem ser iguais à frequência de NCEMN no SP.

Essa proposição deixa claro que em determinadas condições de exposição, em animais de laboratório onde o baço não está eliminando as células micronucleadas, após determinado período de tempo, espera-se que as frequências de células micronucleadas da MO e do SP equiparem-se. No entanto, sabe-se que, no biomonitoramento citogenético *in situ*, não há como eliminar a interferência de vários fatores - ambientais e internos - que podem contribuir para que os resultados obtidos sejam diferentes do esperado, mesmo em áreas supostamente não contaminadas.

Em vista disso, antes da discussão dos resultados obtidos para os parâmetros que avaliaram os efeitos de possíveis genotoxinas ambientais na linhagem eritropoiética da MO e SP, são apresentadas algumas hipóteses de estudo sobre os resultados esperados, nessa abordagem, perante a presença ou não de genotoxinas ambientais, nos locais avaliados.

Para estabelecer essas hipóteses de estudo é importante definir alguns termos com relação tanto à intensidade como à frequência da exposição.

Com relação à intensidade dos efeitos provocados pelas genotoxinas ambientais pode-se classificá-la em: 1) aguda - forte, com efeitos expressivos; 2) fraca - sem efeitos ou com poucos efeitos expressivos; 3) moderada - com efeitos intermediários entre as duas anteriores.

Com relação à frequência da exposição da linhagem celular de interesse, às genotoxinas ambientais, pode-se classificá-la em: 1) acidental - que ocorreu num determinado momento ou pode ocorrer esporadicamente; 2) intermitente - que ocorre regularmente,

porém de forma descontínua; 3) contínua - que ocorre sem interrupção; 4) crônica - que vem ocorrendo, continuamente, à algum tempo.

Fica claro do exposto acima que os efeitos observados nas frequências de células micronucleadas, no biomonitoramento citogenético *in situ*, dependerão da combinação entre a intensidade e a frequência da exposição dos animais às genotoxinas ambientais.

Sendo assim, na análise das frequências de PCEMN e NCEMN, na MO de animais provenientes de áreas supostamente não contaminadas, espera-se encontrar PCEMN = NCEMN pois, de modo semelhante ao que foi proposto por MacGregor *et al.* (1990), as eventuais células micronucleadas que possam surgir, devido a alguns fatores ambientais e internos, estarão progressivamente amadurecendo, sem que nada interfira nesse processo. Eventuais desvios do esperado sugerem contaminação ambiental.

Por outro lado, a análise das frequências de PCEMN e NCEMN, na MO de animais provenientes de áreas supostamente contaminadas, poderá revelar os seguintes resultados ou efeitos da exposição: 1) PCEMN > NCEMN - Nessa situação, pode-se pensar que os efeitos genotóxicos sobre os animais foram agudos e contínuos, pois a quantidade de células jovens portadoras de micronúcleos é maior do aquelas que já amadureceram; 2) PCEMN < NCEMN - Aqui os efeitos genotóxicos e citotóxicos podem ter sido agudos e acidentais, pois algumas células jovens micronucleadas morreram, abaixando o índice de PCEMN, enquanto que outras, provavelmente derivadas de outras condições de exposição, puderam contribuir para a composição da população de células maduras. Também, perante esses resultados, é possível pensar que no passado a intensidade da exposição tenha sido mais intensa do que estava sendo no momento da coleta do material; 3) PCEMN = NCEMN - Nesse caso, de acordo com MacGregor *et al.* (1990), a melhor hipótese que se pode formular é que a exposição dos animais às genotoxinas ambientais devia estar sendo moderada e crônica no momento da coleta do material (note-se que a interpretação desse resultado pode ser diferente em área não contaminada).

Uma vez que nesse estudo também foram observadas células micronucleadas no SP das duas espécies selecionadas, pode-se supor que as células micronucleadas

produzidas na MO estão passando para a circulação e não estão sendo eliminadas pelo baço, de modo semelhante ao que ocorre em camundongos.

As PCEMN e NCEMN do SP não puderam ser discriminadas com o método de coloração aqui empregado e, na verdade, SPMN expressa uma soma desses dois tipos celulares em circulação. Em vista disso, são aqui apresentadas algumas hipóteses de resultados das comparações entre as frequências de células micronucleadas da MO e do SP (PCEMN + NCEMN) x SPMN, embora se saiba que entre as SPMN existam não só NCEMN recém-produzidas e amadurecidas, mas também células micronucleadas já amadurecidas há algum tempo, além das PCEMN.

Se essas comparações forem feitas entre células de animais provenientes de áreas supostamente não contaminadas o resultado esperado será  $(PCEMN + NCEMN) < SPMN$ . Isto se deve ao fato de que, mesmo em áreas não contaminadas, é possível que alguns fatores ambientais e internos contribuam, de modo fraco e crônico, para a expressão de efeitos genotóxicos. Quando a quantidade de células micronucleadas produzidas na MO é baixa, e essas não são eliminadas pelo baço, ficando em circulação por algum tempo, obtém-se o efeito acima esperado.

Já, nas comparações de células micronucleadas da MO e SP, de animais provenientes de áreas contaminadas por genotoxinas ambientais, os seguintes resultados poderão ser encontrados: 1)  $(PCEMN + NCEMN) > SPMN$  - Nessa situação pode-se pensar que os animais estivessem sob exposição aguda e contínua, pois por mais que tenham se acumulado SPMN, a frequência de células micronucleadas na MO ainda é maior do que em circulação. Também, nesse caso, pode-se pensar em efeito agudo acidental no momento da coleta, o que estaria tornando a frequência de células micronucleadas na MO momentaneamente mais alta; 2)  $(PCEMN + NCEMN) < SPMN$  - Como as SPMN representam uma soma de células jovens, recém-amadurecidas e amadurecidas já há algum tempo, perante esses resultados pode-se pensar que o efeito das genotoxinas no momento da coleta do material estava sendo mais moderado do que foi anteriormente, mas é crônico, pois verifica-se uma frequência maior de células micronucleadas no SP. Nesse caso também pode-se admitir a ocorrência de efeito citotóxico acidental, o que pode ter contribuído para a diminuição da frequência de células micronucleadas da MO. (note-se que a interpretação

desse resultado pode ser diferente em área não contaminada); 3)  $(PCEMN + NCEMN) = SPMN$  - Nesse caso pode-se pensar em efeito moderado e crônico pois a frequência de células micronucleadas na MO é mais elevada do que a frequência esperada dessas células em áreas não contaminadas.

### 5.2.1 *Akodon montensis* (Tabela XIX; Figura 19).

Os resultados obtidos nas comparações intraespecíficas simpátricas entre as frequências de PCEMN e NCEMN em *A. montensis* revelaram que elas diferiram significativamente entre si nas áreas expostas - Arrozal e Á. Industrial - tendo sido maiores que o esperado em PCEMN. Já na Á. de Preservação as frequências de PCEMN e NCEMN não diferiram significativamente.

As comparações das frequências de SPMN com as frequências somadas de PCEMN e NCEMN revelaram que nas três populações as frequências de SPMN foram significativamente maiores.

Com base nesses resultados, e no exposto anteriormente, pode-se dizer que os animais dessa espécie, provenientes da Área de Preservação, estavam sofrendo um impacto genotóxico fraco e crônico, o que está dentro do esperado para populações naturais de áreas não expostas.

Os resultados obtidos nas populações expostas - Arrozal e Área Industrial - permitem sugerir que os indivíduos dessa espécie, nesses locais, estavam sofrendo um forte impacto genotóxico e que este impacto devia estar ocorrendo a um tempo suficiente para que as células por ele afetadas pudessem ter passado para a circulação e aí se acumulado. Em resumo, com base nessas comparações, nas área expostas, pode-se dizer que o impacto genotóxico ambiental sobre os indivíduos de *A. montensis* deve ter sido agudo e crônico.

### 5.2.2 *Oryzomys nigripes* (Tabela XXII; Figura 21)

Os resultados das comparações intraespecíficas simpátricas entre as frequências de PCEMN e NCEMN em *O. nigripes* revelaram que elas diferem entre si apenas na Á. Industrial, onde a frequência de PCEMN é maior do que a de NCEMN. Nos outros dois locais - Arrozal e Área de Preservação - as frequências de PCEMN e NCEMN não diferiram significativamente.

As comparações das frequências de SPMN com as frequências somadas de PCEMN e NCEMN revelaram:- 1) Diferença não significativa no Arrozal - Esses resultados, comparados com os resultados da frequência de células micronucleadas da MO e com as hipóteses anteriormente levantadas, permitem dizer que os efeitos da exposição a genotoxinas ambientais nessa área, em *O. nigripes*, estavam sendo moderados e crônicos; 2) Diferença significativamente maior para a soma das frequências de PCEMN e NCEMN na Área de Preservação - A comparação desses resultados com o resultado da frequência de células micronucleadas da MO, que ficou dentro do esperado para essa área, permite sugerir que na verdade existe a possibilidade de que os indivíduos dessa população tivessem sofrido efeito genotóxico moderado e acidental. É importante ressaltar que apenas a análise anterior não permitiria fazer essa interpretação sobre os efeitos da exposição dos animais aos agentes ambientais dessa área, e que a comparação com SPMN levanta suspeitas quanto a não exposição às genotoxinas dos animais dessa espécie, na Área de Preservação; 3) Diferença significativamente menor para a soma das frequências de PCEMN e NCEMN na Área Industrial - Esses resultados, juntamente com aqueles obtidos nas comparações das frequências de células micronucleadas da MO, permitem sugerir que os animais dessa espécie, nessa área, estavam sofrendo não só exposição a agentes que provocavam efeito genotóxico agudo e contínuo, mas também a agentes citotóxicos que produziam efeito agudo e crônico. Esta interpretação se baseia no fato de que, embora a frequência de PCEMN seja alta, essas células provavelmente estão sendo eliminadas antes de passarem para a circulação, o que fica claro pela baixa frequência de SPMN observada.

Schlegel e MacGregor (1982) sugeriram um período de vida dos NCE em circulação de 30 dias no camundongo, enquanto Schlegel e MacGregor (1984) sugeriram um período de 60 dias no rato. Essas estimativas foram feitas com base na observação da eliminação de células micronucleadas do SP, após um determinado período de tempo da exposição contínua dos animais a um agente genotóxico. Nesse estudo essas estimativas não foram feitas, mas uma vez que, em alguns casos, observaram-se freqüências de SPMN maiores do que as freqüências somadas de células micronucleadas da MO, é provável que tanto em *A. montensis* como em *O. nigripes* o tempo de duração das células em circulação seja superior aos tempos relatados na literatura para a formação de PCE (26h), sua permanência na MO (24h) e passagem para o SP (24h), ou seja, para haver acúmulo de células micronucleadas no SP estas supostamente deverão ficar em circulação por um tempo superior a 74h ou mais de três dias.

Não foram consideradas nessas comparações os totais de CM pois, como pode ser verificado nas Tabelas VII a IX e XIII a XV, foram observadas apenas 4 CM entre as 246000 células de SP analisadas. Desse fato pode-se pensar que, apesar do que foi dito acima, é possível que exista nas espécies aqui estudadas, algum tipo de "critério de seleção" das células que passam para o SP, que pode inclusive ser a eliminação das CM dentro da própria MO. Por outro lado, como as células do SP não foram discriminadas em PCE e NCE, o que é possível ser feito com técnicas que empregam coloração fluorescente (Hayashi *et al.*, 1992), pode-se também pensar que, se as CM possíveis de permanecer em circulação estão surgindo numa freqüência baixa, elas ficam muito "diluídas" no total de células novas e antigas em circulação. Nesse sentido, Asita *et al.* (1992) salientaram que a desvantagem principal associada com o uso de SP é que a toxicidade é difícil de ser estimada. Isso se deve à grande abundância de eritrócitos maduros em relação aos jovens e também à distribuição desigual desses últimos na lâmina. Esses autores concluem que, devido a isso, a freqüência de eritrócitos jovens entre o total de maduros no SP, comparada com a freqüência de PCE/NCE na MO, está provando ser um índice difícil e incerto de medir.

De modo contrário, pode-se dizer que, apesar da dificuldade da estimativa de células micronucleadas da MO, em comparação com a facilidade observada para a mesma estimativa em células do SP, a análise e comparação das freqüências de todos esses

parâmetros são muito importantes no biomonitoramento citogenético *in situ*, e a análise de apenas alguns deles poderá levar a falsas interpretações sobre os efeitos decorrentes da exposição dos animais aos diferentes agentes ambientais.

Embora as análises acima não tenham sido feitas com intenção de mostrar diferença de sensibilidade das espécies aos diferentes tipos de agentes ambientais, elas sugerem que isso possa ter ocorrido.

### 5.3 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS

Nessas comparações foram incluídas as frequências de CM. Esse parâmetro pode ser considerado como uma medida de efeito de agente genotóxico pois considerou-se célula morta aquela que apresentou mais do que 3 micronúcleos. Outros tipos de CM certamente poderão ocorrer, por diversas razões, mas não poderão ser detectadas pela análise desse parâmetro. Em vista disso, efeitos citotóxicos (causados ou não por genotoxinas) poderão ser aqui detectados não pela frequência de CM, mas através das comparações das flutuações das frequências do conjunto dos parâmetros analisados.

#### 5.3.1 *Akodon montensis* ( Tabelas XVIII e XX / Figura 20)

Em *A. montensis* a menor frequência significativa de PCEMN observada na Área de Preservação, em comparação com as outras áreas, pode representar um efeito genotóxico mais intenso nas áreas expostas do que na não exposta.

As frequências de NCEMN nas três áreas de coleta não diferiram significativamente, o que, à primeira vista, pode parecer um resultado paradoxal. Porém, se admitirmos a possibilidade de que nas áreas expostas esteja ocorrendo uma maior mortalidade de PCEMN do que na área não exposta, poderemos supor que esta seja a razão das frequências de NCEMN se mostrarem equivalentes.

Ao analisarem-se as frequências de CM e SPMN verificou-se que elas são inversamente proporcionais no Arrozal, ou seja, enquanto que a frequência de CM nessa área é significativamente maior do que nas outras, na frequência de SPMN observa-se o contrário. Sabe-se que a quantidade de SPMN é o resultado de células vivas micronucleadas que passam da MO para o SP. Sendo assim, pode-se dizer que a frequência significativamente alta de CM no Arrozal está dentro do esperado, se o que foi sugerido acima sobre as frequências de PCEMN e NCEMN nas populações expostas estiver correto, isto é, se realmente estiver ocorrendo uma alta mortalidade de PCEMN.

Não fosse a frequência de PCEMN na Área de Preservação ser significativamente menor do que na Área Industrial, fato que sugere efeito genotóxico mais intenso nesta última, seria possível supor que, nestas duas áreas, a ação de agentes genotóxicos ambientais fosse equivalente, já que as frequências dos demais parâmetros não foram significativamente diferentes e portanto não permitem diferenciar uma da outra.

Do exposto acima pode-se deduzir que em *A. montensis* as comparações das frequências de células micronucleadas da MO e do SP revelam um efeito genotóxico maior no Arrozal do que nas outras áreas. Os dados das frequências de PCEMN sugerem efeito genotóxico importante também na Área Industrial, porém as frequências dos outros parâmetros analisados não permitem confirmar esta hipótese.

### 5.3.2 *Oryzomys nigripes* (Tabelas XXI e XXIII / Figura 22)

Em *O. nigripes* as frequências de PCEMN não diferiram significativamente entre as três áreas. Esses resultados permitem formular três hipóteses explicativas: a ) não há agentes genotóxicos atuando nestas áreas; b) há agentes genotóxicos atuantes, porém seus efeitos são iguais nas três áreas; c) a alta mortalidade de PCEMN nas áreas expostas não permite diferenciá-las da Área de Preservação onde, supostamente, a frequência de PCEMN deveria ser naturalmente menor do que nas outras áreas .

As frequências maiores de NCEMN na Área de Preservação e de CM no Arrozal reforçam a possibilidade representada pela hipótese c, além de sugerirem um efeito genotóxico maior no Arrozal.

De acordo com o obtido nos parâmetros acima, o esperado para as frequências de SPMN seria: a) frequência maior na Área de Preservação, já que ali a frequência de NCEMN foi maior e b) frequência menor no Arrozal, já que ali a frequência de CM foi maior. O esperado não ocorreu, e a frequência de SPMN foi significativamente maior na Área Industrial e não significativa entre as outras duas áreas; esse fato, acrescido da suposição apresentada na hipótese c, sugerem que, nesta espécie, na Área Industrial esteja havendo um efeito genotóxico maior do que na Área de Preservação.

Do exposto, pode-se dizer que em *O. nigripes* as frequências dos parâmetros da MO apontam para possibilidade de efeito genotóxico maior no Arrozal, enquanto que a frequência de SPMN aponta um efeito maior na Área Industrial.

#### 5.4 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS E ALOPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS

Para ser possível interpretar o quadro geral de interferência do ambiente no material genético das células das linhagens eritro e mielopoiéticas, de cada uma das espécies escolhidas, nas áreas selecionadas, foi necessário analisar em primeiro lugar o resultado observado para a frequência de cada parâmetro em particular, e depois as frequências do conjunto dos parâmetros.

A análise conjunta dos resultados obtidos nas comparações intraespecíficas simpátricas e alopátricas das frequências dos parâmetros citogenéticos da MO e SP, tornaram assim possível delinear um “perfil” de genotoxicidade ambiental para cada área de estudo, em cada uma das espécies, tal como segue:

##### 5.4.1 *Akodon montensis*

- Arrozal - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeitos genotóxico e citotóxico agudos e crônicos.
- Área de Preservação - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico fraco e crônico; não há evidência de efeito citotóxico.
- Área Industrial - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico agudo e crônico e efeito citotóxico moderado.

#### 5.4.2 *Oryzomys nigripes*

- Arrozal - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico moderado e crônico e efeito citotóxico agudo e crônico.
- Área de Preservação - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico moderado e acidental; não há evidência de agentes causadores de efeito citotóxico.
- Área Industrial - possibilidade de ocorrência de agentes causadores de efeito genotóxico agudo e crônico; não há evidência de efeito citotóxico.

#### 5.5 COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (TABELAS XXIV A XXVI; FIGURAS 23, 24 E 25)

Uma vez delineados os perfis genotóxicos para cada área de estudo e espécie, baseados nas comparações intraespecíficas simpátricas e alopátricas das frequências de células micronucleadas da MO e SP, estabeleceu-se, com base nos mesmos parâmetros, a relação de diferença de sensibilidade ao impacto ambiental entre as espécies, através das comparações dos resultados das frequências de cada parâmetro em cada área de estudo

A análise das Tabelas XVIII, XXI, XXIV a XXVI e das Figuras 23 a 25 demonstra que em todas as áreas estudadas, *O. nigripes* e *A. montensis* diferiram nas frequências dos parâmetros analisados, sendo que em todas as comparações os resultados obtidos foram significativamente maiores em *O. nigripes*. A única exceção é a diferença não significativa das frequências de SPMN na Área de Preservação.

Esses dados sugerem maior sensibilidade de *O. nigripes* aos agentes genotóxicos ambientais das áreas estudadas. O resultado de SPMN na Área de Preservação pode ser devido à falta de continuidade de exposição dos animais desta região aos agentes genotóxicos, pois havendo interrupção na produção de células micronucleadas na MO estas estarão proporcionalmente em menor quantidade no SP em determinados momentos. Esta possibilidade está de acordo com o perfil genotóxico ambiental delineado para esta área, para os indivíduos dessa espécie (item 5.4.2)

Também, com base no que foi dito inicialmente na discussão, é possível pensar-se que essa diferença de sensibilidade seja não só decorrente das propriedades intrínsecas do acervo gênico de cada espécie com relação à susceptibilidade a ação de agentes genotóxicos, mas também que ela esteja revelando a consequência dos diferentes momentos de readaptação vividos por cada espécie aos ambientes impactados.

Se esse for o caso, pode-se pensar que *A. montensis* esteja melhor adaptada a viver nas áreas expostas aqui estudadas do que *O. nigripes*. Especialmente no Arrozal, onde a ocorrência de *O. nigripes* é nitidamente menor do que a de *A. montensis* em relação às outras áreas (Tabela II), esta hipótese parece ser bastante provável, porém deveria ser futuramente testada com metodologias adequadas para esse fim.

## 5.6 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRA E INTERESPECÍFICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS

O tipo de abordagem empregado na análise de efeitos citogenéticos provocados por possíveis agentes genotóxicos ambientais, aqui realizado, deixou claro que a análise da frequência de apenas um parâmetro não é suficiente para compreender-se a extensão dos efeitos desses agentes no material genético nas células da linhagem eritropoiética e avaliar suas consequências.

Na comparação das frequências de PCEMN e NCEMN de roedores silvestres provenientes de áreas pouco e muito contaminadas, por poluição provocada por tráfego intenso, Ieradi *et al.*(1996) encontraram frequências de PCEMN e NCEMN que aumentaram proporcionalmente com o aumento da poluição, porém os autores não compararam as duas frequências entre si.

Neste trabalho, as frequências isoladas de PCEMN e NCEMN não puderam ser diretamente associadas com o aumento da contaminação ambiental, e somente a comparação das frequências desses parâmetros, um com o outro, é que permitiu formular hipóteses com relação aos efeitos dos agentes ambientais sobre as células da linhagem eritropoiética dos animais, nos locais de coleta.

Verificou-se também, neste trabalho, que apenas a estimativa da frequência de SPMN poderia ter levado a sub-estimativas do risco que as genotoxinas ambientais poderiam estar impondo aos animais de áreas contaminadas. Por exemplo, a análise isolada dos resultados desse parâmetro, em *A. montensis* do Arrozal, teria levado a concluir que, nessa área, não estava ocorrendo efeito genotóxico nas células da linhagem eritropoiética desses animais. No entanto, a comparação dos resultados desse parâmetro com os demais revelou que, na verdade, a frequência mais baixa de SPMN aí observada pode ser consequência da alta frequência de CM na MO. Barale *et al.* (1985) sugeriram que o declínio de células micronucleadas no SP, depois de tratamentos prolongados, pode também ser devido a: 1) seleção de células resistentes; 2) decréscimo da capacidade de metabolização dos agentes em metabólitos genotóxicos; 3) ou, por outro lado, um aumento da capacidade de desintoxicação dos efeitos dos metabólitos. Em *A. montensis* do Arrozal os dados aqui obtidos permitiram a formulação da hipótese acima, no entanto as possibilidades levantadas por Barale *et al.* (1985), não podem ser aqui descartadas, para nenhuma população de nenhuma das duas espécies.

Resultados de medidas da presença/ausência de espécies podem muitas vezes ser relacionados com os efeitos severos de um estressor (ou estressores) ambiental que podem conduzir à erradicação de uma ou mais espécies de um determinado local. Por outro lado, o principal objetivo de “monitorar a saúde ambiental” é a detecção precoce de efeitos de

estressores. Normalmente, essa detecção é feita em indivíduos que não morreram sob os efeitos provocados pelos estressores, porém é preciso que os efeitos detectados nos indivíduos possam se refletir na população como um todo, pois se não for assim, os efeitos detectados não serão nem ecológica nem evolutivamente importantes ( Gray, 1989).

Os efeitos genotóxicos aqui detectados, entre as diferentes populações de cada espécie, e entre as espécies, permitem dizer que, no biomonitoramento citogenético *in situ*, o biomarcador frequência de células micronucleadas, permite identificar a ação de efeitos de estressores ambientais precocemente, fornece indicação sobre quais são as populações intraespecíficas e interespecíficas em maior risco, e portanto permite delinear um perfil de genotoxicidade ambiental num determinado período e local, além de ser um indicador importante de futuras alterações que poderão ocorrer na composição faunística das comunidades locais. Esses dados possibilitam que medidas de correção da contaminação ambiental seja tomadas antes que os danos ambientais se tornem conspícuos.

## 5.7 COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

### 5.7.1 *Akodon montensis* (TABELAS XLIV, XLV e XLVI / Figuras 32 e 33 )

Nenhuma das comparações das frequências de células com aberrações cromossômicas permitiu diferenciar as populações de *A. montensis* com relação aos danos genotóxicos ambientais, como foi possível fazer com a frequência de células micronucleadas.

No entanto, antes de questionar a validade desse parâmetro, como uma medida de avaliação de danos citogenéticos, no biomonitoramento *in situ*, é importante estabelecer uma comparação entre os resultados das frequências de células com AC e o IM.

O IM, discutido no ítem 5.1.2, revelou a possibilidade de existência de agentes citotóxicos nas áreas expostas. Como foi anteriormente mencionado, o maior IM nessas áreas, em relação a Área de Preservação, pode tanto ser devido à proliferação regenerativa como ao atraso do ciclo de divisão celular (acúmulo de metáfases).

Admitindo-se a primeira hipótese, e levando-se em conta a possibilidade de exposição crônica dos animais das áreas expostas aos agentes ambientais (ítem 5.4.1), pode-se supor que as células que estão proliferando são aquelas resistentes aos agentes citotóxicos, os quais, como já foi dito, podem ser genotóxicos ou não. Se os agentes citotóxicos eram genotóxicos, pode-se pensar que a diferença interpopulacional não significativa deve ser devida à mortalidade das células portadoras de tais alterações, e que as que estavam se reproduzindo eram aquelas não afetadas pelos agentes; nesse caso, pode-se dizer que a alteração do IM prejudicou a detecção de possíveis efeitos citogenéticos provocados pelos agentes ambientais, nas áreas expostas. Se os agentes citotóxicos não eram genotóxicos, as células que estavam se reproduzindo obviamente não poderiam apresentar alterações citogenéticas observáveis. Nos dois casos, portanto, a diferença interpopulacional não significativa entre as frequências de células com AC, nessa espécie, estaria dentro do esperado.

Por outro lado, admitindo-se a hipótese de que o IM significativamente maior nas áreas expostas seja devido ao atraso da divisão celular normal, pode-se supor que os agentes responsáveis pelo atraso não sejam clastogênicos, pois não se observou diferença significativa entre as áreas, nos parâmetros citogenéticos que avaliaram essa possibilidade.

Em resumo, no primeiro caso, admite-se que as células que estavam sofrendo danos citotóxicos (genotóxicos ou não) não estavam sobrevivendo, e que portanto estavam se dividindo apenas aquelas não afetadas (talvez por serem mais resistentes aos agentes ambientais). No segundo caso, admite-se a possibilidade de que as células afetadas sejam aquelas que estavam demorando mais para completar sua divisão, e que o atraso do ciclo de divisão tenha sido o único efeito nelas produzido. A diferença interpopulacional não significativa de células danificadas cromossômicamente (Tabela XLVI), reforça a possibilidade de que a segunda hipótese levantada acima seja a que melhor explique os dados

obtidos e sugere a presença de agentes que interferem no funcionamento normal do aparelho mitótico, nas áreas expostas.

Além do exposto, deve-se considerar, na determinação do perfil genotóxico para *A. montensis*, das áreas estudadas, que os resultados obtidos para as frequências de eritrócitos micronucleados, tanto na MO como no SP, revelaram efeitos genotóxicos e citotóxicos maiores no Arrozal e os resultados das frequências de PCEMN sugeriram efeitos genotóxicos e citotóxicos importantes, também na Á. Industrial, conforme discutido anteriormente no item 5.4.1. Deve ser lembrado que, com a metodologia aqui empregada, não foi possível diferenciar se os MN eram formados em sua maioria de fragmentos cromossômicos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros (efeito de agentes perturbadores do fuso) ou de uma mistura deles. Sbrana *et al* (1993) sugeriram que bloqueadores de mitose tendem a ser aneugênicos porque as células que se demoram em divisão tendem a ter anáfases anormais em consequência de malformação do fuso. A possibilidade de discriminar entre efeito clastogênico e aneugênico na avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados, teria trazido informações importantes sobre o impacto dos agentes ambientais em *A. montensis*, e sobre a diferença de sensibilidade entre as duas linhagens celulares estudadas.

Nakano *et al* (1996) ressaltaram que o fato de os testes do micronúcleo e aberrações cromossômicas serem realizados em diferentes tipos celulares ou seja, células da linhagem eritropoiética no primeiro e células das linhagens eritro e mielopoiéticas no segundo, pode revelar diferente suscetibilidade destas linhagens celulares a um mesmo agente genotóxico.

A proporção média esperada de mielócitos : eritrócitos na medula óssea de seres humanos é de 2,3 : 1 (Wintrobe *et al*, 1974). Neste estudo não foram discriminadas as células dessas duas linhagens, e tanto na determinação da frequência de células com AC, como na determinação do IM, o total metafases analisadas está composto de uma mistura desses dois tipos celulares, numa proporção supostamente equivalente a anteriormente citada.

Os resultados aqui encontrados para a frequência de células com AC e frequência de células micronucleadas também sugerem diferença de sensibilidade entre as

duas linhagens celulares aos efeitos dos mesmos agentes ambientais. Como, neste estudo, a frequência de células com AC não permitiu diferenciar áreas expostas de área não exposta, pode-se pensar que, em *A. montensis*, as células da linhagem mielopoiética (aproximadamente duas vezes mais frequentes do que as células da linhagem eritropoiética) sejam menos susceptíveis do que as células da linhagem eritropoiética aos efeitos provocados pelos agentes ambientais presentes nas áreas estudadas (identificados nessas células pelas alterações das frequências de células micronucleadas em áreas expostas), ou que apresentem mecanismo de reparo mais eficiente, ou uma combinação das duas coisas.

Obviamente a análise isolada das frequências de células com AC permitiria eliminar a possibilidade da ação de agentes genotóxicos ou citotóxicos nas áreas expostas, o que certamente seria uma subestimativa dos perigos que os agentes ambientais estão oferecendo aos indivíduos de *A. montensis*, nessas áreas. Esse fato torna clara a necessidade da análise de vários parâmetros, em diferentes linhagens celulares, nos indivíduos de uma espécie de uma determinada área, no biomonitoramento citogenético *in situ*, a fim de não incorrer em erros na determinação do perfil genotóxico ambiental.

#### 5.7.2 *Oryzomys nigripes* (TABELAS XLVII, XLVIII e XLIX / Figuras 34 e 35)

Os resultados das comparações intraespecíficas alopátricas das frequências de células com diferentes tipos de AC revelaram valores significativamente maiores de células com e sem gaps, de células danificadas e de células com segregação precoce, na população de *O. nigripes* do Arrozal, do que nas outras populações.

Por outro lado, o IM dessa espécie foi significativamente menor na população do Arrozal do que nas outras duas. Conforme discutido no item 5.1.2.1, esses dados do IM sugerem efeito citotóxico agudo para os indivíduos dessa espécie, nessa área.

As células sobreviventes aos efeitos citotóxicos dos agente ambientais do Arrozal apresentaram evidências significativas de terem sido submetidas à ação de agentes clastogênicos, pois as frequências de células com e sem gaps e de células danificadas foram maiores no Arrozal do que nas outras áreas.

Neste trabalho foram também consideradas as frequências de células com pelo menos 1 cromossomo metafásico apresentando divisão centromérica prematura ou separação centromérica assincrônica, ou separação prematura das cromátides-irmãs, ou ainda, como aqui denominado, por simples questão descritiva, segregação precoce. O termo divisão centromérica prematura (PCD) tem sido utilizado tanto para designar o fenômeno irregular onde apenas um cromossomo X humano está envolvido (Fitzgerald *et al*, 1975), como para designar o fenômeno irregular onde todos os cromossomos humanos estão envolvidos (Rudd *et al*, 1983); o termo separação centromérica assincrônica foi empregado por Dolara *et al* (1994) para descrever o fenômeno irregular observado após a exposição de linfócitos humanos *in vitro* a uma mistura de 15 pesticidas, onde nem todos os cromossomos estavam envolvidos; ainda Miyazaki e Orr-Weaver (1994) utilizaram o termo separação prematura de cromátides irmãs (PSSC) para descrever o fenômeno irregular observado em alguns cromossomos, de mutantes de diferentes categorias taxonômicas, tanto na mitose como na meiose. Essas citações evidenciam que, embora mal compreendido, esse fenômeno tem sido observado como um efeito metafásico irregular em diferentes situações e organismos.

Por outro lado, Vig e Zincowski (1985) sugeriram que a seqüência de separação centromérica não é casual, que ela deve depender tanto da quantidade como da qualidade da heterocromatina, e que cada espécie apresenta para o seu genoma “um padrão regular assincrônico” de separação do centrômero, dependendo dessas características. Um exemplo bem conhecido, que pode reforçar a hipótese levantada por esses autores, é a divisão pós-reducional do cromossomo X em alguns insetos (ex. Odonata), onde ocorre a separação assincrônica das cromátides-irmãs do cromossomo X ainda na anáfase I (Bueno, 1982).

Em resumo, pode-se dizer que a observação citológica de alguns cromossomos metafásicos particulares, ou de todos os cromossomos de uma placa, apresentando suas cromátides e centrômeros nitidamente separados, pode ser uma característica intrínseca da

espécie ou o resultado do efeito de agentes ambientais. Evidentemente que no primeiro caso não há porque esperar diferenças significativas entre diferentes populações de uma mesma espécie, a menos que fatores externos também possam estar envolvidos no processo.

Neste trabalho não foi feita uma avaliação qualitativa deste efeito no sentido de verificar se os cromossomos com segregação precoce apresentavam ou não características heterocromáticas peculiares, conforme sugerido por Vig e Zincowski (1985). Mas, como a frequência de células com diferentes cromossomos apresentando segregação precoce, em *O. nigripes*, foi significativamente maior no Arrozal do que nas outras populações, pode-se dizer que, mesmo que alguns fatores intrínsecos (genéticos) possam estar envolvidos na separação assíncrona dos centrômeros dos cromossomos dessa espécie, a variação interpopulacional aqui observada sugere que essa característica também devia estar sendo afetada por fatores extrínsecos (agentes ambientais). A interferência de fatores extrínsecos, na seqüência de separação dos centrômeros, foi demonstrada em situação experimental por Dolara *et al* (1994).

Sullivan *et al* (1996) fizeram uma revisão do conhecimento atual sobre o DNA centromérico, as proteínas centroméricas importantes na formação do complexo centrômero/cinetócoro, as proteínas envolvidas na função do centrômero e no movimento cromossômico e segregação e as interações entre cada um desses fatores e o ciclo celular. Fica claro desse, e de outros trabalhos, que este assunto, ou seja, a compreensão da estrutura e função do centrômero, e sua relação com o ciclo celular, ainda é bastante incompleta.

Apesar das dificuldades de explicação do fenômeno, pode-se dizer que a segregação precoce, comprovadamente causada por fatores extrínsecos, é um caso de malsegregação dos cromossomos, que pode ser conseqüência da ação de agentes que alteram o funcionamento dos componentes celulares que regulam o ciclo de divisão celular, como por exemplo o aparelho mitótico. Em vista disso, a segregação precoce, assim como a não-disjunção, podem estar envolvidas na origem de erros do processo divisão - mitótica e meiótica -, cujas conseqüências citológicas podem ser as alterações cromossômicas numéricas.

Zelesco *et al* (1990) encontraram fortes evidências de que o benomil, um fungicida do grupo dos carbamatos, induziu aumento de frequência, de modo diretamente proporcional a dose, tanto de aneuploidia como de poliploidia em um sistema teste de células híbridas hamster Chinês/humana (EUBI). Nesse sistema teste, o aumento da frequência de células poliplóides foi expressivamente maior do que o de células aneuplóides, nas concentrações mais altas testadas. Dolara *et al* (1994) verificaram, numa mistura de 15 pesticidas, em linfócitos humanos cultivados, que a retirada do benomil da mistura abolia o efeito de separação centromérica assincrônica observada quando de sua presença. Os efeitos aneugênicos e inibidores do fuso de alguns carbamatos foram discutidos por Önfelt (1986). Por outro lado, Adhikari e Grover (1988) observaram efeito clastogênico, dependente da dose, do benomil, na medula óssea de ratos e Vasudev e Krishnamurthy (1994) não observaram indução de aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais, nem na mitose nem na meiose de camundongos expostos a dois pesticidas carbamatos - Dithane M-45 e Baygon.

A análise da Tabela I e do item III.1 revela que no Arrozal são utilizados pelo menos dois tipos de pesticidas do grupo dos carbamatos: o Furadan 5G e o Satanil E. Além desses, são empregados na cultura de arroz outros pesticidas, entre eles o Roundup (Glifosato - organofosforado), que foi considerado não mutagênico em vários sistemas teste (IPCS,1994). Marinovich *et al* (1996) avaliaram o efeito de diferentes misturas de pesticidas, numa linhagem de neuroblastoma humano, e verificaram que os efeitos de uma mistura são muitas vezes diferentes dos efeitos isolados de um produto, e que a mesma mistura pode ter efeitos tóxicos, significativos ou não, dependendo do parâmetro analisado. Esses autores concluem que, em misturas complexas, podem ocorrer interações químicas e biológicas, as quais não são facilmente extrapoláveis da estrutura e atividade de componentes individuais.

Em vista da mistura de pesticidas presentes no Arrozal, da maior frequência de células com e sem gaps, de células com segregação precoce, e de células danificadas, nesta área do que nas outras duas, e do que foi anteriormente discutido, pode-se pensar que no Arrozal, além de agentes clastogênicos, também existam agentes perturbadores da estrutura e funcionamento normais do aparelho mitótico (potencialmente indutores de aneuploidias ou poliploidias), e que os efeitos citogenéticos observados nessa espécie devem, muito mais

provavelmente, ser devidos aos efeitos da mistura de pesticidas presentes naquela região do que aos efeitos isolados de cada um deles.

A comparação intraespecífica alopátrica das frequências de células poliplóides revelou uma maior proporção deste tipo de alteração cromossômica na Á. Industrial do que nas outras áreas, o que revela a existência de agentes perturbadores do fuso também nesse local. É interessante ressaltar que as células poliplóides, observadas nesse estudo, nunca apresentaram um número cromossômico que correspondesse a um múltiplo exato do número haplóide da espécie, o que está de acordo com o proposto por Mitchell *et al* (1995) para a poliploidia induzida por agentes perturbadores do fuso de divisão.

Em *O. nigripes* os resultados das comparações das frequências de células com AC (com e sem gaps), de células danificadas e também da frequência de células com segregação precoce permitem dizer que ela estava mais sujeita a impacto genotóxico no Arrozal do que nas outras áreas. Esses resultados para AC aparentemente estão de acordo com os resultados das comparações intraespecíficas alopátricas das frequências de eritrócitos micronucleados da medula óssea, embora aqui também não tenha sido possível distinguir a natureza dos micronúcleos observados. A possibilidade de discriminar entre efeitos clastogênicos e de agentes perturbadores do fuso seria importante para ajudar a esclarecer uma possível diferença de sensibilidade aos efeitos dos agentes ambientais, entre as células das linhagens eritro e mielopoiéticas em *O. nigripes*.

## 5.8 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS DOS TOTAIS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Com base apenas nos dados obtidos nas comparações intraespecíficas das frequências de células com AC é possível delinear um “perfil” de genotoxicidade ambiental para cada área de estudo, em cada uma das espécies, tal como segue abaixo:

### 5.8.1 *Akodon montensis*

As diferentes áreas estudadas não podem ser diferenciadas quanto a frequência de células com AC, o que não permite indicar a presença de agentes genotóxicos nas áreas expostas, para essa espécie, com base nesse parâmetro. Todavia, a análise comparativa dos resultados do IM com os das frequências de AC revelam a possibilidade da presença de agentes que interferem no fuso de divisão, nas áreas expostas.

### 5.8.2 *Oryzomys nigripes*

- Arrozal - possibilidade de ação de agentes clastogênicos e de agentes que interferem no fuso de divisão.
- Área de Preservação - falta de evidência de atuação de agentes genotóxicos.
- Área Industrial - possibilidade de ação de agentes que interferem no fuso de divisão.

## 5.9 COMPARAÇÕES INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DO TOTAL DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (TABELAS L A LIII; FIGURAS 36, 37 E 38)

De modo semelhante ao que foi feito para as frequências de células micronucleadas, foram comparadas as frequências de células com diferentes tipos de AC, entre as espécies, em cada área de estudo, a fim de tentar estabelecer a relação de diferença de sensibilidade aos diferentes tipos de agentes genotóxicos ambientais.

Ao se analisarem nas Tabelas L - LII e nas Figuras 36 a 38 os parâmetros que permitem revelar diferença de sensibilidade entre as espécies aos agentes clastogênicos, ou seja, frequências de células com e sem gaps, verificou-se a ocorrência de diferença de sensibilidade nas áreas expostas, sendo que no Arrozal os resultados obtidos foram significativamente maiores do que os esperados em *O. nigripes* e na Á. Industrial esses resultados foram significativamente maiores em *A. montensis*. A dedução imediata é que *O. nigripes* é mais sensível aos agentes clastogênicos presentes no Arrozal enquanto que *A. montensis* é mais sensível aos agentes clastogênicos da Á. Industrial. Na Área de Preservação não houve diferença significativa entre as espécies para esses parâmetros.

Também se pode verificar nas tabelas acima referidas que a frequência de células danificadas não diferiu significativamente entre as espécies em nenhuma das três áreas.

Nas Tabelas L - LIII podem ser analisados os parâmetros que permitem revelar diferença de sensibilidade entre as espécies aos agentes que interferem no fuso de divisão, ou seja, frequência de células com segregação precoce e frequência de células poliplóides.

As comparações das frequências de células com segregação precoce entre as duas espécies revelaram que, nas áreas expostas, as frequências foram significativamente maiores do que o esperado em *O. nigripes* e que na Á. de Preservação a frequência desse parâmetro não diferiu significativamente entre as espécies. Já a frequência de células

poliplóides diferiu entre as espécies nas três áreas, sendo maior do que o esperado em *A. montensis* no Arrozal e na Á. de Preservação, e em *O. nigripes* na Á. Industrial.

Os resultados das comparações interespecíficas simpátricas, que revelam diferença de sensibilidade entre as espécies aqui estudadas aos agentes que interferem no fuso de divisão, sugerem que nas áreas expostas existam pelo menos dois tipos desses agentes, um que leva a aneuploidia e outro que leva a poliploidia, e que na Á. de Preservação existe pelo menos um agente indutor de poliploidia. No entanto, é importante lembrar que Zelesco (1990) observou que uma mesma substância (benomil) pode induzir esses dois efeitos e que, portanto, isto também pode estar acontecendo com o material aqui estudado. Além disso, fica claro desses resultados que: 1) nas áreas expostas, *O. nigripes* foi mais susceptível do que *A. montensis* à ação de agentes perturbadores do fuso; 2) no Arrozal e na Á. de Preservação *A. montensis* foi mais susceptível à ação de agentes indutores de poliploidia, enquanto que *O. nigripes* foi mais susceptível à ação desses agentes na Á. Industrial. Esse último resultado pode ser devido tanto à natureza diferente dos agentes indutores de poliploidia presentes nas diferentes áreas, como pode ser consequência de diferentes interações de um mesmo agente em diferentes ambientes, ou ambos.

Por último, e de modo semelhante ao que já foi discutido sobre a melhor adaptação de *A. montensis* às condições das áreas expostas (item 5.4), os dados acima apresentados sobre os efeitos de agentes clastogênicos e perturbadores do fuso, nessa espécie, no Arrozal, também permitem sugerir que ela está melhor adaptada a viver nas condições dessa área do que *O. nigripes*.

## 5.10 DEDUÇÕES DAS COMPARAÇÕES INTRAESPECÍFICAS ALOPÁTRICAS E INTERESPECÍFICAS SIMPÁTRICAS DAS FREQUÊNCIAS DE CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As análises anteriores permitem deduzir que as comparações intraespecíficas alopátricas das frequências de células com diferentes tipos de AC podem não ser suficientes para a detecção de efeitos genotóxicos ambientais. No entanto, pode-se dizer que uma análise conjunta dos resultados obtidos nas comparações intraespecíficas alopátricas com os das comparações interespecíficas simpátricas, das frequências de células com diferentes tipos de AC, associadas com os resultados obtidos para o IM, ajudam a detectar a presença e a esclarecer a natureza dos agentes genotóxicos ambientais.

Por exemplo, a simples análise das frequências de células com AC em *A. montensis* não teria permitido detectar a ação de agentes genotóxicos em nenhuma das três áreas selecionadas para este estudo. No entanto, quando se estabelece uma comparação dos resultados das frequências de células com AC com os do IM, nessa espécie, pode-se sugerir a presença e a ação de agentes perturbadores do fuso nas áreas expostas (5.7.1). Além disso, a comparação interespecífica simpátrica revelou: 1) frequência maior de células com e sem gaps na Área Industrial em *A. montensis*, demonstrando a presença e os efeitos de agentes clastogênicos neste local e 2) frequência maior de células poliplóides em *A. montensis* no Arrozal e na Área de Preservação, revelando a presença e ação de agentes perturbadores do fuso nestes locais (5.9).

Desse modo, fica claro que, no biomonitoramento citogenético *in situ*, a determinação da frequência de células com AC, por si só, em uma única espécie, pode levar a falsas interpretações sobre os riscos genotóxicos oferecidos pelo ambiente. No entanto, a interpretação dos resultados desse parâmetro, obtidos em mais de uma espécie e em associação com o IM, pode fornecer informações valiosas sobre a presença e a natureza de agentes genotóxicos ambientais.

## 6 CONCLUSÕES

1) Dado que a variabilidade genética é a regra na grande maioria das espécies e populações; dado que a relação entre as espécies e dessas com seu ambiente representa uma intrincada rede de interrelações, e uma vez que populações intraespecíficas alopátricas podem ser diferenciadas com relação à frequência de células com danos citogenéticos, pode-se dizer que o biomonitoramento citogenético *in situ* pode ser considerado como um bom instrumento de mudança proativa<sup>1</sup>, e que o estudo de pelo menos duas espécies simpátricas nas regiões de estudo, afetadas ou não, aumentará a confiabilidade dos resultados obtidos, já que este procedimento evitará que se esbocem super ou sub-estimativas dos perigos de genotoxicidade a que estão submetidos os organismos que ali vivem.

2) Dado que no biomonitoramento citogenético *in situ* os organismos-teste estão expostos cronicamente aos diferentes estressores ambientais e seus modos de ação; dado que a dinâmica de proliferação celular é uma característica determinada geneticamente, porém passível de sofrer fortes alterações por fatores ambientais, e uma vez que os parâmetros citogenéticos podem ser influenciados pela oscilação da proliferação celular, é recomendável, a fim de se certificar sobre a pertinência dos resultados, que estes sejam obtidos da avaliação de vários parâmetros citogenéticos relacionáveis entre si.

3) Dos marcadores biológicos de efeitos cito e genotóxicos aqui utilizados, pode-se dizer que a determinação da razão PCE/NCE, nas mesmas preparações medulares de onde são estimadas as frequências de PCEMN, NCEMN e CM, além da determinação da frequência de SPMN, entre o total de eritrócitos circulantes, no mesmo espécimen de onde foi extraída a medula, é uma metodologia altamente eficiente em detectar riscos genotóxicos ambientais precocemente.

4) Dado que a frequência de células com AC e o IM são determinados entre células de diferentes origens e com base nos resultados aqui obtidos para esses parâmetros,

---

<sup>1</sup> Mudança proativa (Rebouças, 1997) - medida que antecipa-se à existência do problema e procura evita-lo ou neutraliza-lo.

pode-se dizer que eles são mais relevantes em esclarecer a natureza dos agentes genotóxicos ambientais do que na detecção precoce de seus efeitos.

5) Uma maior eficiência da metodologia aqui empregada poderá ser obtida quando da possibilidade de utilização de técnicas de citogenética molecular, a fim de diferenciar entre efeitos de agentes clastogênicos e aneugênicos, e considera-se premente um esforço nesse sentido.

6) Evidentemente que a mesma abordagem pode ser aplicada a populações humanas suspeitas de exposição a agentes genotóxicos, e isso é até desejável. No entanto, os resultados preliminares obtidos com populações de animais silvestres ou domesticados permitem uma previsão, para não falar em extrapolação, do que pode acontecer ou estar acontecendo com o material genético das populações humanas. A natureza das questões éticas epidemiológicas, tais como sensibilização para a necessidade da avaliação, avaliação pregressa de certos hábitos, discriminação de indivíduos sob risco, escolha da população controle, entre outras, são em geral mais difíceis de serem resolvidas do que as que tratam dos procedimentos da ecogenotoxicologia. Portanto, a utilização dessa última abordagem permite postergar o estudo de populações humanas para um momento em que os resultados preliminares com populações animais sugerirem um perigo real de genotoxicidade (e não apenas uma suspeita de risco), quando, então, necessariamente as questões éticas acima referidas deverão ser enfrentadas.

## ANEXO

Listagem das indústrias que lançam efluentes nos rios Cedro e Benedito segundo a Secretariado Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Timbó-SC, em agosto de 1994.

Indústria	Atividade
Cebex Ind. Com. e Exportação Ltda.	Indústria madeireira
Laminadora Fronza Ltda.	Indústria madeireira
Arliz Ind. Com. de Artefatos de Madeira Ltda.	Indústria madeireira
Germer Industrial S.A.	Indústria madeireira
Ype Indústria de Madeiras Ltda.	Indústria madeireira
Walter Mueller S.A.	Indústria de matéria plástica
Walter Mueller S.A.	Fábrica de máquinas de lavar roupa
Indústria de Relógios Hermég S.A.	Fábrica de cronômetros, relógios e acessórios
Rudolph - Usinados de Precisão Ltda.	Fábrica de cronômetros, relógios e acessórios
Indústria de Artefatos de Metais Gutz Ltda.	Fábrica de artefatos de metais
Metisa Metalúrgica Timboense S.A.	Fundição de produtos metalúrgicos
Metalúrgica Schuetze Ltda. ME	Indústria metalúrgica
Industrial Acrilan Ltda.	Fábrica de fiação e tecelagem
Malharia Diana S.A.	Malharia e fábrica de tecidos elásticos
Malhas Wilson Ltda.	Malharia e fábrica de tecidos elásticos
Porcelanas Industriais Germer S.A.	Fábrica de porcelanas para eletricidade
Aldasi Ind. Com. Mat. Elétricos Ltda.	Fábrica de material elétrico
Eletromeca-Metalurgia Casa Grande Ltda.	Fábrica de material elétrico
Harka Ind. Com. Repres. Ltda.	Fábrica de material elétrico
IIIN do Brasil Ind. Com. Mat. Elétricos e Metalúrgicos	Fábrica de material elétrico
Metalva Indústria e Comércio Ltda.	Fábrica de material elétrico
Souza Cruz S.A.	Fábrica de preparação de fumo
Benecke Irmãos e Cia. Ltda.	Fábrica de equipamentos para indústria
Delka do Brasil Ind. Com. Máquinas e Equipamentos Ltda.	Fábrica de equipamentos para indústria
H. Benecke e Filhos Ltda.	Fábrica de equipamentos para atividades agrícolas e rurais
Odamar Produtos de Limpeza Ltda.	Fábrica de inseticidas e produtos de limpeza
Calçados Theilacker S.A. Ind. Com.	Fábrica de calçados
S.A. Fábrica de Papelão Timbó	Fábrica de papel
Frigorífico Timboense Ltda.	Frigorífico e abate de animais com derivados

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, N.; GROVER, I.S. Genotoxic Effects of Some Systemic Pesticides: In vivo Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells in Rats. *Environ. Mol. Mutagenesis*, v. 12, p. 235-242, 1988.
- ADLER, I-D. Cytogenetic Tests in Mammals. In: VENITT, S. e PARRY, J.M., eds. MUTAGENICITY TESTING. Oxford: IRL Press. 1984. p. 275-306.
- \_\_\_\_\_. Synopsis of the in vivo results obtained with the 10 known or suspected aneugens tested in the CEC collaborative study. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 131-137, 1993.
- AGOSTINI, J.M.S.; OTTO, P.A.; WAJNTAL, A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. *Rev. Brasil. Genet.*, v.19, n. 4, p. 641-646, 1996.
- ALAY, F.; CAMPOS, H.; GAVILÁN, J. et al. Monitoreo de Recursos Geneticos Acuaticos en la Octava Region del Biobio. *II Congresso Latinoamericano de Genetica y 3. de Mutagenesis, Carcinogenesis y Teratogenesis Ambiental*, p. 593, 1994. Resumo.
- ALBERTINI, R.J. Why Use Somatic Mutation for Human Biomonitoring ? *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 23, Suplemento v. 24, p.18-22, 1994.
- ASITA, A.O; HAYASHI, Y.; KODAMA, A. et al. Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice. *Mutat. Res.*, v. 271, p. 29-37, 1992.
- AWA, A.A. Chromosome damage in atomic bomb survivors and their offspring - Hiroshima and Nagasaki. IN: RADIATION-INDUCED CHROMOSOME DAMAGE IN MAN. New York: Alan R. Liss, 1983. p. 433-453.
- BARALE, R.; GIORGELLI, L.; MIGLIORE, R. et al Benzene induces micronuclei in circulating erythrocytes of chronically treated mice. *Mutat. res.*, v. 144, p. 193-196, 1985.

- BISHOP, J.B.; DELLARCO, V.L.; HASSOLD, T. et al. Aneuploidy in Germ Cells: Etiologies and Risk Factors. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 28, n. 3, p. 159-166, 1996.
- BRO-RASMUSSEN, F.; LOKKE, H. Ecoepidemiology - A Casuistic Discipline Describing Ecological Disturbances and Damages in Relation to Their Specific Causes: Exemplified by Chlorinated Phenols and Chlorophenoxy Acids. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, v. 4, p. 391-399, 1984.
- BUENO, A.M.S. Estudos Cromossômicos na Ordem Odonata. Rio Claro, 1982. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BUENO, A.M.S.; AGOSTINI, J.M.S.; GAIDZINSKI, K. et al. Frequencies of Chromosomal Aberrations in Rodents Collected in the Coal-Field and Tobacco Culture Region of Criciúma, South Brasil. *Journ. Toxicol. Environ. Health* v. 36, p. 91-102, 1992.
- CAIRNS JR., J. Estimating Hazard. *BioScience*. v. 30, n. 2, p. 101-107, 1980.
- CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese In Rabello-Gay, M.N., Rodrigues, M.A.L.R. e Monteleone-Neto, R., eds. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese Métodos e Critérios de Avaliação* São Paulo: Rev. Bras. Genet. 1991 . p.177-192.
- CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.*, v. 204, p. 379-406, 1988.
- CAUBET, C.G.; FRANK, B. **Manejo Ambiental em Bacia Hidrográfica: o caso do rio Benedito (Projeto Itajaí I). Das reflexões teóricas às necessidades concretas.** Florianópolis: Fundação Água Viva, 1993.
- COLBORN, T. Statement from the Work Session on Environmentally Induced Alterations in Development: A focus on Wildlife. *Environ. Health Perspect.* v. 103, Suplemento v. 4, p. 3-5, 1995.

- COLE, R.J.; TAYLOR, N.; COLE, J.; ARLETT, C.F. Short-Term Tests for Transplacentally Active Carcinogens I. Micronucleus Formation in Fetal and Maternal Mouse Erythroblasts. *Mutat. Res.*, v. 80, p. 141-157, 1981.
- CORDANI, U.G.; MARCOVITCH, J.; SALATI, E. Avaliação das Ações Brasileiras em Direção ao Desenvolvimento Sustentável após a Rio-92. In: \_\_\_\_\_. RIO 92 CINCO ANOS DEPOIS. São Paulo: Alphagraphics, 1997. p. ix-xix.
- CRISTALDI, M.; D'ARCANGELO, E.; IERADI, A. et al. <sup>137</sup> Cs Determination and Mutagenicity Tests in Wild *Mus musculus domesticus* before and after the Chernobyl Accident. *Environ. Pollut.*, v. 64, p. 1-9, 1990.
- CRISTALDI, M.; IERADI, L.A.; MASCANZONI, D.; MATTEI, T. Environmental impact of the Chernobyl accident: mutagenesis in bank voles from Sweden. *Int. J. Radiat. Biol.* v. 59, n. 1, p. 31-40, 1991.
- CSGMT (Colaborative Study Group for the Micronucleus Test) Protocol recommended by the CSGMT / JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*. v. 10, n. 3, p. 153-159, 1995.
- CUSTÓDIO, H.B. A. Legislação Brasileira do Estudo de Impacto Ambiental. IN: TAU, S.M. ANÁLISE AMBIENTAL: UMA VISÃO MULTIDISCIPLINAR. São Paulo: UNESP, 1991. p.37-59.
- DEAN, B.J.; DANFORD, N. Assays for the Detection of Chemically-Induced Chromosome Damage in Cultured Mammalian Cells. IN: VENITT, S.; PARRY, J.M. MUTAGENICITY TESTING. Oxford: IRL Press, 1984. p. 187-232.
- DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.*, v. 258, p. 285-320, 1991.
- DIETER, M.P. Identification and quantification of pollutants that have the potential to affect evolutionary processes. *Environ. Health Perspect.*, v. 101, p. 273, 1993.

- DOLARA, P.; TORRICELLI, F.; ANTONELLI, N. Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy. *Mutat. Res.*, v. 325, p. 47-51, 1994.
- FITZGERALD, P.H.; PICKERING, A.F.; MERCER, M. J.; MIETHKE, P. M. Premature centromere division: A mechanism of non disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man. *Ann. Hum. Genet.*, v. 38, p. 417-428, 1975
- FONSECA, G. A.B. A Proteção à Biodiversidade na Federação Brasileira Após a Rio-92 by P. Nogueira-Neto IN: RIO 92 CINCO ANOS DEPOIS. São Paulo: Alphagraphics, p. 173-178, 1997. Comentário.
- FORD, CE; HAMERTON, J.C. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technol.*, v. 31, p. 247-251, 1956.
- FOX, G.A. Tinkering with the Tinkerer: Pollution versus Evolution. *Environ. Health Perspect.*, v. 103, Suplemento v. 4, p. 93-100, 1995.
- GRAY, J.S. Effects of environmental stress on species rich assemblages. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 37, p. 19-32, 1989.
- GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 347, p. 97-99, 1995.
- HADNAGY, W.; SEEMAYER, N.H. *In Vitro* Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy by Particulate Pollutants. *Toxic. in Vitro*, v. 5, n. 5/6, p. 507-510, 1991.
- HAYASHI, M.; NORPPA, H.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JR., M. Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes. *Mutagenesis*, v. 7, n. 4, p. 257-264, 1992 .
- HAYASHI, M.; TICE, R.R.; MACGREGOR, J.T. et al. *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutat. Res.*, v. 312, p. 293-304, 1994.

- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* v. 123, p. 61-118, 1983.
- IERADI, L.A.; CRISTALDI, M.; MASCANZONI, D. et al. Genetic Damage in Urban Mice Exposed to Traffic Pollution. *Environ. Pollut.*, v. 92, n. 3, p. 323-328, 1996.
- IPCS ( International Programme on Chemical Safety) **Glyphosate** . Geneva: WHO, 1994.
- JONES, H.B.; ELDRIDGE, S.R.; BUTTERWORTH, B.E.; FOSTERS, J.R. Measure of Cell Replication in Risk/Safety Assesment of Xenobiotic-Induced, Nongenotoxic Carcinogenesis. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, v. 23, p. 117-127, 1996.
- KIMBAL, K.D.; LEVIN, S.A. Limitations of Laboratory Bioassays: The Need for Ecosystem-Level Testing. *Bioscience* v. 35, n. 3, p. 165- 171, 1985.
- KLIGERMAN, A.D; CHAPIN, R.E.; EREXSON, G.L. et al. Analyses of cytogenetic damage in rodents following exposure to simulated groundwater contaminated with pesticides and a fertilizer. *Mutat. Res.* v. 300, p. 125-134, 1993.
- LEBLANC, G.A. Assessing Deleterious Ecosystem-level Effects of Environmental Pollutants as a Means of Avoiding Evolutionary Consequences. *Environ. Health Perspect.*, v. 102, p. 266-267, 1994.
- LEOPARDI, P.; ZIJNO, A.; BASSANI, B.; PACCHIEROTTI, F. In vivo studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 119-130, 1993.
- MACEDO, R.K. Equívocos e Propostas para a Avaliação Ambiental. IN: TAUKE, S.M. ANÁLISE AMBIENTAL: UMA VISÃO MULTIDISCIPLINAR. São Paulo: UNESP, 1991. p. 27-36.
- MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved test. *Environ. Mutagen.*, v. 2, p. 509-514, 1980.

- NASMYTH, K. Viewpoint: Putting the Cell Cycle in Order. *Science*, v. 274, p. 1643-1645, 1996.
- NATARAJAN, A. T.; VYAS, R.C.; WIEGANT, J.; CURADO, M. P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutat. Res.*, v. 252, p. 157-160, 1991.
- NATARAJAN, A.T. An overview of the results of testing of known or suspected aneugens using mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 113-118, 1993.
- NATARAJAN, A.T.; OBE, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens? *Mutat. Res.*, v. 167, p. 189-201, 1986.
- ÖNFELT, A. Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mutat. Res.*, v. 168, p. 249-300, 1986.
- PARRY, J.M. Research on the Mechanisms of Action of Aneugenic Chemicals and Regulatory Approaches for Their Control in the European Communities. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 28, n. 3, p. 248-253, 1996.
- PARRY, J.M.; PARRY, E.M.; BOURNER, R. et al The detection and of aneugenic chemicals. *Mutat. Res.*, v. 353, p. 11-46, 1996.
- PARRY, J.M.; SORS, A. The detection and assessment of the aneugenic potential environmental chemical: The European Community Aneuploidy Project. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 3-15, 1993.
- PEREIRA, C.A.B. Teste Estatístico para Comparar Proporções em Citogenética. IN: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. MUTAGÊNESE, TERATOGENÊNESE E CARCINOGENÊNESE - MÉTODOS E CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO. São Paulo: Rev. Bras. Genet., 1991. p. 113-121.
- PERERA, F.P.; WHYATT, R.M. Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat. Res.*, v. 313, p. 117-129, 1994.

- MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; HENIKA, P.R.; SHELBY, M.D. The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.*, v. 14, p. 513-522, 1990.
- MARGOLIN, B.H. Statistical Aspects of Using Biologic Markers. *Statistical Science*. v. 3, n. 3, p. 351-357, 1988.
- MARINOVICH, M.; GHILARDI, F.; GALLI, C. L. Effect of pesticide mixtures on *in vitro* nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicol.*, v. 108, p. 201-206, 1996.
- MARQUES, C. Frecuencia de Micronúcleos e Índice Mitótico en Branquias de Mejillones *Mytilus californianus* Afectados por Petróleo. *II Congreso Latinoamericano de Genética y 3. de Mutagenesis, Carcinogenesis y Teratogenesis Ambiental*. p. 305, 1994. Resumen.
- MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, v. 239, p. 29-80, 1990.
- MCCLINTOCK, B. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* v. 226, p. 792-801, 1984.
- MITCHELL, I.; LAMBERT, T.R.; BURDEN, M. et al. Is polyploidy an important genotoxic lesion? *Mutagenesis*. v. 10, n. 2, p. 79- 83, 1995.
- MIYAZAKI, W.Y.; ORR-WEAVER, T.L. Sister-Chromatid Cohesion in Mitosis and Meiosis. *Annu. Rev. Genet.*, v. 28, p. 167-187, 1994.
- NAKANO, E.; RABELLO-GAY, M.N.; PEREIRA, C.A.B. Evaluation of the Genotoxic Potential of Flumethrin in Mouse Bone Marrow by Chromosomal Analysis and Micronucleus Test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, v. 16, p. 37-48, 1996.

- PIÑA-CALVA, A.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; FUENTES, M.V. et al. Increased Frequency of Chromosomal Aberrations in Railroad Car Painters. *Arch. Environ. Health*, v. 46, n. 6, p. 335-339, 1991.
- RABELLO, M.N.; BEÇAK, W.; ALMEIDA, W.F. et al. Cytogenetic Studies on Individuals Occupationally Exposed to DDT. *Mutat. Res.*, v. 28, p. 449-454, 1975.
- RABELLO-GAY, M.N. E ALMEIDA, T.M.B. Testes com células germinativas em mamíferos. IN: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. MUTAGÊNESE, TERATOGÊNESE E CARCINOGENESE MÉTODOS E CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO. São Paulo: Rev. Bras. Genet., 1991. p. 141-150.
- RAMALHO, A.T.; NASCIMENTO, A.C.H.; LITTLEFIELD, L.G. et al. Frequency of chromosomal aberration in a subject accidentally exposed to <sup>137</sup> Cs in the Goiania (Brazil) radiation accident: intercomparasion among four laboratories. *Mutat. Res.*, v. 252, p. 157-160, 1991.
- REBOUÇAS, A.C. Análise da Comissão Interministerial para o Desenvolvimento Sustentável como Agência Implementadora da Agenda 21. In: CORDANI, U.G.; MARCOVITCH, J.; SALATI, E. RIO 92 CINCO ANOS DEPOIS. São Paulo: Alphagraphics, 1997. p. 252-266.
- RIBEIRO, L.R. Teste do Micronúcleo em células esfoliadas. IN: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. MUTAGÊNESE, TERATOGÊNESE E CARCINOGENESE - MÉTODOS E CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO. São Paulo: Rev. Bras. Genet., 1991. p. 91-96.
- ROOT, M. Biological monitors of pollution. *BioScience*. v. 40, n. 2, p. 83-86, 1990.
- RUBES, J.; BORKOVEC, L.; HORÍNOVÁ, Z. et al. Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. *Mutat. Res.*, v. 283, p. 199-210, 1992.
- RUDD, N.L.; TESHIMA, I.E.; MARTIN, R.H. ET AL. A dominantly inherited cytogenetic anomaly: a possible cell division mutant. *Hum. Genet.*, v. 65, p. 117-121, 1983.

- SANDHU, S.S.; SERRES, F.J. *In Situ* Evaluation of Biological Hazards of Environmental Pollutants. *Mutat. Res.*, v. 216, p. 341-352, 1989.
- SAVAGE, J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, v. 12, p. 103-122, 1975.
- SBRANA, I.; DI SIBIO, A.; LOMI, A.; SCARCELLI, V. C-Mitosis and numerical chromosome aberration analyses in human lymphocytes: 10 known or suspected spindle poisons. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 57-70, 1993.
- SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat. Res.*, v. 104, p. 367-369, 1982.
- SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: implications for cytogenetic screening. *Mutat. Res.*, v. 127, p. 169-174, 1984.
- SCHMID, W. The Micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SCHULTE, P.A.; SWEENEY, M.H. Ethical Considerations, Confidentiality Issues, Rights of Human Subjects, and Uses of Monitoring Data in Research and Regulation. *Environ. Health Perspect.*, v. 103, Suplemento v. 3, p. 69-74, 1995.
- SEILER, J.P. The ecological impact of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, v. 97, p. 220-221, 1982.
- SEXTON, K.; CALLAHAN, M.A.; BRYAN, E.F. Estimating Exposure and Dose to Characterize Health Risks: The Role of Human Tissue Monitoring in Exposure Assessment. *Environ. Health Perspect.*, v. 103, Suplemento v. 3, p. 13-29, 1995.
- SKALISZ, R.O.; POLACK, S.W. **Agrotóxicos: sintomas e tratamento**. Curitiba, 1991.
- SULLIVAN, B.A.; SCHWARTZ, S.; WILLARD, H. F. Centromeres of Human Chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 28, p. 182-191, 1996.

- THERMAN, E. E SUSMAN, M. **Cromosomas Humanos Estructura, Comportamiento y Efectos** 3a. ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1996.
- TICE, R.R.; HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T. et al. Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat. Res.*, v. 312, p. 305-312, 1994.
- TOMATIS, L. Cell Proliferation and Carcinogenesis: A Brief History and Current View Based on an IARC Workshop Report. *Environ. Health Perspec.*, v. 101, Suplemento v.5, p. 149-152, 1993.
- TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assesment. *Mutat. Res.*, v. 365, p. 147-159, 1996
- VARELLA-GARCIA, M. Teste de trocas entre cromátides-irmãs. IN: RABELLO- GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. MUTAGÊNESE, TERATOGÊNESE E CARCINOGENÊNESE - MÉTODOS E CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO. São Paulo: Rev. Bras. Genet., 1991. p. 123-140.
- VARGAS, V., GUIDOBONO, R., HORN, R. et al. Avaliação Tóxica e Genotóxica na Área de Influência do Complexo Petroquímico do Sul. *Rev. Bras. Genet.*, v. 19, n. 3, p.182, 1996. Resumo.
- VASUDEV, V.; KRISHNAMURTHY, N.B. In vivo cytogenetic analyses of the carbamate pesticides Dithane M-45 and Baygon in mice. *Mutat. Res.*, v. 323, p. 133-135, 1994.
- VERBEK, M.M. Biomarkers of exposure versus parameters of external exposure; practical applications in estimating health risks. *Toxicology*, v. 101, p. 107-115, 1995.
- VIG, B.K.; ZINKOWSKI, R.P. Sequence of centromere separation: influence of pericentromeric heterochromatin (repetitive DNA) in *Mus*. *Genetica*, v. 67, p. 153-159. 1985.

- WARR, T.J.; PARRY, E.M.; PARRY, J.M. A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. *Mutat. Res.*, v. 287, p. 29-46, 1993.
- WILLIAMS, A. Ecogenetics, xenobiotic biochemistry and neurological disease. *J. Neurol.* v. 238, p. 187-190, 1991.
- WINTROBE, M.M.; LEE, G.R.; BOGGS, D.R. **Clinical Hematology** . 7. ed. London: H. Kimpton, 1976.
- WÜRLER, F.E.; KRAMERS, P.G.N. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis.*, v. 7, n. 5, p. 321-327, 1992.
- ZELESCO, P.A.; BARBIERI, I.; GRAVES, J.A.M. Use of a cell hybrid test system to demonstrate that benomyl induces aneuploidy and polyploidy. *Mutat. Res.*, v. 242, p. 329-335, 1990.
- ZIELHUIS, R.L. Biological monitoring *Scand. J. Work Environ. & Health.* v. 4, p. 1-18, 1978.