

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caracterização da biologia de populações de planárias do
gênero *Girardia* nativas do Rio Grande do Sul.

Tanise Knakievicz

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau do Doutor
em Ciências

Orientador: Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, 15 de junho de 2007.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

"A justificativa da ciência não está nas aplicações. Provavelmente haverá aplicações, mas o mecanismo intelectual da pesquisa, a motivação, não é a aplicação. A motivação é a compreensão".

(Oriol Bohigas)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Henrique, exemplo de profissional, pela oportunidade, confiança, dedicação, apoio, e direcionamento nos momentos em que precisei de auxílio durante a realização deste trabalho.

À minha Comissão de Acompanhamento, Dr. Augusto Shrank e Dra. Irene Shrank, pela dedicação e atenção dispensadas e pelas críticas e sugestões acrescentadas a este trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pelo suporte infra-estrutural.

A todos a professores do PPGBCM pela oportunidade de aprendizado.

À Rosane Fagundes, Renato Moreira Rosa e Isabel Vilella, pela gentil colaboração.

A todos os colegas dos laboratórios 204, 206 e 210 e às alunas de iniciação científicas Sabrina Moura Vieira, Angela Menegassi e Priscila Alves da Silveira.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Sílvia R. Centeno e ao Luciano Saucedo, pelo atendimento sempre amável e gentil.

Aos meus amigos Sergio Artur Luz Wagner, Rejane Gueno, Érica Hermel, Daniel Ruschel, Alexandre Chiele, especialmente a Graziela Beck Porto, amiga do coração de todas as horas, e ao Teonísio Ludke.

Aos amigos do CIEC-IIPC.

À minha família, José, Domercília, Telmo, Tanara, João Augusto, Laine e Bárbara, pelo amor incondicional que de tão intenso se fez sempre presente apesar da distância física continental.

Índice

<i>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades</i>	6
<i>Resumo</i>	7
<i>Abstract</i>	9
1. Introdução	10
0.1 Sistemática, habitat e nicho ecológico de <i>G. tigrina</i> e <i>G. schubarti</i>	10
0.2 Características anatômicas e fisiológicas gerais das planárias 12	
0.2.1 Reprodução e desenvolvimento.....	12
0.2.2 Regeneração	14
0.2.3 Neoblastos	15
0.3 Monitoramento Ambiental	17
0.3.1 Testes de toxicidade ambiental.....	18
0.3.2 O uso de planárias no monitoramento de impactos ambientais	19
1. Objetivos	20
2. Resultados	22
2.1 Capítulo I - Reproductive modes and life cycles of freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicula) from southern Brazil	22
2.2 Capítulo II - Planarian neoblast micronucleus assay for mutagenicity evaluation	23
2.3 Capítulo III - Evaluation of copper effects upon <i>G. tigrina</i> freshwater planarians based on a set of biomarkers	24
2.4 Capítulo IV - Avaliação da capacidade de regeneração e da longevidade de <i>G. tigrina</i> e <i>G. schubarti</i>	25
2.4.1 Introdução	26
2.4.2 Materiais e Métodos	26
2.4.3 Resultados	28
3. Discussão final	36
4. Conclusões	43
5. Perspectivas	46
6. Referências Bibliográficas	47
7. Anexos	56
7.1 Condições de cultivo, manutenção e teste	56

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Fc	Número de casulos/indivíduos/semana
Fr	Número de filhotes/indivíduos/semana
Fs	Número de fissiparidade/indivíduo/semana
CEM	Campo eletromagnético
C:E	Fotoperíodo claro:escuro de 12 h:12 h cada
C:C	Fotoperíodo sempre claro
E:E	Fotoperíodo sempre escuro
FC	Medida de intensidade luminosa em Food candle.
LC ₅₀	Concentração letal para metade dos organismos expostos
mIC ₅₀	Concentração de inibição de 50 da mobilidade
rIC ₅₀	Concentração de inibição de 50 da mobilidade
MN	Micronúcleo(s)
RNAi	RNA de interferência
BrdU	Bromodesoxiuridina - marcação de síntese de de DNA
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
miRNA	microRNA

Resumo

As planárias são organismos de escolha para a realização de uma ampla gama de estudos básicos, abrangendo desde aspectos ecotoxicológicos até abordagens de biologia celular e molecular. Isso se deve, especialmente, à capacidade extraordinária de regeneração destes organismos e à presença de células-tronco somáticas (neoblastos) no adulto. Portanto, a disponibilização de espécies e linhagens de planárias com características fisiológicas bem definidas é fundamental. As espécies *Girardia tigrina* e *Girardia schubarti*, nativas do Rio Grande do Sul, foram estudadas quando ao modo de reprodução, ciclo de vida, capacidade de regeneração e a suscetibilidade a agentes tóxicos e mutagênicos. Em ambas as espécies, o modo de reprodução correlaciona-se com a ploidia; indivíduos diplóides são geralmente sexuados e os indivíduos triplóides e mixoplóides são exclusivamente fissiparitários. Planárias fissiparitárias geram um número menor de descendentes e são mais longevos do que as sexuadas. A frequência de reprodução sexuada e a longevidade em ambas as espécies sofre influência das condições ambientais, mas alterações ambientais não levam a trocas entre os modos de reprodução sexual e assexual. *G. tigrina* e *G. schubarti* apresentam capacidades similares de regeneração e suscetibilidades a agentes clastogênicos. Assim, ambas as espécies permitem avaliações da toxicidade aguda e/ou crônica de amostras de interesse através de bioensaios de mortalidade/mobilidade, de regeneração, de micronúcleos e de reprodução. Tais ensaios foram padronizados para a avaliação dos efeitos da exposição de *G. tigrina* a soluções de sulfato de cobre. Portanto, este trabalho disponibilizou um sistema padronizado de bioensaios rápidos, sensíveis e baratos para biomonitoramento ambiental dos ecossistemas de água doce. Além disso, os resultados obtidos forneceram subsídios para estudos dos mecanismos de manutenção de neoblastos, os quais são diretamente responsáveis pela regeneração, pela homeostase dos tecidos e pela reprodução.

Abstract

Planarians are organisms of choice for realization of a wide series of basic studies including from this ecotoxicology aspects until cellular and molecular approach, especially due their regeneration extraordinary capacity and the presence of somatic stem cell in adult organisms. Thus, the availability of species and lineage with knowledge well physiological characters is fundamental. The native species from Rio Grande do Sul State, *Girardia tigrina* e *Girardia schubarti* were studied as how as reproductive modes, life cycle, regenerative capacity e toxicity, susceptibility to teratogenic and mutagenic agents. In both species, there was inter-relation between reproductive mode and ploidy. Diploid individuals were usually sexual (in *G. schubarti*, ~20 % from hatchlings were mixoploids) and triploid and mixoploid individuals were exclusively fissiparous. Fissiparous planarians produce smaller progeny, and were more long-life than sexual planarians (but mixoploid *G. schubarti* individuals died in temperatures as low as 6°C). In both species the reproduction sexual frequency and the longevity undergo influence of the environmental conditions, nevertheless did not observed switching of sexual and asexual reproduction modes. *G. tigrina* and *G. schubarti* species shown similar regeneration capacity and clastogenic agent susceptibility. Thus, both species consent assessment of acute and/or chronic toxicity of choice samples by lethality/mobility, regeneration, micronuclei, and reproduction, as proof for *G. tigrina* exposed in copper sulfate solutions. Hence, this work provided a rapid, sensitive and expensive standard bioassay system for environmental biomonitoring of freshwater ecosystems, based in native organisms from Rio Grande do Sul State. Besides, the obtained results provide foundation for future studies of the mechanisms of stem cells (neoblasts) maintenance, which were directly responsible by regeneration, by homeostasis of all tissue and by reproduction.



1. Introdução

1.1 Sistemática, habitat e nicho ecológico de *G. tigrina* e *G. schubarti*

O filo Platyhelminthes apresenta uma grande diversidade de organismos, que gradualmente fazem uma transição evolutiva entre organismos de vida livre a parasitos. Ele é, portanto, é um dos mais instrutivos em biologia funcional e evolutiva (RUPPERT *et al.*, 2005). Este filo inclui vermes chatos tanto de vida livre (Classe Turbellaria), ectoparasitas (Classes Temnocephalidae) e parasitas (Classes Trematoda e Cestoda).

O nome planárias é genericamente aplicado aos membros da classe Turbellaria, que são predominantemente aquáticos, havendo poucos terrestres (SLUYS, 1989). As planárias de água doce (infraordem Paludicola) são habitantes de bentos de lagos, poças, riachos e nascentes.

As planárias paludícolas que ocorrem na América do Sul pertencem à família Dugesidae e ao gênero *Girardia* (VRIES & SLUYS, 1991). As espécies de planárias que já foram coletadas no Rio Grande do Sul são *Girardia (Cura) schubarti* (Marcus, 1946), *Girardia tigrina* (Girard, 1850), *Girardia anderlani* (Kawakatsu *et al.*, 1983), *Girardia uroriograndeana* (Kawakatsu *et al.*, 1992), *Girardia arndti* (Marcus, 1946) e *Girardia biapertura* (SLUYS *et al.*, 1997). As duas primeiras espécies, objetos de estudo desta tese, são as relativamente mais abundantes e conhecidas.

As espécies *G. tigrina* e *G. schubarti* são organismos livre-nadantes e habitantes de ecossistemas paludícolas lênticos (lagos e lagoas) e lóticos (nascentes de rios e riachos), respectivamente (KNAKIEVICZ *et al.*, 2007). Assim, as espécies de planárias possuem microhabitats específicos, o que pode levar a diferenças em sua distribuição geográfica, como pode ser observado para a distribuição de *G. tigrina* e *G. schubarti* no Rio Grande do Sul (ver Figura 1).

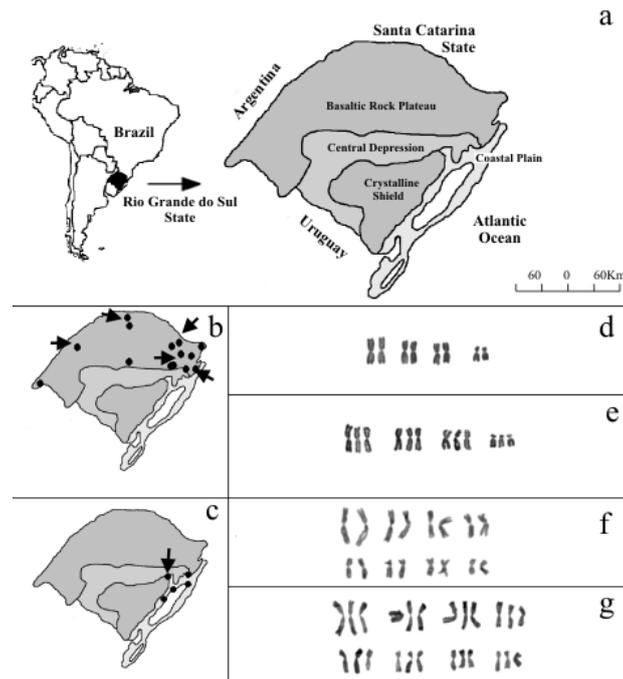


Figura 1. Distribuição geográfica e cariótipos de planárias paludícolas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os pontos e setas indicam onde planárias diplóides e poliplóides (triplóides ou mixoplóides) foram encontradas, respectivamente. (a) Regiões morfogeológicas do Rio Grande do Sul (mapa adaptado de Ramgrab *et al.*, 2000). Ocorrência de planárias da espécie *G. schubarti* (b) e *G. tigrina* (c). Cariótipos 2n e 3n da espécie *G. schubarti* (d,e); da espécie *G. tigrina* (f,g)(modificado de KNAKIEVICZ *et al.*, 2007).

Planárias são organismos de ciclo de vida simples, os quais sobrem influencias das condições de alimentação, do tamanho populacional (KOSTELECKY *et al.*, 1989), das estações do ano (GAMO & NOREÑA-JANSSEM, 1998) e da assimilação de poluentes (INDEHERBERG *et al.*, 1999). As planárias são predadores de pequenos invertebrados e larvas de insetos, detritívoros e servem de alimento a invertebrados e vertebrados predadores, portanto ocupam diversos níveis da teia alimentar. Devido a essas características, planárias são bons candidatos como organismo-teste nativo alternativo para o uso no monitoramento da poluição aquática.

1.2 Características anatômicas e fisiológicas gerais das planárias

Planárias são animais pequenos, achatados dorso-ventralmente, bilateralmente simétricos e acelomados, que têm o corpo coberto por uma

epiderme unilaminar, ciliada e glandular (RUPPERT *et al.*, 2005). Não apresentam sistema circulatório, mas possuem protonefrídios para a secreção e musculatura bem desenvolvida. O sistema nervoso central (SNC) é composto por um cérebro bilobular na região anterior do animal e por dois cordões ventrais longitudinais (AGATA, *et al.*, 1998), com várias funções e domínios estruturais definidos molecularmente (MINETA *et al.*, 2003, CEBRIÀ *et al.*, 2002) que correspondem aos fotoreceptores (ocelos), estatocistos (receptores de gravidade) e quimiorreceptores (aurículas, usadas na localização de alimentos e de cônjuges). O cérebro participa do controle da reprodução sexuada (FAIRWEATHER & SKUCE, 1995), da reprodução assexuada (MORITA & BEST, 1984) e da regeneração (MARTELLY & FRANQUINET, 1984).

Nas planárias, a cavidade digestiva é geralmente de fundo cego, sendo a boca, equipada com uma faringe protraível, usada tanto para ingestão quanto para egestão (RUPPERT *et al.*, 2005). Estes organismos são principalmente carnívoros e predam invertebrados (protozoários, rotíferos, larvas de insetos, crustáceos, lesmas e anelídeos). Enzimas proteolíticas auxiliam na perfuração do corpo da presa e o conteúdo parcialmente digerido e liquefeito é bombeado para o interior do trato digestivo pela peristalse faríngea. As planárias liberam o excesso de água e, provavelmente, outros resíduos metabólicos usando os protonefrídios, que estão espalhados por todo o corpo.

1.2.1 Reprodução e desenvolvimento

Muitas espécies de planárias consistem de raças distintas, cuja definição está tipicamente associada ao nível de ploidia e ao modo de reprodução (D'SOUZA *et al.*, 2004). Por exemplo, a espécie *G. tigrina* consiste de indivíduos diplóides ($2n = 16$) e triplóides ($3n = 24$), enquanto *G. schubarti* pode consistir de indivíduos simpátricos diplóides ($2n = 8$), triplóides ($3n = 12$) e mixoplóides ($2n = 8$ e $3n = 12$) (ver Figura 1). Geralmente, indivíduos diplóides são sexuais e os poliplóides (triplóides e mixoplóides) são assexuais (STORHAS *et al.*, 2000).

Quando sexuais, as planárias são hermafroditas e reproduzem-se por cópula simultânea e fecundação interna (RUPPERT *et al.*, 2005). Companheiros

de cópula trocam quantidades similares de esperma e este fato pode ajudar a explicar o estabelecimento e manutenção do hermafroditismo, pois machos ou fêmeas puras poderiam ser desvantajosos ou deficientes em uma população onde os acasalamentos dependem da reciprocidade (VREYS & MICHIELS, 1998). O desenvolvimento dos ovos fecundados é direto e estes ovos, juntamente com gotículas de vitelo, são envolvidos por uma cápsula (RUPPERT *et al.*, 2005). Por serem animais pequenos, produzem poucos casulos (cápsulas de ovos), que contêm também poucos filhotes (de 3 a 15) e são cuidadosamente fixados em rochas. Há uma correlação positiva entre o tamanho dos casulos e o número de filhotes, mas a correlação é negativa entre o número e o tamanho dos filhotes em uma mesma cápsula (PREZA, 1995).

Quando assexuadas, as planárias podem ser partenogênicas ou fissiparitárias (RUPPERT *et al.*, 2005). Indivíduos partenogênicos geram filhotes a partir de óvulos não fecundados, no entanto, são dependentes da cópula pois os óvulos partenogênicos necessitam dos espermatozoides para a indução do desenvolvimento embrionário (D'SOUZA *et al.*, 2004). Planárias fissiparitárias, em geral, dividem-se em duas partes e então regeneram as partes faltantes após a separação, em um processo conhecido como arquitomia. O plano de fissão, com frequência, se forma atrás da faringe e a separação parece depender da locomoção: a extremidade posterior do verme prende-se ao substrato, ao passo que a metade anterior continua a se mover para a frente, até que as regiões se separem. São conhecidos muitos fatores que controlam a frequência de fissão, incluindo a temperatura da água, as condições de alimentação e o ritmo circadiano (HORI & KISHIDA, 1998; ITOH *et al.*, 1999). Nos metazoos, a correlação entre a ocorrência de fissiparidade e de regeneração pode sugerir que esses processos surgiram juntos, ou seja, a regeneração poderia ser uma co-opção dos mecanismos de fissiparidade (SÁNCHEZ ALVARADO, 2000).

1.2.2 Regeneração

A regeneração é um dos mais fascinantes e interessantes problemas da biologia, pois está correlacionada com o desenvolvimento, isto é, aos processos de proliferação celular, morfogênese e organogênese (SÁNCHEZ ALVARADO,

2000). Quase todos os filos possuem uma ou várias espécies capazes de regenerar. A ampla variedade e as distâncias evolutivas que existem entre os animais capazes de realizar a regeneração de partes perdidas do corpo e, em alguns casos, de regenerar todo o organismo a partir de distintas partes de seu corpo, são realmente surpreendentes.

As estratégias utilizadas por cada animal para a regeneração são questões de grande interesse da pesquisa contemporânea. A regeneração nos Metazoa pode ser classificada em morfálaxia e epimorfose. No primeiro caso, a diferenciação de novas estruturas no regenerante surgem na ausência de proliferação celular, como, por exemplo, em hidras (HOLSTEIN *et al.*, 1991). No segundo caso, há exigência de proliferação celular. A regeneração epimórfica está dividida em duas categorias: a regeneração não-baseada no blastema (regeneração de anfíbios e do fígado e ossos humanos) e a regeneração baseada no blastema (regeneração de planárias) (SÁNCHEZ ALVARADO, 2000).

A regeneração blastemal envolve a formação de uma estrutura especializada, conhecida como blastema de regeneração, pela interação dorso-ventral de tecidos durante o fechamento da ferida por contrações musculares (KATO *et al.*, 1999). Esta estrutura é similar em forma e organização aos brotos embriológicos dos membros durante a embriogênese de invertebrados e vertebrados (SÁNCHEZ ALVARADO, 2000). Dependendo do organismo, o blastema de regeneração pode formar-se horas após a amputação ou ferimento. As partes perdidas são regeneradas a partir da diferenciação do blastema, como ocorre em planárias, moluscos, equinodermos e urocordatos e na regeneração de membros ou caudas de vertebrados. Essa similaridade observada entre blastemas de diversos metazoários pode ser explicada pela origem ancestral comum dos processos de regeneração.

As planárias apresentam capacidade de regeneração sem paralelo, exibindo uma plasticidade excepcional no desenvolvimento, que permite que se regenerem completamente quando cortadas transversal ou longitudinalmente ou em pequenos fragmento, que podem ter apenas 1/279 do tamanho de seu corpo (MORGAN, 1898). Quando uma planária é cortada, a região do corte é

rapidamente fechada por contrações musculares (SCHÜMANN & PETER, 1998). Como consequência, a parte dorsal adere-se a parte ventral induzindo a expressão de genes específicos que sinalizam a formação do blastema (epimorfose) (INOUE *et al.*, 2004). No blastema não ocorrem divisões celulares, somente migração da progênie dos neoblastos do mesênquima (REDDIEN *et al.*, 2005). No blastema, então, estas células diferenciam-se em células específicas utilizando-se das informações posicionais relativas do fragmento de origem (REDDIEN & SÁNCHEZ ALVARADO, 2004). As estruturas interpoladas formadas na região blastema/toco também coordenam a produção de sinais moleculares para o rearranjo dos padrões do corpo (morfalaxia) através da repadronização da expressão dos genes Hox ao longo do eixo dorso-ventral e do eixo antero-posterior no novo organismo (INOUE *et al.*, 2004). Além do fechamento da ferida, a participação ativa do sistema nervoso é importante para a formação bem sucedida do blastema (AGATA, 2002).

Recentemente, a investigação dos processos moleculares de diferenciação em planárias tem sido intensificada (ver, por exemplo, GONZALEZ-ESTEVEZ *et al.*, 2003; REDDIEN *et al.*, 2005a; GUO, 2006), mas há ainda muitas questões não esclarecidas.

1.2.3 Neoblastos

Uma característica fundamental das planárias é a presença de uma população relativamente grande (20 a 30% do número total de células) de células-tronco conhecidas como neoblastos (BAGUÑÀ *et al.*, 1989). Os neoblastos são células pequenas e indiferenciadas, com pouco citoplasma e núcleo proeminente (HORI & KISHIDA, 1998; SCHUMANN & PETER, 2001). A importância dos neoblastos na biologia dos turbelários é amplamente reconhecida. Eles são responsáveis pelo restabelecimento de todos os tipos celulares durante o desenvolvimento e, nos adultos, são as únicas células mitoticamente ativas, originando todos os tipos de células diferenciadas durante a reposição celular e a regeneração (GSCHWENTNER *et al.*, 2001; REDDIEN *et al.*, 2004), incluindo a

linhagem germinativa (SATO *et al.*, 2006).

No adulto, os neoblastos parecem estar dividindo-se regularmente e não permanecem quiescentes por mais de três dias (SÁNCHEZ ALVARADO, 2000). Entretanto, após alimentação ou corte, há um rápido aumento na atividade mitótica dos neoblastos (BAGUÑÁ, 1974). Apesar do estado dinâmico da renovação celular de todos os tecidos, os neoblastos localizam-se exclusivamente no mesênquima, um compartimento bem definido espacialmente (SALVETTI *et al.*, 2000), e migram após proliferação para outras regiões (por exemplo, a região anterior aos fotorreceptores, originalmente sem neoblastos), onde se diferenciaram para substituir células mortas (SÁNCHEZ ALVARADO, 2000; REDDIEN *et al.*, 2005b). Durante a regeneração, a proliferação celular está restrita ao compartimento mesenquimal, ocorrendo no blastema somente diferenciação celular (SALVETTI *et al.*, 2000).

Essas características contrastam diretamente com a falta de flexibilidade dos tecidos de *Caenorhabditis elegans* e de *Drosophila melanogaster*, organismos-modelo para estudos de desenvolvimento, que carecem de células-tronco somáticas. Assim, as planárias oferecem uma excelente oportunidade para estudo tanto da biologia do desenvolvimento quanto, mais especificamente, das células-tronco somáticas (SÁNCHEZ ALVARADO & KANG, 2005). O estudo de células-tronco de planárias pode também servir como um modelo para as investigações sobre células-tronco de organismos mais complexos, incluindo seres humanos. Além disso, estudos genômicos em planárias podem contribuir para a biomedicina, dado a dificuldade de manipulação experimental dos platielmintos parasitas, através da identificação de genes específicos deste grupo e assim colaborar na identificação de moléculas candidatas a interação terapêutica (SANCHEZ ALVARADO *et al.*, 2002).

1.3 Monitoramento Ambiental

O impacto ambiental pode ser definido como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas ou biológicas do meio ambiente resultante de atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetem a saúde, a segurança e

o bem-estar das populações humanas; das atividades sociais e econômicas; da biota; das condições estéticas e sanitárias do ambiente e da qualidade dos recursos ambientais (Resolução do CONAMA n.º 01 de 23/01/86). A avaliação preliminar de riscos ecológicos é realizada através do monitoramento ambiental preventivo dos ecossistemas em risco. Em função da grande diversidade de impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos, o controle ambiental de riscos ecológicos deve envolver uma abordagem integrada, através do monitoramento da qualidade física, química e biológica da água, bem como a avaliação da qualidade estrutural de habitats (GOULART & CALLISTO, 2003). Para atender a essa demanda, o uso de organismos bioindicadores é recomendada. Bioindicador é todo e qualquer organismo, ou um conjunto de organismos, que permitem caracterizar o estado de um ecossistema e evidenciar tão precocemente quanto possível as modificações naturais ou provocadas neste (NASCIMENTO, *et al.*, 2006).

Nos ambientes aquáticos, vertebrados e invertebrados são diretamente expostos aos poluentes (VARGAS *et al.*, 2001). Portanto, para o biomonitoramento destes ambientes, recomenda-se a utilização de espécies nativas, em um número mínimo de três: um representante dos produtores; um representante dos consumidores primários e/ou secundário; e um representante dos consumidores secundários e/ou terciários (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). O estudo ecológico de invertebrados bentônicos nativos como bioindicadores de qualidade de água, é amplamente utilizado na Austrália, nos Estados Unidos, no Canadá e em diversos países da Europa. No entanto, a utilização destes organismos em estudos de impacto ambiental ainda é incipiente no Brasil (menos de 20 anos).

1.3.1 Testes de toxicidade ambiental

Os ensaios de toxicidade desenvolvidos em laboratórios são úteis e necessários para a caracterização de amostras ambientais, embora diversos fatores possam afetar os resultados. Por exemplo, pode haver divergências relacionadas aos procedimentos experimentais, aos organismos-teste utilizados ou a fatores ambientais. Assim, a utilização de métodos padronizados é

recomendada para minimizar as variabilidades, melhorar a precisão e a reprodutibilidade dos testes e permitir que os resultados gerados em diferentes laboratórios possam ser comparados entre si (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Além disso, a escolha dos organismos e a interpretação dos resultados devem ser feitas criteriosamente. Por exemplo, os resultados de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos não podem ser extrapolados para organismos de lodo, de solo ou para organismos marinhos. Diversos ensaios de toxicidade já foram desenvolvidos e padronizados, pois é necessária a disponibilização de uma grande variedade de teste para que sejam atendidas as demandas específicas de cada ambiente a ser monitorado. (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2006).

1.3.2 O uso de planárias no monitoramento de impactos ambientais

As planárias são amplamente distribuídas em nascentes de rios, riachos, lagos e lagoas (KNAKIEVICZ *et al.*, 2007), biomas extremamente vulneráveis à degradação antrópica (SALA *et al.*, 2000), as quais são sensíveis tanto a poluição orgânica (BEST & MORITA, 1991) quanto as modificações estruturais dos ambientes (GAMO & NOREÑA-JANSSEM, 1998). Elas têm sido usadas como organismos-testes para detecção de poluição ambiental desde 1940 (ERICHSEN JONES, 1940), e já foi demonstrado em diversas espécies de planárias de diferentes partes do mundo que são organismos sensíveis a inúmeros poluentes ambientais, apresentando potencial para a detecção dos efeitos associados à exposição a agentes tóxicos, teratogênicos e genotóxicos (BEST, & MORITA, 1991; CALEVRO *et al.*, 1998, 1999; PRÁ *et al.*, 2005). Assim, dentre os invertebrados bentônicos aquáticos, as planárias permitem a avaliação do efeito dos poluentes através da análise de diferentes bioensaios, os quais detectam efeito em distintos níveis da organização biológica, tais como molecular, celular, morfológico e fisiológico ou compartamental (BEST & MORITA, 1991, CALEVRO *et al.*, 1998, 1999, GUECHEVA *et al.*, 2001), permitindo a obtenção de informações complementares partir de diferentes biomarcadores sobre a toxicidade das amostras avaliadas.

Desta forma, as informações acima sugerem que as planárias são organismos promissores para o uso tanto como organismos-teste quanto como

organismos bioindicadores da qualidade dos ambientes aquáticos. Assim, planárias potencialmente podem ser úteis na ecotoxicologia, a qual busca integrar o monitoramento da toxicidade de poluentes e com a conservação visando garantir a manutenção integral da saúde dos ecossistemas.



2. Objetivos

O filo Platyhelminthes apresenta uma composição filogenética bastante interessante para estudos de evolução comparada, entre outros, mas ainda carece de espécies-modelo melhor caracterizadas que viabilizem o estudo do desenvolvimento. Planárias surgem como os platelmintos de vida livre de escolha para a realização de uma ampla gama de estudos básicos, abrangendo desde aspectos ecológicos até abordagens de biologia celular e molecular. Estes organismos são particularmente atrativos para a pesquisa científica, pois apresentam grande capacidade de regeneração, a qual envolve processos similares às observadas na embriogênese de vertebrados, tais como proliferação, diferenciação e migração celulares, morfogênese e organogênese. Além disso, devido a sua sensibilidade a poluentes ambientais, presta-se muito bem a estudos ecotoxicológicos. Contudo, para a utilização destes organismos como sistemas-modelo tanto para estudos básicos de desenvolvimento como estudos aplicados de ecotoxicologia, há necessidade da disponibilização de espécies e linhagens com prévia caracterização fisiológica.

O uso de planárias em ecotoxicologia, como organismos bioindicadores, demanda conhecimentos prévios sobre o seu comportamento na natureza e no laboratório (STOHLER *et al.*, 2004), bem como a identificação de marcadores de resposta biológica, i.e. biomarcadores, que demonstram desvios da normalidade frente a poluentes ambientais ou compostos específicos (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Uma vez identificados, os biomarcadores podem ser ferramentas úteis para a caracterização de fenótipos, etapa fundamental para a seleção de indivíduos e populações com diferentes características fisiológicas e para o estabelecimento de linhagens bem caracterizadas para estudos mais refinados, em nível celular e/ou molecular, por exemplo. O estabelecimento de linhagens de planárias também pode contribuir para o aprimoramento de testes

ecotoxicológicos, uma vez que tais linhagens são candidatas promissoras para o biomonitoramento da poluição ambiental.

Considerando os aspectos mencionados acima, o presente trabalho teve por objetivo principal caracterizar populações nativas de planárias *G. tigrina* e *G. schubarti* do Rio Grande do Sul, cultivadas em laboratório e padronizar com elas alguns testes de ecotoxicológicos para detecção de poluentes aquáticos.

O estudo foi subdividido em duas áreas, correspondendo a primeira delas aos resultados descritos nos Capítulos I e IV e a segunda correspondendo aos resultados descritos nos Capítulos II e III. Os objetivos específicos de cada área do estudo estão listados abaixo:

1 – Caracterização de ciclos de vida, modos de reprodução e de processos de regeneração (Capítulo I e IV)

- Caracterizar o modo de reprodução de *G. tigrina* e *G. schubarti*, verificando as influências da ploidia, da densidade populacional, de alterações físico-químicas da água de cultivo e da alimentação.
- Avaliar a capacidade regenerativa de *G. tigrina* e *G. schubarti* em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes condições ambientais.
- Avaliar a longevidade das populações de *G. tigrina* diplóide (sexuada) e de *G. schubarti*.mixoplóide (assexuada).

2 – Caracterizar a suscetibilidade de *G. tigrina* e *G. schubarti* a agentes tóxicos (Capítulos II e III).

- Identificar biomarcadores para exposições agudas ou crônicas a compostos tóxicos, teratogênicos e/ou mutagênicos.
- Padronizar e validar o ensaio de micronúcleos em neoblastos de *G. tigrina* diplóide e *G. schubarti* mixoplóide
- Padronizar bioensaios para a avaliação dos efeitos de toxicidade aguda de poluentes aquáticos em diferentes níveis da organização biológica (molecular, celular e sistêmico) de *G. tigrina*.



3. Resultados

3.1 Capítulo I - Reproductive modes and life cycles of freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicula) from southern Brazil

Tanise Knakievicz, Sabrina Moura Vieira, Bernardo Erdtmann, Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Artigo publicado em *Invertebrate Biology* 125: 212-221, 2006.



3.2 *Capítulo II* - Planarian neoblast micronucleus assay for mutagenicity evaluation

Tanise Knakievicz, Priscila Alves da Silveira & Henrique Bunselmeyer Ferreira.

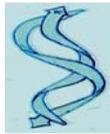
Manuscrito submetido à revista *Mutation Research*



3.3 Capítulo III - Evaluation of copper effects upon *G. tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers

Tanise Knakievicz & Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Manuscrito submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*



3.4 Capítulo IV - Avaliação da capacidade de regeneração e da longevidade de *G. tigrina* e *G. schubarti*

3.4.1 Introdução

Planárias são organismos únicos no reino animal quanto a presença de uma população especial de células totipotentes, os neoblastos (REDDIEN & SÁNCHEZ ALVARADO, 2004). A importância dos neoblastos na biologia dos turbelários é amplamente reconhecida. Eles são responsáveis pelo restabelecimento de todos os tipos celulares durante desenvolvimento, crescimento, regeneração e reposição de células mortas. Para o estudo dos mecanismos moleculares da manutenção dos neoblastos das planárias, é pré-requisito conhecer a longevidade das planárias e as alterações na capacidade regenerativa e reprodutiva decorrentes do aumento da idade. A capacidade regenerativa e capacidade reprodutiva são dois parâmetros indiretos que permitem avaliar a homeostase dos neoblastos ao longo da vida das planárias.

Para atingir os objetivos, este trabalho foi subdividido em duas etapas:

- 1^a Verificar a capacidade de regeneração de indivíduos juvenis e adultos das espécies *G. tigrina* (GtPop1, linhagem sexuada) e *G. schubarti* (GsPop1, linhagem sexuada e GsPop2 e GsPop3, linhagens assexuadas) através da quantificação do tempo regeneração da cabeça em indivíduos previamente decapitados.
- 2^a Acompanhar o ciclo de vida da população *G. tigrina* sexuada (GtPop1) e das populações *G. schubarti* assexuadas (GsPop2 e GsPop3) para verificar o efeito da longevidade sobre a reprodução sexuada através dos índices de fertilidade e fecundidade e sobre a reprodução assexuada através dos índices de fissiparidade, respectivamente.

3.4.2 Materiais e Métodos

3.4.2.1 Planárias

As espécies e populações de planárias estudadas foram *G. tigrina*, diplóide adulta (GtPop1, com idade de de 3 a 4 meses e com 10 - 13 mm de comprimento); *G. schubarti*, em diplóides jovem (GsPop1, com idade de 3 a 4

meses e com ~ 8 - 10 mm de comprimento), em diplóides adultos (com idade superior a 18 meses e com 20 - 30 mm de comprimento) e em mixoplóides (população fissiparitária) (GsPop2 e GsPop3, com idade indeterminada e com ~ 15 mm de comprimento).

3.4.2.2 Avaliação da capacidade regenerativa das planárias *G. tigrina* e *G. schubarti*.

A capacidade de regeneração de *G. tigrina* (diplóides) e *G. schubarti* (diplóides e mixoplóides) foi avaliada através da determinação do tempo necessário para o surgimento das aurículas e ocelos após decapitação, como descrito no Capítulo I e através da mobilidade das planárias durante o processo de regeneração, como descrito no Capítulo III. Durante os experimentos, as planárias regenerantes eram mantidas em condições padrões de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (C:E, 12h:12h) e luminosidade (35 FC), ou em condições modificadas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), de luminosidade (0; 0,1; 8; 40,5 e 46,2 FC) de fotoperíodo, (claro constante, C:C, e escuro:escuro, E:E) ou na presença de campo eletromagnético (CEM) fraco (834 MHz, 32-54 V/m) por 8 h/dia durante a período de regeneração.

3.4.2.3 Avaliação da ciclo de vida das planárias *G. tigrina*.

A sobrevivência, a fertilidade e a fecundidade de populações de *G. tigrina* diplóides foram analisadas como descrito no Capítulo I, para avaliação do efeito da densidade populacional, da quantidade de sais na água de cultivo e da longevidade. Para verificar o efeito da densidade populacional sobre a reprodução, populações com 20 a 60 indivíduos $\cdot\text{L}^{-1}$ foram monitoradas por 14 semanas. Para verificar o efeito da quantidade de sais na água sobre a reprodução e a longevidade, populações com inicialmente 60 indivíduos $\cdot\text{L}^{-1}$ foram monitoradas por ~189 semanas em água com concentração padrão, com redução de 50% e com acréscimo de 3x na quantidade de sais.

3.4.2.4 Análises estatísticas.

Os procedimentos estatísticos utilizados estão descritos nos Capítulos I e

III, secção *Material and Methodos* – 2.5 *Mobility assay* e 2.6 *Regeneration assay*.

3.4.3 Resultados

3.4.3.1 Avaliação da capacidade regenerativa de planárias *G. tigrina* e *G. schubarti*.

Em condições padrões, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo C:E (12h:12h) e luminosidade de 35 FC, para planárias diplóides e adultas da espécie *G. tigrina* planárias adultas foi observado que o surgimento de ocelos e aurículas no 3º ou no 4º dia após a decapitação (Capítulo III, Table 4), assim como para planárias jovens diplóides e as mixoplóides da espécie *G. schubarti* (Figura 2E,D e 3E,D). No entanto, para planárias diplóides e adultas da espécies *G. schubarti* foi requerido o dobro do tempo para a surgimento destas estruturas (ver Capítulo I). Portanto para a espécie *G. schubarti*, os jovens diplóides e os mixoplóides têm similar capacidade de regeneração e regeneram mais rápido do que os adultos diplóides.

No entanto, alterações no tempo de regeneração podem ser introduzidas por alterações das condições ambientais. O efeito da luminosidade de 0 a 46,2FC sobre o tempo de regeneração da cabeça de planárias *G. tigrina* diplóides adultas decapitadas foi avaliado. Não houve diferenças significativas no tempo de regeneração nas luminosidades testadas (0,1 a 46,2). No entanto, luminosidade constante (C:C) de 35 FC acelerou o tempo de regeneração (Figura 4A), enquanto que a ausência total de luz (0 FC) retardou a regeneração em mais de 4 dias. As alterações na regeneração causadas pela presença CEM foram similares em *G. tigrina* e *G. schubarti* (Figura 4B). O aumento na temperatura levou a uma redução no tempo de regeneração em *G. tigrina* (2n) (Figuras 4C e 4D) em *G. schubarti* (2n/3n) (dados não-mostrados).

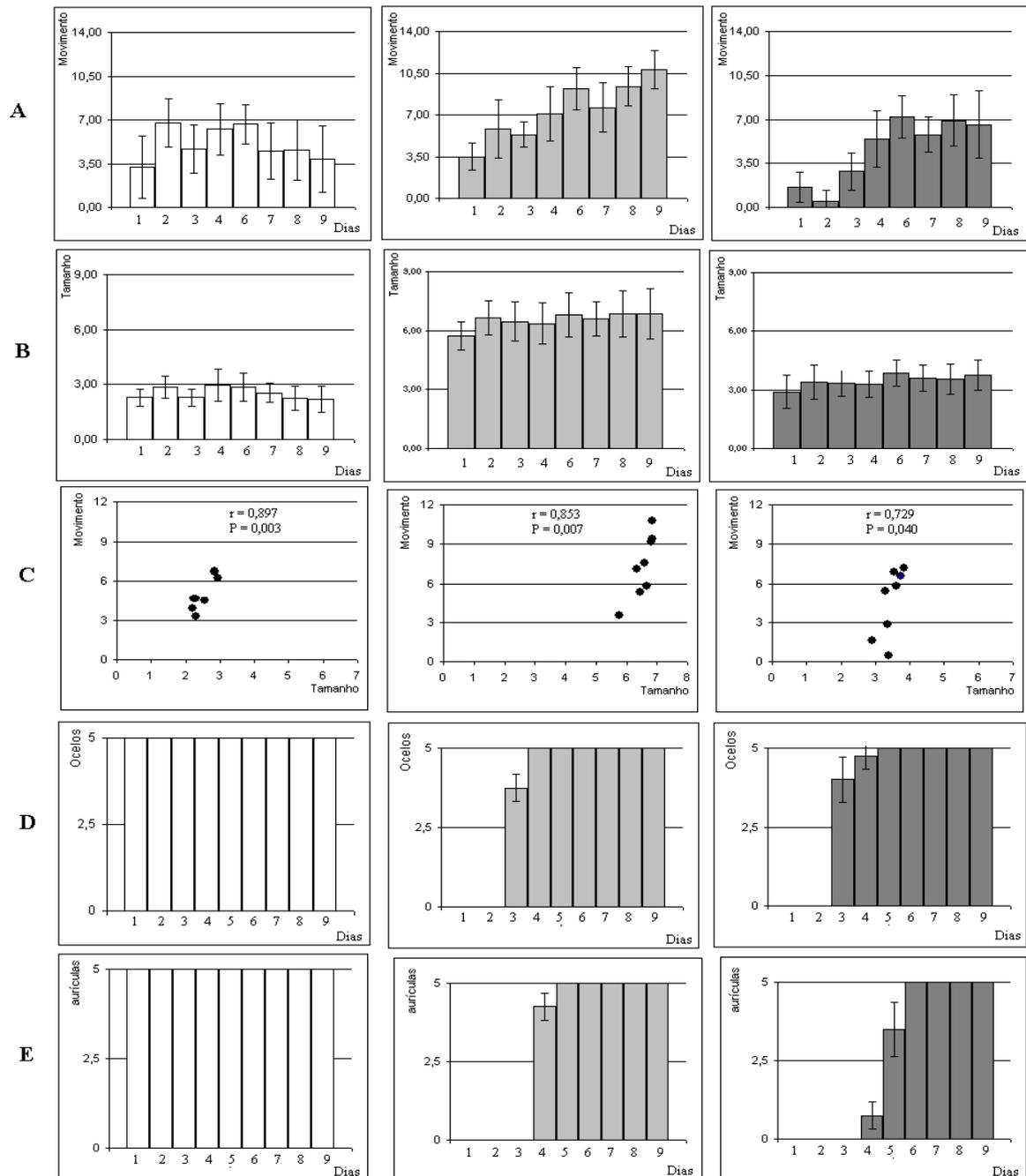


Figura 2. Análise de diferentes parâmetros para acompanhamento do processo regeneração de *G. schubarti* 2n jovem (2 - 3 meses de idade). Os gráficos da coluna da esquerda corresponde aos fragmentos da cabeça, os da coluna central corresponde aos fragmentos do meio do corpo e os da direita correspondem aos fragmentos da cauda. Parâmetros analisados: **A)** movimento dos regenerantes (número de linhas cruzadas por unidade de tempo); **B)** Tamanho dos regenerantes (cm); **C)** Correlação de Pearson entre mobilidade e o tamanho dos regenerantes. **D)** Tempo necessário (dias) para surgimento (detectado visualmente, em lupa) dos primeiros rudimentos dos ocelos; **E)** Tempo necessário (dias) para surgimento (detectado visualmente, em lupa) dos primeiros rudimentos das aurículas.

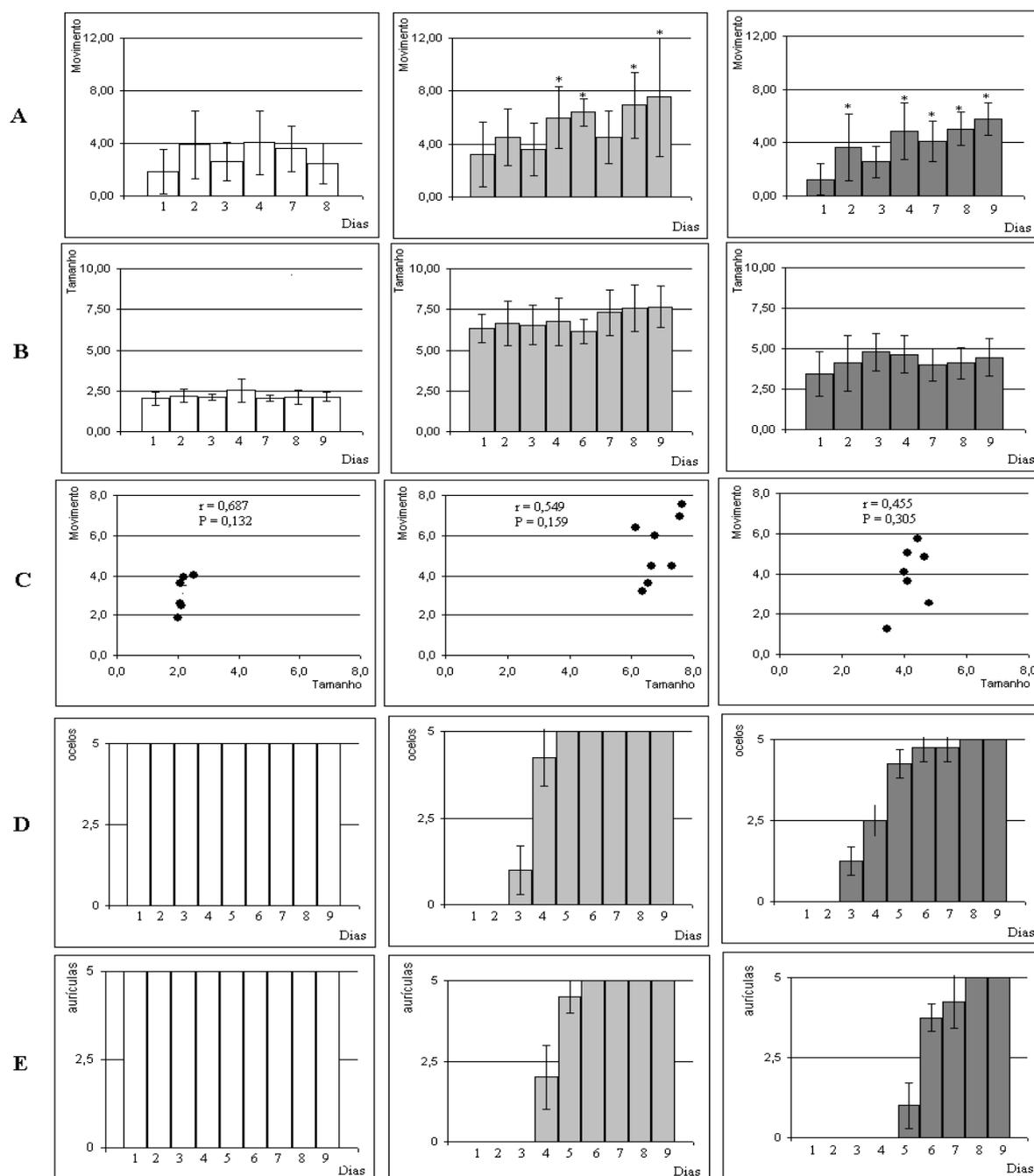


Figura 3. Análise de diferentes parâmetros para acompanhamento do processo regeneração de *G. schubarti* mixoplóide (população clonal). Os gráficos da coluna da esquerda corresponde aos fragmentos da cabeça, os da coluna central corresponde aos fragmentos do meio do corpo e os da direita correspondem aos fragmentos da cauda. Parâmetros analisados: **A)** movimento (número de linhas cruzadas por unidade de tempo); **B)** Tamanho (cm); **C)** Correlação de Pearson entre mobilidade e o tamanho dos regenerantes. **D)** Tempo necessário (dias) para surgimento (detectado visualmente, em lupa) dos primeiros rudimentos dos ocelos; **E)** Tempo necessário (dias) para surgimento (detectado visualmente, em lupa) dos primeiros rudimentos das aurículas.

Quanto ao tamanho do fragmento em regeneração, para *G. tigrina* não foram observadas alterações significativa no comprimento dos fragmentos regenerantes (dados não-mostrados), assim como para ambas as raças cromossômicas diplóide e mixoplóide de *G. schubarti* (Figura 4B e 5B, respectivamente), independentemente da região do corpo (regiões cefálica, média e caudal) regenerada. Portanto, em ambas as espécies durante o processo de regeneração foram formadas a(s) parte(s) perdida(s) e foi restabelecido o padrão corporal sem alterações do comprimento dos regenerantes.

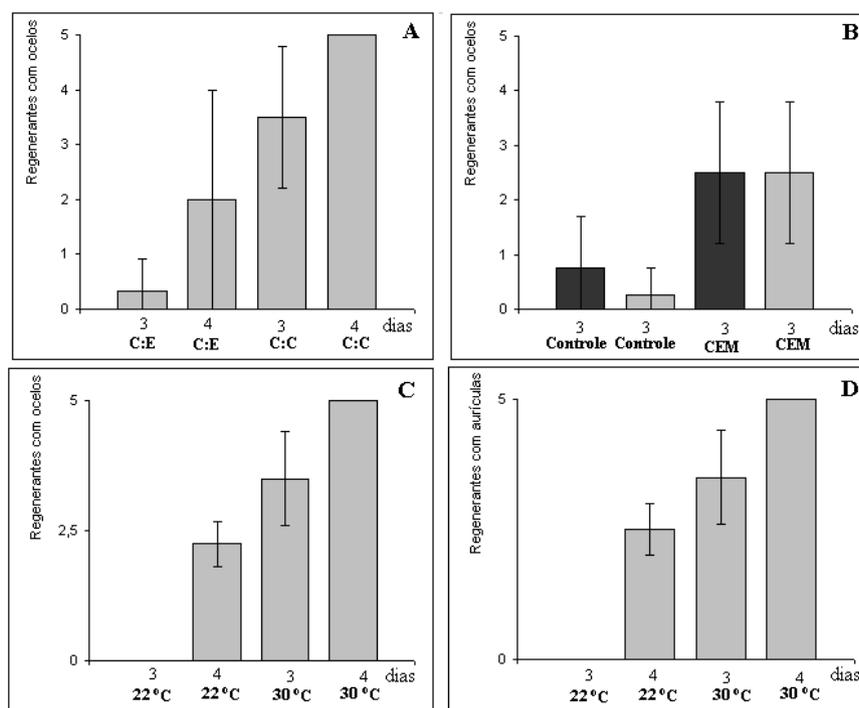


Figura 4. Efeito da temperatura, do CEM e da temperatura sobre a regeneração de planárias. As barras claras representam regenerantes *G. tigrina* diplóides e as barras pretas representam regenerantes *G. schubarti* (mixoplóide). **A)** Efeito do fotoperíodo; **B)** Efeito do CEM; **C)** Efeito da temperatura sobre a regeneração dos ocelos e **D)** Efeito da temperatura sobre a regeneração das aurículas.

Quanto a mobilidade dos regenerantes, foi observado para *G. tigrina* (Capítulo III, Secção Supplementary Material – Table 5S) e para ambas as raças cromossômicas de *G. schubarti* (Figura 2A e 3A, respectivamente) que a velocidade de deslocamento é retomada simultaneamente com o surgimento dos ocelos e das aurículas. Para a raça cromossômica diplóide *G. schubarti*, há

correlação significativa entre a quantidade de movimento e o tamanho dos fragmentos regenerantes da cabeça, do tronco ou da cauda (Figura 2C). Entretanto, para os mixoplóides não há correlação entre mobilidade e o tamanho dos fragmentos regenerantes para quaisquer partes do corpo (Figura 3C). Essa diferença de mobilidade entre as raças sexuadas e assexuadas de *G. schubarti* pode estar refletindo diferenças de pressões adaptativas dos indivíduos diplóides e mixoplóides.

3.4.3.2 Densidade e estabilidade populacional em *G. tigrina*.

Para verificar o efeito da densidade sobre a estabilidade populacional e a reprodução, populações de *G. tigrina* com 20 a 60 indivíduos/litros, de diferentes idades, foram monitoradas por ~14 semanas. Foi observado que populações jovens (3 a 6 meses) são menos férteis que populações com um ano ou mais de vida (Figura 5A). E populações com > 60 indivíduos·L⁻¹ apresentam maior mortalidade, estabilizando o número de indivíduos em ~ 40 indivíduos·L⁻¹ (Figura 5B). Também foi observado que os maiores e menores índices de Fc e Fr ocorreram em populações menos e mais densas, respectivamente (Figura 5C e 5D).

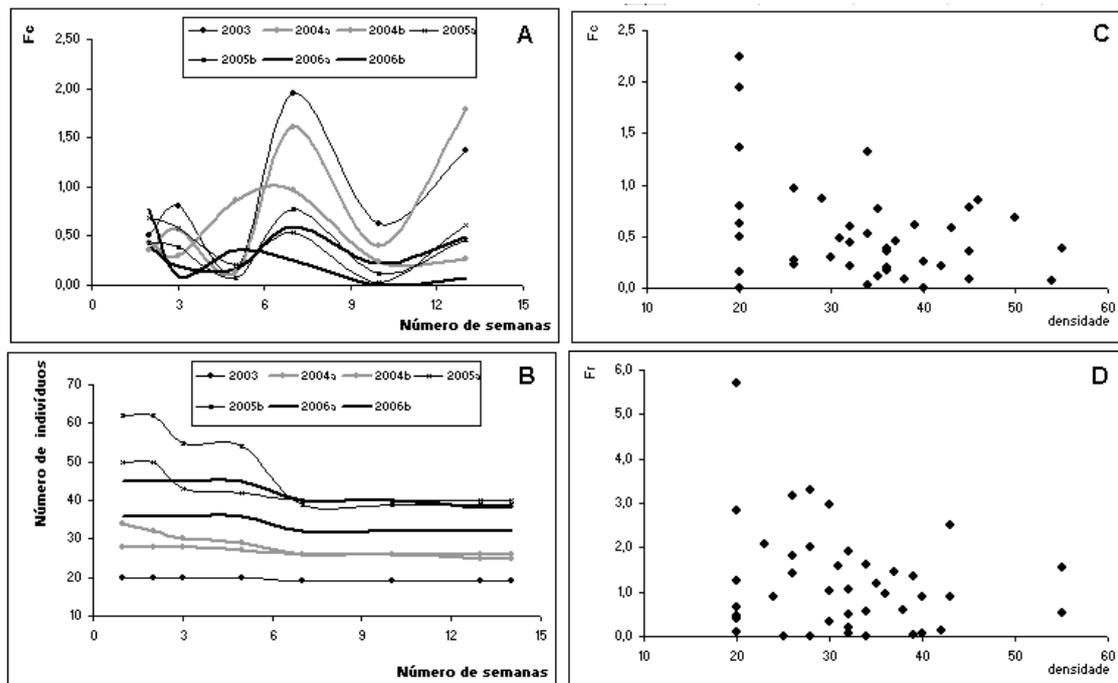


Figura 5. Efeito da densidade populacional sobre a reprodução sexuada e a sobrevivência de *G. tigrina*. **A)** Efeito da idade sobre a Fc (linhas representam o número de casulos/indivíduo/semana); **B)** Efeito da densidade populacional sobre a sobrevivência (linhas representam o número de indivíduos); **C)** Correlação entre a densidade populacional e o Fc (n° de casulos/indivíduo/semana) **D)** Correlação da densidade populacional e o Fr (n° de filhotes/indivíduo/semana).

O cultivo de populações de *G. tigrina* pelo período de ~200 semanas de 2002 a 2007 foi monitorado. Nas duas populações (Figura 6A e 6B) mantidas em quantidade de sais padrão, o aumento da idade dos indivíduos aparentemente diminui a taxa de reprodução (Figura 6E e 6F), no entanto não ocorre diminuição da produção de gametas (dados não-mostrados).

A redução de 50% da quantidade de sais na água de cultivo, causa uma redução similar no n° de indivíduos (Figura 6C) e um aumento de 3x na concentração de sais reduz a longevidade das planárias à ~ 60 semanas (Figura 6D). No entanto, a concentração de sais parecem não efetuar a Fc (Figura 6E,F,G,H). Dentro da janela de tempo monitorada, observou-se que o aumento da idade dos indivíduos aparentemente diminui a taxa de reprodução (Fc) independentemente da concentração de sais da água de cultivo.

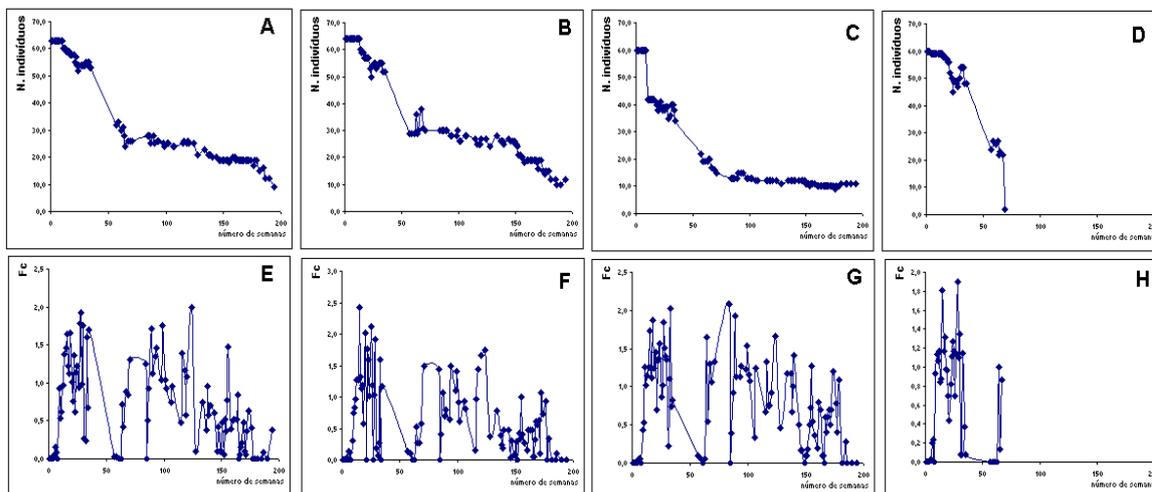


Figura 6. A sobrevivência de *G. tigrina* e sua capacidade reprodutiva (Fc) foram monitoradas por ~200 semanas através do número de indivíduos sobreviventes e de sua fertilidade (Fc). **A e B)** sobrevivência de indivíduos cultivados em água de cultivo com quantidade de sais padrão, **C)** sobrevivência de indivíduos cultivados em água de cultivo com 50% de redução na quantidade de sais, **D)** sobrevivência de indivíduos cultivados em água de cultivo com 150% de acréscimo na

quantidade de sais. **E, F, G e F**) fertilidade de indivíduos cultivados nas condições descritas em A, B, C e D, respectivamente.

Esses resultados sugerem que provavelmente uma porcentagem dos indivíduos de *G. tigrina* são mais longevos de outros. Portanto, a diminuição da fertilidade observada, pode ser devido à redução da viabilidade da gametas produzidos, e não devido a sobrevivência diferencial dos indivíduos menos férteis.



4. Discussão final

A caracterização biológica (ciclo de vida, modo de reprodução e ploidia) das populações nativas de *G. tigrina* e *G. schubarti* e o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico de fenótipos diferenciados (testes de toxicidade, teratogenicidade e mutagenicidade) são relevantes para o estudo das células-tronco uma vez que estas são responsáveis, não só pela capacidade de regeneração (BAGUÑÀ *et al.*, 1989), mas pela homeostase de todos os tecidos destes organismos (REDDIEN *et al.* 2005a; 2005b) e pela produção de suas células germinativas (SATO *et al.*, 2006).

A espécie *G. tigrina* apresenta duas raças cromossômicas, a diplóide e a triplóide e a espécie *G. schubarti* apresenta três raças cromossômicas, a diplóide, a triplóide e a mixoplóide. Em ambas as espécies, as raças triplóides e a raça mixoplóide da espécie *G. schubarti* distinguem-se das raças diplóides por serem exclusivamente fissiparitárias e terem tamanho corporal menor do que as raças cromossômicas diplóides (ver Capítulo 1).

É amplamente conhecido que mudanças no tamanho do genoma por multiplicações do genoma causam diversidade morfológica em animais e em plantas (GREGORY, 2005). Em anfíbios, o aumento da ploidia causa uma simplificação do sistema neuronal e diminuição do número de células nervosas (GREGORY, 2003) e, em planárias, causa diminuição considerável do tamanho corporal, assexualidade e diferenças de adaptabilidade à temperatura ambiental (ver Capítulo 1). Sabe-se que o número de células nervosas de planárias está intimamente correlacionado com o tamanho corporal (OVIEDO *et al.*, 2003) e com a manutenção do número de células-tronco (GUO *et al.*, 2006). Por exemplo, o gene *cintillo* de *S. Mediterranea* é expressado em neurônio sensoriais que variam em número proporcionalmente conforme o tamanho do animal (OVIEDO *et al.*, 2003). Além disso, HORI & KISHIDA (1998) observaram que a decapitação de

planárias acelera a freqüência de fissiparidade, provavelmente devido ao decréscimo nas concentrações de neurotransmissores (YOSHIZAWA *et al.*, 1991). É provável que a proporção de tecido específico, número de células, tamanho do genoma, tamanho do animal e condições ambientais sejam intrinsecamente regulados. A interligação destes fatores pode ser parte do mecanismo de determinação do modo de reprodução (sexuado ou assexuado) em planárias. Como a interligação das funções-chave das células diferenciadas e indiferenciadas, tais como herança e adaptação, respondem a seleção natural permanece a ser esclarecido (HSIN & KENYAN, 1999).

Além disso, sabe-se que indivíduos mixoplóides da espécie *G. schubarti* o aumento na disponibilidade de nutrientes aumenta a proporção de células 3n, entretanto um aumento na proporção de células 3n parece não afetar a freqüência de fissiparidade (Figura 7). Assim, os organismos mixoplóides, nos quais as células 2n e 3n compartilham o mesmo nicho, também podem ser úteis na compreensão das inter-relações número de células/tamanho do genoma, e os processos de diferenciação celular.

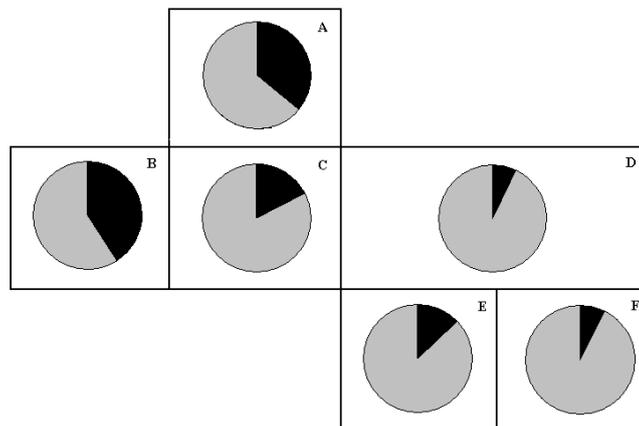


Figura 7. Flutuações na proporção de células triplóides (cinza) e diplóides (preto) em indivíduos *G. schubarti* mixoplóide (GsPop2). DN = Dieta normal, alimento fornecido semanalmente; RC = Restrição Calórica, alimento fornecido a cada 20 dias; DC = Dieta calórica, alimento fornecido a cada 4 dias. (A) RC constante, de 1993 a 1996 (UFRGS); (B) RC constante, de 1983 a 2000 (UNISINOS). (C) DN, de 1996 a 1999; (D) DC, durante seis meses em 1999; (E) População amostrada em D, submetida a RC por 9 meses, 2001; (F) População amostrada em D, sob DC por

mais nove meses, 2001. (modificado de Knakievicz, 2001).

Outra questão interessante é as que envolvem a elucidação dos mecanismos determinantes da longevidade dos organismos. Há uma correlação positiva entre a proporção tamanho do cérebro/tamanho do corpo e a longevidade dos organismos, especialmente em mamíferos (MATTSON *et al.*, 2002). Isso sugere um papel para o cérebro na determinação da longevidade, provavelmente associado à capacidade do cérebro de estimular rotas de sinalização celular que aumentam a resistência a estresses oxidativos (KARBOWNIK *et al.*, 2001; REITER, 2003) e/ou por sua interação com as células-tronco (GUO *et al.*, 2006; REUTER & KRESHCHENKO, 2004). Em *C. elegans* um aumento na longevidade do organismo ocorre quando as células-tronco da linhagem germinativa são mortas (HSIN & KENYAN, 1999). Em *G. schubarti*, os indivíduos assexuados (triplóides e/ou mixoplóides) são mais longevos e menores do que os sexuados (diplóides) (ver Capítulo I).

O aumento da idade, tanto para a *G. tigrina* sexuada (Figura 6) quanto para a *G. schubarti* assexuada parecem ter pouco efeito sobre reprodução (ver Capítulo I). Provavelmente, planárias contam com mecanismos eficientes de auto-seleção de neoblastos normais e eliminação dos anormais (KALAFATIC *et al.*, 2004; ver Capítulo II), os quais, podem compensar as desvantagens da reprodução assexuada a longo prazo (RICE, 2002). Se a proporção tamanho do cérebro/tamanho do corpo e/ou tamanho/quantidade de células fazem parte de mecanismos que regulam a manutenção das células-tronco e sua progênie (células germinativas e células somáticas) permanece para ser esclarecido. Também devem ser investigadas as possíveis correlações de tais mecanismos com o modo de reprodução (sexualidade e/ou assexualidade) e a longevidade em planárias.

Devido à excepcional capacidade de regeneração das planárias e a presença de uma grande população de células-tronco proliferativas inclusive nos organismos adultos, o uso destes organismos para avaliação dos riscos biológicos dos poluentes tem se mostrado promissor (GUECHEVA *et al.*, 2001, 2003; PRÁ *et al.*, 2005). As planárias consentem informações complementares do

efeito tóxico, teratogênico, mutagênico e crônico das amostras avaliadas através de bioensaios simultâneos (Ver Capítulo III).

Este conjunto de bioensaios, além ser úteis à ecotoxicologia, pode auxiliar na obtenção de fenótipos diferenciados (Figura 8) para o uso em estudos de desenvolvimento. A obtenção de fenótipos diferenciados bem caracterizados aliado aos métodos avançados já disponíveis para outras espécies de planárias, tais como tais como RNAi (SANCHEZ ALVARADO & NEWMARK, 1999), marcação com BrdU, (NEWMARK & SANCHEZ ALVARADO, 2000), bancos de dados de EST (ZAYAS *et al.*, 2005), microRNA (PALAKODETI *et al.*, 2006) e outras; podem ser recursos complementares úteis. Por exemplo, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de regeneração da SNC de planárias disponíveis (MINETA *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 2004) aliado à análise comparativa do efeito simultâneo tóxico, teratogênico e/ou mutagênico de agentes que interferem em rotas de sinalização conhecidas podem auxiliar na obtenção de linhagem sensíveis a poluentes ambientais específicos de interesse para a saúde humana ou dos ecossistemas. Desta forma contribuir não só para a pesquisa básica dos mecanismos de regeneração cerebral mas, também, contribuir para a conservação da saúde dos ecossistemas.

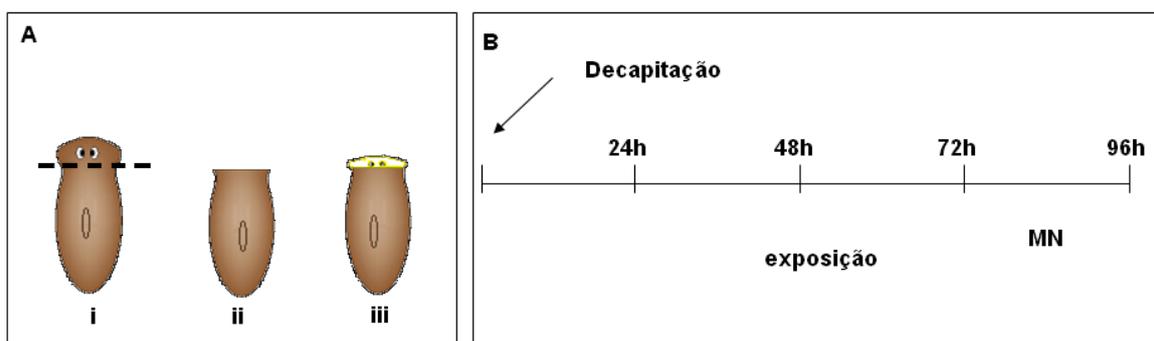


Figura 8. Esquema de exposição de planárias a substâncias de interesse. **A)** Planárias regenerantes (ii) são obtidas pela decapitação de planárias intactas (i) que completam a regeneração em 72 h a 96 h (iii). **B)** Procedimento de exposição de planárias intactas (A-i) ou regenerantes (A-ii) e troca de solução-teste a cada 24 h, seguida de análise de sobrevivência, mobilidade, regeneração e/ou frequência de MN.

Conhece-se pouco a respeito de como o ciclo celular de células-tronco somáticas de planárias adultas pode ser regulado. No entanto, existe uma série de evidências de que o ciclo celular dos neoblastos pode ser modulado, por outros fatores além daqueles ativados pela regeneração (BAGUÑA, 1976). A proliferação dos neoblastos também responde a fatores ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes (BAGUÑA, 1974; NIMETH *et al.*, 2004), CEM (Figura 4A), luminosidade (Figura 4B), temperatura (Figura 4C e 4D) e ritmo circadiano. Na regulação pelo ritmo circadiano, a fase S do ciclo celular de neoblastos é sincronizada com o período claro do dia ao menos para *G. schubarti* (dados não-mostrados), ao contrário do que é observado em vertebrados, (MATSUO *et al.*, 2003; MERROW & ROENNEBERG, 2004). Além disso, o ciclo celular de neoblastos 2n e 3n de planárias mixoplóides parece ser diferentemente modulado pela disponibilidade de nutrientes (Figura 7).

As células-tronco de planárias, conhecidas como neoblastos, assim como as de outros organismos apresentam várias características únicas quando comparadas com células diferenciadas, tais como a presença de corpos cromatóides (material citoplasmático eletrodense) (SHIBATA *et al.*, 1999), capacidade de proliferação (NEWMARK & SANCHEZ ALVARADO, 2000), citosol altamente basófilo (SÁNCHEZ ALVARADO & KANG, 2005), além de sensibilidade a raios X (AGATA, 2003; REDDIEN *et al.*, 2005a). No entanto, a relativa uniformidade morfológica dos neoblastos totipotentes e da sua progênie (Figura 10) dificulta a determinação da heterogeneidade existente nesta população celular (REDDIEN & SÁNCHEZ ALVARADO, 2004). Os corpos cromatóides (ricos em RNAs que codificam enzimas modificadoras de cromatina) dos neoblastos parecem estar comprometidos com o processo de diferenciação celular tecido-específico e posição-dependente, promovendo a transição da cromatina inativa para a ativa em domínios cromossômicos específicos (ROSSI *et al.*, 2001; AGATA, 2003), os quais são induzidos a se formarem por neuropeptídeos (HORI & KISHIDA, 2003). Recentemente, foi observado em células-tronco germinativas de *D. melanogaster* que a herança diferencial do centrômero assegura divisões mitóticas assimétricas (SPRADLING & ZHENG, 2007). A retenção permanente do centrômero-mãe promove considerável

estabilidade e longevidade a essas células, sugerindo que esse mecanismo pode ser essencial à biologia das células-tronco. É provável que os fatores controladores da arquitetura da cromatina desempenhem um papel fundamental na definição do destino de desenvolvimento da progênie dos neoblastos, (SÁNCHEZ ALVARADO & KANG, 2005).

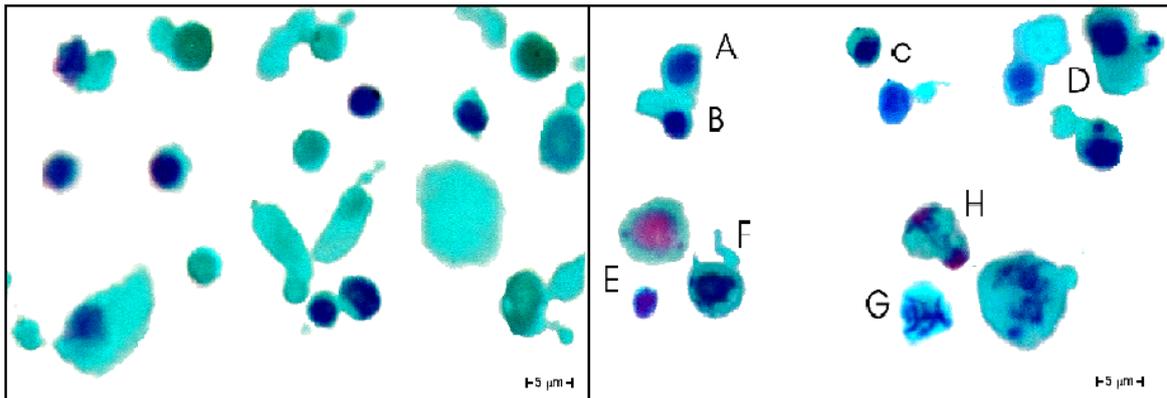


Figura 10. Neoblastos de planárias *Girardia tigrina*. Neoblasto eucromático (A) e heterocromático (B). Os micronúcleos (MN) pequenos (C), grandes (D) ou múltiplos (E,F). Anomalias cromossômicas, pontes (H) ou mitoses (G).

As planárias, provavelmente, contam com mecanismos eficientes de eliminação dos neoblastos anormais (KALAFATIC *et al.*, 2004). Observamos em ambas as espécies, que a frequência de MN em neoblastos aumenta de 48 h a 96 após a exposição micronucleados. Depois deste período, após 120 h da exposição ao agente clastogênico, a frequência de neoblastos micronucleados diminuiu consideravelmente (ver Capítulo II). Essa diminuição na frequência de MN em neoblasto pode ser via diferenciação celular dos neoblastos micronucleados e/ou por eliminação de neoblastos micronucleados (UNGER *et al.*, 1994; SABLINA *et al.*, 1998; BAATOUT & DERRADII, 2004). Também observamos, apesar da grande capacidade de regeneração, poucos indivíduos com crescimento desordenado de seus tecidos (Figura 11). O requerimento de um compartimento específico (mesênquima) para a manutenção das células-tronco (SALVETTI *et al.*, 2000; OGAWA *et al.*, 2002; ORII *et al.*, 2005) e a diferenciação da progênie dos neoblastos dependente de migração tecido-

específico (AGATA, 2003; REDDIEN & SÁNCHEZ ALVARADO, 2004), provavelmente sejam importantes para a manutenção da homeostase de todos os tecidos destes organismos.



Figura 10. Planária *G. tigrina* com crescimento desordenado de tecidos. Planária cultivada em condições-padrão, com 3 anos de idade. Permaneceu com o tecido anormal por 6 meses, sofreu fissão despreendendo o tecido anormal (que se degradou) e regenerou-se as partes perdidas dando origem a dois novos organismos normais.

Portanto, planárias são organismos promissores para a realização de uma ampla gama de estudos para investigar o papel das células-tronco pois consentem múltiplas abordagens experimentais. Planárias podem ser organismos interessantes para o estudo das inter-relações entre proliferação celular, tamanho genômico e tamanho corporal, prováveis fatores responsáveis pela modulação/regulação da fissiparidade/assexualidade, e modo de reprodução (sexualidade e/ou assexualidade) e a longevidade.

As planárias podem ser úteis para investigar a separação fisiológica das funções das células indiferenciadas e diferenciadas as quais sofrem pressões operacionalmente opostos para produzir ganhos apropriados em adaptabilidade respectiva. Elas também para o estudo das inter-relações entre compartimento específico os neoblastos e sua progênie, prováveis fatores responsáveis pela manutenção da homeostase de todos os tecidos. A compreensão dos mecanismos de manutenção da homeostase celular nesses seres pode contribuir para o desenvolvimento de terapias de interesse para a saúde humana.



5. Conclusões

Quando à ploidia e ao modo de reprodução

- Em *G. tigrina* e *G. schubarti*, o modo de reprodução correlaciona-se com a ploidia; indivíduos diplóides são geralmente sexuais (em *G. schubarti*, ~20% dos filhotes eclodidos de casulos foram mixoplóide) e os indivíduos triplóides e mixoplóides são exclusivamente fissiparitários.

- Em ambas as espécies, a progênie sexuada é maior (até ~ 14 vezes em *G. tigrina* e ~ 2 vezes em *G. schubarti*) do que a progênie assexuada; no entanto, a Fs (prole assexuada) nas planárias fissipárias é similar. Indivíduos mixoplóides da espécie *G. schubarti* morrem em temperaturas menores do que 6°C.

- *G. tigrina* e *G. schubarti* diferem entre si em relação a alguns aspectos reprodutivos. Quanto às raças cromossômicas diplóides ou linhagens sexuais, *G. tigrina* é em torno de 10 vezes mais fértil e/ou fecunda do que *G. schubarti*. Os casulos de *G. tigrina* são ~100% viáveis, enquanto que, em *G. schubarti* a viabilidade dos casulos é de 77%. A frequência de malformações em filhotes de *G. schubarti* é ~ 4 vezes maior do que aquela em filhotes de *G. tigrina*;

- A frequência de reprodução sexuada e a longevidade em ambas as espécies sofre influência das condições ambientais, tais como concentração de sais, e aeração da água de cultivo, densidade populacional, tipo de alimento, no entanto, não foi observado troca de modos de reprodução sexuada a assexuada nos indivíduos.

Quanto à longevidade e fertilidade

- em ambas as espécies, a densidade populacional e o tipo de alimento afetam a longevidade. Populações diplóides de *G. tigrina* com ~ 40 indivíduos·L⁻¹ são naturalmente estabelecidas por morte de indivíduos supernumerários dentro

de algumas semanas de cultivo. Populações diplóides de *G. schubarti* são estáveis com até ~ 50 indivíduos $\cdot L^{-1}$, no entanto o aumento da densidade populacional acima de ~ 12 indivíduos $\cdot L^{-1}$ leva a diminuição na fertilidade.

- ao menos em *G. schubarti*, as populações poliplóides (com indivíduos triplóides e mixoplóides) são mais longevos do que os diplóides em temperaturas entre (13-21°C); e são sensíveis a baixas temperaturas ($> 6^{\circ}C$);

- em populações mixoplóides de *G. schubarti*, o aumento populacional assexuada não reduz a frequência de fissiparidade, no entanto densidade aumenta até ocorrer a morte simultânea de praticamente todos os indivíduos da população.

- em populações diplóides de *G. tigrina* o aumento da idade diminui a F_c e F_r , No entanto em populações mixoplóides de *G. schubarti*, o aumento na idade não afeta a F_s .

Quanto à regeneração

- planárias, de ambas as espécies, quando decapitadas regeneram suas cabeças em ~ 4 dias, exceto para planárias diplóides *G. schubarti* adultas (com mais de 12 meses de idade e com 20 mm a 30 mm de comprimento) que requerem o dobro do tempo.

- em ambas as espécies, durante a regeneração os fragmentos de qualquer parte do corpo (da cabeça, do tronco ou da cauda) mantém o comprimento do fragmento inicial;

- em ambas as espécies, condições ambientais, tais como temperatura, intensidade luminosas e CEM afetam a regeneração.

Quando à sustentabilidade a agentes tóxicos e à identificação de biomarcadores.

- em ambas as espécies, *G. tigrina* e *G. schubarti*, os agentes clastogênicos raios γ , MMS e CP somente induzem aumento significativo na

freqüência de formação de MN em neoblastos de planárias regenerantes;

- em ambas as espécies, a exposição a agentes clastogênicos concomitantemente com o início da regeneração leva a um aumento significativo na freqüência de MN entre 72 e 96 h seguida de diminuição após 120 h;

- *G. tigrina* quando exposta a solução de sulfato de cobre, apresentou fluxo dinâmico de entrada e saída deste metal e permitiu avaliações múltiplas de toxicidade através dos bioensaios simultâneos de mortalidade/mobilidade, de regeneração e de MN; e da avaliação do desempenho reprodutivo. Este conjunto de bioensaios demonstrou ser um método sensível e fácil para monitorar o efeito da poluição agudo e/ou crônica.



6. Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas:

- realizar a normatização dos testes ecotoxicológicos já padronizados para *G. schubarti* e *G. tigrina* de acordo com as normas técnicas da ABNT;
- caracterizar o ciclo celular normal de neoblastos de *G. schubarti* e de *G. tigrina* e suas possíveis variações em função do estágio de desenvolvimento, idade ou ploidia, durante a regeneração e em diferentes condições nutricionais e de fotoperíodo;
- padronizar do cultivo *in vitro* de neoblastos de *G. schubarti* e de *G. tigrina*;
- Estudar comparativamente o comportamento de neoblastos das duas espécies em cultura;
- desenvolver ensaios de citotoxicidade, teratogenicidade e mutagenicidade baseados em neoblastos em cultura;
- Realizar estudos de proteômica comparativa para identificar proteínas expressadas diferencialmente em planárias intactas e regenerantes e/ou em diferentes estágios de desenvolvimento.



7. Referências Bibliográficas

- AGATA, K. Molecular e Cellular approaches to regeneration of planarians. *Zoological Science*, 19: 1391-1392, 2002.
- AGATA, K. Regeneration and gene regulation in planarians. *Current opinion in genetics & development*, 13: 492–496, 2003.
- ARAGÃO, M. A. & ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de Toxicologia com organismos aquáticos In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (ed), 2006, *Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações*. Ed. RiMa, São Carlos, p 117-152. 2006.
- BAATOUT, S. & DERRADJI, H. Cytometric methods to analyses radiation effects. *Journal of Biological regulators and homeostatic agents*, 18: 101-105, 2004.
- BAGUÑÀ, J. Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and hypothesis for the control mechanism. *Journal experimental zoology*, 190: 117-122, 1974.
- BAGUÑÀ, J. SALÓ, E. & AULADELL, C. Regeneration and pattern formation in planarians. III Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development*, 107 : 77-86, 1989.
- BAGUÑÀ, J. Mitosis in the Intact and regeneranting planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II mitosis studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *Journal experimental zoology*, 195: 65-80, 1976.
- BEST, J. B. & MORITA, M. Toxicology of planarians. *Hydrobiology*, 227: 375-383, 1991.
- CALEVRO, F., FILIPPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BATISTONI, R. Toxic effects of Aluminum, Chromium and Cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 37: 651-659, 1998.

- CALEVRO, F., CAMPINI, S., FILIPPI, C., BATISTONI, R., DERI, P., BUCCI, S., RAGGHIANI, M. & MANCINO G. Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2: 281-288, 1999.
- D'SOUZA, T.G., STORHAS, M., SCHUENBURG, H., BEUKEBOOM, L.W. & MICHIELS, N.K. Occasional sex in an 'asexual' polyploid hermaphrodite. *Proceedings: Biological science.*, 271: 1001-1007, 2004.
- ERICHSEN JONES, J. R. A further study of the relations between toxicity and solution pressure, with *Polycelis nigra* as test animal. *Journal of Experimental Biology*, 17: 408-415, 1940.
- GAMO, J. & NOREÑA-JANSSEM, C. Old and new records of turbellarians from the central areas of Spain. *Hydrobiologia*, 383: 299-305, 1998.
- GONZÁLEZ-ESTÉVEZ C., MOMOSE, T., GEHRING, W. J., & SALO, E. Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 14046–14051, 2003.
- GOULART, M. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FEPAM*, 2 (1) 2003.
- GREGORY, T.R. Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biological journal of the Linnean society*, 79: 329–339, 2003.
- GREGORY, T. R. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of botany*, 95: 133–146, 2005.
- GUECHEVA, T., HENRIQUES, J. A. P. & ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutation research*, 497: 19-27, 2001.
- GUO, T., PETERS, A. H. F. M. & NEWMARK, P. A. A bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Developmental Cell*, 11, 159–169, 2006.

- HOLSTEIN, T.W., HOBMAYER, E. & DAVID, C.N. Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Developmental biology*, 148: 602-611, 1991.
- HORI I, & KISHIDA Y. Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during cell differentiation in the planarian *Dugesia japonica*. *Journal submicroscopic cytology pathology*, 35(4): 439-44, 2003.
- HORI, I. & KISHIDA, Y. A fine structural study of regeneration after fission in the planarian *Dugesia japonica*. *Hydrobiologia*, 383: 131-136, 1998.
- HSIN, H. & KENYAN, C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*, 399: 326-362, 1999.
- INDEHERBERG, M. B. M., VAN STRAALLEN, N. M. & SCHOCKAERT, E. R. Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between population of *Polycelus tenuis* (Platyhelminthes). *Ecotoxicology and environmental safety*, 44: 1-11, 1999.
- INOUE, T., KUMAMOTO, H., OKAMOTO, K., UMESONO, Y. SAKAI, M. SANCHEZ ALVARADO A. & AGATA K. Morphological and functional recovery of planarian photosensory system during head regeneration. *Zoological science*, 21: 275 – 283, 2004.
- ITOH, M. T., SHINOZAWA, T. & SUMI, Y. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. *Brain research*, 830: 18-25, 1999.
- KALAFATIĆ, M., KOPJAR, N., BESENDORFER, V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulfate. *Toxicology in vitro*. 18: 99-107, 2004.
- KARBOWNIK, M., LEWINSKI, A. & REITER, R. J. Anti-carcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 33: 735–753, 2001.
- KATO, K., ORII, H., WATANABE, K. & AGATA, K. The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration. *Development*, 126: 1031-1040, 1999.

- KNAKIEVICZ, T. Avaliação citogenética, reprodutiva e biogeográfica das espécies de planárias (Platelmintes, Tricladida, Paludicola) no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2001.
- KNAKIEVICZ, T., LAU, A. H., PRÁ D. & ERDTMANN, B. Biogeography and Karyotypes of Freshwater Planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) in Southern Brazil. *Zoological Science*, 24: 123-129. 2007.
- KOSTELECKY, J., ELLIOTT, B. & SCHAEFFER, D. J. Planarians in toxicology. I. Physiology of sexual-only *Dugesia dorotocephala*: Effects of diet and population density on adult weight and cocoon production. *Ecotoxicology and environmental safety* 18 (3): 286-295, 1989.
- MARTELLY, I. & FRANQUINET, R. Planarian regeneration as a model for cellular activation studies. *Trends in biological science*, 9: 468-471, 1984.
- MATSUO, T., YAMAGUCHI, S., MITSUI, S., EMI, A., SHIMODA, F. & OKAMURA, H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302: 255-259, 2003.
- MATTSON, M. P., DUAN, W. & MASWOOD, N. How does the brain control lifespan? *Ageing Research Reviews*, 1: 155-165, 2002.
- MERROW, M. & ROENNEBERG, T. Cellular Clocks: Coupled Circadian and Cell Division Cycles. *Current biology*, 14: R25–R26, 2004.
- MINETA, K., NAKAZAWA, M., CEBRIA, F., IKEO, K., AGATA, K. & GOJOBORI, T. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 7666–7671, 2003.
- MORGAN T. H. Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Arch Entw Mech Org* 7: 364-397, 1898. in: NEWMARK, P. A. & ALVARADO, A. S. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature reviews*, 3: 210-220, 2002.
- MORITA, M. & BEST, J. B. Effects of photoperiods and melatonin on planarian asexual reproduction. *Journal experimental zoology*, 231: 273-282, 1984

- NASCIMENTO, I. A., PEREIRA, S. A. & LEITE M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO P. A. & BERTOLETTI E. (ed), 2006, Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. Ed. RiMa. São Carlos, pp. 413-432, 2006.
- NEWMARK, P. A. & ALVARADO, A. S. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews*, 3: 210-220, 2002.
- NEWMARK P. A. & SÁNCHEZ ALVARADO A. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental Biology*, 220: 142-153, 2000.
- NIMETH, K. T., MAHLKNECHT, M., MEZZANATO, A., PETER, R., RIEGER, R. & LADURNER, P. Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum sp.* (Platyhelminthes). *Developmental dynamics*, 230: 91-99, 2004.
- OGAWA, K., ISHIHARA, S., SAITO, Y., MINETA, K., NAKAZAWA, M., IKEO, K., GOJOBORI, T., WATANABE, K. & AGATA, K. Induction of a noggin-like gene by ectopic DV interaction during planarian regeneration. *Developmental biology*, 250: 59–70, 2002.
- ORII, H., SAKURAI, T. & WATANABE, K. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Developmental genes evolution*, 215: 143–157, 2005.
- ORII, H., KATO, K., UMESONO, Y., SAKURAI, T., AGATA, K. & WATANABE, K. The planarian HOM/HOX homeobox genes (Plox) expressed along the anteroposterior Axis. *Developmental biology*, 210: 456–468, 1999.
- OVIEDO, N. J., NEWMARK, P. A. & SÁNCHEZ ALVARADO, A. Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Developmental dynamics*, 226: 326–333, 2003.
- PALAKODETI, D., SMIELEWSKA, M. & GRAVELEY, B. R. MicroRNAs from the planarian *Schmidtea mediterranea*: a model system for stem cell biology. *RNA*, 12(9): 1640-1649, 2006.
- PENNISI, E. RNAi takes evo-devo world by storm. *Sciences*, 304: 384, 2004.

- PRÁ, D., LAU, A. H., KNAKIEVICZ, T., CARNEIRO, F. R. & ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation research*, 585: 79–85, 2005.
- REDDIEN, P. W. & SÁNCHEZ ALVARADO, A. Fundamentals of planarian regeneration. *Annual review of cell and developmental biology*, 20: 725–757, 2004.
- REDDIEN, P. W., BERMANGE, A. L., MURFITT, K. J., JENNINGS, J.R. & SÁNCHEZ ALVARADO, A. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Developmental cell*, 8: 635–649, 2005a.
- REDDIEN, P. W., OVIEDO, N. J., JENNINGS, J. R., JENKIN, J.C. & SÁNCHEZ ALVARADO, A. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, 310: 1327–1330, 2005b.
- REITER, R. J. Melatonin: clinical relevance. *Best practice & research clinical endocrinology and metabolism*, 17: 273–285, 2003.
- REUTER, M. & KRESHCHENKO, N. flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Canadian journal zoological*, 82: 334-356. 2004.
- RICE, W. R. Experimental tests of the adaptive significance of sexual recombination. *Nature reviews*, 3: 241-241, 2002.
- ROSSI, L., BATISTONI, R., SALVETTI, A., DERI, P., BERNINI, F. ANDREOLI, I. FALLENI, A. & GREMIGNI, V. Molecular aspects of cell proliferation and neurogenesis in planarians. *Belgian journal zoology*, 131: 83-87, 2001.
- RUPPERT, E. E., FOX, R. S. & BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados, 7th ed. Editora Roca. São Paulo. pp. 259-308, 2005.
- SABLINA, A. A., ILYINSKAYA, G. V., RUBTSOVA, S. N., AGAPOVA, L. S., CHUMAKOV, P. M. & KOPNIN, B.P. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation, *Journal cell science*, 111: 977–984, 1998.
- SALA, O. E., CHAPIN, III, F. S. & ARMESTO, J.J. Global biodiversities scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774, 2000.

- SALVETTI, A., ROSSI, L., DERI, P. & BATISTONI, R. An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Developmental dynamics*, 218: 603-614, 2000.
- SÁNCHEZ ALVARADO, A. & KANG, H. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Experimental cell research*, 306: 299 – 308, 2005.
- SÁNCHEZ ALVARADO, A., NEWMARK, P. A., ROBB, S. M. C. & JUSTE, R. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development*, 129: 5659-5665, 2002.
- SÁNCHEZ ALVARADO, A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays*, 22: 578–590, 2000.
- SATO, K., SHIBATA, N., ORII, H., AMIKURA, R., SAKURAI, T., AGATA, K., KOBAYASHI, S. & WATANABE, K. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. *Development, growth & differentiation*, 48: 615–628, 2006.
- SCHÜRMAN, W. & PETER, R. Planarian cell culture: a comparative review of methods and an improved protocol for primary cultures of neoblasts. *Belgian journal of zoology*, 131 (Supplement 1): 123-130, 2001.
- SCHÜRMAN, W. & PETER, R. Inhibition of regeneration in the planarian *Dugesia polychroa* (Schmidt) by treatment with magnesium chloride: a morphological study of wound closure. *Hydrobiologia*, 383: 111- 116, 1998.
- SHIBATA, N., UMESONO, Y., ORII, H., SAKURAI, T., WATANABE, K. & AGATA, K. Expression of vasa (vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Developmental biology*, 206:73-87, 1999.
- SLUYS, R., HAUSER, J. & WIRTH, Q. J. Deviation on the groundplan: a new species of freshwater planarians from South Brazil Platyhelminthes: Tricladida: Paludicola. *Journal of zoology*, 241: 593-601, 1997.
- SLUYS, R. Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Bijdragen dierk*, 59: 3-25, 1989.

- SALO, E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays*, 28(5): 546-559, 2006.
- SPRADLING, A. C. & ZHENG, Y. The Mother of All Stem Cells? *Science*, 315: 469-470, 2007.
- STOHLER, R. A., CURTIS, J. & MINCHELLA, D. J. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *International journal for parasitology*, 34: 595–601, 2004.
- STORHAS, M., WEINZIERL, R. P. & MICHIELS, N. K. Paternal sex in parthenogenetic planarians: a tool to investigate the accumulation of deleterious mutations. *Journal evolutionay biology*, 13: 1-8, 2000.
- UNGER, C., KRESS, S., BUCHMANN, A. & SCHWARZ, M. Gamma irradiation-induced micronuclei from mouse hepatoma cells accumulate high levels of the tumour suppressor protein p53, *Cancer research*, 54 (14): 3651–3655, 1994.
- VARGAS, V. M. F., MIGLIAVACCA, S. B., MELO, A. C., HORN, R. C., GUIDOBONO, R. R., FERREIRA, I. C. F. S. & PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants, *Mutation research*, 490: 141–158, 2001.
- VREYS, C. & MICHIELIS, N. K. Sperm trading by volume in a Platyhelminthe platworm with mutal penis intromission. *Animal behaviour*, 56: 777-785, 1998.
- VRIES, E. L. de & SLUYS, R. Phylogenetic relationships of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Journal of zoology (London, England: 1987)*, 223: 103-116, 1991.
- YOSHIZAWA, Y., WAKABAYASHI, K. & SHINAZAWA, T. Inhibition of planarian regeneration by melatonin. *Hydrobiologia*, 227: 31-40, 1991.
- ZAGATTO P. A. & BERTOLETTI E. (ed) *Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações*. Ed. RiMa. São Carlos, pp 464, 2006.
- ZAYAS, R. M., HERNANDEZ, A., HABERMANN, B., WANG, Y., STARY, J. M. & NEWMARK, P. A. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: Analysis of ESTs from the hermaphroditic strain.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,
102 (51): 18491–18496, 2005.



8. Anexos

8.1 *Condições de cultivo, manutenção e teste*

A seguir são apresentadas as condições otimizadas para a manutenção das populações de planárias em laboratório e para a realização de testes ecotoxicológicos de curta e longa duração.

Tabela 1A. Requerimentos para aceitabilidade de testes de toxicidade de 5 dias com planárias *G. tigrina* ou *G. schubarti*. (Lista de exigências compilada a partir dos resultados obtidos durante os procedimentos para padronização de testes desenvolvidos na elaboração dos resultados apresentados nos Capítulos I, II e III da seção de Resultados).

-
1. A idade dos organismos-teste no início dos ensaios deve estar dentro dos limites requeridos de 0 a 7 dias para filhotes recém-nascidos e de 3 meses para adultos.
 2. Os níveis de dureza, alcalinidade, pH da água de cultivo não devem variar mais do que 50% durante os testes.
 3. Mensalmente, ou no início de testes com poluentes, o lote de organismos utilizado deve ser avaliado usando uma substância tóxica de referência (por exemplo, o sulfato de cobre). A duração do teste poderá ser de 48 h. É aceitável para utilização em testes o lote de organismos onde houver sobrevivência de 90% dos organismos do controle (água de cultivo).
 4. Temperatura da água de cultivo deve ser medida diariamente, e semanalmente o pH da água de cultivo, dureza, alcalinidade e condutividade da água de cultivo devem ser medidos mensalmente.
-

Tabela 1A. Continuação

5. A qualidade dos alimentos (fígado bovino congelado) e a contaminação da água devem ser caracterizadas se forem observados problemas na cultura dos organismos ou durante os testes.
 6. Medidas fisiológicas, tais como idade da maturidade sexual e taxas de fertilidade e fecundidade podem fornecer informações úteis sobre a saúde das populações cultivadas.
 7. Todos os organismos em um teste devem ter a mesma origem.
 8. É recomendável o início dos testes o mais breve possível após a coleta das amostras de água no campo.
 9. Todos os recipientes devem ter o mesmo tamanho e compartilhar o mesmo número de organismos e de volume de amostra.
 10. Um controle negativo e controles positivos apropriados devem ser incluídos no teste. A média de sobrevivência de planárias no controle deve ser maior ou igual a 80% no final dos testes.
 11. Diariamente, organismos mortos devem ser removidos dos recipientes testes e as soluções devem ser renovadas.
 12. A temperatura durante os testes deve ser a mesma da cultura das populações. A aclimação dos organismos testes na água teste é requerida.
 13. A variação média diária da temperatura teste deve estar entre $\pm 1\text{C}^\circ$ da temperatura desejada. Alterações instantâneas podem oscilar em até $\pm 3\text{C}^\circ$ em relação a temperatura desejada.
 14. As características físico-químicas naturais das amostras de água coletadas para serem testadas devem estar dentro dos limites de tolerância dos organismos-teste. Relacionado ao item 8.
-

Tabela 2A. Resumo das condições de cultivo de planárias em laboratório.

Condições de cultivo	Recomendado
Sistema	Semi-estático
Temperatura	20 ± 2 °C
Qualidade da luz	Luz fria, tipo fluorescente
Intensidade luminosa	35 FC
Fotoperíodo	12 h luz; 12 h escuro
Tipo/capacidade do recipiente	Recipiente plástico de 2 L, com tampa fosca
Água de manutenção	Reconstituída com dureza de 0 a 2 mg CaCO ₃ ·L ⁻¹ , pH 7,2 a 7,6 e condutividade de 62 a 63 mS·cm ⁻¹
Volume de água de manutenção por recipiente	Aproximadamente 1000 ml
Aeração	Não
Troca de água	1 vez por semana
Nº de organismos/recipiente	40
Tipo de organismos/recipientes	Organismos matrizes ou organismos testes
Nº de recipientes com organismos matrizes	Mínimo de 6, sendo que cada um dever conter organismos de determinada idade, ou seja, de 3 a 48 meses
Nº de recipientes com organismos testes	Mínimo de 3, sendo que cada um dever conter organismos de determinada idade
Idade dos organismos	conhecida
Alimentação	Semanal, num mesmo dia da semana
Tipo e qualidade de alimento/recipiente/ semana	Fígado bovino congelado por no máximo durante um mês
Duração das culturas	indeterminado
Controles diários	Temperatura da água e máxima e mínima do ar do ambiente
Controles no dias da troca de água	sobrevivência dos organismos nas culturas, pH temperatura da água de manutenção. Contagem e remoção do nº de casulos para um recipientes datado. Os filhotes eclodidos dos casulos também são contados e removidos para outro recipientes para início de uma nova população (matriz ou testes).
Controle da sensibilidade das culturas	Teste mensal com uma substância de referência. A CL ₅₀ obtida de estar em um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos
Controles adicionais	Observação periódica da presença ou não de contaminantes por fungos ou outros organismos. Anotar estas datas

Tabela 3A. Resumo das condições de testes de toxicidade aguda com *Girardia tigrina* e *G. schubarti*

Condições-teste	<i>G. tigrina</i> (diplóide sexuada)	<i>G. schubarti</i> (mixoplóide assexuada)
Sistema de teste	Semi-estático	
Duração	24 a 96	
Temperatura	20 ± 2 °C	
Qualidade de luz	Luz fria, tipo fluorescente	
Intensidade luminosa	35 FC	
Fotoperíodo	12 h luz; 12 h escuro	
Tamanho do frasco-teste	Recipiente plástico de 100 mL, com tampa	
Volume da solução-teste	20 mL	
Renovação da solução-teste	diária	
Idade dos organismos	Conhecida - filhotes (de 0 a 7 dias de vida) ou adultos (3 meses de idade)	Não estabelecido (tamanho de 7 a 10 mm)
Nº organismo/réplica	5	
Nº réplicas/concentração	4	
Nº de soluções-teste	4 a 5	
Fator de diluição	0,3 ou 0,5	
Alimentação durante os teste	Não	
Troca dos frascos-testes	Não	
Aeração das soluções-testes	Não	
Água de diluição	Reconstituída	
Crítérios de avaliação de efeito	Mortalidade, mobilidade, regeneração de cabeça, freqüência de MN	
Biomarcadores (<i>endpoint</i>) de exposição aguda	Testes de mobilidade, regeneração e MN	
Biomarcadores (<i>endpoint</i>) de exposição crônica	Avaliação da desempenho reprodutivo	
Expressão dos resultados	DL ₅₀ , mCl ₅₀ , rCl ₅₀ Teste de MN, Fc e Fr (24 a 96 h)	
Crítérios de aceitação do teste	> 80% de sobrevivência dos organismos-controles	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)