



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Avaliação do Potencial Tóxico e Genotóxico do Sulfato de Cobre em
Planária: Utilidade deste Organismo para Biomonitoramento
Ambiental**

Temenouga Nikolova Guecheva

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João A. P. Henriques
Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Porto Alegre
2002

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo: Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. João Antonio Pêgas Henriques, pela orientação, pela confiança, pela atenção. Por saber valorizar às nossas conquistas e dar força nos momentos difíceis, muito obrigada, por tudo!

Ao Prof. Bernardo Erdtmann, pela oportunidade de trabalhar com as planárias e pela ajuda num campo novo para mim, pela liberdade que me deu para conduzir o meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica da UFRGS, pela acolhida e apoio acadêmico e científico. Aos funcionários e técnicos Cleia, Sílvia, Márcia, Elmo, Dona Maria e Luciano, pelo auxílio e pela atenção.

Aos colegas Karina, Clarice, Eduardo e Jose Ferreira, que me ajudaram nos meus primeiros meses no Brasil, enquanto ainda não falava português.

Ao Prof. Martin Brendel, pela amizade, pelas conversas, pelas discussões e sugestões, e pela revisão do inglês.

Aos colegas do laboratório de Citogenética – Adri Lau, Juliana da Silva, Jaque Miranda, Adri Gava, Tanise, Aline e Daniel, pela ajuda, e por todos os momentos compartilhados que nos fizeram amigos.

Aos colegas Rafael e Renato, pela atenção e por poder contar com eles sempre que precisei. Às colegas Cristina e Jane, pelo exemplo de força de vontade. Aos colegas Jeniffer, Diego, Helena, Miriam e todos os outros, pela convivência, pela amizade, pelas discussões e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho e pela ajuda na elaboração da Tese.

Foi muito bom trabalhar com vocês! Vou sentir saudades...

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I – INTRODUÇÃO	1
1. Metais Pesados e o Risco à Saúde Humana	1
2. Radicais Livres e Sistemas Biológicos	4
2.1. Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	5
2.2. Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	5
2.3. Radical Hidroxila (OH^{\bullet})	6
2.4. Danos oxidativos ao DNA	6
3. Defesas antioxidantes.....	10
4. O cobre	14
5. Biomonitoramento	22
6. As planárias como organismos-teste	24
7. Metodologias utilizadas neste estudo.....	27
7.1. Teste Cometa	27
7.2. Detecção de Proteínas de Estresse	30
7.3. Determinação da Atividade de Catalase	32
II – OBJETIVOS	35
1. Objetivo Geral	35
2. Objetivos Específicos	35

III – CAPÍTULO I:	
“Genotoxic Effects Of Copper Sulphate in Freshwater Planarian In Vivo Studied With the Single-Cell Gel Test (Comet Assay)”	36
IV - CAPÍTULO II:	
“Stress Protein Response and Catalase Activity in Freshwater Planarian <i>Dugesia (Girardia) schubarti</i> Exposed to Copper“	46
V – DISCUSSÃO	71
1. Efeitos Genotóxicos do Cobre em Planária	71
1.1. Detecção do dano induzido no DNA pelo cobre utilizando o Teste Cometa ..	71
1.2. Interferência do cobre com o reparo no DNA	75
2. Toxicidade do cobre em Planária	78
2.1. Acumulação de Proteínas de Estresse	78
2.2. Modulação na atividade da Catalase	82
3. Utilidade das planárias como organismo-teste em biomonitoramento ambiental	84
VI – CONCLUSÕES	86
VII – PERSPECTIVAS	88
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1 – Esquema das interações que envolvem ERO causando dano aos tecidos	02
Figura 2 – Representação da formação do radical OH^\bullet pelas reações de Haber-Weiss/ Fenton	07
Figura 3 – Danos oxidativos às bases do DNA	09
Figura 4 – Mecanismos de ação dos antioxidantes	11
Figura 5 – Mecanismos de patogênese celular em Doença de Wilson	19
Figura 6 – Planária <i>Digésia sp.</i>	24
Figura 7 – Imagens de diferentes tipos de dano em células de Planária no Teste Cometa.	28
Figura 8 – Algumas vias de dobramento e distribuição de proteínas dentro das células, controladas por proteínas de estresse das famílias hsp60 e hsp70	31
Figura 9 – Produção intracelular e decomposição enzimática dos radicais livres	33

III. CAPÍTULO I

Figura 1 – Distribution of DNA damage observed in planarians exposed to a range of CuSO_4 concentrations for 2 h	40
Figura 2 – The effects of MMS-treatment, postincubation, and posttreatment with CuSO_4 on DNA migration in Comet assay with Planarian	41
Figura 3 – Repair kinetics of MMS-caused DNA damage in presence of CuSO_4 in Planarian	41
Figura 4 – Distribution of DNA damage in planarians observed after MMS treatment followed by different periods of postincubation or posttreatment with CuSO_4 .	41
Figura 5 – Genotoxic effect caused by 7 days CuSO_4 treatment in Planarian	42

IV. CAPÍTULO II

Figura 1 – Western blot for hsp60 in planarian exposed to 27°C for 24 h	68
Figura 2 – Western blots for hsp60 in planarian exposed to a range of Cu concentrations for 4 or 24 h	69
Figura 3 – Catalase activity in planarian <i>D. schubarti</i> after treatment at a range of copper concentrations for 24 h	70

V. DISCUSSÃO

Figura 10 – Reparo por excisão de bases	72
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

I. INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Papel dos metais de transição na conversão das espécies menos reativas às espécies mais reativas	17
--	----

III. CAPÍTULO I

Tabela 1 – Genotoxic effects caused by CuSO ₄ in Planarian in vivo with the Comet assay	40
---	----

IV. CAPÍTULO II

Tabela 1 – Heat shock protein hsp60 in planarians exposed to copper, expressed as µg of total protein at detection limit determined via quantitative immunoblots	66
---	----

V. DISCUSSÃO

Tabela 2 – Algumas condições que provocam indução na síntese de proteínas de estresse	78
--	----

ABREVIATURAS

A	Adenina
AP	Sítios apurínicos e apirimídicos
BER	Reparo por excisão de bases (<i>base excision repair</i>)
C	Citosina
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSB	Quebras duplas no DNA (<i>double strand breaks</i>)
EMS	Etilmetanosulfonato
ERO	Espécies reativas de oxigênio
G	Guanina
GPX	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>heat shock proteins</i>)
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleos
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos (<i>nucleotide excision repair</i>)
PBS	Tampão salina-fosfato
SCGE	Eletroforese em gel de célula única (<i>single cell gel eletroforesis</i>)
-SH	Grupamentos sulfidríla
SOD	Superóxido-dismutase
SSB	Quebras simples no DNA (<i>single strand breaks</i>)
T	Timina
UV	Radiação ultravioleta

RESUMO

A poluição do meio ambiente por metais pesados apresenta um problema grave devido a sua alta toxicidade e a capacidade de bioacumulação. Tendo em vista o vasto uso do sulfato de cobre em algumas indústrias e nas lavouras do Rio Grande do Sul, e a importância de se avaliar possíveis danos causados nos seres vivos, o objetivo deste trabalho foi determinar o potencial tóxico do sulfato de cobre em Planária e verificar a utilidade deste organismo para biomonitoramento ambiental.

O sulfato de cobre induziu dano dose-dependente no DNA após exposição aguda e crônica, sendo que o efeito observado é a primeira evidência da genotoxicidade do cobre detectada com o Teste Cometa. A interferência dos íons de cobre com o processo de reparo do dano no DNA induzido pelo MMS sugere que o cobre poderia modular os efeitos genotóxicos associados com a exposição às misturas complexas no meio ambiente. Monitoramento da cinética do reparo no DNA em planárias mostrou reparo mais lento *in vivo* em comparação aos dados obtidos em cultura de células, acentuando a importância dos testes *in vivo* na avaliação do risco associado com a exposição adversa.

O conteúdo da proteína hsp60 em planária *Dugesia schubarti* não foi alterado em resultado da exposição ao cobre, mostrando que não é um parâmetro adequado para avaliação da contaminação química. Animais não tratados apresentaram quantidades detectáveis de proteína hsp60, revelando um alto nível basal de expressão desta proteína que poderia mascarar possível indução em resultado da exposição química. Contudo, indução da hsp60 foi observada após choque térmico.

A atividade da catalase em planária foi significativamente induzida após exposição às baixas concentrações de sulfato de cobre, mostrando-se um indicador sensível para exposição aguda ao cobre e sugerindo possível uso deste ensaio em estudos com outros agentes oxidantes. A atividade relativamente alta da catalase, detectada nas planárias não tratadas, provavelmente está relacionada com o alto nível de oxigênio dissolvido no seu habitat.

A exposição das planárias ao mutagênico conhecido MMS, *in vivo*, induziu quebras no DNA, de maneira dose-dependente, em concentrações similares com as da referência em células de mamíferos, comprovando a sensibilidade do sistema utilizado. A planária se mostrou também um organismo bastante apropriado para a detecção de danos no DNA utilizando-se o Teste Cometa, sugerindo que poderia ser útil para o monitoramento de efeitos genotóxicos induzidos por agentes químicos no ambiente aquático.

Os resultados apresentados neste estudo revelam o potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planárias e também sugerem que este organismo-teste pode ser considerado um sistema valioso para avaliação da contaminação química em estudos ambientais.

ABSTRACT

The environmental pollution by heavy metals is a serious problem due to its high toxicity and capacity of bioaccumulation. Having in mind that the copper sulphate is widely used in some industries and as agrochemical in grape-growing areas for control of mildew and other fungal diseases in the State of Rio Grande do Sul, as well as the importance of evaluation the possible harmful effects to human health, the aim of this study was to determine the toxic potential of copper sulphate in Planarian and the usefulness of this organism for environmental biomonitoring.

The copper sulphate induced dose-dependent damage to DNA as a result of acute and chronic exposure. This observation is the first evidence for copper genotoxicity detected with the Comet Assay. The inhibition effect of copper ions on repair of MMS-induced DNA damage suggests that copper could modulate the genotoxic effects associated with complex mixture exposure in the environment. The results of repair kinetic studies in Planarian *in vivo* were in agreement with previous data that showed reduced repair capacity of differentiated or non-dividing cells and reinforce the importance of *in vivo* studies in risk assessment.

No difference in the hsp60 expression between copper exposed and control animals was found, suggesting that hsp60 content in *D. schubarti* cannot be considered as a valuable biomarker of copper exposure. Untreated animals showed detectable quantity of hsp60, which can mask the response to chemical exposure; however, induction of hsp60 was observed after heat shock treatment.

Catalase activity in *D. schubarti* was a very sensitive indicator for acute copper exposure. This high sensitivity suggests the possible use of catalase as a biomarker of toxic exposure to heavy metals in planarians. The high catalase activity in untreated animals of Planarian *D. schubarti* can be explained with the high levels of dissolved oxygen in the inhabiting cold stream water.

The exposure of planarians to well known mutagen MMS induced DNA-breaks in dose-dependent manner at concentrations similar of these used in mammalian cell-culture studies, confirming the sensitivity of the test-system. Our results demonstrated that planarians are suitable organisms for detection of DNA damage by Comet assay and can be used for monitoring of chemical exposure in aquatic ecosystems.

The present results showed the toxic and genotoxic effects of copper sulphate and suggest the usefulness of planarians as a test-system for evaluating the adverse exposure in environmental studies.

I - INTRODUÇÃO

1. Metais Pesados e o Risco à Saúde Humana

A poluição do meio ambiente por metais pesados apresenta um problema grave devido a sua alta toxicidade e a capacidade de bioacumulação. O ambiente aquático merece atenção especial em relação a possíveis efeitos da contaminação por metais pesados sobre os organismos aquáticos e o risco potencial para a saúde humana associado com o uso destas águas. Estudos recentes mostraram que metais como ferro, cobre, cromo e vanádio são capazes de catalisar o início de ciclo redox dentro da célula (pela reação de Fenton), gerando Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou radicais livres, enquanto cádmio, mercúrio, níquel e chumbo, reduzem o nível da glutatona e dos grupamentos -SH protéicos. Como consequência disto ocorrem peroxidação lipídica, danos no DNA e alterações na homeostase do cálcio e dos grupamentos sulfidrila (Stohs e Bagchi, 1995; Britton, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999). Os macrófagos são outras fontes importantes de ERO em resposta aos metais pesados (Stohs e Bagchi, 1995). Existem dados, também, que íons dos metais podem elevar a produção do Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e ativar a proteína quinase C, assim como induzir a produção de proteínas de estresse e apoptose (revisado por Stohs e Bagchi, 1995; Ma *et al.*, 1998). Desta maneira, alguns dos mecanismos associados com a toxicidade dos metais são similares aos efeitos produzidos por muitos dos xenobióticos orgânicos (Fig. 1). As diferenças específicas na toxicidade dos íons de metais podem estar relacionadas com as diferenças de solubilidade, absorção, transporte, reatividade química e formação de compostos complexos dentro do organismo (Stohs e Bagchi, 1995; Mason e Jenkins, 1996).

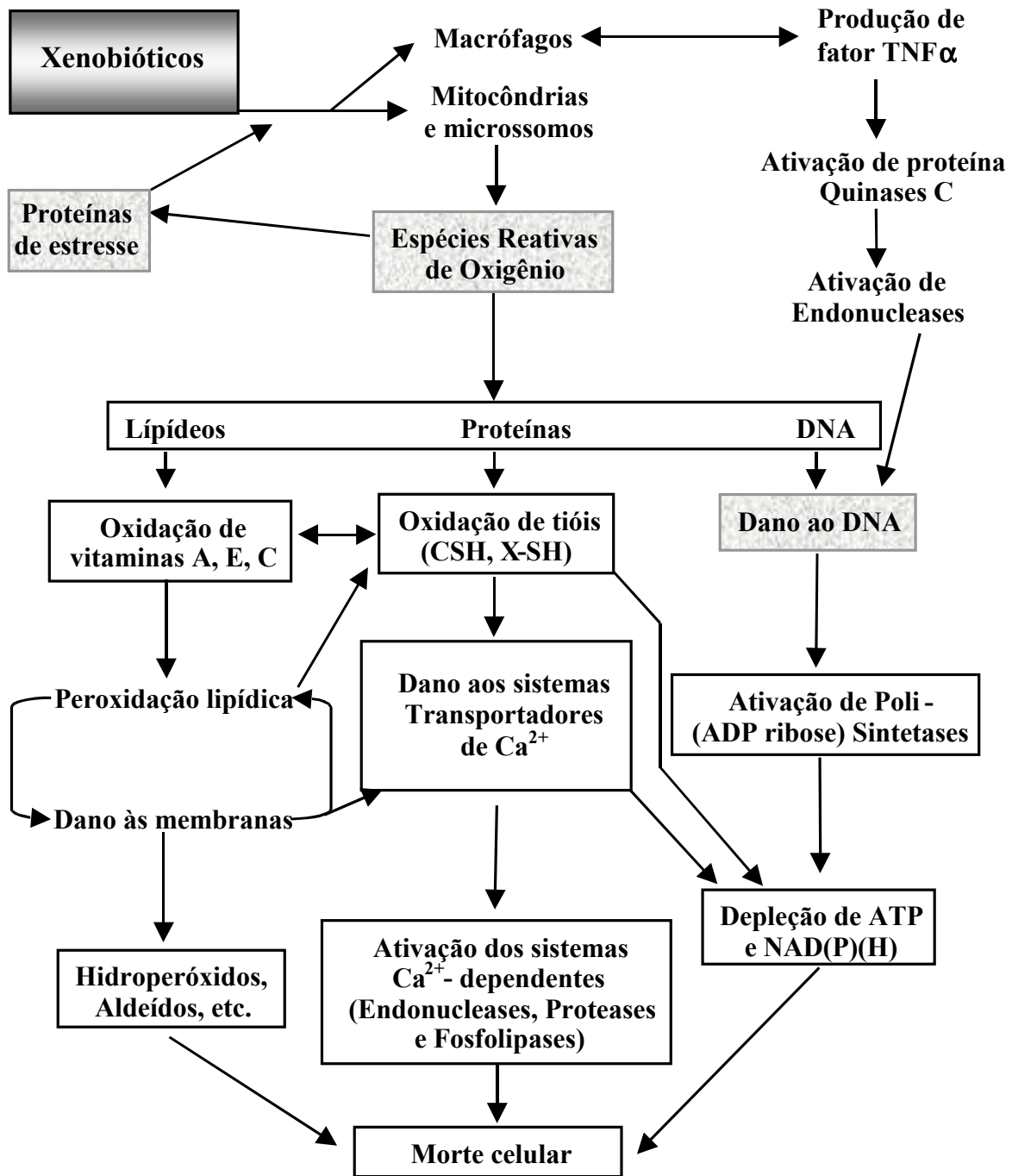


Figura 1. Esquema das interações que envolvem ERO, causando dano aos tecidos (adaptado de Stohs e Bagchi, 1995).

A genotoxicidade causada por íons de metais pesados é decorrente de dois mecanismos predominantes: geração de danos oxidativos, direto ou via ERO, e interferência com o reparo e replicação do DNA (Hartwig, 1995; Porter *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 1998; Kasprzak *et al.*, 1999). Estas lesões são continuamente reparadas pelas células, porém, algumas permanecem ou são incorretamente reparadas, e há evidências de que o acúmulo de danos oxidativos ao DNA possa ser a principal causa de doenças como artrite reumatóide, esclerose amiot lateral, doenças neuro-degenerativas (como a doença de Alzheimer e o mal de Parkinson), problemas cardíacos e câncer, além de participar no processo de envelhecimento. A maioria dos metais carcinogênicos provoca aumento dos efeitos citotóxico e mutagênico em sistemas bacterianos e em células de mamíferos em combinação com diferentes tipos de agentes que danificam o DNA (Snow, 1992; Rossman, 1995). No caso de As(III), Ni(II), Cd(II), Co(II) e Pb(II) estes efeitos são diretamente relacionados ao interação com o processo de reparo no DNA (revisado por Hartwig, 1995; Kasprzak *et al.*, 1999).

2. Radicais Livres e Sistemas Biológicos

Os radicais livres são conceitualmente denominados como átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, sendo assim extremamente reativos e capazes de se difundir pelo sistema (Halliwell e Gutteridge, 1999). O termo ERO – espécies reativas do oxigênio – abrange coletivamente os radicais de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, radical superóxido; OH^{\bullet} , radical hidroxil; RO_2^{\bullet} , radical peroxil; RO^{\bullet} , radical alcoxil) e os derivados não radicais potencialmente oxidantes (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; ozônio; HOCl; oxigênio singlet) (Boveris, 1998). As ERO são produzidas normalmente nos seres vivos como consequência de diversos processos metabólicos que envolvem reações de transferência de elétrons. Elas também podem ser geradas através da autoxidação de pequenas moléculas tais como hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, influenciada pela presença de íons de metais de transição, levando a produção de ânion superóxido.

As ERO, uma vez formadas, são capazes de reagir com quase todas as biomoléculas, através de oxidoredução, causando modificações, inativação de enzimas, agregação ou fragmentação de proteínas, danos à molécula de DNA e em lipídios de membrana (Fridovich, 1998). A peroxidação dos lipídeos da membrana inicia-se com a subtração de íons de hidrogênio do grupo metileno dos fosfolipídios, com posterior produção de dienos conjugados, hidroperóxidos e formação de outras espécies reativas mais deletérias à célula, como o radical alcoxil e peroxil. A lesão na membrana altera a sua fluidez, aumenta a sua permeabilidade, alterando as trocas iônicas e acarretando o influxo excessivo de cálcio. Isso leva a ativação das enzimas autolíticas, provocando proteólise e morte celular. A cisão do anel da deoxirribose dos ácidos nucleicos pelos radicais livres

promove mutações e inibição da síntese protéica.

Os radicais livres podem promover diversas alterações na estrutura das proteínas através de modificações em seus aminoácidos ou promovendo alterações conformacionais, na atividade enzimática, e mesmo a quebra de ligações peptídicas. A oxidação de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) por radicais livres é um fenômeno importante na etiologia da arteriosclerose.

2.1. Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical superóxido é o mais comum e abundante na célula, que pode ser gerado em eventos de transporte de elétrons nas mitocôndrias, cloroplastos e microsossomos do retículo endoplasmático ou por autooxidação do oxigênio molecular (Boveris, 1998). Além destes, o radical superóxido pode ser formado por algumas células especializadas na produção de ERO como, por exemplo, os macrófagos que produzem $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para defesa bactericida (Henriques *et al.*, 2001).

2.2. Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A membrana da mitocôndria, considerada a maior fonte de $O_2^{\bullet-}$, é impermeável ao mesmo (Boveris, 1998). Porém, o $O_2^{\bullet-}$ é dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) para H_2O_2 que por ser uma molécula neutra atravessa membranas com relativa facilidade. Peróxido de hidrogênio também é formado por fagócitos e apesar de não ser um radical é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo seu alcance. Por não reagir imediatamente, o H_2O_2 pode migrar pela célula e atingir alvos distantes do local de sua formação.

2.3. Radical Hidroxila (OH[•])

Na presença de íons de ferro e cobre na forma reduzida o H₂O₂ pode originar um dos intermediários mais reativos do oxigênio, o radical hidroxila através da reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 1999, ver Fig. 2). O radical OH[•] tem uma meia vida curtíssima e sua difusão é limitada pela sua velocidade de reação (Czapski, 1984). Por isto, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é preventiva: evitar que seja gerado. Na ausência da catálise pelos íons metálicos, a reação de Fenton ocorreria de forma muito lenta, caso realmente acontecesse (Gralla e Kosman, 1992). Por esta razão, a célula mantém um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado (Eide, 1998) e os íons de metais de transição são mantidos em sua valência mais alta ou estão de alguma forma complexados a proteínas e enzimas onde são armazenados ou fazem parte funcional das mesmas.

2.4. Danos oxidativos ao DNA

Os radicais livres produzem uma série de lesões ao DNA, danificando bases, deoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítiosapurínicos e apirimídicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas por uma série de mecanismos (revisado por Dizdaroglu, 1993). Sabe-se que nem o radical superóxido nem o peróxido de hidrogênio atacam o DNA diretamente. O radical superóxido, por sua natureza bioquímica, seria antes um redutor que um oxidante, enquanto que o peróxido de hidrogênio, que não é um radical, é oxidante forte e eficiente do ponto de vista cinético. De fato, o nível de O₂^{•-} correlaciona-se com o estresse oxidativo, o que pode ser explicado pelas reações de Haber-Weiss/Fenton (Fig. 2). Dentre as ERO que lesionam o DNA diretamente estão radical hidroxila (OH[•]) e o oxigênio singlet (Fridovich, 1998, Cadet *et al.*, 1999).

O radical OH^\bullet reage com todas as quatro bases do DNA, produzindo principalmente bases modificadas, além de causar quebras de cadeias do DNA e sítios AP (Cadet *et al.*, 1999). Do ataque a pirimidinas podem resultar os glicóis da timina ou citosina, entre outros (Fig. 3a). O ataque às purinas provoca a formação de 8-hidroxi-purinas, formamido-pirimidinas e outros (revisado por Cadet *et al.*, 1997, ver Fig. 3b). Porém, uma das mais importantes modificações de base geradas por radicais hidroxila e oxigênio singlet, é a 8-hidroxi-guanina (8-OHG), que é uma guanina com substituição do hidrogênio do C8 por um grupo $-\text{OH}$ (Dizdaroglu 1991, Fig. 3c). A 8-OHG emparelha com a adenina ao invés da citosina e causa a transversão de G-C para T-A, após um ciclo de replicação do DNA (Brozmanova *et al.*, 2001).

As riboses também são alvo do radical hidroxila, formando radicais que em reações subseqüentes podem levar a quebras simples de cadeia, deixando sítios AP e sítios alcalilábeis (Dizdaroglu, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999).

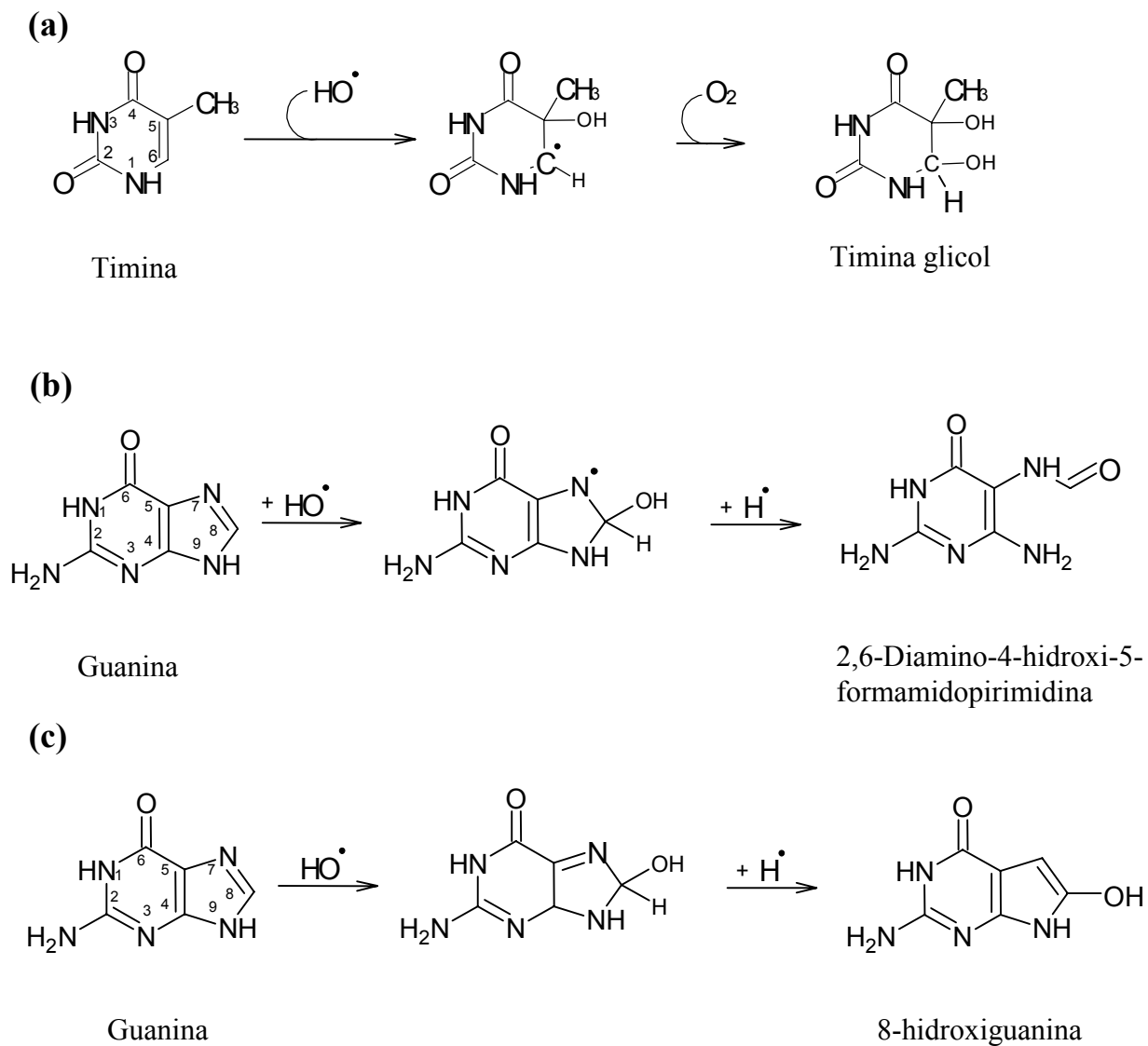


Figura 3. Danos oxidativos às bases do DNA: (a) formação de timina glicol pelo ataque do radical hidroxila à timina; (b) abertura do anel imidazólico e (c) formação de 8-hidroxi-guanina, após ataque de radicais livres à guanina (adaptado de Friedberg *et al.*, 1995).

3. Defesas antioxidantes

A produção constante de ERO durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais tem sido acompanhada pela contínua inativação destas formas reativas pelos sistemas antioxidantes, que conseguem manter as concentrações de ERO em níveis compatíveis com as funções celulares. A produção excessiva de ERO ou a diminuição das defesas antioxidantes provoca um desequilíbrio no estado redox celular conhecido como estresse oxidativo. Os radicais livres podem ser provenientes da reoxigenação de tecidos isquêmicos, dos processos inflamatórios agudos e crônicos, da radiação ionizante, da lesão causada por substâncias químicas e da reação com metais. Segundo Sies (1993, 1997), as defesas antioxidantes que protegem os sistemas biológicos de danos provocados por ERO, compreendem três etapas:

(a) prevenção: proteção contra a formação de ERO (sistemas de homeostase metálica na prevenção do estresse oxidativo);

(b) interceptação: através de sistemas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos, interceptando as ERO e impedindo a continuação das reações em cadeia;

(c) reparo: uma vez ocorrido algum dano, existem sistemas capazes de repará-lo.

Os antioxidantes podem ser definidos como “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração com relação à de um substrato oxidável retarda, significativamente, ou previne a oxidação deste substrato” (Halliwell e Gutteridge, 1999). Podem ser divididos em antioxidantes naturais, normalmente presentes no organismo e compostos sintéticos com atividade antioxidante. De acordo com seu mecanismo de ação os antioxidantes podem ser divididos em: (1) enzimas antioxidantes; (2) antioxidantes

preventivos; (3) antioxidantes seqüestradores e estabilizadores (Maxwell, 1995, ver Fig. 4).

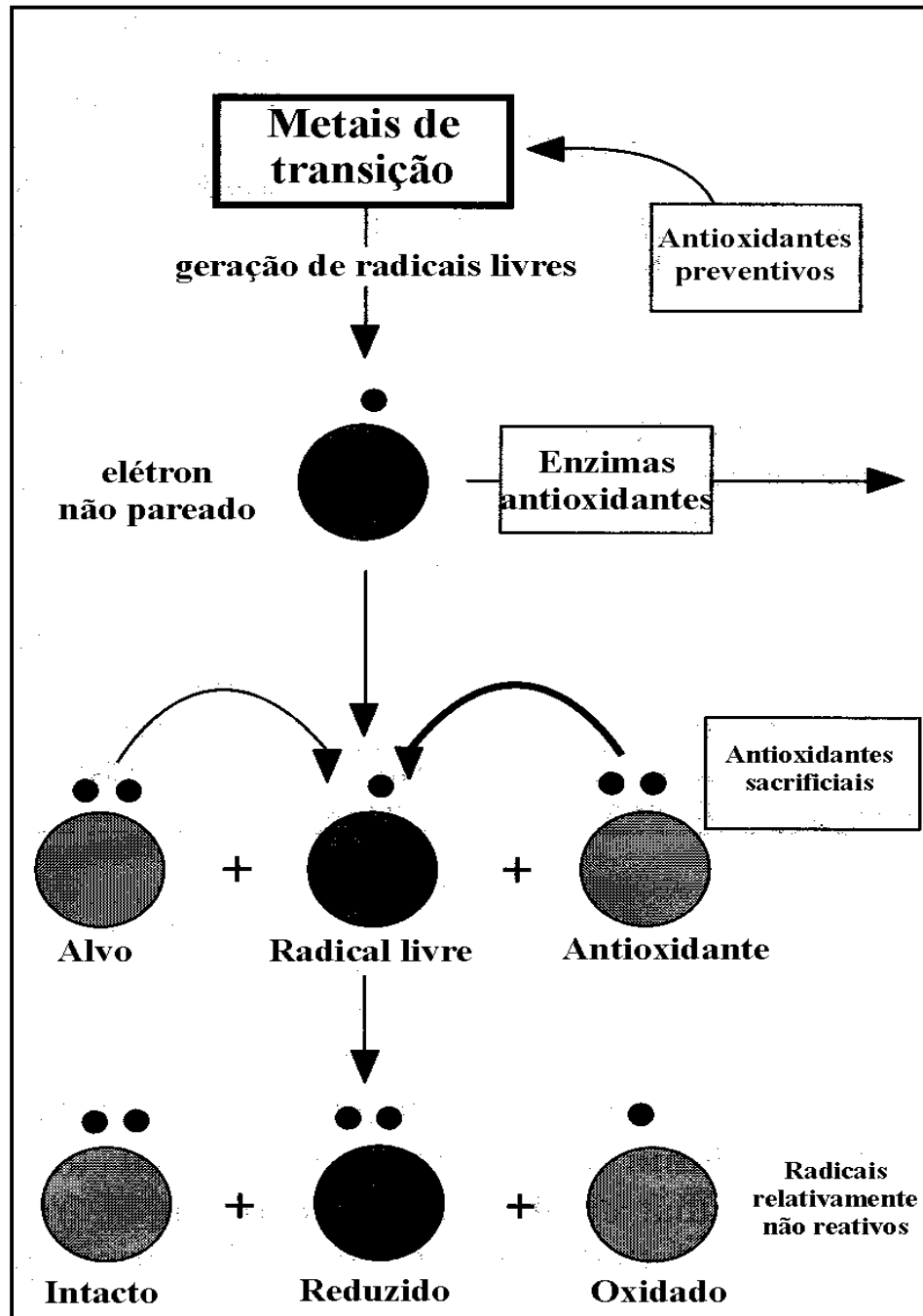


Figura 4. Mecanismos de ação dos antioxidantes (adaptado de Maxwell, 1995).

Como os metais essenciais em elevados níveis tornam-se tóxicos, as células possuem sistemas interligados que controlam a homeostase metálica ou a detoxificação de íons e as defesas contra ERO. No plasma humano, a maior defesa preventiva contra oxidações parece ser o aprisionamento de íons metálicos que participam de reações formadoras de radicais como os íons de ferro e cobre. Ceruloplasmina, transferrina-lactoferrina, albumina, haptoglobina-hemoperoxima, provavelmente atuam como antioxidantes preventivos que seqüestram estes metais (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Entre as principais enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX), as quais catalisam a redução dos oxidantes primariamente no meio intracelular (Maxwell, 1995). As SOD são metaloenzimas abundantes em células aeróbicas, e que agem sobre o radical $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o a H_2O_2 . Em células eucarióticas, existem várias isoenzimas do tipo SOD, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em seus sítios ativos (Fridovich, 1998). A catalase é uma ferro-hemoenzima, presente nos peroxissomas, onde existem muitas moléculas geradoras de peróxido de hidrogênio. Ela é responsável pela conversão do H_2O_2 à H_2O e O_2 e ajuda a regular a geração de H_2O_2 pela ação de oxidases presentes nestas organelas (Aruoma, 1997). Na mitocôndria de mamíferos, a glutatona peroxidase é a principal defesa contra o H_2O_2 , já que de maneira geral, estas organelas não possuem CAT (Fernandez-Checa, 1998). Ela é uma seleno-enzima, cuja ação é baseada na oxidação da glutatona (GSH) ao dissulfeto correspondente (GSSG) (Fridovich, 1998).

Os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que podem interceptar as ERO, atuando num processo de desativação do poder lesivo que as ERO provocam nas biomoléculas. Existem três mecanismos básicos da atividade antioxidante não-enzimática – sequestradora, estabilizadora e quelante de metais (Maxwell, 1995). Os antioxidantes do tipo sequestradores de radicais ou de quebra de reação em cadeia (“scavengers” ou “chain-breaking”) reagem preferencialmente com ERO antes que elas possam lesar as biomoléculas (Maxwell, 1995). A abstração de elétrons pelos radicais, normalmente forma outro radical que, teoricamente, poderá causar reações em cadeia. Os antioxidantes de quebra de reação em cadeia são oxidados a produtos que apresentam uma reatividade insuficiente para propagar a reação em cadeia estabelecida pelos radicais, que desta forma é interrompida (Maxwell, 1995, ver Fig. 4).

4. O cobre

O cobre tem sido reconhecido como elemento traço essencial para os organismos vivos desde a metade da década de 1930 (Linder, 2001). As necessidades diárias para o homem são de 2 a 3 mg (Linder, 2001). Existem evidências que dietas pobres em cobre levam a alterações na pressão arterial e no metabolismo do colesterol e glicose, podendo causar osteoporose e isquemia cardíaca (Klevay, 1998). As principais fontes de cobre são frutos do mar, cereais integrais, trigo mourisco, fígado, feijões e frutas secas. Também pode provir da água bebida, panelas e fungicidas. A sua concentração no habitat aquático é baixa, portanto, a sua acumulação em células vivas exige transporte ativo. O íon Cu^{2+} é tóxico, mesmo em concentrações baixas, razão pela qual o transporte dentro dos organismos é efetuado somente na forma de complexo, normalmente com proteínas (Malsröm e Leckner, 1998; Huffman e Halloran, 2001). A ceruloplasmina, por exemplo, transporta cerca de 90% do cobre plasmático (Halliwell e Gutteridge, 1999). A albumina, apesar da sua baixa capacidade de ligar cobre, pode limitar a formação de ERO catalisada por resíduos ativos de cobre e contribui para a atividade de quebra de cadeia por ser o maior componente do plasma em grupamentos tióis (Maxwell, 1995).

As funções biológicas do cobre estão intimamente relacionadas com as suas propriedades de metal de transição. Os metais de transição podem ser classificados como radicais livres, por possuírem elétrons desemparelhados no seu último orbital, e exercem papel principal na biologia por existirem em múltiplos estados de oxidação *in vivo* (Harrison *et al.*, 2000). O cobre é um dos metais de transição mais predominantes na célula, superado somente pelo ferro. Em condições fisiológicas ele existe na forma de íon cúprico - Cu(II) e cuproso - Cu(I) .

		3d	4s	
Átomo de cobre	Ar	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	\uparrow	um e^- desemparelhado
Íon de cobre (I)	Ar	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$		não radical
Íon de cobre (II)	Ar	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow$		um e^- desemparelhado

Nas células, o cobre é utilizado como elemento estrutural de proteínas reguladoras, e sua química é utilizada em reações de transferência de um elétron. A importância do cobre como co-fator de várias enzimas é bem estabelecida (Linder, 2001), incluindo citocromo *c* oxidase (a enzima terminal na cadeia respiratória), Cu/Zn superóxido dismutase e ceruloplasmina (que eliminam o radical $O_2^{\bullet-}$ e outros radicais potencialmente tóxicos), assim como a tirosinase (atuando na síntese da melanina), dopamina-monoxigenase (necessária para a síntese da catecolamina), e peptidil-glicina monoxigenase (atuando na modificação dos hormônios neuropeptídicos).

Contudo, as propriedades do cobre que o fazem elemento essencial para os sistemas biológicos, também contribuem para a sua toxicidade quando em excesso (Harrison *et al.*, 2000). O ciclo redox que ocorre entre Cu(II) e Cu(I) pode catalisar a produção do radical hidroxila que é altamente tóxico para a célula (Malsröm e Leckner, 1998). Em presença de redutores celulares disponíveis, o ferro e o cobre ligados com moléculas de baixo peso molecular podem atuar como catalisadores na formação de radicais livres comprometendo os processos fisiológicos e a integridade das células (revizado por Britton, 1996). As reações em cadeia de um radical com um não radical levam a formação de outros radicais diferentes (Tabela 1). Esta cadeia de reações se amplifica e inúmeras moléculas podem ser oxidadas no processo (Fridovich, 1998). Isto ocorre com proteínas, carboidratos, ácidos

nucléicos e principalmente com lipídeos polinsaturados, abundantes nas membranas celulares (Britton, 1996).

Alguns complexos do Cu(II) reagem com redutores celulares (ácido ascórbico, glutathiona, acetilcisteína, etc.) gerando radical hidroxila em condições aeróbias, causando quebras no DNA (Ueda *et al.*, 1998). Hiraku *et al.* (1995) mostraram que na presença de cobre alguns metabólitos do triptofano produzem ERO em células de cultura, causando quebras de fita simples e dupla no DNA. Misturas de Cu(II) e H₂O₂ em pH 7.4 provocaram dano maior às bases do DNA que o dano causado por misturas de Fe(III)/H₂O₂, sendo que os produtos da reação são típicos resultantes do ataque dos radicais hidroxila sobre as bases de DNA, tais como glicóis da citosina e timina, 8-hidroxiadenina e especialmente 8-hidroxi-guanina (Aruoma *et al.*, 1991). A formação de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina em DNA de esperma de salmão e quebras de fita simples e dupla em plasmídeo pBluescript K+ são detectadas como resultado de reações do tipo Fenton após exposição ao peróxido de hidrogênio e cobre (II) (Lloid *et al.*, 1998). Dano oxidativo às bases do DNA resultando em indução de apoptose foi observado em cultura de células humanas após tratamento com nitriloacetato de cobre (Ma *et al.*, 1998). Existem também evidências de relação entre a exposição ao cobre e o desenvolvimento de câncer (Overvad *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994).

Tabela 1. Papel dos metais de transição na conversão das espécies menos reativas às espécies mais reativas.*

Agente inicial	Espécies mais reativas produzidas na presença de íons metálicos	Metal envolvido	Comentário
H_2O_2 ($\pm\text{O}_2^{\bullet-}$)	OH^\bullet (e provavelmente espécies reativas oxo-metal)	Fe/Cu	Conversão Fe/Cu-dependente do H_2O_2 a OH^\bullet e outras espécies oxidantes (e.g. ferril)
HOCl	OH^\bullet	Fe	Fe(II) reage com HOCl para formar Cl^- e OH^\bullet
Peróxidos lipídicos	Radicais peroxil, alcoxil, aldeídos citotóxicos	Fe/Cu	
Tióis (R-SH)	$\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , RS^\bullet , OH^\bullet	Fe/Cu	Oxidação de tióis, como GSH gera radicais tíl e radicais de oxigênio
NAD(P)H	NAD(P)^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet	Fe, especialmente Cu	Os radicais NAD(P)^\bullet reduzem O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$
Ácido ascórbico	OH^\bullet , possivelmente $\text{O}_2^{\bullet-}$, radical semi-dehidroascorbato	Fe, especialmente Cu	Oxidação do ascorbato gera espécies citotóxicas
Aloxano, adrenalina, DOPA, dopamina, dihidroxifumarato, tetrahydrofolatos, 6-hidroxi-dopamina, outros compostos “autoxidáveis”	OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, outros radicais centrados no carbono ou radicais derivados de toxinas	Fe, Cu, Mn, outros metais	Maioria das “autoxidações” depende da presença de traços de íons dos metais de transição
Peroxinitrito (ONOO^-)	NO_2^+	Fe/Cu	Metais de transição e algumas metaloproteínas (incluindo CuZnSOD) aceleram nitratação dos compostos aromáticos adicionando ONOO^- , possivelmente facilitando a sua decomposição a espécies como NO_2^+ , íon nitrónio

* Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 1999.

Alterações no metabolismo do cobre estão relacionadas com processos de inflamação, arteriosclerose, anemia, desenvolvimento de câncer, e também com as doenças genéticas como Síndrome de Menke (deficiência de cobre) e Doença de Wilson (acúmulo de cobre) (revisado por Linder e Hazegh-Azam, 1996; Strausak *et al.*, 2001). Apesar dos fenótipos clínicos distintos destas doenças, ambas são causadas por defeito em proteínas ATPase do tipo P, membros da família das transportadoras de cátions (Harris, 2000). O alto grau de conservação destas proteínas na escala evolutiva em bactérias, leveduras, plantas e mamíferos revela o papel fundamental desta estrutura, essencial para a excreção do cobre em todas as formas vivas (Harris e Gitlin, 1996).

A Doença de Wilson é causada pela ausência ou mau funcionamento de uma ATPase expressa no aparelho de Golgi dos hepatócitos, que transporta o cobre para ser incorporado a ceruloplasmina ou para excreção via duto biliar (Fig. 5). Em condições fisiológicas, a excreção biliar representa o único mecanismo de eliminação do cobre. Assim, nos indivíduos afetados, ocorre acumulação progressiva do cobre no fígado (Loudianos e Gitlin, 2000). Quando a capacidade de estocamento hepático for excedida, ocorre morte celular com liberação do cobre no plasma e hemólise. Em ratos da linhagem Long-Evans Cinnamon (com defeito no gene homólogo da ATPase do Wilson) o acúmulo persistente de cobre após necrose tóxica dos túbulos é a principal causa da ocorrência espontânea de câncer renal (Kitaura *et al.*, 1999).

O defeito no transporte do cobre na Síndrome de Menke resulta em severa deficiência de cobre nos tecidos. Os pacientes com esta doença apresentam uma série de problemas, incluindo defeitos esqueléticos, aneurismas e degeneração do sistema nervoso. A deficiência de cobre também pode levar a dano oxidativo, diminuindo os níveis da ceruloplasmina e a atividade da CuZnSOD (Halliwell e Gutteridge, 1999).

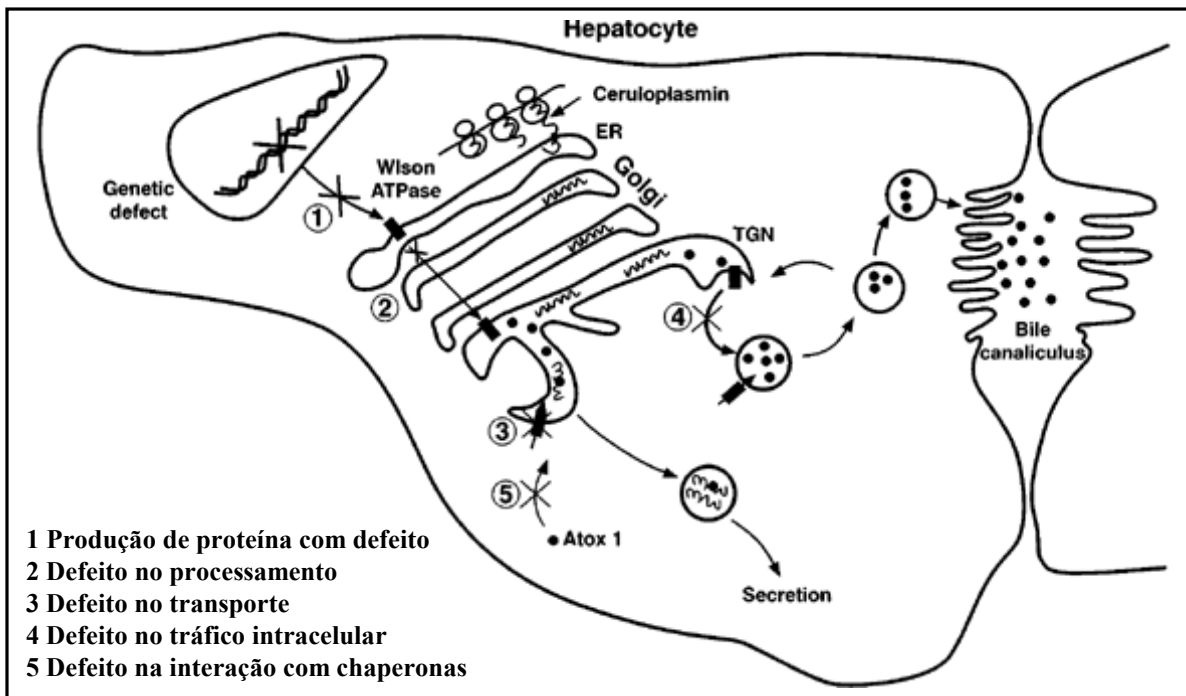


Figura 5. Mecanismos de patogênese celular em Doença de Wilson. O modelo mostra os múltiplos mecanismos moleculares que podem levar a distúrbios em homeostase do cobre em hepatócitos expressando mutações em ATPase da Doença de Wilson (adaptado de Strausak *et al.*, 2001).

Existem evidências que íons do cobre exercem papel importante na biologia das doenças causadas por príon. A forma normal do príon (PrP^c) contém cobre, enquanto a forma patogênica desta proteína (PrP^{Sc}) não contém cobre. Acredita-se que a forma normal é uma glicoproteína Cu-dependente de superfície, com configuração predominante de α -hélice (revisado por Sorenson, 2001). A função sugerida para esta proteína em condições fisiológicas é internalização do cobre presente no meio extracelular. A proteína anormal (que não contém cobre) possui estrutura β -pregueada e é apontada como responsável por

uma série de doenças neuro-degenerativas, conhecidas como “doenças induzidas por prion”. Entretanto, a etiologia destas doenças, assim como o papel da proteína PrP^{Sc} permanecem desconhecidos (Sorenson, 2001).

Em organismos aquáticos, os efeitos tóxicos do cobre provocam alterações no crescimento e reprodução, assim como distúrbios em vários processos fisiológicos (Sanders *et al.*, 1991). O cobre mostrou efeito imunomodulador em mexilhão *Mytilus edulis*, o que pode levar a maior suscetibilidade a outros poluentes do meio ambiente (Pipe *et al.*, 1999). Exposição ao cobre em marisco *Adamussium colbecki* resulta na redução da estabilidade da membrana plasmática e alterações morfológicas graves, como perda de lisossomas. Também foram detectadas depleção da glutatona e atividade reduzida das enzimas catalase e glutatona-S-transferase (Regoli *et al.*, 1998). Em resposta de exposição ao cobre em molusco *Tapes philippinarum*, foram observados desestabilização dos lisossomas, redução na atividade da SOD, e aumento na atividade do citocromo oxidase (Matozzo *et al.*, 2001). Em salmão, que habitava áreas poluídas, foi detectado acúmulo de cobre no fígado, acompanhado de alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos (Dethloff *et al.*, 2001). Em planária *Polycelis felina* o cobre causou distúrbio na diferenciação dos neoblastos, anomalias morfológicas e mudanças no comportamento (Damjan *et al.*, 2000).

Pré-exposição às baixas concentrações de cobre tem efeito protetor contra o dano oxidativo causado por endossulfan em fígado de peixe (Pandey *et al.*, 2001). Em mexilhão de água salgada *Mytilus galloprovincialis* o cobre provoca aumento no nível das glioxilases (enzimas que detoxificam os α -cetoaldeídos formados por estresse oxidativo na célula), além de diminuição do nível da glutatona e redução na atividade da catalase (Regoli e Principato, 1995). Redução do nível da glutatona e atividade da catalase foram observadas

também em fígado de carpo *Cyprinus carpio* L. após exposição ao cobre (Varanka *et al.*, 2001). O cobre provoca aumento do nível da metionina em mexilhão de água doce *Dreissena polymorpha* (Lafontaine *et al.*, 2000), e diminuição do nível da glutathione reduzida, acompanhada pela depleção das defesas antioxidantes, em *Unio tumidus* (Doyotte *et al.*, 1997). A depleção da glutathione em *Crassostrea virginica* potencializa a resposta celular ao estresse oxidativo induzido pelo cobre (Connors e Ringwood, 2000). O cobre induziu a catalase em planta aquática *Lemna minor* L. após exposição aguda (Teisseire *et al.*, 1998).

5. Biomonitoramento

É difícil avaliar o impacto ecológico e o risco para a saúde humana associados com a exposição aos poluentes do meio ambiente. As técnicas analíticas são de grande valor para identificar as espécies poluentes presentes, mas não informam sobre o efeito biológico de misturas complexas, nem suas interações potenciais e efeitos biológicos associados (Bolognesi *et al.*, 1999). Os estudos epidemiológicos também possuem valor limitado na prevenção dos efeitos maléficos da exposição nas áreas poluídas devido à insuficiência no tamanho da amostra, incorreta definição da exposição e longo período *lag* que antecede a manifestação de algumas doenças como câncer (Bolognesi *et al.*, 1999). Uma outra alternativa para a abordagem deste assunto envolve biomonitoramento, ou avaliação da toxicidade e genotoxicidade em organismos que estão em contato direto com a área contaminada (sedimento, água, ar).

Os biomonitores, também conhecidos por organismos sentinela, vêm sendo utilizados há muito tempo no que diz respeito em alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. A observação de animais selvagens ou domésticos envenenados pode ser considerada como indicador inicial da potencialidade do ambiente em causar danos à saúde humana (Backer, 1995). A principal vantagem de se utilizar organismos sentinela para monitoramento ambiental comparado ao método tradicional físico-químico, é a informação que ele pode dar em relação à exposição cumulativa em organismos e populações sobre a resposta de letalidade e subletalidade, além de detectar efeitos indiretos (Bromenshenk *et al.*, 1995).

Para detecção de dano genotóxico, um organismo sentinela deve ser capaz de detectar muitas classes de danos e em diversos tipos de células, além de ser sensível e de

fácil acesso. Muitos tipos de organismos são utilizados como sentinelas para se avaliar possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica. Entre estes incluem-se organismos aquáticos, pois os reservatórios de água recebem e muitas vezes concentram as substâncias do seu meio (Petras *et al.*, 1995); plantas (Ma, 1995); e diversas espécies de mamíferos que vivem próximas ao homem (Tice, 1995).

O sulfato de cobre é um agrotóxico inorgânico muito utilizado nas lavouras no estado de Rio Grande do Sul, que tem o destino final nas águas. No ambiente aquático o cobre é altamente acumulado por vários organismos nos diferentes níveis tróficos (Klerks e Weis, 1987; Duquesne *et al.*, 2000).

As substâncias contendo cobre são testadas para toxicidade e genotoxicidade em vários organismos. Por causa da contradição nos resultados não se tem ainda uma resposta clara sobre o potencial mutagênico do cobre. O sulfato de cobre causou aumento dose-dependente na incidência de micronúcleos (MN) (Bhunya e Pati, 1987) e aumento na frequência de aberrações cromossômicas (Agarwal *et al.*, 1990) em medula óssea de camundongo albino Suíço, mas não induziu a incidência de MN em medula óssea de camundongo CBA (Tinwell e Ashby, 1990). O cobre foi detectado como genotóxico pelas testes microbianos MutatoxTM e SOS, e não se mostrou mutagênico em Teste de Salmonella/microsoma e *E.coli* WP2 test (Codina *et al.*, 1995). O potencial clastogênico de sulfato de cobre foi observado em cultura de células de galinha *in vivo* (Bhunya e Jena, 1996). Cu(II) não se mostrou mutagênico em ensaios com plantas (Steinkellner *et al.*, 1998). Aumento dose-dependente na incidência de MN e em quebras no DNA foram observados em mexilhão tratado com Cu(II) (Bolognesi *et al.*, 1999).

6. As planárias como organismos-teste

As planárias são organismos multicelulares complexos, com diferenciação de órgãos e tecidos (Fig. 6). Pertencem ao Filo Platyhelminthes, classe Turbellaria, ordem Seriata. Existem espécies terrestres, dulciaquícolas, e marinhas, todas de vida livre. As planárias aquáticas pertencem à subordem Tricladida, infra-ordem Paludicola, de água doce, que representa o grupo mais avançado dentro dos tricladidos.

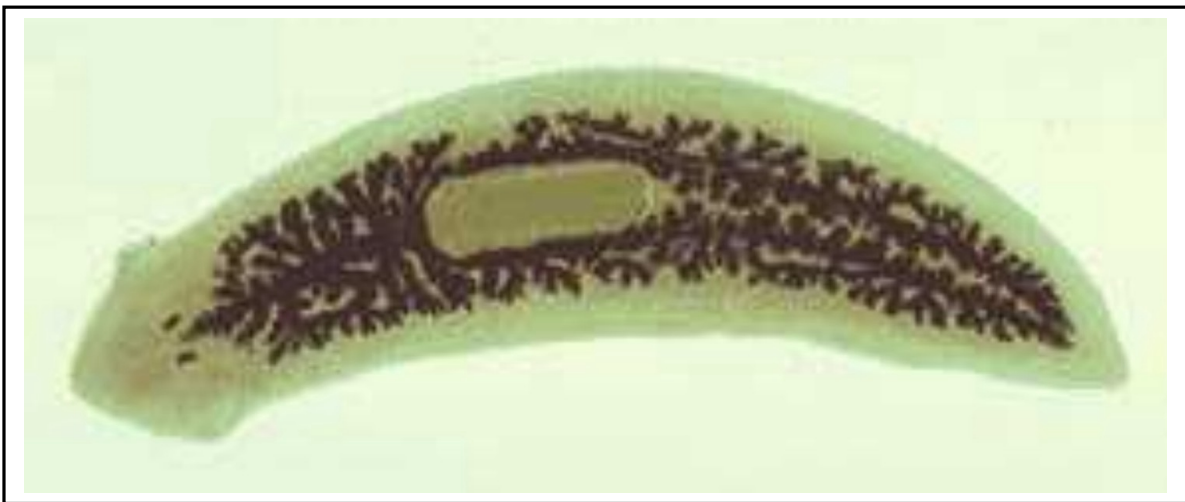


Fig. 6. Planária *Dugesia* sp.

As espécies autóctones do Rio Grande do Sul são incluídas na família Dugesidae, gênero *Dugesia* (Wirth e Hauser, 1990), a qual pertence *Dugesia schubarti*, espécie empregada neste estudo. Elas vivem em rios e lagoas, debaixo de pedras, entre raízes e folhas de plantas aquáticas ou mesmo no fundo das águas. São consideradas consumidoras de terceira ordem, alimentando-se com espécies concentradoras de substâncias presentes no meio como larvas, insetos (mosquitos e borrachudos), moluscos, anelídeos, zooplâncton (cladóceros e rotíferos). Podem ser sexuadas ou assexuadas, multiplicando-se por

fissiparidade. As planárias sexuadas do Sul do Brasil são hermafroditas, realizando sempre fecundação cruzada.

As espécies *Dugesia schubarti* e *Dugesia tigrina*, endêmicas do Sul do Brasil, mostraram-se bioindicadoras naturais da qualidade da água. A *Dugesia schubarti* é muito sensível à poluição orgânica, encontrada exclusivamente em águas correntes, limpas, e bastante oxigenadas. *Dugesia tigrina* é mais resistente à poluição, sendo encontrada em águas paradas e pantanosas. Elas são facilmente cultivadas e a sua vasta distribuição natural permite a realização de testes em laboratório e *in situ*.

A relativa simplicidade das planárias, a sua plasticidade de desenvolvimento, e posição na escala evolutiva, faz deste organismo um sistema muito atrativo para estudos básicos de processos biológicos. Apesar da pesquisa ainda insuficiente sobre as planárias, vários motivos relacionados com as suas características biológicas tornam-as especialmente recomendadas como organismo-teste para avaliações da genotoxicidade de substâncias químicas e amostras ambientais.

As planárias de água doce possuem habilidade extraordinária de regeneração, que faz deste organismo modelo clássico para estudo deste fenômeno (revisado por Alvarado e Newmark, 1998). Elas foram utilizadas também com sucesso em estudos de toxicidade (Johnson *et al.*, 1994; Hutchinson *et al.*, 1997; Inderberg *et al.*, 1999; Kalafatic e Tomaskovic, 2000), carcinogênese e teratogênese (revisado em Best e Morita, 1991; Schaffer, 1994), assim como em estudos ecotoxicológicos (Villar *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993; Ugazio *et al.*, 1997). No Brasil, Sáfyadi (1993) empregou *Dugesia tigrina* para avaliar o grau de regeneração, capacidade de reação ao toque e morte após exposição aguda a compostos metálicos (mercúrio, cobre, cádmio, cromo e zinco) e Preza e Smith (2001) estudaram a toxicidade aguda do dicromato de potássio utilizando a mesma espécie. Lau

(1998) testou a resposta das espécies *Dugesia tigrina* e *Dugesia schubarti* a agentes físicos e químicos. Nelson *et al.* (1994) verificaram a suscetibilidade de *Dugesia tigrina* a pesticidas sob condições de campo, em relação ao uso desta espécie para biocontrole de larvas de mosquitos. Recentemente a planária tem sido empregada em estudos de neurotransmissores e de biologia molecular (Itoh e Igarashi, 2000; Cebria *et al.*, 2002; Asada *et al.*, 2002).

7. Metodologias utilizadas neste estudo

7.1. Teste Cometa

O Teste Cometa ou Eletroforese em Gel de Célula Única (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis test*) é um teste de genotoxicidade muito apropriado para detecção de danos no DNA em organismos sentinela por apresentar algumas vantagens: detecta muitos tipos de danos em vários tipos de células, fornece dados a nível celular, é simples, rápido, sensível e de baixo custo (Tice, 1995). O Ensaio Cometa apresenta ainda outras vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estes a necessidade de somente um pequeno número de células e não ser necessário a presença de células em divisão.

Existem dois tipos de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro, que detecta quebra dupla no DNA, e (b) tratamento alcalino, que detecta quebras simples de cadeia (SSB - *Single Strand Breaks*), diretas ou induzidas por lesões nas bases do DNA (como oxidação, metilação e outros adutos), cujo procedimento transforma essas anomalias em lesões álcali-lábeis (Fairbairn *et al.*, 1995). O Teste Cometa permite ainda estudos de reparo (Collins *et al.*, 1995; Hartmann e Speit, 1996) e detecção de diferentes tipos de poluentes genotóxicos utilizando enzimas de reparo específicas para diferentes tipos de dano no DNA (Collins *et al.*, 1993; Duthie e Collins, 1997).

Durante o teste, as células são englobadas em gel de agorose sobre uma lâmina para microscopia e submetidas a uma corrente elétrica, que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes de quebras (Singh *et al.*, 1988). Após a coloração com brometo de etídio, as lâminas são observadas no microscópio de fluorescência. Os núcleos intactos aparecem redondos (Fig. 7). Já nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma “cauda” de fragmentos, semelhante a um

cometa. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (Fairbairn *et al.*, 1995). Para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado (McKelvey-Martin *et al.*, 1993), mas somente é consenso que a visualização do "cometa", significa dano ao nível do DNA, podendo ser quebra simples, duplas e/ou lesões álcali-lábeis (McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn, 1995; Tice, 1995).

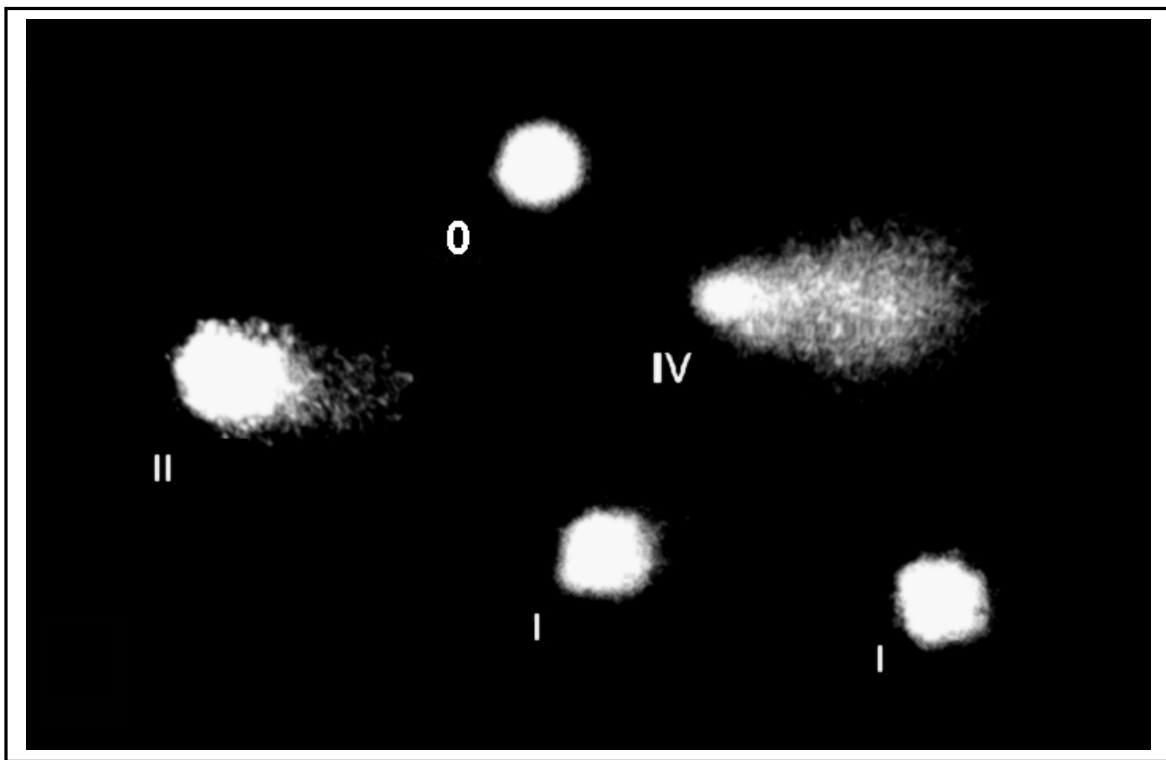


Figura 7. Imagens de diferentes classes de dano (0 – IV) em células de Planária no Teste Cometa.

A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras: uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular reticulada, e outra forma é classificar visualmente em diferentes classes (0 – IV) as células com dano (Fig. 7), podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral de uma população de

células (Collins *et al.*, 1997; Speit e Hartmann, 1996). O crescente interesse e importância do Ensaio Cometa levou o desenvolvimento de um analisador de imagens, que serve para quantificar a cromatina que migrou para fora do núcleo.

O teste Cometa tem sido aplicado amplamente como teste indicativo de genotoxicidade em biomonitoramento humano e ambiental (revisado por Tice, 1995). Atualmente o método já foi adaptado a qualquer tipo de célula isolada (Miyamae *et al.*, 1998), além de ser aplicado a diversos organismos. Como por exemplo, avaliações de genotoxicidade em sistemas aquáticos utilizando SCGE já foram descritas com diferentes tecidos de peixes, *Ameiurus nebulosus* e *Cyprinus carpio* (Pandurangi *et al.*, 1995); com moluscos, *Pantunopecten yessoensis* e *Tapes japonica* (Sasaki *et al.*, 1997a); e também com algumas espécies de girinos, *Rana clamitans*, *Bufo americanus* (Ralph *et al.*, 1997) e *Rana catesbeiana* (Clements *et al.*, 1997); além de ponta de raiz de *Vicia faba* (Koppen e Vershaeve, 1996). Sistemas terrestres também são monitorados utilizando Ensaio Cometa em diferentes organismos como minhocas, *Eusemia foetida* (Vershaeve e Gilles, 1995; Salagovic *et al.*, 1996); roedores, *Ochrotomys nuttalli* (Nascimbeni *et al.*, 1991) e *Ctenomys torquatus* (Silva, 1999; Silva *et al.*, 2000a); e o próprio homem (Lebailly *et al.*, 1998). Assim, além das células sanguíneas, as células de outros tecidos também podem ser utilizadas, desde que sejam liberadas em forma de suspensão (Sasaki *et al.*, 1997b; Silva *et al.*, 2000b).

7.2. Detecção de Proteínas de Estresse

O uso das proteínas de choque térmico (HSP – Heat Shock Proteins) tem sido recomendado como um indicador da exposição tóxica em vários organismos (revisado por Sanders, 1993a; Goering, 1995; de Pomerai, 1996). Os HSP pertencem à grande família das proteínas de estresse, incluindo membros induzíveis e constitutivamente expressos (Sanders, 1990). A classificação dos HSP é feita de acordo com o seu peso aparente, sendo que hsp90 (83-90kDa), hsp70 (66-78kDa) e hsp60 (58-60kDa) são os representantes mais conhecidos (Morimoto *et al.*, 1990; Nover, 1991; Sanders, 1993b). A função destas proteínas dentro da célula em condições fisiológicas é atuarem como chaperonas moleculares que mediam o transporte e o dobramento correto de outros polipeptídeos (Ellis e Van der Vies, 1991, Fig. 8). A exposição a uma variedade de fatores maléficos, tais como temperatura elevada, metais pesados, substâncias tóxicas, entre outros, provoca aumento no nível destas proteínas (Schlesinger, 1990; Welch, 1993).

A utilidade da concentração de proteínas de estresse como bioindicador na ecotoxicologia é apontada por vários autores (revisado por Goering, 1995). Proteínas de estresse foram induzidas após exposição aos agentes físicos e químicos em mexilhão *Mytilus galloprovincialis* e em *Haliotis rufescens* (Snyder *et al.*, 2001). Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos têm efeito inibidor na expressão das proteínas hsp60 e hsp70 em artrópodo *Ampelisca abdita* (Werner *et al.*, 1998). Membros da família hsp60 são as principais proteínas induzidas em anfípodos após exposição a xenobióticos (Werner e Nagel, 1997). Aumento no nível do hsp60 após exposição ao cobre foi detectado em mexilhão (Sanders *et al.*, 1991; Sanders *et al.*, 1994a; Clayton *et al.*, 2000) e em nematodos

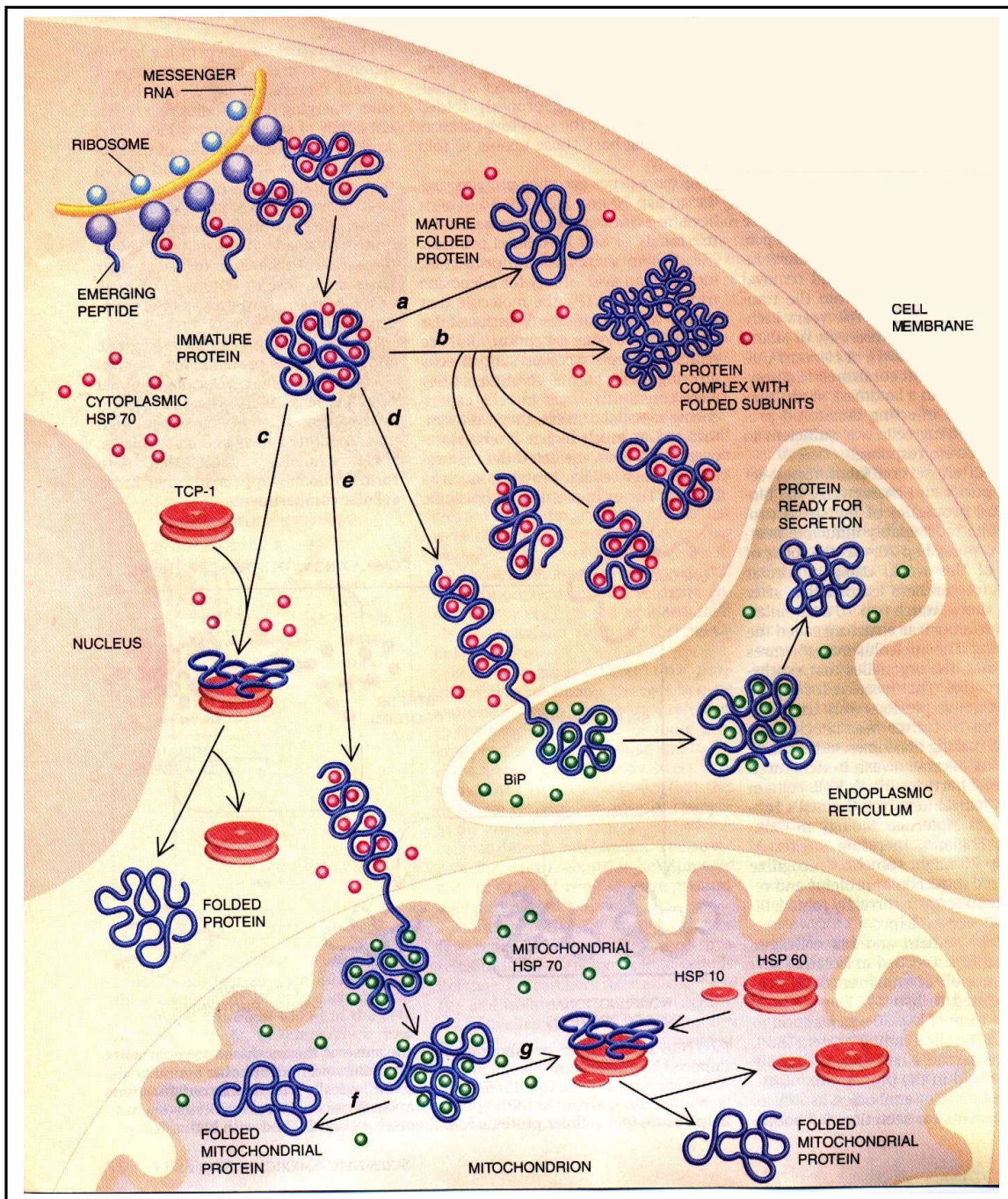


Figura 8. Algumas vias de dobramento e distribuição de proteínas dentro das células, controladas por proteínas de estresse das famílias hsp60 (hsp60, TCP-1) e hsp70 (hsp70, BiP) – adaptado de Welch (1993).

Plectus acuminatus (Kammenga *et al.*, 1998). Elevados níveis de cobre impedem a síntese de proteínas de estresse em resposta às temperaturas elevadas em embriões de ouriço do mar e podem inibir a síntese de proteínas reguladoras (Sanders e Martin, 1994). Indução de hsp60, por exposição crônica ao cobre em baixas concentrações, leva a aumento da resistência a uma variedade de poluentes em exposições subseqüentes (Wheelock *et al.*, 1999). Contudo, recentemente alguns dados apontam possíveis restrições na utilização das proteínas de estresse como bioindicadores universais em estudos ecotoxicológicos (revisado em Bierkens, 2000).

7.3. Determinação da Atividade de Catalase

O complexo sistema de defesa antioxidante celular está baseado no balanço da atividade de diversas enzimas, como a SOD citoplasmática e mitocondrial responsáveis pela dismutação do radical superóxido formando H_2O_2 , que por sua vez é transformado em água e oxigênio molecular pela atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase. A maioria das células aeróbias possui catalase. Em animais a catalase está presente em todos os órgãos, sendo a concentração mais alta encontrada no fígado e as mais baixas no cérebro, no coração e nos músculos esqueléticos. A atividade da catalase está localizada nos peroxissomas, organelas que contêm muitas enzimas geradoras de H_2O_2 , tais como glicolato oxidase e flavoproteína deshidrogenases envolvidas na β -oxidação dos ácidos graxos (Fig. 9).

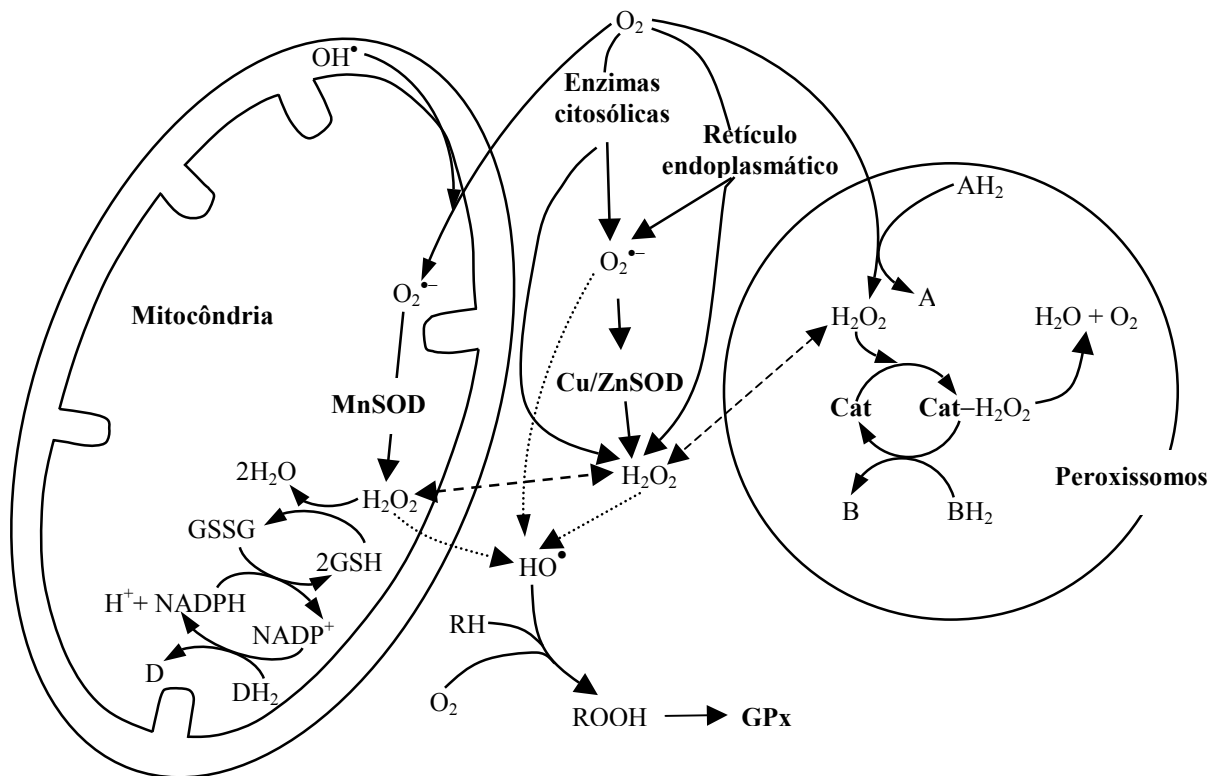


Figura 9. Produção intracelular e decomposição enzimática dos radicais livres. A molécula do oxigênio, ao difundir pelo sistema, pode vir a ser parcialmente reduzida ao radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, pela reação com metais ou pela ação de enzimas citosólicas. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutatona peroxidase (GPx) fazem parte do sistema antioxidante celular (adaptado de Boveris, 1998).

A catalase presente nos eritrócitos tem papel protetor contra H_2O_2 resultante da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ gerado no processo de autooxidação da hemoglobina no sangue. Os eritrócitos exibem também efeito protetor contra dano oxidativo em outros tecidos, onde o H_2O_2 difunde rapidamente.

A atividade da catalase em amostras biológicas pode ser determinada tanto pela decomposição do peróxido de hidrogênio, quanto pela liberação de oxigênio. Para concentração fixa do H_2O_2 , a velocidade inicial da reação seria proporcional da concentração de catalase presente. Decomposição do H_2O_2 pode ser medida diretamente pelo decaimento da absorbância em 240 nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Aebi, 1984). Os organismos aquáticos possuem as principais enzimas antioxidantes, incluindo a catalase, embora existam grandes diferenças quantitativas entre as espécies estudadas (revisado em Winston, 1991). Um efeito importante em resposta do estresse oxidativo induzido pelo cobre é a modulação da atividade destas enzimas antioxidantes. A atividade da catalase tem sido utilizada como bioindicador para exposição ao cobre em vários organismos, como mexilhão de água doce *Unio tumidus* (Doyotte *et al.*, 1997); mexilhão de água salgada *Mytilus galloprovincialis* (Regoli e Principato, 1995); marisco *Adamussium colbecki* (Regoli *et al.*, 1997, 1998); carpo *Cyprinus carpio* L. (Varanka *et al.*, 2001); e planta aquática *Lemna minor* L. (Teisseire *et al.*, 1998). Estes estudos mostraram que a exposição crônica ao cobre causa inibição da catalase, o que pode tornar os organismos mais suscetíveis aos contaminantes do ambiente.

II - OBJETIVOS

Tendo em vista o vasto uso do sulfato de cobre em algumas indústrias e nas lavouras do Rio Grande do Sul, e a importância de se avaliar possíveis danos causados nos seres vivos, o objetivo deste trabalho foi:

1. Estudar o potencial genotóxico do sulfato de cobre em Planária utilizando Teste Cometa;
2. Avaliar o potencial tóxico do sulfato de cobre empregando o método de imunodeteção das proteínas de estresse hsp60 em Planária;
3. Determinar atoxicidade do sulfato de cobre em Planária detectando alterações na atividade da enzima catalase;
4. Verificar a utilidade da Planária como organismo teste em estudos de biomonitoramento ambiental para contaminação química.

III - CAPÍTULO I

Genotoxic Effects Of Copper Sulphate in Freshwater Planarian

In Vivo Studied With the Single-Cell Gel Test

(Comet Assay)

Publicado em Mutation Research

Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay)

Temenouga Guecheva^{a,*}, João A.P. Henriques^a, Bernardo Erdtmann^b

^a Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Caixa Postal 15093, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Received 17 January 2001; received in revised form 14 May 2001; accepted 24 May 2001

Abstract

The alkaline single-cell gel electrophoresis, or comet assay, was used to evaluate the genotoxic potential of copper sulphate in planarians. Concentration-related increase in DNA damage was induced after 2 h and 7 days exposure to CuSO₄ dissolved in culture water. To study the influence of copper ions on the persistence of mutagen-induced DNA lesions, planarians were treated with methyl methanesulphonate (MMS), and further incubated in the absence (post-incubation) or presence (post-treatment) of CuSO₄. After 2 h of post-treatment enhanced persistence of DNA effects in relation to the corresponding post-incubation value was detected, which indicate inhibition of DNA repair by CuSO₄. At 4 h an increase of DNA migration in relation to the 2 h value was observed, which is significant for the post-incubation group. After 24 h, DNA damage decreased but was still significantly elevated in relation to the control. From our results, we conclude that planarians are suitable organisms for in vivo detection of copper genotoxicity in the comet assay, and can be used to assess both acute and chronic exposure to this chemical in aquatic ecosystems. The inhibition effect of copper ions on repair of MMS-induced DNA damage suggests that copper could modulate the genotoxic effects associated with complex mixture exposure in the environment. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Planarian; Aquatic monitoring; Copper sulphate; Alkaline comet assay; DNA damage; DNA repair

1. Introduction

Heavy metals are stable and persistent environmental contaminants. Chronic exposure and accumulation of metals by aquatic biota can result in tissue burdens that have adverse effects on the exposed organisms. Chemical determination of metal concentrations in water and in sediment may not give information about the severity of contamination, especially in the case of sub-lethal levels. Biological monitoring using sentinel species could allow a sensitive approach to

predict the potential risk of persistent contaminants like heavy metals [1]. To assess the risk for the environment, adequate systems reflecting quantitatively and qualitatively the effects of exposure are needed. The most suitable for such a system are organisms that are in direct contact with the contaminated compartments (sediment, water, air) [2]. The freshwater planarians live in the rivers and lakes under stones, roots and leaves of aquatic plants. They feed on larvae of insects, molluscs and annelids — organisms acting as bioconcentrators for a range of pollutants. The wide natural distribution of planarians permit relation of field to laboratory studies. Furthermore, they are easy to keep in the laboratory with minimal costs and

* Corresponding author. Fax: +55-51-316-60-84.
E-mail address: tguecheva@dna.cbiot.ufrgs.br (T. Guecheva).

care. Planarians have been used successfully to assess toxicity, teratogenesis and carcinogenesis [3].

Carcinogenic metals induce genotoxicity in a multiplicity of ways, either alone or by enhancing the effects of other chemical agents. Although, molecular genetic studies have shown that certain metal ions cause DNA damage, they give negative effects in most bacterial mutagenicity assays and the results obtained in cytogenetic and gene mutation assays with mammalian cells are controversial [4,5]. Recent studies have shown that metals, including iron, copper, chromium, and vanadium undergo redox cycling resulting in the production of reactive oxygen species (ROS) [6]. As a consequence, enhanced lipid peroxidation, DNA damage, and altered calcium and sulphohydril homeostasis occur. Furthermore, some metal ions exert higher affinities to amino acids as compared to nucleotides, leading rather to an inactivation of proteins involved in DNA replication, transcription and repair processes [7,8]. DNA damage, either induced by genotoxic (direct or via oxygen radicals) or co-genotoxic (e.g. inhibition of DNA repair) processes, may play an important role in the initiation of cancer. The comet assay provides a sensitive tool to investigate DNA damage and repair [9,10]. The alkaline version of this technique, introduced by Singh et al. [11], allows evaluation of DNA damage in individual cells, including double and single strand breaks, alkali-labile sites, DNA–protein cross-links, and incomplete excision repair events. The comet assay has proven to be extremely sensitive and useful in the area of genetic toxicology and environmental biomonitoring [10–13].

For this study, a broad-spectrum inorganic pesticide copper sulphate, widely used in agriculture in the State of Rio Grande do Sul (southern Brazil), was selected. Final destination of Cu is an aquatic environment, where it is highly accumulated by a number of organisms at different trophic levels [14]. Genotoxic and mutagenic effects of Cu compounds have been studied in a variety of test systems, and the results are contradictory [15–19]. Over the last decade, evidence is emerging for copper-induced mutagenesis via ROS production [20,21]. Epidemiology indicates that pre-conceptional paternal exposure to copper containing fumes and dust may contribute to higher incidence of cancer in the progeny [22]. Relation between

plasma copper levels and the risk of developing breast cancer in a case-cohort study was seen [23]. However, little is known about the genotoxic effects of copper on inhabiting organisms and there are no data in the literature about the effects of copper in the comet assay.

The aim of the present work was to investigate the genotoxic effects of copper sulphate in cells of in vivo exposed freshwater planarians by comet assay in order to evaluate the utility of planarians as sentinel species to assess the genotoxic risk of copper exposure in the aquatic environment.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Phosphate buffered saline (calcium- and magnesium-free), Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride), disodium ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), dimethyl sulfoxide, (DMSO), ethidium bromide (EtBr), methyl methanesulphonate (MMS) and copper sulphate were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Low melting point (LMP) agarose and normal agarose (electrophoresis grade) were obtained from Gibco-BRL (Grand Island, NY).

2.2. Animals

Asexual mixoploid ($2n/3n$) *Dugesia (Girardia) schubarti* was used for this study. A number of 13 basic cell types are described for planarians, 4 of them (neoblasts, nerve, epidermal and fixed parenchyma cells) constituting about 75% of the total cell number [24]. Despite the heterogeneous morphology of the cell population, the DNA content variation among nuclei in a single individual was shown to be small, and the diploid genome size measured for *D. polychroa* and *D. tigrina* was 2.64 and 3.76 pg, respectively [25]. There are no data in the literature for the DNA content in *D. schubarti* cells. In our study, the nuclei image diameter of “undamaged” cells was estimated to be approximately 22 μm .

In the laboratory, the planarians were cultivated in tanks with reconstituted water [26] at 19°C. They were fed on bovine liver once a week and the water was changed twice a week. About 3 days prior to the start of the experiment, 5–8 mm long planarians were

selected from the culture population. During this period as well as during the treatment, the planarians were not fed.

2.3. Toxicity test

The planarians were exposed to CuSO_4 dissolved in culture water at a range of concentrations for 24 h or for 7 days (solutions changed daily). For each treatment eight planarians in separate containers were analysed. The LC_{50} of 3.85×10^{-5} M CuSO_4 (24 h) and 1.5×10^{-5} M CuSO_4 (7 days) were determined.

2.4. Treatment of planarians and sample preparation

Since, this is the first attempt to evaluate DNA damage in planarians by the comet assay, all experiments were repeated in four to eight independent tests in order to estimate the variability of the method. Four animals per treatment group were exposed in each experiment and used as a pooled sample for analysis. At the end of the treatment, the planarians (whole bodies) were disintegrated mechanically by pressing through fine gauze and trypsinised with trypsin 0.4% in phosphate buffer, pH 6.8, for 30 s. The cell suspension (10 μl) was then immediately mixed with 100 μl 0.5% LMP agarose and used in the comet assay. This procedure was determined by preliminary experiments in which different solutions (0.075 M NaCl/0.024 M Na_2EDTA ; HBSS/20 mM EDTA/10% DMSO; trypsin 0.15% for 2 min, etc.) and techniques (i.e. homogenisation/mincing with centrifuging) for the cell suspension preparation were compared in order to achieve the desired cell density with a minor percentage of apoptotic like (dead) cells.

2.4.1. Dose-response studies

Planarians were exposed to copper sulphate dissolved in culture water at concentrations of 1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} and 5.0×10^{-5} M in the 2 h tests, or at concentrations of 0.1×10^{-5} , 0.25×10^{-5} , 0.5×10^{-5} , 0.75×10^{-5} and 1.0×10^{-5} M (solutions changed daily) in the 7 days tests.

2.4.2. Defining the dose for repair studies

The planarians were treated for 2 h with MMS at concentrations of 4×10^{-5} , 8×10^{-5} and 16×10^{-5} M and further incubated for 2 h in culture water

(post-incubation) or 2 h in the presence of 2×10^{-5} M CuSO_4 (post-treatment).

2.4.3. Repair kinetics studies

Planarians were treated 2 h with MMS (8×10^{-5} M) and further incubated for 2, 4 and 24 h in culture water (post-incubation) or for 2, 4 and 24 h in the presence of 2×10^{-5} M CuSO_4 (post-treatment). Untreated planarians were also incubated for 2, 4 and 24 h in culture water or in the presence of CuSO_4 (2×10^{-5} M).

2.5. Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [11]. Briefly, 10 μl ($\sim 10,000$ cells) of the cell suspension were mixed with 100 μl 0.5% LMP agarose, spread on a normal agarose pre-coated microscope slide and placed at 4°C for 5 min to allow for solidification. The cells were lysed in high salt and detergent and placed in a horizontal electrophoresis box. Subsequently, the cells were exposed to alkali (300 mM NaOH/1 mM Na_2EDTA , pH 13) for 20 min at 4°C , to allow for DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. For electrophoresis, an electric current of 300 mA (25 V) was applied for 20 min at 4°C . In order to demonstrate the electrophoresis conditions and efficiency, negative and positive controls from human blood were included for each experiment. After electrophoresis, the slides were neutralised, stained with ethidium bromide, and analysed at $200\times$ magnification using a fluorescence microscope equipped with an excitation filter of BP 546/12 nm and a barrier filter of 590 nm. A number of 100 randomly selected cells per sample were scored visually according to tail intensity into five classes (from undamaged, zero, to maximally damaged, four). Thus, the damage score for each sample can range from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (maximum damaged: 100 cells \times 4). Apoptotic like cells (the head and the tail distinctly separated) were also observed but not evaluated. Although visual scoring is subjective, it was found that it shows a clear relationship to the percentage of DNA appearing in the tail, as measured by computer image analysis [27]. Comet tail lengths (the distance of DNA migration from the body of the nuclear core) were also measured using calibrated ocular scale for 2 h CuSO_4 treatment.

2.6. Statistical analysis

Differences in the extent of DNA strand breakage, between the control and the treatments in dose-response studies, were tested for significance using ANOVA analysis of variance with Dunnett's multiple comparison test and Pearson correlation. For repair studies two-way ANOVA with Bonferroni post-tests were applied. The values in repair kinetics studies were compared using Student's *t*-test. An alpha level of 0.05 was used to determine significance in all statistical analyses.

3. Results

The genotoxic effect of CuSO₄ in the comet assay with planarian was estimated by three different parameters: (1) damage score; (2) mean comet tail length; (3) and percent of damaged cells (cells with tail under the test conditions used), (see Table 1). Significantly elevated DNA damage was observed at concentration range of 3×10^{-5} to 5×10^{-5} M CuSO₄. The damage score was selected for further evaluation as the distance of DNA migration was shown to reached a plateau [28]. A concentration-related increase in the DNA damage induced by 2 h CuSO₄ treatment at concentration range of 1×10^{-5} to 5×10^{-5} M was observed ($r = 0.984$; $P < 0.001$). Fig. 1 shows the distribution of DNA damaged cells among animal groups treated at different salt concentrations and a control group. It can be seen that the comets in the same treatment group show a heterogeneous distribution. The high percentage of cells, which remain undamaged

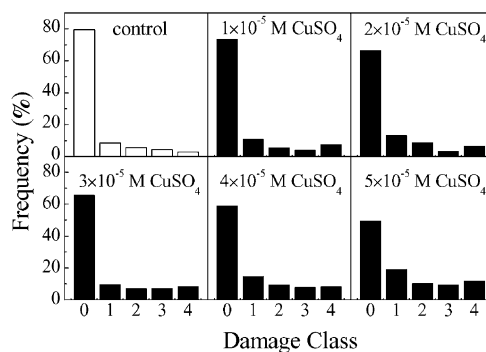


Fig. 1. Distribution of DNA damage observed in planarians exposed to a range of CuSO₄ concentrations for 2 h.

might be a consequence of the heterogeneous cell population. According to the results of the 2 h treatment, the concentration of 2×10^{-5} M CuSO₄ was chosen for the post-treatment experiments, which itself did not cause significant DNA damage in the comet assay.

Fig. 2 shows the effects of 2 h MMS treatment and subsequent 2 h post-incubation in culture water or 2 h post-treatment with CuSO₄ in the comet assay with planarians. MMS treatment caused dose-dependent increase in DNA damage at concentration range of 4×10^{-5} to 16×10^{-5} M, which was reduced significantly after 2 h of post-incubation at concentrations of 8×10^{-5} M ($P < 0.01$) and 16×10^{-5} M ($P < 0.05$). In the presence of copper, the DNA damage decreased to a lesser extent. The concentration of 8×10^{-5} M MMS was selected to monitor the repair kinetics of MMS-induced DNA damage for a period of 24 h.

Table 1
Genotoxic effects caused by CuSO₄ in planarians in vivo with the comet assay^a

Concentration CuSO ₄ (M)	Damage score (0–400)	Damaged cells (%)	Tail length ^b (μm)
0	42.6 ± 4.4	20.4 ± 2.2	7.33 ± 0.74
1×10^{-5}	60.8 ± 9.3	26.4 ± 3.3	8.70 ± 1.03
2×10^{-5}	69.7 ± 10.2	33.3 ± 5.6	8.86 ± 1.21
3×10^{-5}	82.8 ± 8.8**	34.3 ± 3.6*	12.84 ± 1.93*
4×10^{-5}	87.2 ± 7.3**	40.9 ± 3.6**	16.02 ± 1.87**
5×10^{-5}	111.1 ± 9.5**	50.3 ± 4.4**	23.76 ± 1.46**

^a Mean value ± S.E. of six to eight experiments.

^b The mean nuclei diameter of undamaged cells was 22.69 ± 0.40 μm.

* Significantly different from the control value $P < 0.05$.

** Significantly different from the control value $P < 0.01$.

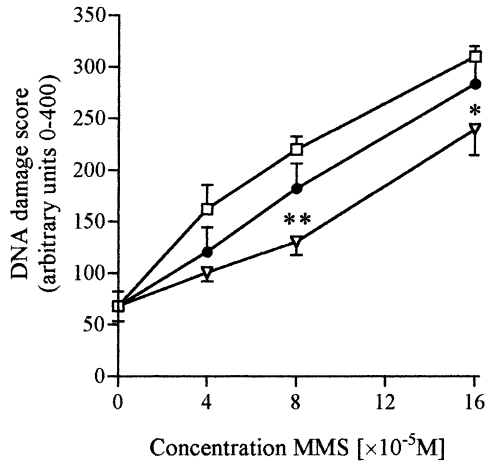


Fig. 2. The effects of MMS treatment, post-incubation, and post-treatment with CuSO₄ on DNA migration in comet assay with planarians: (□), 2 h MMS; (▽) 2 h MMS and 2 h post-incubation in culture water; and (●), 2 h MMS and 2 h post-treatment with 2 × 10⁻⁵ M CuSO₄. Mean and range of four to five experiments. (*) Significantly different from the corresponding MMS treatment value *P* < 0.05; and (**), *P* < 0.01.

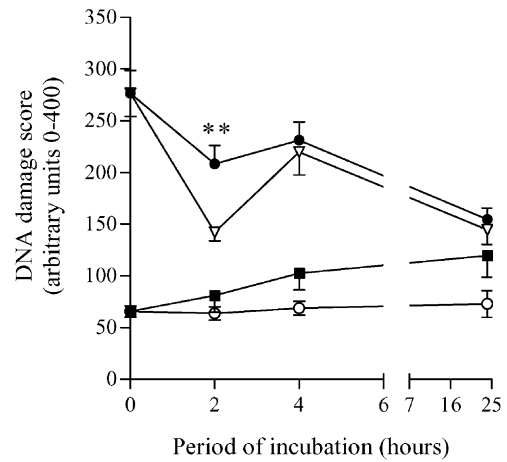


Fig. 3. Repair kinetics of MMS-caused DNA damage in presence of CuSO₄ in planarians. Planarians were treated for 2 h with MMS (8 × 10⁻⁵ M) and further incubated in: (▽), culture water post-incubation; or (●), in the presence of 2 × 10⁻⁵ M CuSO₄ post-treatment. Untreated planarians were also incubated in: (○), culture water; or (■) in the presence of 2 × 10⁻⁵ M CuSO₄. Mean and range of five to seven experiments. (**) Significantly different from the corresponding post-incubation value, *P* < 0.01.

DNA damage induced by 2 h MMS (8 × 10⁻⁵ M) treatment decreased significantly in relation to the initial level after 2 h of post-incubation (Fig. 3). In the presence of metal salt, enhanced persistence of DNA effects in relation to the corresponding post-incubation value was detected (*P* < 0.01). At 4 h, an increase of DNA damage in relation to the 2 h value was observed, which is significant for the post-incubation group (*P* < 0.05). After 24 h, DNA effects decreased but still persisted in planarian cells in relation to the control. DNA migration in control animals remained constant during 24 h incubation period. Incubation with 2 × 10⁻⁵ M CuSO₄ (the concentration used in post-treatment experiments), causes slight increase in DNA migration after 24 h, which is not significant in relation to the control. The distribution of DNA damage in planarians observed after MMS treatment followed by different periods of post-incubation or post-treatment with CuSO₄ is shown in Fig. 4. It can be seen that the frequency of damaged cells in post-treatment protocol (damage classes 1–4), remains higher than that of post-incubation protocol for all sampling times.

Fig. 5 shows the results of 7 days CuSO₄ treatment at concentration range of 10⁻⁶ to 10⁻⁵ M. Sig-

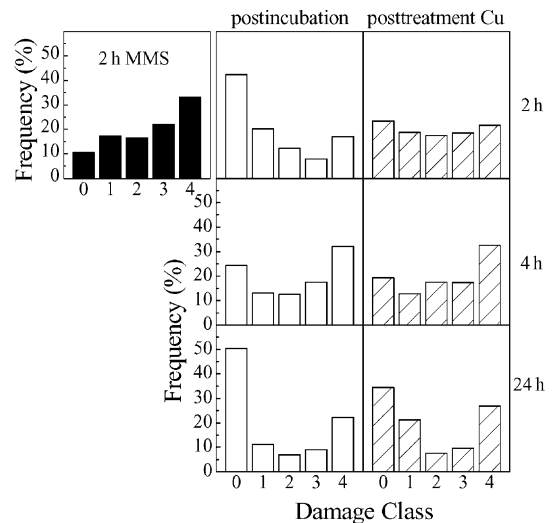


Fig. 4. Distribution of DNA damage in planarians observed after MMS treatment followed by different periods of post-incubation or post-treatment with CuSO₄. See the legend of Fig. 3 for details.

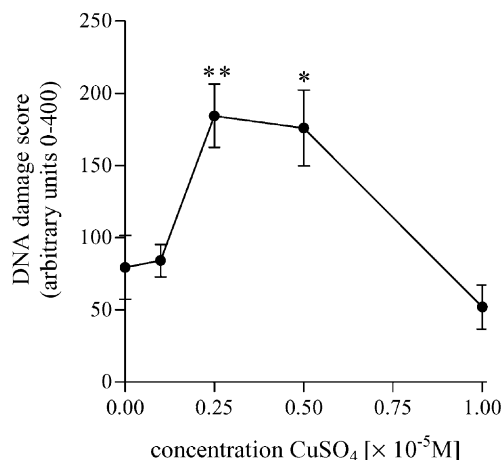


Fig. 5. Genotoxic effect caused by 7 days CuSO₄ treatment in planarians. Mean and range of four to six experiments. (*) Significantly different from the control value, $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

nificantly elevated DNA damage was observed at concentrations 0.25 ($P < 0.01$) and 0.5×10^{-5} M CuSO₄ ($P < 0.05$), that represent 15 and 30% of the LC₅₀ (7 days), respectively. The highest concentration tested (1×10^{-5} M) induced toxic effects in treated animals resulting in parallel decrease of the genotoxic effects.

4. Discussion

Our present results showed genotoxic effects of copper sulphate in the comet assay of in vivo exposed planarians. Under the experimental conditions, a concentration-related DNA damage was induced by Cu(II). The heterogeneity of the response in the same treatment group may be a function of cell type as well as of the kind of DNA damage. After chronic exposure of planarians to copper sulphate, genotoxic effects were detected at concentrations 10 times lower as compared to those that show positive results in the 2 h treatment. Our data are in agreement with those of Bolognesi et al. [1], that reported Cu-induced DNA strand breakage in mussels detected by the alkaline elution technique. In the presence of available cellular reductants (i.e. ascorbic acid, glutathione, and *N*-acetylcysteine), copper and iron may play a catalytic role in the initiation of free radical reactions under aerobic conditions [29,30]. The ROS generated by this process could attack DNA, leading to base

damage and DNA strand excision. The true strand breaks and/or the strand breaks formed as an intermediate step in excision repair of altered bases could explain the increased DNA migration in the comet assay with planarians after copper sulphate treatment.

The comet assay does not necessarily predict the mutagenic potential of the test compound, since the effects seen for some substances mainly occur as a consequence of an error-free DNA repair process [31]. However, an interference with this process can modulate the genotoxicity in combination with other DNA damaging agents. To study the influence of copper ions on the persistence of mutagen-induced DNA lesions, planarians were treated with methyl methanesulphonate (MMS), direct mutagen causing DNA-alkylation, and further incubated in the absence (post-incubation) or presence (post-treatment) of CuSO₄. The alkylated DNA is sensitive to degradation at alkali-labile sites, where the rate of depurination is increased and the abasic sites are transformed into strand breaks. The enhanced persistence of MMS-induced DNA damage after 2 h post-treatment with copper sulphate, in relation to the corresponding post-incubation value (Fig. 3), can be explained by the inhibition of polymerisation/ligation steps of DNA excision repair. These steps were shown to be very sensitive towards the action of Cd(II), Pb(II), Co(II), Ni(II) and As(III) [7]. There is no evidence for DNA polymerase or DNA ligase inhibition by Cu(II), but it was shown for at least one class of Mg(II) dependent enzymes, designated MutT in *Escherichia coli* and MTH1 in humans [32]. The mechanisms proposed were competition with essential metal ions and/or structural changes of the enzymes through -SH oxidation, which is apparently common for the transition metals [7,8].

Contrary to the in vitro studies, which indicate rapid repair of DNA damage in the comet assay [33], MMS-treated animals in our experiment showed an increased DNA migration value after 4 h post-incubation in relation to the 2 h value (Fig. 3). Similar phenomenon for DNA damage in comet assay was reported by De Boeck and Kirsch-Volders [2] in *Nereis virens* as a result of continuous EMS treatment. One possible explanation for the second peak could be the induction of glycosylase and/or nuclease activity through de novo protein synthesis. Induction of increased 3 mA DNA glycosylase II synthesis takes

place in the adaptive response to alkylation damage in *E. coli* [34]. Mutants defective in the gene encoding 3 mA DNA glycosylase II are very sensitive to MMS, despite the presence of normal levels of constitutive 3 mA DNA glycosylase I. This suggests that one or more alkylation products are recognised as substrates only by the inducible enzyme [34]. There is evidence of a 3 mA DNA glycosylase activity in mammalian cells, with the broad range of substrate specificity characteristic of the *E. coli* 3 mA DNA glycosylase II activity, but there are no compelling indications that expression of this enzyme is transcriptionally regulated [35]. The gene for 3 mA DNA glycosylase activity in *Saccharomyces cerevisiae* is transcriptionally induced when cells are exposed to alkylating agents [36]. However, it is also responsive to treatment with a diverse array of DNA damaging agents, including UV-radiation and UV-mimetic chemicals [37]. The lower relative increase of DNA migration in 4 h post-treatment protocol, as compared to the post-incubation one (Fig. 3), may be caused by copper inhibition of protein synthesis required for the induction of novel repair mechanism(s). Such a inhibition was reported for Cd(II) [4] and Co(II) [38]. On the other hand, if the delay in DNA breaks rejoining in post-treatment group at 2 h is overcome at 4 h, the similar level of DNA damage in post-incubation and post-treatment protocols at 4 h could indicate that the induced activity is not affected by copper. As nothing is known about DNA repair in planarians, only assumptions can be made.

DNA migration in MMS-treated animals was still significantly elevated after 24 h of post-incubation in relation to the control group. This result agrees with the previous *in vivo* studies that show positive results in comet assay 24 h after MMS treatment in multiple mouse organs [39] and in *Rana clamitans* tadpoles [40]. We can observe in Fig. 4 that the frequency of highly damaged cells (damage class 4) remains almost unaltered during 24 h period. The reduced repair capacity was shown to be a general feature of differentiated or non-dividing cells [27,41,42].

Our results, in the comet assay showed a relatively high inter-experimental variation. This may result from different susceptibility of the animals and/or of a heterogeneous cell population obtained. The different size of planarians can also contribute for unequal bioavailability of tested chemical reflecting in the

heterogeneous distribution of DNA damaged cells. However, four to six experiments provided statistically reliable data. The high DNA damage observed in control group for all experiments may result from DNA breaks formed during sample preparation or can implicate physiological processes, as a damage score at toxic concentration of CuSO₄ (i.e. 1×10^{-5} M in 7 days treatment) was lower than that in control animals.

From our results, we conclude that planarians are suitable organisms for *in vivo* detection of copper genotoxicity in the comet assay, and can be used to assess both acute and chronic exposure to this chemical in aquatic ecosystems. The inhibition effect of copper ions on repair of MMS-induced DNA damage suggests that copper could modulate the genotoxic effects associated with complex mixture exposure in the environment. However, further knowledge of DNA repair mechanisms in planarians is necessary in order to support repair studies with these organisms by comet assay.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr. Günter Speit for introducing us to the comet assay and to Dr. Martin Brendel for critical reading of the manuscript. T. Guecheva held a CAPES doctoral grant and was supported by GENOTOX.

References

- [1] C. Bolognesi, E. Landini, P. Roggieri, R. Fabbri, A. Viarengo, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environ. Mol. Mutagen.* 33 (1999) 287–292.
- [2] M. De Boeck, M. Kirsch-Volders, *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 82–90.
- [3] J.B. Best, M. Morita, Toxicology of planarians, *Hydrobiologia* 277 (1991) 375–383.
- [4] E.T. Snow, Metal carcinogenesis: mechanistic consideration, *Pharm. Ther.* 53 (1992) 31–65.
- [5] T.G. Rossman, Metal mutagenesis, in: R.A. Goyer, G.C. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals*, Springer, New York, 1995, pp. 373–403.
- [6] S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 321–336.
- [7] A. Hartwig, Current aspects in metal genotoxicity, *BioMetals* 8 (1995) 3–11.

- [8] K.S. Kasprzak, W. Bal, D.W. Porter, K. Bialkowski, Studies on oxidative mechanisms of metal-induced carcinogenesis, in: M. Dizdaroglu, A.E. Karakaya (Eds.), *Advances in DNA Damage and Repair*, Kluwer Academic Publishers, New York, 1999, pp. 193–208.
- [9] V.J. McKelvey-Martin, M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo, A. Collins, The single-cell gel electrophoresis (comet assay): an European review, *Mutat. Res.* 288 (1993) 47–63.
- [10] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339 (1995) 37–59.
- [11] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [12] R.R. Tice, Applications of the single-cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants, in: F.M. Butterworth (Ed.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, 1995, pp. 314–327.
- [13] A.R. Collins, M. Dusinska, M. Franklin, M. Somorovska, H. Petrovska, S. Duthie, M. Panayiotidis, K. Raslova, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 139–146.
- [14] P.L. Klerks, J.S. Weis, Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review, *Environ. Pollut.* 45 (1987) 173–205.
- [15] K. Agarwal, A. Sharma, G. Talukder, Clastogenic effects of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo, *Mutat. Res.* 243 (1990) 1–6.
- [16] H. Tinwell, J. Ashby, Inactivity of copper sulphate in a mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutat. Res.* 245 (1990) 223–226.
- [17] J.C. Codina, C. Pérez-Torrente, A. Pérez-García, F.M. Cazorla, A. de Vicente, Comparison of microbial tests for detection of heavy metal genotoxicity, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29 (1995) 260–265.
- [18] S.P. Bhunya, G.B. Jena, Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo test system, *Mutat. Res.* 367 (1996) 57–63.
- [19] H. Steinkellner, K. Mun-Sik, C. Helma, S. Ecker, T.H. Ma, O. Horak, M. Kundi, S. Knasmüller, Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1998) 183–191.
- [20] L.K. Tkeshelashvili, T. McBride, K. Spence, L.A. Loeb, Mutation spectrum of copper-induced DNA damage, *J. Biol. Chem.* 266 (10) (1991) 6401–6406.
- [21] T.M. Reid, D.I. Feig, L.A. Loeb, Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals, *Environ. Health Perspect.* 102 ((Suppl. 3)) (1994) 57–61.
- [22] L.M. Anderson, K.S. Kasprzak, J.M. Rice, Preconception exposure of males and neoplasia in their progeny: effects of metals and consideration of mechanisms, in: A.F. Olshan, D.R. Mattison (Eds.), *Male-Mediated Development Toxicity*, Plenum Press, NY, 1994, pp. 129–140.
- [23] K. Overvad, D.Y. Wang, J. Olsen, D.S. Allen, E.B. Thorling, R.D. Bulbrook, J.L. Hayward, Copper in human mammary carcinogenesis: a case-cohort study, *Am. J. Epidemiol.* 137 (4) (1993) 409–414.
- [24] J. Bagañá, R. Romero, Quantitative analysis of cell types during growth, de-growth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*, *Hydrobiologia* 84 (1981) 181–194.
- [25] T.R. Gregory, P.D.N. Hebert, J. Kolasa, Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods, *Heredity* 84 (2000) 201–208.
- [26] R. Cabridenc, Dureza (Teores em Sais Minerais), in: *Les bioassais en Ecotoxicologie*, IRCHA, IV, São Paulo, 1979, p. 3.
- [27] A.R. Collins, A.-G. Ma, S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells, *Mutat. Res.* 336 (1995) 69–77.
- [28] P.L. Olive, D. Wlodek, R.E. Durand, J.P. Banáth, Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Exp. Cell Res.* 198 (1992) 259–267.
- [29] R.S. Britton, Metal-induced hepatotoxicity, *Semin. Liver Dis.* 16 (1) (1996) 3–12.
- [30] J. Ueda, M. Takai, Y. Shimazu, T. Ozawa, Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission, *Arch. Biochem. Biophys.* 357 (2) (1998) 231–239.
- [31] G. Speit, S. Hanelt, R. Helbig, A. Siedel, A. Hartmann, Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis, *Toxicol. Lett.* 88 (1996) 91–98.
- [32] D.W. Porter, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, M.J. Fivash Jr., K.S. Kasprzak, Sensitivity of *Escherichia coli* (MutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II), *Carcinogenesis* 18 (1997) 1785–1791.
- [33] A. Hartmann, K. Herkommer, M. Glück, G. Speit, DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (comet assay), *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 180–187.
- [34] P. Karran, T. Hjelmgren, T. Lindahl, Induction of a DNA glycosylase for *N*-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents, *Nature* 296 (1982) 770–773.
- [35] C.T. Gombar, E.J. Katz, P.N. Magee, M.A. Sirover, Induction of the DNA repair enzymes uracil DNA glycosylase and 3-methyladenine DNA glycosylase in regenerating rat liver, *Carcinogenesis* 2 (1981) 595–599.
- [36] J. Chen, B. Derfler, L. Samson, *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the AlkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage, *EMBO J.* 9 (1990) 4569–4575.
- [37] J. Chen, L. Samson, Induction of *S. cerevisiae* MAG 3-methyladenine DNA glycosylase transcript levels in response to DNA damage, *Nucl. Acids Res.* 19 (1991) 6427–6432.
- [38] A.C. Leitão, R.A. Soares, J.S. Cardoso, H.C. Guillobel, L.R. Caldas, Inhibition and induction of SOS responses in *E. coli* by cobalt chloride, *Mutat. Res.* 286 (1993) 173–180.
- [39] Y.F. Sasaki, E. Nishidate, F. Izumiyama, N. Matsusaka, S. Tsuda, Simple detection of chemical mutagens by the alkaline

- single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), *Mutat. Res.* 391 (1997) 215–231.
- [40] S. Ralph, M. Petras, R. Pandrangi, M. Vrzoc, Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1996) 112–120.
- [41] E. Kaminskas, J.C. Li, Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes, *Mutat. Res.* 274 (1992) 103–110.
- [42] A.A.W.M. Van Loon, E. Sonneveld, J. Hoogerbrugge, G.P. van der Schans, J.A. Grootegoed, P.H.M. Lohman, R.A. Baan, Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionising radiation, *Mutat. Res.* 294 (1993) 139–148.

IV - CAPÍTULO II

Stress Protein Response and Catalase Activity in Freshwater

Planarian *Dugesia (Girardia) schubarti*

Exposed to Copper

Submetido à Ecotoxicology and Environmental Safety

**Stress Protein Response and Catalase Activity in Freshwater Planarian *Dugesia*
(*Girardia*) *schubarti* Exposed to Copper**

Temenouga Guecheva¹, Bernardo Erdtmann² and João A. P. Henriques^{1*}

1 – Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brazil.

2 – Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brazil.

Running title: **Copper toxicity in Planarian**

***Correspondence to:**

João A. P. Henriques

Centro de Biotecnologia – UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421

Caixa Postal 15005

CEP 91501-970, Porto Alegre – RS

BRAZIL

Fax: (+5551) 3316 60 84

E-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Abstract

The hsp60 expression pattern and catalase activity in freshwater Planarian *Dugesia schubarti* exposed to copper under laboratory conditions were investigated. In the hsp60 induction experiments, planarians were exposed to a range of copper concentrations (0 – 960 µg Cu/L) for 4h or 24h and to concentrations of 50 or 100 µg Cu/L for 2, 4, 8 and 24h at 19°C, as well as to heat shock at 27°C for 24h. The concentrations of hsp60 in whole body homogenates were determined immunochemically by western blotting. Stress protein induction was detected only after 24h treatment at 27°C. The tissue concentration of hsp60 remains unaltered in Cu-exposed planarians under the experimental conditions used. Catalase activity was significantly induced at concentrations of 40, 80 and 160 µg Cu/L after 24h exposure. Our results suggest that catalase levels in Planarian could represent biomarker of interest for the estimation of copper effects in freshwater ecosystems.

Keywords: Copper; Heat shock proteins; Hsp60; Catalase; *Dugesia schubarti*; Planarian

1. Introduction

The contamination of aquatic ecosystems by heavy metals has gained increasing attention over the last decade. Metal toxicity results from nonspecific metal binding, which can inactivate important regulatory enzymes by displacing essential metal ions from catalytic sites, by altering catalytic cysteine groups, or by allosterically altering the functional conformation of proteins (Mason and Jenkins, 1996). Recent studies have shown that metals, including iron, copper, chromium, and vanadium undergo redox cycling resulting in the production of reactive oxygen species (ROS) (Stohs and Bagchi, 1995). As a consequence, enhanced lipid peroxidation, DNA damage, and altered calcium and sulfhydryl homeostasis occur.

Chronic exposure and accumulation of metals by aquatic biota can result in tissue burdens that have adverse effects on the exposed organisms. Chemical analyses of complex mixtures are time consuming, expensive, and cannot predict the ultimate bioavailability of a chemical compound (Bierkens, 2000). In this respect mortality tests for acute toxicity, and observation of morphological or physiological alterations at the cellular or organ level for chronic exposure, have been used to supplement chemical analyses. A different approach has consisted of looking at the level at which possible adverse effects impact, i.e., at the site of interaction of chemicals with the different macromolecules in the cell (Bierkens, 2000). When the target molecule is part of the defense, repair, or detoxification machinery of the cell, it becomes a direct and specific marker of exposure and effect (biomarker).

The detection of stress protein induction in organisms, in particular hsp60 and hsp70, has been suggested as suitable biomarker to evaluate environmental conditions in their surroundings (for reviews see Sanders, 1993a; Goering, 1995; de Pomerai, 1996). The heat shock, or stress, proteins (HSPs) are families of proteins, including stress-inducible

and constitutively expressed members, classified according to their apparent molecular weight in four major groups denominated as hsp90, hsp70, hsp60 and low molecular weight stress-proteins (Morimoto et al., 1990; Nover, 1991). In unstressed cells they are involved in the maintenance of protein homeostasis, i.e., protein folding, aggregation and trafficking (Hightower, 1991). The elevation in stress protein levels was detected in cells under a variety of harmful stimuli, including heat, toxic metals, poisons, injuries, diseases, and other stressors (Schlesinger, 1990; Welch, 1993). The common mode of action of these diverse stressors seems to be subcellular damage to protein targets, a condition that has been called proteotoxicity (Hightower, 1991). The stress proteins demonstrate a high degree of homology (Lindquist and Craig, 1988) and might be broadly crossreactive in species from diverse phyla, a characteristic that would enhance their usefulness in environmental studies. More recently, however, several papers have reported possible restrictions to the use of stress proteins as universal biomarker in ecotoxicology (for review see Bierkens, 2000).

Copper sulphate belongs to the most widely used agrochemicals on grape-growing areas in the State of Rio Grande do Sul (Southern Brazil) for control of mildew and other fungal diseases. Copper and other pesticides may end up in surface waters, either dissolved in runoff water or adsorbed to soil particles. In aquatic organisms, Cu is highly accumulated by a number of organisms at different trophic levels (Klerks and Weis, 1987; Duquesne *et al.*, 2000). Induction of hsp60 was detected after copper treatment in mussel *Mytilus edulis* (Sanders *et al.*, 1991), nematode *Plectus acuminatus* (Kammenga *et al.*, 1998) and in zebra mussels (Clayton *et al.*, 2000). Other important effect of copper is an induction of ROS followed by elicitation of several defense enzymes such as catalase (Foyer *et al.*, 1994; Doyotte *et al.*, 1997; Teisseire *et al.*, 1997; Regoli *et al.*, 1998; Varanka *et al.*, 2001).

The aim of this study was to investigate hsp60 induction pattern and catalase activity in Planarian in order to assess the suitability as a potential biomarker of exposure to copper. The freshwater planarians feed on larvae of insects, mollusks and annelids, organisms acting as bioconcentrators for a range of pollutants. They are easy to keep in the laboratory with minimal costs and care and their wide natural distribution permits relation of field to laboratory studies. Furthermore, planarians were used successfully to assess genotoxicity (Guecheva *et al.*, 2001), teratogenesis and carcinogenesis (reviewed in Best and Morita, 1991; Schaeffer, 1993), as well as in ecotoxicology (Villar *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Hutchinson *et al.*, 1997; Ugazio *et al.*, 1997; Indeferberg *et al.*, 1999; Preza and Smith, 2001).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Polyclonal antibody against hsp60 from the moth *Heliothis virescens* and recombinant human hsp60 were purchased from StressGen (Victoria, BC, Canada). Goat anti-rabbit IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate was purchased from BioRad (Hercules, CA).

2.2. Animals

Planarians *Dugesia (Girardia) schubarti* (phylum **Platyhelminthes**, class **Turbellaria**) were collected from uncontaminated creek and acclimated under laboratory conditions for 3 months in tanks with reconstituted water (Cabridenc, 1979) at 19°C. The animals were fed on bovine liver once a week and the water was changed twice a week. Three days prior to the start of the experiment, 8–12 mm long planarians were selected

from the culture population. During this period as well as during the treatment, the planarians were not fed.

2.3. Toxicity test

Planarians were exposed to CuSO_4 dissolved in culture water at a range of concentrations for 24 h or for 7 days (solutions changed daily). For each treatment eight planarians in separate containers were analyzed.

2.4. Stress protein analysis

Ten planarians per treatment group, in duplicate, were exposed to copper (as a copper sulphate dissolved in the culture water) at concentrations of 40, 80, 160, 320 and 960 $\mu\text{g/L}$ for 4 h or to 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{g/L}$ for 24 h. To determine time of induction planarians were treated at concentrations of 50 or 100 $\mu\text{g Cu/L}$ for 2, 4, 8 and 24 h at 19°C. In the experiment there were also included planarians exposed to heat shock at 27°C for 24 h as well as the control group at 19°C. At the end of the treatment the ten animals as a pooled sample were used for stress protein analysis. Whole body homogenates in 66 mM Tris buffer (pH 7.5) containing 0.1 mM PMSF were prepared. The samples were centrifuged at $10\,000 \times g$ for 30 min at 4°C and the supernatants were stored at -80°C. The total protein concentration in the samples was determined by the Bradford protein assay (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard.

The concentrations of hsp60 in the planarian tissue samples were determined immunochemically by western blotting. Purified recombinant human hsp60 was used as positive control. Soluble proteins of 50 to 6.25 μg total protein were separated on 12% SDS-

PAGE gels (200 V for 45 min) and transferred onto 0.45 μm nitrocellulose (100 V for 60 min at 4°C) in transfer buffer of 0.192 M glycine/ 0.025 M Tris/ 20% methanol per volume, pH 8.3. The membranes were incubated for 1h in blocking buffer 50 mM Tris/ 200 mM NaCl (TBS), containing 3% nonfat dried milk and then washed with TBS containing 0.05% Tween-20 (TTBS). The blots were incubated with polyclonal antibody against hsp60 from the moth *H. virescens* for 90 min at room temperature and rinsed several times with TTBS. After incubation for 90 min with goat anti-rabbit alkaline phosphatase (AP) conjugate, the blots were washed and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT).

To quantify the immunoreactive bands, gels were loaded at serial dilutions of 50, 25, 12.5 and 6.25 μg total protein. The relative hsp60 concentration in each sample was expressed as the inverse of the total protein at detection limit of the sample divided by the total protein at detection limit of the control (Sanders *et al.*, 1991). To determine the time of induction, stress protein concentrations were compared visually from western blots of gels loaded with 50 μg of total protein.

2.5. Catalase activity

Five animals per treatment group were exposed to copper at concentrations of 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{g}/\text{L}$ for 24 h. Whole body homogenates in 100 mM Na-phosphate buffer pH 7.5, containing 0.1 mM PMSF were prepared immediately after the end of the treatment and centrifuged at 12 000 $\times g$ for 30 min at 4°C. The total protein concentration in the supernatants was determined by the Bradford protein assay (Bradford, 1976). Catalase (EC 1.11.1.6) activity was measured, according to Aebi (1984) following the decomposition of

H₂O₂ ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assays were carried out at 240 nm in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 with 30 mM H₂O₂.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed by GraphPad Prism 3.0. Data were compared using one-way ANOVA analysis of variance with Dunnett's multiple comparisons test. Variances were checked using Bartlett's test. An alpha level of 0.05 was used to determine significance in the statistical analysis. Data from toxicity tests were analyzed by Probit analysis in order to determine LC₅₀ values.

3. Results

In the toxicity test with planarians LC₅₀ of 1230 $\mu\text{g Cu/L}$ (24 h) and 480 $\mu\text{g Cu/L}$ (7 days) were determined. The highest concentration used for the treatment in the hsp60 and catalase analyses was 26 % of the LC₅₀ (24 h) with exception of the dose of 960 $\mu\text{g Cu/L}$ (78 %) in 4 h treatment, and the lowest concentration was 1.6 %.

The polyclonal antibody against hsp60 from the moth *H. virescens* in this study crossreacted with *D. schubarti* proteins to produce one band (Fig. 1 and Fig. 2) of approximately the same molecular weight of a positive control (recombinant human hsp60). The two weak bands of proteins with lower molecular weight that appeared on Fig. 1 could be assigned to members of the hsp60 family or caused by nonspecific binding to other proteins because of the polyclonal antibody being less specific than monoclonal antibody. In the control animals, hsp60 detection minimum was 25 μg of total protein. Stress protein induction was detected only after 24 h treatment at 27°C, where hsp60 detection limit was

6.25 µg of total protein (Fig. 1). The tissue concentration of hsp60 remains unaltered in Cu-exposed planarians. Immunoblots carried out with copper treated animals at a concentration range of 40 – 960 µg Cu/L for 4 h (Fig. 2a) or at a concentration range of 40 – 320 µg Cu/L for 24 h (Fig. 2b), showed hsp60 content similar to the control group. No difference in hsp60 detection minimum was observed also between animals treated at 50 and 100 µg Cu/L for 2, 4, 8 or 24 h and the control animals (Table 1).

Catalase activity (Fig. 3) was significantly induced after treatment with copper sulphate at concentrations of 40, 80 and 160 µg Cu/L ($p < 0.001$). After treatment with 320 µg Cu/L catalase activity decreases to near control level. No apparent toxicity was observed at the range of copper concentration used during the treatment.

4. Discussion

Our results in the stress protein induction experiments indicate that the hsp60 content in planarians is not correlated with copper concentration at a range of 40 – 960 µg Cu/L under the exposure conditions used. Similarly to us Clayton *et al.* (2000) observed lack of relationship in dose-response curve for hsp60 in Cu-exposed freshwater mussel at a range of 30 to 300 µg Cu/L (24 h), where the hsp60 content is not different from that of the control with exception of one peak at 32 µg Cu/L exposure concentration (50 – 75 µg Cu/L nominal concentration). It is possible that the lower concentration used in our hsp60 experiment (40 µg Cu/L), corresponding to 3.2 % of the LC₅₀ (24 h), was too high to detect a stress protein induction due to the biphasic nature of dose-response curve (Cochrane *et al.*, 1991; Clayton *et al.*, 2000). This explanation, however, is not likely as hsp60 content in planarians remains unaltered after treatment with 50 µg Cu/L for 2, 4 and 8 h, also. In

contrast to our data, Sanders *et al.* (1991) detected hsp60 induction in blue mussel *Mytilus edulis* after exposure to copper using Western blot analysis and the polyclonal rabbit anti-moth (*Heliothis virescens*) antibody.

In all control samples hsp60 was always present in detectable quantities, which indicate that planarians may have high levels of constitutively expressed hsp60. Detectable background of hsp60 in the control animals was also found in nematode *Plectus acuminatus* (Kammenga *et al.*, 1998) and in zebra mussels (Clayton *et al.*, 2000). Sanders and Martin (1991) did not find any background level of hsp60 in the mussel tissue. Many stress proteins, including members of the hsp60 family, however, are constitutively expressed and have essential functions as molecular chaperones under normal ambient conditions (Martin *et al.*, 1992). Besides this, it is possible that *D. schubarti* in our experiment suffered from handling stress or there are other factors, which induced hsp60 expression in untreated animals.

Studying the induction of hsp60 and hsp70 in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to multiple heavy-metal exposures, Eckwert *et al.* (1997) have shown that hsp70 reacted more sensitively to metal contamination than hsp60. In contrast, Pedersen *et al.* (1997) found that hsp70 levels in gills of crab *Carcinus maenas* did not appear to correlate with the degree of trace metal exposure. Laboratory tests with Cu in centipede *Lithobius mutabilis* demonstrated that the effect of this chemical on the hsp70 content is rather weak and inconsistent with a high variability between samples undergoing the same treatment, small or undetectable differences in hsp70 content under higher concentrations of copper, and high level of hsp70 in the control, untreated centipedes (Pyza *et al.*, 1997).

Our results on stress protein induction in Planarian are in agreement with other data previously reported in the literature, indicating that stress protein content in an animal body

is not clearly correlated with exposure to harmful chemicals. Sanders (1993b) points out difficulties with separating hsp responses to chemicals from those caused by other environmental factors. In some cases, the synthesis of hsp is much greater in response to heat shock than to chemical toxicants (Sanders, 1990). Thus in animals exposed to high variability in temperature, such as centipedes (Pyza *et al.*, 1997), as well as planarians, any response to chemicals can be masked by high levels of these proteins induced by unfavorable thermal conditions. It is unknown, however, whether seasonal changes in the stress protein level appear in Planarian as the result of direct exposure to cold or heat or are regulated by an endogenous clock. If the second explanation is considered, seasonal differences will be maintained even after acclimatization to a constant photoperiod and temperature in the laboratory. Feder *et al.* (1996) observed that even under controlled laboratory conditions, the accumulation of hsp70 does not always increase during heat shock and decrease after it, but in some individuals it continues to increase after cessation of heat.

Proteome analysis showed that a number of proteins were induced or repressed in *Mytilus edulis* after copper exposure (Shepard *et al.*, 2000). Thus, the similar hsp60 content in treated and control animals in our experiment may be explained with qualitative and not quantitative changes in hsp60 expression in planarians exposed to copper. The use of more selective antibody to distinguish between constitutive and inducible hsp60 may increase sensitivity of the technique (the current antibody recognizes both forms). Also, the technique may be improved by increasing the number of replicates analyzed.

Aquatic organisms contain the major antioxidant enzymes, including catalase, albeit there are marked quantitative differences among various species reported (for review see Winston, 1991). Catalase is an enzyme involved in antioxidant defense that eliminates

hydrogen peroxide ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Different responses of catalase have been described in aquatic organisms exposed to copper in both field and laboratory experiments (Regoli and Principato, 1995; Doyotte *et al.*, 1997; Teisseire *et al.*, 1997; Regoli *et al.*, 1998; Varanka *et al.*, 2001). Decreased catalase activity as a consequence of contaminant exposure would render the organisms more susceptible to the “natural” oxidative stress related to their environment.

Catalase activity in control animals of planarian *D. schubarti* was by an order higher than those found in digestive gland of freshwater *Unio tumidus* (Doyotte *et al.*, 1997) and seawater *Adamussium colbecki* (Regoli *et al.*, 1998), although this comparison is not so informative due to the different concentrations of H_2O_2 used for catalase activity determination. The high catalase activity in untreated animals may indicate that Planarian *D. schubarti* possess a strong defense system against reactive oxygen species because of high levels of dissolved oxygen in the inhabiting cold stream water. High levels of catalase in *Adamussium colbecki* really represent an adaptation to the elevated environmental oxygen levels (Regoli *et al.*, 1997).

The increase of catalase activity in our experiment (Fig. 3) can be explained with ROS production induced by copper, because catalase takes part of the defense mechanism against elevated concentrations of ROS responsible for lipid peroxidation (Fridovich, 1978). Our data are in agreement with Teisseire *et al.* (1998) that reported increased catalase activity in *Lemna minor* L. after a 24 h exposure to copper. The stimulation of catalase activity in response to copper occurred at low contaminant concentration; at higher concentration it reached a maximum and then decreased again. This decrease can be interpreted as a classical stress response in which the intensity of the stress is too high and

the stage of exhaustion is reached. The decreased catalase activity at high metal concentrations can also be attributed to enzyme and/or protein synthesis inhibition by copper (Hartwig, 1995; Eckwert *et al.*, 1997). The reduction of the antioxidant cellular defenses would be deleterious for the organisms since oxidative stress causes protein and enzyme inactivation, lipid peroxidation, damage to DNA and ultimately chemical carcinogenesis (Winston *et al.*, 1991).

Our results suggest that catalase activity in planarians can be considered as a sensitive indicator for acute exposure to copper. Comparing the effects of metals on catalase in a chronically polluted mussel population and in translocated organisms, Regoli and Principato (1995) hypothesized that variations of catalase could be a transitory response to contaminants during acute exposure, before some compensatory or adaptive mechanism occurs in chronically exposed populations. Such parameters should not be used as biomarkers in native population, but only when investigating transplanted organisms. Thus, catalase pattern in planarians after chronic exposure to copper should be investigated in order to determine the usefulness of this assay in studies with native populations.

5. Conclusion

This study suggests that hsp60 content in *D. schubarti* cannot be considered a valuable biomarker of copper exposure. Untreated animals showed detectable quantity of hsp60. No difference in the hsp60 expression between copper exposed and control animals was found. Induction of hsp60 was observed only after heat shock treatment. Catalase activity in *D. schubarti* was a very sensitive indicator for acute copper exposure. Concentration as low as 20 µg Cu/L stimulated the activity of the enzyme after 24 h of

incubation. This high sensitivity suggests the possible use of catalase as a biomarker of copper exposure in planarians. The enzyme pattern in chronic exposure, however, should be investigated to elucidate the response in native populations. Determination of catalase activity in Planarian is very easy to realize, does not require expensive chemicals, and gives results in short time. Thus, it is worth performing studies on this organism with other oxidative stress inducing substances in order to extend the applicability of the assay in ecotoxicology.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Mara Benfato for helpful suggestions and to Dr. Martin Brendel for critical reading of the manuscript. T. Guecheva held a CAPES doctoral grant and was supported by Genotox - UFRGS.

6. References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* **105**, 121-126.
- Best, J.B., and Morita, M. (1991). Toxicology of planarians. *Hydrobiologia* **277**, 375-383.
- Bierkens, J.G.E.A. (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicol.* **153**, 61-72.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cabridenc, R. (1979). Dureza (Teores em Sais Minerais). In “*Les bioassais en Ecotoxicologie*” IV, pp. 3. IRCHA, São Paulo.

- Clayton, M.E., Steinmann, R., and Fent, K. (2000). Different expression patterns of heat shock proteins hsp60 and hsp70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol.* **47**, 213-226.
- Cochrane, B.J., Irby, R.B., and Snell, T.W. (1991). Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **98**, 385-390.
- de Pomerai, D.I. (1996). Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human and Experimental Toxicol.* **15**, 279-285.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.-C., Babut, M., and Vasseur, P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* **39**, 93-110.
- Duquesne, S., Riddle, M., Schulz, R., and Liess, M. (2000). Effects of contaminants in the Antarctic environment – potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. *Aquat. Toxicol.* **49**, 131-143.
- Eckwert, E., Alberti, G., and Köhler, H-R. (1997). The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy-metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicol.* **6**, 249-262.
- Feder, M.E., Cartano, N.V., Milos, L., Krebs, R.A., and Lindquist, S.L. (1996). Effect of engineering hsp70 copy number on hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **199**, 1837-1844.

- Foyer, C.H., Lelandais M., and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696-717.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- Goering, P.L. (1995). Stress proteins – Molecular Biomarkers of Chemical Exposure and Toxicity. In “*Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*” (Butterworth, F.M. *et al.*, Eds.). Plenum Press, New York.
- Guecheva, T.N., Henriques, J.A.P., and Bernardo, E. (2001). Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.* **497**, 19-27.
- Hansen, L.G., Tehseen, W.M., Foley, G.L., and Schaeffer, D.J. (1993). Modification by polychlorinated biphenyls (PCBs) of cadmium induced lesions in the planarian model, *Dugesia dorotocephala*. *Biomed. Environ. Sci.* **6**, 367-384.
- Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals.* **8**, 3-11.
- Hightower, L.E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**, 191-197.
- Hutchinson, T.H., Hutchings, M.J., and Moore, K.W. (1997). A review of the effects of bromate on aquatic organisms and toxicity of bromate to oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**, 238-243, doi:10.1006/eesa.1997.1584.
- Indeherberg, M.B., van Straalen, N.M., and Schockaert, E.R. (1999). Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between populations of *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**, 1-11, doi:10.1006/eesa.1999.1785.
- Jonson, L.R., Davenport, R., Balbach, H., and Schaeffer, D.J. (1994). Phototoxicology. 3. Comparative toxicity of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes to *Daphnia*

- magna*, *Dugesia dorotocephala*, and sheep erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27**, 34-49, doi:10.1006/eesa.1994.1005.
- Kammenga, J.E., Arts, M.S.J., and Oude-Breuil, W.J.M. (1998). HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 253-258.
- Klerks, P.L., and Weis, J.S. (1987). Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* **47**, 173-205.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- Martin, J., Horwich A.L., and Hartl, F.U. (1992). Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin HSP60. *Science* **258**, 995-998.
- Mason, A.Z., and Jenkins, K.D., 1996. Metal detoxification in aquatic organisms. In “*Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*” (A.Tessier, D.R.Turner, Eds.), pp. 479-608. IUPAC Press, London.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (1990). “*Stress Proteins in Biology and Medicine*”. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Nover, L. (1991). “*Heat-shock Response*”. CRC Press, Boca Raton.
- Pedersen, S.N., Lundebue, A.-K., and Depledge, M.H. (1997). Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* **37**, 183-200.
- Preza, D.L.C., and Smith, D.H. (2001). Use of newborn *Girardia tigrina* (Girard, 1850) in acute toxicity tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **50**, 1-3, doi:10.1006/eesa.2001.2072.
- Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P., and Laskowski, R. (1997). Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**, 244-251,

doi:10.1006/eesa.1997.1595.

Regoli, F., and Principato, G.B. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **31**, 143-164.

Regoli, F., Nigro, M., and Orlando, E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* **40**, 375-392.

Regoli, F., Principato, G.B., Bertoli, E., Nigro, M., and Orlando, E. (1997). Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biol.* **17**, 251-258.

Sanders, B.M. (1990). Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In “*Biomarkers of Environmental Contamination*” (J.F. McCarthy, and L.R. Shugart, Eds.), pp. 165-191. Lewis, Boca Raton, FL.

Sanders, B.M. (1993a). Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 49-75.

Sanders, B.M. (1993b). The cellular stress response. *Environ* **16**, 3-6.

Sanders, B.M., Martin, L.S., Nelson, W.G., Phelps, D.K., and Welch, W. (1991). Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Envir. Res.* **31**, 81-97.

Schaeffer, D.J. (1993). Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **25**, 1-18, doi:10.1006/eesa.1993.1001.

Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 12111-12114.

- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., and Bradley, B.P. (2000). Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine Envir. Res.* **50**, 337-340.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321-336.
- Teisseire, H., Couderchet, M., and Vernet, G. (1998). Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**, 194-200, doi:10.1006/eesa.1998.1682.
- Ugazio, G., Burdino, E., Crespi, M., Barbero, N., Garizio, M., Arru, G., and Congiu, A.M. (1997). Eco-toxicological study conducted with a battery of biological and phytological tests on sediments carried out on a series of 24 tributaries of the Po in 1994 and 1995. *Giornale Italiano di Medicina Del Lavoro Ed Ergonomia* **19**, 10-16.
- Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsók, J., and Ábrahám, M. (2001). Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tanic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C* **128**, 467-478.
- Villar, D., Li, M.H., and Schaeffer, D.J. (1993). Toxicity of organophosphorus pesticides to *Dugesia dorotocephala*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**, 80-87.
- Welch, W.J. (1993). How cells respond to stress. *Sci. Amer.* **268**, 56-64.
- Winston, G.W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* **100**, 173-176.
- Winston, G.W., Moore, and Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* **19**, 137-161.

Table 1

Heat shock protein hsp60 in planarians exposed to copper, expressed as μg of total protein at detection limit determined via quantitative immunoblots.

Time (hours)	50 μg Cu/L	100 μg Cu/L	control
2	25	25	25
	25	25	25
4	25	25	25
	25	25	12.5
8	25	25	25
	25	12.5	25
24	25	25	25
	25	25	25

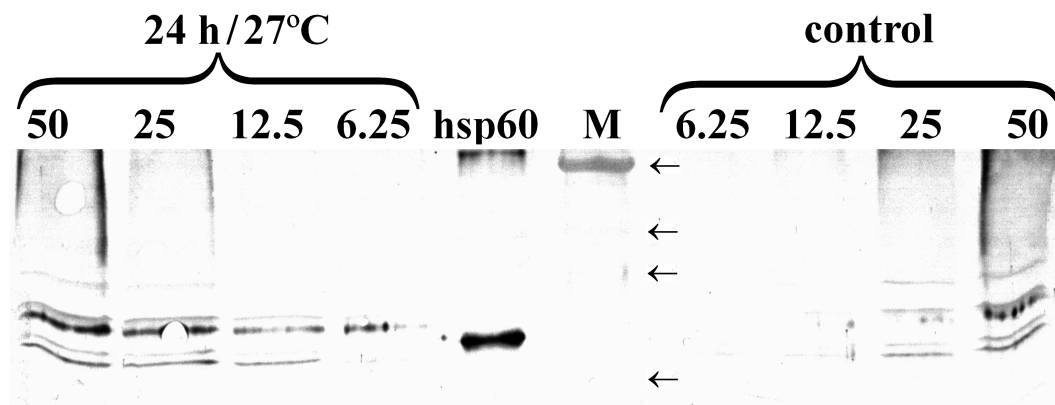
Data are based on pools of ten planarians per treatment group, in duplicate.

Figure captions

Fig. 1. Western blot for hsp60 in planarian exposed to 27°C for 24 h. Numbers at the top indicate concentration of total protein (μg) loaded. Line 1 to 4 – planarians treated at 27°C for 24 h, line 7 to 10 – control, line 5 – recombinant human hsp60, line 6 – pre-stained molecular weight standards (220, 118, 85, 47 kDa).

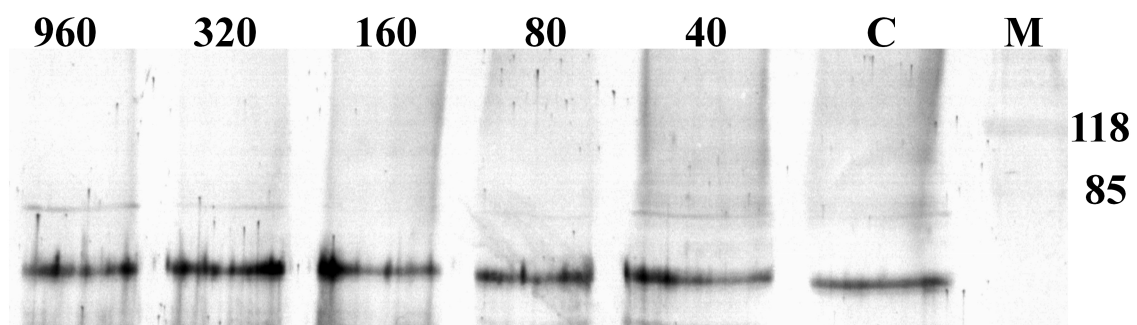
Fig. 2. Western blots for hsp60 in planarian exposed to a range of Cu concentration for 4 h (a) or 24 h (b). Numbers at the top indicate nominal Cu concentration in $\mu\text{g/L}$. Fifty μg of total protein was loaded on the gel for each sample. C – control, hsp60 – recombinant human hsp60, M – pre-stained molecular weight standards in kDa.

Fig. 3. Catalase activity in planarian *D. schubarti* after treatment at a range of copper concentrations for 24 h. Values are mean \pm standard errors, n = 5. *** Significantly different from the control value, $p < 0.001$.

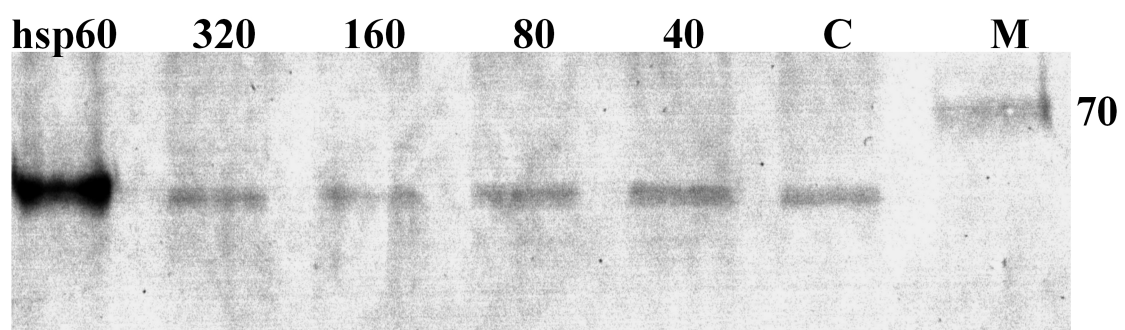


T. Guecheva et al., Fig. 1

(a)

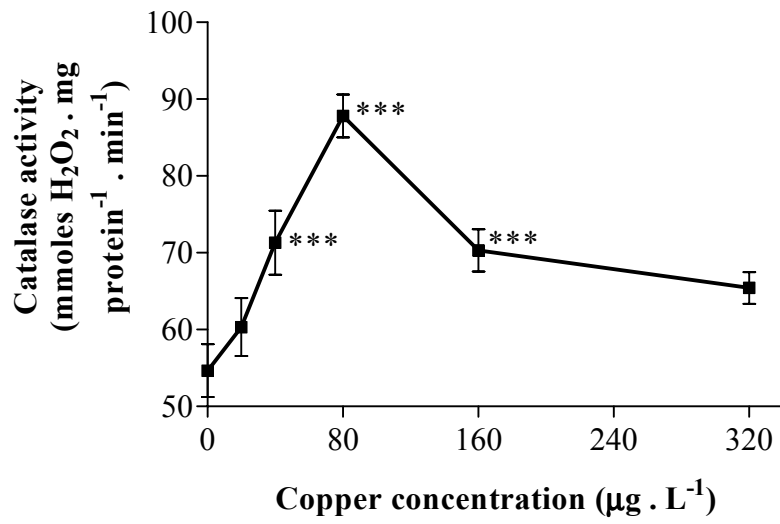


(b)



T. Guecheva et al., Fig. 2

T. Guecheva et al., Fig. 3



V – DISCUSSÃO

1. Efeitos Genotóxicos do Cobre em Planária

1.1. Detecção do dano induzido no DNA pelo cobre utilizando o Teste Cometa

Uma das vantagens mais importantes do Teste Cometa é a sua aplicabilidade em qualquer tipo celular e organismo eucarioto, além de ser sensível, rápido e de baixo custo. Devido a isto ele é recomendado como um teste preliminar para monitorar a genotoxicidade ambiental. Outra vantagem do teste é que ele fornece dados sobre o dano induzido no DNA ao nível celular e permite monitorar a cinética do reparo deste dano. A maioria dos trabalhos com Teste Cometa nesta área são com linfócitos humanos, tanto *in vitro*, expondo as células a um agente específico, como *in vivo*, no biomonitoramento ocupacional (Collins *et al.*, 1997). Ultimamente o teste é aplicado também em outros organismos para biomonitoramento ambiental (Ralph *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1997a,b; Belpaeme *et al.*, 1998), mas os estudos de reparo são exclusivamente conduzidos em cultura de células *in vitro* (Collins *et al.*, 1995; Duthie e Collins, 1997).

O cobre pode promover dano oxidativo ao DNA diretamente ou indiretamente via supressão das defesas antimutagênicas da célula. O mecanismo direto pode envolver quelação do metal pelas proteínas nucleares e ativação das espécies de oxigênio em proximidade do DNA (revisado por Kasprzak *et al.*, 1999). As ERO formadas lesionam o DNA, produzindo bases modificadas, além de causar quebras de cadeias e sítios AP (que são álcali-lábeis). O alvo preferencial do ataque de ERO parece ser a guanina, sendo que o

produto final mais freqüente é a 8-hidroxi guanina (Fig. 3, Introdução). As quebras de cadeia e os sítios AP (transformados em quebras após tratamento alcalino) são detectados no Teste Cometa pela migração do DNA para fora do núcleo, formando a “cauda do cometa”.

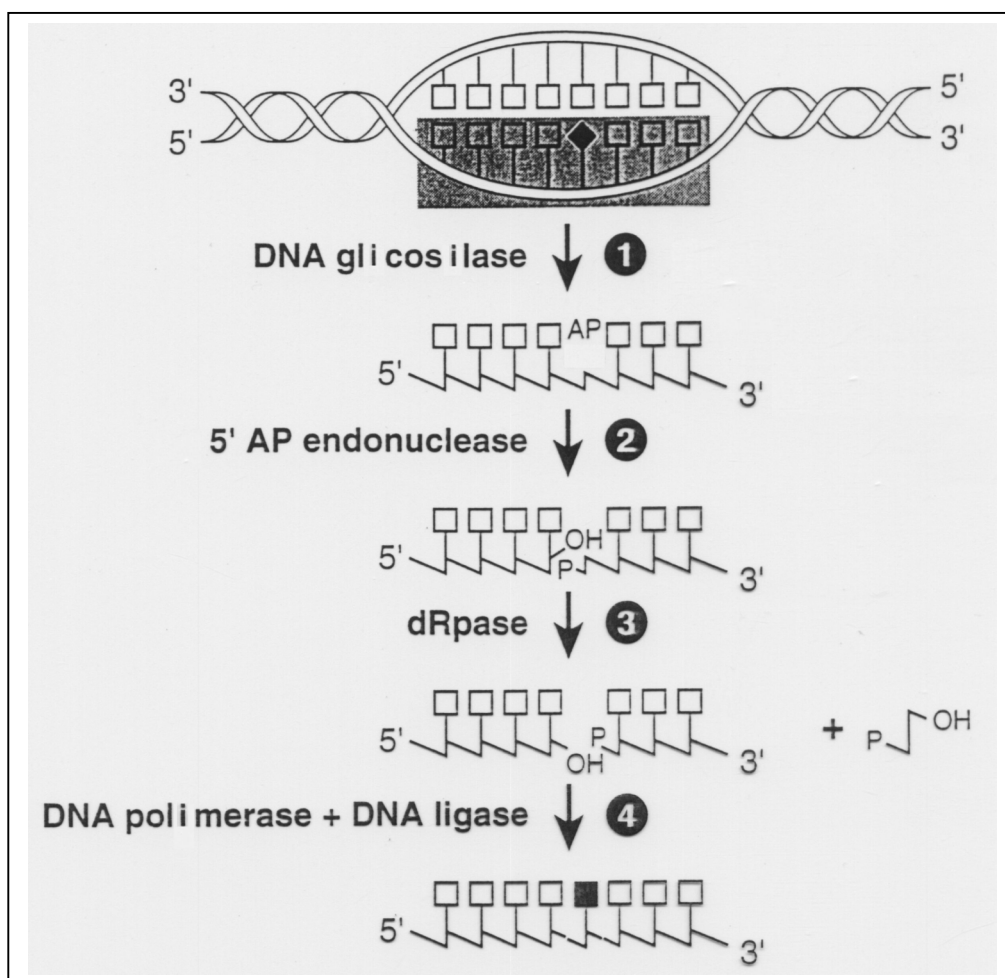


Figura 10. Reparo por excisão de bases (adaptado de Friedberg *et al.*, 1995).

Sítios AP e quebras de cadeia no DNA são gerados também durante o processo de reparo por excisão (Fig. 10). O reparo por excisão de bases (BER) é um processo multienzimático, que é requisitado quando uma única base do DNA é modificada, por

exemplo, por um agente oxidante ou agente alquilante monofuncional (Cadet *et al.*, 2000; Brozmanova *et al.*, 2001). Geralmente, as bases modificadas são excisadas por DNA glicosilases específicas originando sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP). A fosfodiesterase remove os resíduos de açúcar-fosfato deixando uma lacuna no DNA, que permanece até que o processo de reparo seja concluído por DNA-polimerases e DNA-ligases. As lesões que levam a distorções estruturais na cadeia do DNA, como dímeros de pirimidina, timina-glicóis e adutos gerados por agentes alquilantes, são eliminadas durante o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), onde o passo de excisão envolve 24 a 32 nucleotídeos em torno da lesão (Prakash e Prakash, 2000).

No Capítulo I mostrou-se o efeito genotóxico do sulfato de cobre em planárias após exposição *in vivo* utilizando Teste Cometa. Nas condições experimentais o cobre induziu dano dose-dependente ao DNA ($r = 0.984$; $p < 0.001$), com aumento significativo em relação ao controle nas doses $3-5 \times 10^{-5}$ M CuSO_4 (Tabela 1, Capítulo I). A heterogeneidade da resposta no mesmo grupo de tratamento pode ser em função do tipo de célula, como também do tipo de dano no DNA (Fig. 1, Capítulo I). Após exposição crônica ao sulfato de cobre, os efeitos genotóxicos foram detectados em concentração dez vezes menor em comparação ao tratamento agudo (Fig. 5, Capítulo I). A concentração mais alta testada (1×10^{-5} M) foi tóxica para as planárias, resultando na diminuição dos efeitos genotóxicos.

Nossos dados estão de acordo com Bolognesi *et al.* (1999), que detectaram quebras no DNA, induzidas pelo cobre em mexilhões, empregando a técnica de eluição alcalina. Na presença de redutores celulares disponíveis (i.e. ácido ascórbico, glutathione, e N-acetilcisteína), os íons do cobre e ferro podem ter um papel de catalisadores na iniciação de reações envolvendo produção de radicais livres em condições aeróbias (Britton, 1996; Ueda

et al., 1998). As ERO geradas por este processo podem atacar o DNA, causando dano às bases e quebras de cadeia simples e dupla. Assim, o aumento do dano observado em planárias no Teste Cometa pode ser atribuído às quebras verdadeiras no DNA induzidas pelo cobre, assim como às quebras resultantes do processo de reparo por excisão das bases modificadas (Fig. 10). Dano às bases e quebras no DNA foram detectados também depois de tratamento concomitante com Cu(II) e uma variedade de substâncias (Aruoma *et al.*, 1991; Jacobi *et al.*, 1998; Rodriguez e Akman, 1998; Lloid *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 1999).

Os nossos resultados obtidos no Teste Cometa mostraram uma variação relativamente alta entre os experimentos, descrita também em outros estudos *in vivo*. Isto pode refletir variação na suscetibilidade entre os animais ou obtenção de uma suspensão celular heterogênea. A diferença no tamanho das planárias também pode contribuir para distribuição não homogênea da substância química testada. O elevado índice de dano observado nas planárias não tratadas pode ser atribuído a quebras introduzidas durante a preparação da amostra, ou pode estar relacionado com processos fisiológicos, como por exemplo, alto nível basal de dano no DNA.

1.2. Interferência do cobre com o reparo no DNA

Um resultado positivo no Ensaio Cometa não indica necessariamente potencial mutagênico da determinada substância, tendo em vista que a maioria dos efeitos observados é consequência do “reparo livre de erro” no DNA (Speit *et al.*, 1996). Contudo, substâncias que interferem com este processo podem modular a genotoxicidade em combinação com outros agentes que induzem danos no DNA.

Para estudar a influência dos íons de cobre na persistência das lesões induzidas pelo mutagênico direto metilmetanosulfonato (MMS) no DNA, as planárias foram tratadas com MMS e em seguida incubadas na ausência (pós-incubação) ou presença (pós-tratamento) de CuSO_4 . O MMS é um agente alquilante monofuncional (interagindo com um único centro nucleofílico no DNA), considerado potencialmente carcinogênico. O principal efeito do MMS parece ser a metilação de bases no DNA, criando 7-desoxiguanina e 3-metil adenina (3-mA). Durante o processo de reparo as bases alquiladas são retiradas e os sítios AP são transformados em quebras no DNA.

O tratamento com MMS induziu aumento dose-dependente no índice de dano no DNA em planárias (Fig. 2., Capítulo I) em doses comparáveis com as doses utilizadas em células de mamíferos (Hartmann e Speit, 1996). Após incubação de 2 h em água de cultivo a migração foi reduzida significativamente, indicando reparo ocorrido no DNA. Este efeito não foi observado na presença de cobre, onde o índice de dano permaneceu quase inalterado em relação ao tratamento com MMS correspondente.

A maior persistência do dano induzido por MMS, como resultado do pós-tratamento de 2h com sulfato de cobre, pode ser atribuída a inibição dos passos de polimerização e ligação na fita do DNA durante processo de reparo. Existem evidências que as enzimas ativadas pelo íon Mg(II) são influenciadas pelos íons de outros metais. As enzimas DNA-

polimerase e DNA-ligase envolvidas no reparo por excisão no DNA, exemplos de enzimas que possuem íon Mg(II) como co-fator, são muito sensíveis a ação de Cd(II), Pb(II), Co(II), Ni(II) e As(III) (Hartwig, 1995). Não existem evidências de inibição destas enzimas pelo Cu(II), mas tal inibição foi observada em pelo menos uma classe de enzimas Mg(II) dependentes, designadas de MutT em *Escherichia coli* e MTH1 em humanos (Porter *et al.*, 1997). Os mecanismos propostos são a competição com os íons do metal essencial assim como mudanças estruturais das enzimas por oxidação de grupamentos -SH, ação aparentemente comum para todos os metais de transição (Porter *et al.*, 1997; Kasprzak *et al.*, 1999).

Os animais tratados com MMS no nosso experimento mostraram um aumento na migração do DNA após 4 h de pós-incubação em relação ao valor de 2 h (Fig. 3, Capítulo I). Fenômeno semelhante para a migração do DNA no Ensaio Cometa foi observado por De Boeck e Kirsch-Volders (1997) em *Nereis virens* como resultado de tratamento contínuo com etilmetanosulfonato (EMS). Uma possível explicação para o segundo pico poderia ser a indução de enzimas DNA-glicosilases ou DNA-nucleases via *de novo* síntese de proteínas, como por exemplo, a enzima 3-mA DNA-glicosilase II em resposta de adaptação à alquilação em *Escherichia coli* (Friedberg, 1995). O aumento menor na migração do DNA no grupo de pós-tratamento com cobre (em relação ao grupo de pós-incubação) após 4 h (Fig. 3, Capítulo I), pode ser explicado pela inibição da síntese protéica requerida para a indução destas enzimas pelo cobre. Tal inibição de síntese protéica está descrita para íons de Cd(II) (Snow, 1992) e Co(II) (Leitão *et al.*, 1993).

Ao contrário dos estudos *in vitro*, que indicam reparo rápido do dano em Teste Cometa (Speit *et al.*, 1996), a migração do DNA em planárias tratadas com MMS permanece significativamente elevada em relação ao grupo controle após 24 h de pós-

incubação. A frequência de células com dano “classe 4” (Fig. 4, Capítulo I), diminuiu muito pouco durante este período, indicando baixo nível de reparo nas células de planária. A capacidade reduzida de reparo parece ser uma característica geral das células diferenciadas (Collins *et al.*, 1995; Kaminskias e Li, 1992; Van Loon *et al.*, 1993), ao contrário das células que estão em proliferação. Este resultado interessante está de acordo com outros estudos *in vivo* que mostram permanência do dano induzido por MMS em órgãos múltiplos de rato (Sasaki *et al.*, 1997) e em girino de *Rana clamitans* (Ralph *et al.*, 1997), comprovando mais uma vez a importância dos testes *in vivo* na avaliação do impacto ambiental e risco à saúde humana de um determinado agente.

2. Toxicidade do cobre em Planária

2.1. Acumulação de Proteínas de Estresse

A síntese elevada das proteínas de estresse é um fenômeno universal, observado em resposta de várias condições desfavoráveis na célula (Tabela 2). O modo comum de ação destes fatores diversos parece ser o dano causado aos alvos protéicos, condição conhecida como proteotoxicidade (Hightower, 1991). Nesta condição, algumas das proteínas com expressão constitutiva são induzidas proporcionalmente a intensidade do estresse sofrido, enquanto outras isoformas são sintetizadas exclusivamente após exposição adversa (Bierkens, 2000). As proteínas de estresse combatem os efeitos proteotóxicos prevenindo desnaturação das proteínas danificadas por meio de restabelecimento do seu dobramento correto, ou promovendo degradação das proteínas anormais (Bierkens, 2000).

Tabela 2. Algumas condições que provocam indução na síntese de proteínas de estresse.*

Fatores ambientais	Estados patológicos	Estados fisiológicos
Choque térmico	Infecção viral	Divisão celular
Metais de transição	Febre	Fatores de crescimento
Inibidores do metabolismo energético	Inflamação	Desenvolvimento e diferenciação
Análogos dos aminoácidos	Isquemia	
Quimioterápicos	Hipertrofia	
	Dano oxidativo	

* Adaptado de Welch (1993).

O modo mais eficiente e direto para se medir a concentração das proteínas de estresse envolve o uso de anticorpos específicos. Devido ao alto grau de conservação destas proteínas na escala evolutiva (Lindquist e Craig, 1988), os anticorpos específicos apresentam reatividade cruzada com espécies de filos diferentes. Esta propriedade facilita o seu uso em estudos ambientais, sendo que as famílias hsp60 e hsp70 estão entre as mais utilizadas para este fim (Sanders, 1994b).

O anticorpo policlonal contra proteína hsp60 de mariposa *H. virescens*, utilizado neste estudo (Capítulo II), mostrou reatividade cruzada com a proteína hsp60 da planária *D. schubarti*, resultando em uma banda (Fig. 1 e Fig. 2, Capítulo II) com aproximadamente mesmo peso molecular do controle positivo (hsp60 humana recombinante). As duas bandas fracas com peso molecular mais baixo observadas na Fig. 1 (Capítulo II) podem ser atribuídas aos membros da família das proteínas hsp60, como também podem aparecer em resultado da reação não específica devido à natureza policlonal do anticorpo utilizado. Todos os animais não tratados apresentaram nível detectável da proteína hsp60, com limite de detecção de 25 µg proteína total. Exposição à temperatura elevada (27°C por 24 h) induziu a síntese da proteína hsp60, que foi detectada em 6.25 µg de proteína total (Fig. 1, Capítulo II).

O presente estudo mostra que a quantidade da proteína hsp60 em planárias não sofreu alteração após exposição de 4 h (Fig. 2a, Capítulo II) ou 24 h (Fig. 2b, Capítulo II) ao sulfato de cobre. Também não foi observado aumento no conteúdo de hsp60 após o tratamento com 50 ou 100 mg Cu/L por período de 2, 4 e 8 h (Tabela 1, Capítulo II). Nosso resultado está de acordo com Clayton *et al.* (2000) que relatam ausência de relação dose-resposta para hsp60 em mexilhão de água doce após exposição de 30 - 300 mg Cu/L (24 h).

Este fato pode ser explicado com as mudanças qualitativas na expressão desta proteína (não alterando a quantidade total na célula), que estão comprovadas na análise de proteoma em *Mytilus edulis*, onde várias proteínas da família hsp60 foram induzidas ou reprimidas após exposição ao cobre (Shepard *et al.*, 2000).

A presença de hsp60 em todas as amostras de planárias não tratadas indica um alto nível da expressão constitutiva desta proteína. A proteína hsp60 foi detectada também em animais do grupo controle em nematodo *Plectus acuminatus* (Kammenga *et al.*, 1998) e em mexilhões (Clayton *et al.*, 2000). Em contraste com os nossos dados, Sanders *et al.* (1991) não relatam nível basal de hsp60 no tecido de mexilhão *Mytilus edulis*, que só é induzido após o tratamento com cobre. Porém, muitas proteínas da família de hsp60 são constitutivamente expressas e têm funções essenciais como chaperonas moleculares em condições fisiológicas (Martin *et al.*, 1992). Além disto, é possível que *D. schubarti* em nosso experimento esteja sob impacto de outros fatores, que provocam indução na expressão das proteínas hsp60 nos animais não tratados.

Estudando a indução de hsp60 e hsp70 em *Oniscus asellus* (Isopoda) em resposta a exposição múltipla a metais pesados, Eckwert *et al.* (1997) mostraram que as proteínas hsp70 são mais sensíveis a contaminação em comparação com hsp60. Em contraste, Pedersen *et al.* (1997) mostraram que os níveis de hsp70 em brânquias de caranguejo *Carcinus maenas* não estão correlacionados com o grau de exposição aos metais pesados. Exposição da centopeia *Lithobius mutabilis* ao cobre em laboratório, também revelou pouca diferença no conteúdo de hsp70 nos tratamentos com diferentes concentrações, grande variabilidade entre os animais do mesmo grupo e alto nível de hsp70 nos animais controle (Pyza *et al.*, 1997). Além do mais, Feder *et al.* (1996) observaram que a acumulação de hsp70 nem sempre aumenta durante o choque térmico e diminui após o restabelecimento da

temperatura usual, até mesmo em condições controladas no laboratório, mas em alguns indivíduos continua aumentando depois de cessação do calor.

Nossos resultados em indução de proteínas de estresse em planária estão de acordo com outros dados previamente informados na literatura, indicando que o conteúdo destas proteínas nem sempre está correlacionado com exposição às substâncias químicas prejudiciais (Bierkens, 2000). Em alguns casos, a síntese de hsp é muito maior em resposta ao choque térmico do que em resposta aos agentes tóxicos (Sanders, 1990). Dificuldades de se separar respostas de hsp às substâncias químicas, daquelas causadas por outros fatores ambientais, são apontadas também por Sanders (1993b). Tendo em vista a grande variedade de condições onde as proteínas de estresse são sintetizadas (Tabela 2), o ideal seria que cada agente induzisse diferentes isoformas destas proteínas, fato que não está relatado na literatura até o momento. Esta falta de especificidade é um fator limitante no uso das proteínas de estresse em estudos ambientais, sendo que um biomarcador valioso deveria ser indicativo de um agente específico, capaz de distingui-lo entre os outros.

Uma outra limitação do teste é a utilização do anticorpo que reconhece ambas as formas da proteína hsp60 – induzida e a constitutiva. A expressão de algumas classes das proteínas de estresse aumenta significativamente em diferentes fases do desenvolvimento (Tabela 2), o que poderia mascarar o efeito da indução por agentes desfavoráveis. Para detectar tais mudanças seria necessário o uso de anticorpo seletivo, capaz de distinguir entre a forma da hsp60 expressa constitutivamente e a forma induzida.

2.2. Modulação na atividade da Catalase

Em resposta ao elevado nível de ERO ocorre um aumento na capacidade antioxidante da célula num processo de ativação de genes específicos para enzimas antioxidantes. A catalase é uma destas enzimas, envolvida na desmutação do peróxido de hidrogênio para água e oxigênio (Fridovich, 1998). Ela possui uma afinidade relativamente baixa para o peróxido de hidrogênio, porém tem uma velocidade muito alta. Por isto, é uma defesa potente para neutralizar concentrações altas do peróxido, possivelmente como as que são formadas por fagócitos ativos (Henriques *et al.*, 2001). Os fagócitos são apontados como fonte importante de ERO em resposta aos metais (Stohs e Bagchi, 1995).

Neste estudo foi observado aumento significativo na atividade da catalase em planárias após exposição ao cobre em concentrações 40, 80 e 160 $\mu\text{g Cu/L}$ ($p < 0.001$) por 24 h (Fig. 3, Capítulo II). A dose mais alta utilizada (320 $\mu\text{g Cu/L}$) foi tóxica para os animais, provocando decaimento na atividade da catalase. A alta atividade da catalase em animais não tratados indica que a planária *D. schubarti* pode possuir um forte sistema para defesa contra ERO devido ao alto nível de oxigênio dissolvido na água fria e corrente de seu habitat.

O aumento na atividade da catalase no nosso experimento pode ser explicado com o estresse oxidativo induzido pelo cobre, sabendo-se que a catalase é parte do mecanismo de defesa a elevadas concentrações de ERO. Nossos dados estão de acordo com Teisseire *et al.* (1998) que detectaram atividade de catalase aumentada em *Lemna minor* L. após exposição de 24 h ao cobre. O aumento da atividade de catalase após tratamento com cobre aconteceu em baixas concentrações do contaminante. Em concentrações mais altas a atividade alcança um pico máximo e decai novamente. Esta diminuição pode ser interpretada como uma

resposta clássica ao estresse na qual a alta intensidade do agente leva a fase de esgotamento, caracterizada pela inibição da síntese protéica e atividade enzimática (Hartwig, 1995; Eckwert *et al.*, 1997). Uma inibição da catalase, como consequência de exposição aos contaminantes, poderia tornar os organismos mais suscetíveis ao "estresse oxidativo natural" do ambiente.

Em função destes resultados concluí-se que a atividade da catalase em planárias pode ser considerada um indicador sensível para exposição aguda ao cobre. Porém, existem dados na literatura apontando que as variações na atividade da catalase são uma resposta transitória a contaminantes durante exposição aguda, antes do aparecimento de algum mecanismo compensatório ou adaptável nas populações (Regoli e Principato, 1995). Assim, para determinar a utilidade do ensaio em estudos com populações nativas, tornam-se necessários estudos da variação desta enzima em planárias após exposição crônica ao cobre.

3. Utilidade das planárias como organismo-teste em biomonitoramento ambiental

Grande parte da poluição ambiental tem seu destino final nas águas, lançada diretamente pelos efluentes urbanos e industriais ou absorvida pela água das chuvas. Monitoramento do ambiente aquático é essencial para identificar possíveis efeitos adversos desta poluição sobre os organismos aquáticos e os perigos para a saúde humana. Testes com organismos novos para este fim exigem avaliação de alguns critérios básicos, tais como importância ecológica do efeito testado, disponibilidade e sensibilidade dos organismos-teste, reprodutibilidade dos resultados, simplicidade e baixo custo.

A espécie *Dugesia schubarti* empregada neste estudo, mostrou uma sensibilidade ao mutagênico direto MMS nas concentrações que induzem efeitos em outros organismos e sistemas utilizados rotineiramente nos testes de genotoxicidade. Foi mostrado também o efeito genotóxico do sulfato de cobre em Teste Cometa, o que poderia ajudar esclarecer os dados controversos sobre potencial mutagênico do cobre. Os estudos com planárias não enfrentam o problema de baixa biodisponibilidade do cobre, que é resultado da elevada concentração de sais nos meios de cultura e dificulta bastante os estudos *in vitro*. Este fato pode ter ajudado detectar o efeito genotóxico do cobre neste estudo e apresenta uma vantagem do uso de planárias em futuras pesquisas.

A planária mostrou-se um organismo interessante para estudos de reparo do DNA *in vivo*. Como um organismo íntegro, a planária possui todos os mecanismos de regulação da resposta e preservação da estabilidade do material genético, fatores, que são limitantes nos estudos *in vitro*. Além disto, com o uso de planárias que se reproduzem assexuadamente, evita-se a variabilidade genética que leva a uma heterogeneidade na resposta dos organismos nos estudos *in vivo*.

A presença da catalase em planárias e a simplicidade da execução do método, assim como a sensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo cobre, sugerem que este organismo será bastante útil na avaliação do potencial oxidante de substâncias químicas em testes de laboratório, e também, para avaliar exposição aos agentes oxidantes em ecossistemas aquáticas.

A alta sensibilidade das planárias e a reprodutibilidade dos resultados demonstrados neste estudo, junto com os fatores favoráveis previamente selecionados, tais como a ampla distribuição das planárias na natureza e o baixo custo do cultivo em laboratório, assim como a simplicidade dos métodos empregados, comprovaram a utilidade deste sistema para futuros estudos de toxicidade e genotoxicidade de produtos químicos e em biomonitoramento ambiental.

VI - CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral

Os resultados apresentados neste estudo revelam o potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planárias e também sugerem que este organismo-teste pode ser considerado um sistema valioso para avaliação da contaminação química em estudos ambientais.

2. Conclusões Específicas

- Foi revelado o potencial genotóxico do sulfato de cobre em planária após exposição aguda e crônica *in vivo*, assim como o efeito modulador sobre a ação de outros agentes mutagênicos;
- Este trabalho foi o primeiro a empregar Teste Cometa na avaliação do efeito genotóxico do sulfato de cobre, comprovando a utilidade do método para este fim;
- O monitoramento da cinética do reparo no DNA em planárias *in vivo* mostrou que as células diferenciadas possuem baixa capacidade de reparo em comparação com as células em cultura;

- O conteúdo da proteína hsp60 em planária *Dugesia schubarti* não foi alterado em resultado da exposição ao cobre, revelando que não é um parâmetro adequado para avaliação da contaminação química;

- A atividade da catalase em planária foi significativamente induzida após exposição às baixas concentrações de sulfato de cobre, mostrando-se um indicador sensível para a toxicidade do cobre;

- A planária mostrou-se também um organismo bastante apropriado para detectar dano no DNA utilizando Teste Cometa, sugerindo sua utilidade para monitoramento de efeitos genotóxicos induzidos por agentes químicos no ambiente aquático.

VII - PERSPECTIVAS

Para que seja esclarecido o tipo de dano induzido por sulfato de cobre no DNA seria de extrema relevância complementar os estudos em Teste Cometa utilizando enzimas lesão específicas (Collins *et al.*, 1995). Enzima formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) reconhece o anel aberto das purinas (fapi-adenina, fapi-guanina) e 8-hidroxi-guanina, sendo que o último é considerado de substrato principal desta enzima *in vivo*. A enzima Endonuclease III detecta pirimidinas oxidadas. Assim, comparando-se a quantidade total de quebras no DNA, com as quebras sítio-específicas, pode-se inferir sobre a natureza dos danos oxidativos induzidos por cobre.

Com objetivo de se estudar o reparo dos danos oxidativos no DNA em Teste Cometa, seria interessante a utilização de linhagens de levedura deficientes em enzimas de reparo por excisão de bases, tais como *ntg1Δ* e *ntg2Δ*. O tamanho do genoma de levedura é relativamente pequeno em relação aos eucariotos superiores, o que juntamente com a presença de parede celular dificulta os estudos com este organismo em Teste Cometa. Porém, recentemente este ensaio foi adaptado também para o uso em levedura (Miloshev *et al.*, 2002).

Existem evidências recentes de que o estresse oxidativo provocado por distúrbios em homeostase do cobre pode ter papel importante na etiologia das doenças neurodegenerativas causadas por príon (Sorenson, 2001). Tendo em vista que o nosso trabalho é o primeiro a mostrar que Teste Cometa detecta quebras no DNA induzidas por cobre, poderia-se recomendar o uso deste ensaio na tentativa de se esclarecer função do

cobre, e a suposta proteína transportadora PrP^c, nos animais normais e nos infectados com a forma patogênica desta proteína (PrP^{Sc}).

A planária mostrou-se um sistema bastante sensível para detecção de estresse oxidativo e efeitos genotóxicos induzidos por substâncias químicas. Portanto, seria importante completar este estudo testando outras substâncias, assim como verificar a atividade de outras enzimas antioxidantes (SOD, GPX) e o nível de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione. A acumulação do cobre em planárias, assim como de outros metais, poderia ser medida por método PIXE (emissão de raios-x induzida por partículas) e correlacionada com possíveis alterações fisiológicas. Estudos sobre os efeitos da exposição crônica aos contaminantes também é indispensável na adequação dos métodos para o biomonitoramento ambiental.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H, 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105, 121-126.
- Agarwal K, Sharma A, Talukder G, 1990. Clastogenic effects of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo. *Mutat Res* 243, 1-6.
- Alvarado AS, Newmark PA, 1998. The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair Regen* 6, 413-420.
- Anderson LM, Kasprzak KS, Rice JM, 1994. Preconception exposure of males and neoplasia in their progeny: Effects of metals and consideration of mechanisms. In: *Male-Mediated Development Toxicity* (eds. Olshan AF and Mattison DR), Plenum Press, NY, pp.129-140.
- Aruoma DI, 1997. Free radicals: Dietary Advantages and Disadvantages. In: Scandalios JG (Ed.) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 841-860.
- Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M, 1991. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 273 (Pt3), 601-604.
- Asada A, Kusakawa T, Orii H, Agata K, Watanabe K, Tsubaki M, 2002. Planarian Cytochrome b(561): Conservation of a six Transmembrane Structure and Localization along the Central and Peripheral Nervous System. *J Biochem (Tokyo)* 131, 175-182.

- Backer LC, 1995. Pet dogs as sentinels for human exposure to environmental pollution. In: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change (Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.). Plenum Press, New York, pp. 193-206.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M, 1998. Development and validation of the *in vivo* alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res* 415, 167-184.
- Best JB, Morita M, 1991 Toxicology of planarians. *Hydrobiologia* 277, 375-383.
- Bhunya SP, Jena GB, 1996. Clastogenic effects of copper sulphate in chick *in vivo* test system. *Mutat Res* 367, 57-63.
- Bhunya SP, Pati PC, 1987. Genotoxicity of an Inorganic Pesticide, Copper Sulphate in Mouse *in vivo* Test System. *Cytologia (Tokyo)* 52, 801-808.
- Bierkens JGEA, 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicol* 153, 61-72.
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A, 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ Mol Mutagen* 33, 287-292.
- Boveris A, 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)* 58, 350-356.
- Britton RS, 1996. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 16(1), 3-12.
- Bromenshenk JJ, Smith GC, Watson VJ, 1995. Assessing ecological risks in terrestrial systems with honeybees. In: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change (Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.). Plenum Press, New York, pp. 9-30.

- Brozmanova J, Dudas A, Henriques JAP, 2001. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma* 48, 85-93.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL, 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131, 1-87.
- Cadet J, Bourdat AG, Dham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A, Ravanat JL, 2000. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462, 121-128.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S, 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424, 9-21.
- Cebria F, Nakazawa M, Mineta K, Ikeo K, Gojobori T, Agata K, 2002. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ* 44, 135-146.
- Clayton ME, Steinmann R, Fent K, 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 47, 213-226.
- Clements C, Ralph S, Petras M, 1997. Genotoxicity of selected herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 277-288.
- Codina JC, Pérez-Torrente C, Pérez-García A, Cazorla FM, de Vicente A, 1995. Comparison of microbial tests for detection of heavy metal genotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol* 29, 260-265.
- Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N, 1997. Comet assay in human

- biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. Environ. Mol. Mutagen. 30, 139-146.
- Collins AR, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N, 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. Environ Mol Mutagen 30, 139-146.
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL, 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative basedamage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis 14, 1733-35.
- Collins AR, Ma Ai-guo, Duthie SJ, 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutat Res 336, 69-77.
- Connors DE, Ringwood AH, 2000. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). Aquat Toxicol 50, 341-349.
- Czapski G, 1984. Reaction of OH[•]. Methods Enzymol 105, 209-215.
- Damjan F, Krajna A, Kalafatic M, Ljubescic N, 2000. Toxic effect of copper upon the planarian Polycelis felina (Daly.). Periodicum-Biologorum 102, 283-287.
- De Boeck M, Kirsch-Volders M, 1997. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) Is Not an Adequate Sentinel Species To Assess the Genotoxic Risk (Comet Assay) of PAH Exposure to the Environment. Environ Mol Mutagen 30, 82-90.
- de Pomerai DI, 1996. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. Human and Experimental Toxicol. 15, 279-285.
- Dethloff GM, Bailey HC, Maier KJ, 2001. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Environ Contam Toxicol 40, 371-380.

- Dizdaroglu M, 1993. Chemistry and measurement of damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell B and Aruoma OI (Eds.) DNA and Free Radicals, Sussex: Ellis Horwood Limited.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin M.-C, Babut M, Vasseur P, 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat. Toxcol. 39, 93-110.
- Duquesne S, Riddle M, Schulz R, Liess M, 2000. Effects of contaminants in the Antarctic environment – potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. Aquat. Toxcol. 49, 131-143.
- Duthie SJ, Collins AR, 1997. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. Free Radic Biol Med 22(4), 717-24.
- Eckwert E, Alberti G, Köhler H-R, 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy-metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. Ecotoxicol. 6, 249-262.
- Eide DJ, 1998. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Nutr 18, 441-469.
- Ellis RJ, Van der Vies SM, 1991. Molecular chaperones. Ann Rev Biochem 60, 321-347.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL, 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res 339, 37-59.
- Feder ME, Cartano NV, Milos L, Krebs RA, Lindquist SL, 1996. Effect of engineering hsp 70 copy number on hsp 70 expression and tolerance of ecologically relevant heat

- shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Biol. 199, 1837-1844.
- Fernandes-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Marö M, Miranda M, Ardite E, 1998. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. Biofactors 8, 7-11.
- Fridovich I, 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J Exp Biol 201, 1203-1209.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*, Washington, D.C. ACM Press.
- Goering PL, 1995. Stress proteins – Molecular Biomarkers of Chemical Exposure and Toxicity. In: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change, Edited by F.M. Butterworth et al. Plenum Press, New York.
- Gralla EB, Kosman DJ, 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. Adv Genet 30, 251-319.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, 3ed.
- Hansen LG, Tehseen WM, Foley GL, Schaeffer DJ, 1993. Modification by polychlorinated biphenyls (PCBs) of cadmium induced lesions in the planarian model, *Dugesia dorotocephala*. Biomedical and Environmental Sciences 6, 367-384.
- Harris ED, 2000. Cellular copper transport and metabolism. Annu Rev Nutr 20, 291-310.
- Harris ZL, Gitlin JD, 1996. Genetic and molecular basis for copper toxicity. Am J Clin Nutr 63, 836-841.
- Harrison MD, Christopher EJ, Solioz M, Dameron CT, 2000. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. TIBS 25, 29-32.

- Hartmann A, Speit G, 1996. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ Mol Mutagen* 27, 98-104.
- Hartwig A, 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals* 8, 3-11.
- Henriques JAP, Dafré AL, Picada JN, Maris AF, Salvador M, 2001. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. Em: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (Coordenadores): "Biotecnologia na agricultura e na agroindústria". Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda., pp. 227-256.
- Hightower LE, 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-197.
- Hiraku Y, Inoue S, Oikawa S, Yamamoto K, Tada S, Nishino K, Kawanishi S, 1995. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by certain tryptophan metabolites. *Carcinogenesis* 16, 349-356.
- Huffman DL, O'Halloran TV, 2001. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 70, 677-701.
- Hutchinson TH, Hutchings MJ, Moore KW, 1997. A review of the effects of bromate on aquatic organisms and toxicity of bromate to oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 238-243.
- Indeherberg MB, van Straalen NM, Schockaert ER, 1999. Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between populations of *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes). *Ecotoxicol Environ Saf* 44, 1-11.
- Itoh MT, Igarashi J, 2000. Circadian rhythm of serotonin levels in planarians. *Neuroreport* 11, 473-476.
- Jacobi H, Eicke B, Witte I, 1998. DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propylgallate in the presence of copper(II). *Free Radic Biol Med* 24(6), 972-978.

- Jonson LR, Davenport R, Balbach H, Schaeffer DJ, 1994. Phototoxicology. 3. Comparative toxicity of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes to *Daphnia magna*, *Dugesia dorotocephala*, and sheep erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* 27, 34-49.
- Kalafatic M, Tomaskovic I, 2000. Nickel toxicity on the *Polycelis felina* (Daly.) species in laboratory conditions. *Periodicum Biologorum* 102, 289-292.
- Kaminskas E, Li JC, 1992. Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. *Matat Res* 274, 103-110.
- Kammenga JE, Arts MSJ, Oude-Breuil WJM, 1998. HSP60 as a Potential Biomarker of Toxic Stress in the Nematode *Plectus acuminatus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 34, 253-258.
- Kasprzak KS, Bal W, Porter DW, Bialkowski K, 1999. Studies on oxidative mechanisms of metal-induced carcinogenesis. In: Dizgaroglu M, Karakaya (eds): "Advances in DNA Damage and Repair." New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 193-208.
- Kitaura K, Chone Y, Satake N, Akagi A, Ohnishi T, Suzuki Y, Izumi K, 1999. Role of copper accumulation in spontaneous renal carcinogenesis in Long-Evans Cinnamon rats. *Jpn J Cancer Res* 90, 385-392.
- Klerks PL, Weis JS, 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ Pollut* 45, 173-205.
- Klevay LM, 1998. Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health. *J Am Coll Nutr* 17, 322-326.
- Koppen G, Verschaeve L, 1996. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Res.* 360, 193-200.
- Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM, 2000. Biomarkers in

- zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat Toxicol* 50, 51-71.
- Lau AH, 1998. “Testes de genotoxicidade em planárias. Análise de Aberrações Cromossômicas e Teste cometa”. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da UFRGS, Porto Alegre.
- Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeney D, Godard T, Sichel F, LeTalaer JY, Henry-Amar M, Gauduchon P, 1998. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7, 917-927.
- Leitão AC, Soares RA, Cardoso JS, Guillobel HC, Caldas LR, 1993. Inhibition and induction of SOS responses in *E. coli* by cobaltous chloride. *Mutat Res* 286, 173-180.
- Linder MC, 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat Res* 475, 141-152.
- Linder MC, Hazegh-Azam M, 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63, 797-811.
- Lindquist S, Craig EA, 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Lloid DR, Carmichael PL, Phillips DH, 1998. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions. *Chem Res Toxicol* 11(5), 420-427.
- Loudianos G, Gitlin JD, 2000. Wilson’s Disease. *Sem Liver Disease* 20(3). Thieme Medical Publishers, Inc.
- Ma TH, 1995. *Tradescantia* (Spiderwort) plants as biomonitors of the genotoxicity of environmental pollutants. In: *Application of Short-Term Bioassays in the Analysis*

- of Complex Environmental Mixtures (Sandhu S, Waters MD, eds.). Plenum Publishing Co., New York, pp. 207-216.
- Ma Y, Cao L, Kawabata T, Yoshino T, Yang BB, Okada S, 1998. Cupric nitrilotriacetate induces oxidative DNA damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Free Radic Biol Med* 25, 568-575.
- Malström BJ, Leckner J, 1998. The chemical biology of copper. *Current Opinion in Chem Biol* 2, 286-292.
- Martin J, Horwich AL, Hartl FU, 1992. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin HSP60. *Science* 258, 995-998.
- Mason AZ, Jenkins KD, 1996. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. IUPAC Press, London, pp. 479-608.
- Matozzo V, Ballarin L, Pampanin DM, Marin MG, 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 41, 163-170.
- Maxwell SRJ, 1995. Prospects for use of antioxidant therapies. *Drugs* 49, 345-361.
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A, 1993. The single cell gel electrophoresis (comet assay): A European review. *Mutat Res* 288, 47-63.
- Miloshev G, Mihaylov I, Anachkova B, 2002. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutat Res* 513, 69-74.
- Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki YF, Kobayashi H, Igarashi-Soga M, Shimo K, Hayashi M, 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for

- the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Res* 418, 131-140.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, 1990. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Nascinbeni B, Phillips MD, Croom DK, Andrews PW, Tice RR, Nauman CH, 1991. Evaluation of DNA damage in golden mice (*Ochrotomys nuttalli*) inhabiting a hazardous waste site. *Environ Mol Mutagen* 17, 55.
- Nelson FR, Gray J, Aikhionbare F, 1994. Tolerance of the planarian *Dugesia tigrina* (Tricladida: Turbellaria) to pesticides and insect growth regulators in a small-scale field study. *J Am Mosq Control Assoc* 10, 104-105.
- Nover L, 1991. *Heat-shock Response*. CRC Press, Boca Raton.
- Overvad K, Wang DY, Olsen J, Allen DS, Thorling EB, Bulbrook RD, Hayward JL, 1993. Copper in human mammary carcinogenesis: a case-cohort study. *Am J Epidemiol* 137(4), 409-414.
- Pandey S, Ahmad I, Parvez S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S, 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 41, 345-352.
- Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M, 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bulheads and carp. *Environ Mol Mutagen* 26, 345-356.
- Pedersen SN, Lundebue A-K, Depledge MH, 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat Toxicol* 37, 183-200.

- Petras M, Vrzoc M, Pandrangi R, Ralph S, Perry K, 1995. Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.). Plenum Press, New York, pp. 115-137.
- Pipe RK, Coles JA, Carissan FMM, Ramanathan K, 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 46, 43-54.
- Porter DW, Yakushiji H, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Fivash MJ Jr, Kasprzak KS, 1997. Sensitivity of *Escherichia coli* (MutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II). *Carcinogenesis* 18, 1785-91.
- Prakash L, Prakash S, 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* 451, 13-24.
- Preza DLC, Smith DH, 2001. Use of newborn *Girardia tigrina* (Girard, 1850) in acute toxicity tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 50, 1-3.
- Pyza E, Mak P, Kramarz P, Laskowski R, 1997. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol Environ Safety* 38, 244-251.
- Ralph S, Petras M, Pandrangi R, Vrzoc M, 1997. Alkaline Single-Cell Gel (Comet) Assay and Genotoxicity Monitoring Using Two Species of Tadpoles. *Environ Mol Mutagen* 28, 112-120.
- Regoli F, Nigro M, Orlando E, 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol* 40, 375-392.
- Regoli F, Principato GB, 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Toxicol* 31, 143-164.

- Regoli F, Principato GB, Bertoli E, Nigro M, Orlando E, 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biol.* 17, 251-258.
- Reid TM, Feig DI, Loeb L, 1994. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3, 57-61.
- Rodriguez H, Akman SA, 1998. Mapping oxidative DNA damage at nucleotide level. *Free Radic Res* 29(6), 499-510.
- Rossman TG, 1995. Metal mutagenesis. In Goyer RA, Cherian GC (eds): "Toxicology of Metals." New York: Springer-Verlag, pp 373-403.
- Sáfadi RS, 1993. "Emprego de planárias de água doce *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) na avaliação de toxicidade de compostos metálicos. Proposta metodológica." Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- Salagovic J, Gilles J, Veschaeve L, Kalina I, 1996. The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: A promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42, 17-21.
- Sanders BM, 1990. Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds) *Biomarkers of environmental contamination*. CRC press, Boca Raton, FL. pp 165-192.
- Sanders BM, 1993a. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol* 23, 49-75.
- Sanders BM, 1993b. The cellular stress response. *Environ* 16, 3-6.
- Sanders BM, Martin LS, 1994. Copper inhibits the induction of stress protein synthesis by

- elevated temperatures in embryos of the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 109, 295-307.
- Sanders BM, Martin LS, Howe SR, Nelson WG, Herge ES, Phelps DK, 1994a. Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 125, 206-213.
- Sanders BM, Martin LS, Nakagawa PA, Hunter DA, Miller S, Ullrich SJ, 1994b. Specific cross-reactivity of antibodies raised against two major stress proteins, stress 70 and chaperonin 60, in diverse species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1241-1249.
- Sanders BM, Martin LS, Nelson WG, Phelps DK, Welch W, 1991. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Envir Res* 31, 81-97.
- Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, Ishibashi S, Tsuda S, Matsusaka N, Asano N, Saotome K, Sofuni T, Hayashi M, 1997a. Detection of genotoxicity of polluted seawater using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutation Res* 393, 133-139.
- Sasaki YF, Nishidate E, Izumiyama F, Matsusaka N, Tsuda S (1997b): Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel eletrophoresis (Comet) assay in multiple organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat Res* 391, 215-231.
- Schaeffer DJ, 1994. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 1-18.
- Schlesinger MJ, 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265, 12111-12114.
- Shepard JL, Olsson B, Tedengren M, Bradley BP, 2000. Protein expression signatures

- identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. Marine Envir Res 50, 337-340.
- Sies H, 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 215, 213-219.
- Sies H, 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol 82, 291-295.
- Silva J, 1999. Biomonitoramento de regiões mineradoras de carvão do Rio Grande do Sul – avaliação da genotoxicidade através de roedores nativos. Dissertação de Doutorado, Instituto de Biociências da UFRGS, Porto Alegre.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B, 2000a. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and Micronucleus test. Environ Mol Mutagen 35, 270-278.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Bittencourt F, Cerski CTS, Kliemann LM, Erdtmann B, 2000b. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. Mutat Res 470, 39-51.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175, 184-191.
- Snow ET, 1992. Metal carcinogenesis: Mechanistic consideration. Pharm Ther 53, 31-65.
- Snyder MJ, Girvetz E, Mulder EP, 2001. Induction of marine mollusk stress proteins by chemical or physical stress. Arch Environ Contam Toxicol 41, 22-29.
- Sorenson JRJ, 2001. Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation. J Inorg Biochem 87, 125-127.
- Speit G, Hanelt S, Helbig R, Siedel A, Hartmann A, 1996. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. Toxicology

- Letters 88, 91-98.
- Speit G, Hartmann A, 1996. Nachweis von Genotoxischen Umweltschadstoffen mit dem "Comet Assay". In: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Projekt, Angewandte Ökologie). Ulm, pp. 114.
- Steinkellner H, Mun-Sik K, Helma C, Ecker S, Ma T-H, Horak O, Kundi M, Knasmüller, 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ Mol Mutagen* 31, 183-191.
- Stohs SJ, Bagchi D, 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336.
- Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaupt G, 2001. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 55, 175-185.
- Teisseire H, Couderchet M, Vernet G, 1998. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotoxicol Environ Safety* 40, 194-200.
- Tice RR, 1995. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth FM (ed): "Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change." New York: Plenum Press, pp. 314-327.
- Tinwell H, Ashby J, 1990. Inactivity of copper sulphate in a mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat Res* 245, 223-226.
- Ueda J, Takai M, Shimazu Y, Ozawa T. 1998. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Arch Biochem Biophys* 357(2), 231-9.

- Ugazio G, Burdino E, Crespi M, Barbero N, Garizio M, Arru G, Congiu AM, 1997. Ecotoxicological study conducted with a battery of biological and phytological tests on sediments carried out on a series of 24 tributaries of the Po in 1994 and 1995. *Giornale Italiano di Medicina Del Lavoro Ed Ergonomia* 19, 10-16.
- Van Loon AAWM, Sonneveld E, Hoogerbrugge J, van der Schans GP, Grootegoed JA, Lohman PHM, Baan RA, 1993. Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation. *Mutat Res* 294, 139-148.
- Varanka Z, Rojik I, Varanka I, Nemcsók J, Ábrahám M, 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tanic acid. *Comp Biochem Physiol C* 128, 467-478.
- Verschaeve L, Gilles J, 1995. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull. Environ. Contamination Toxicol.* 54, 112-119.
- Villar D, Li MH, Schaeffer DJ, 1993. Toxicity of organophosphorus pesticides to *Dugesia dorocephala*. *Bull Environ Contam Toxicol* 51, 80-87.
- Welch WJ, 1993. How cells respond to stress. *Sci Amer* 268, 56-64.
- Werner I, Kline KF, Hollibaugh JT, 1998. Stress protein expression in *Ampelisca abdita* (Amphipoda) exposed to sediments from San Francisco Bay. *Mar Environ Res* 45, 417-430.
- Werner I, Nagel R, 1997. Stress proteins hsp60 and hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environ Toxicol Chem* 16, 2393-2403.
- Wheelock CE, Wolfe MF, Olsen H, Tjeerdema RS, Sowby ML, 1999. Hsp-60-induced

- tolerance in the rotifer *Brachionus plicatilis* to multiple environmental contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 36, 281-287.
- Winston GW, 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol C* 100, 173-176.
- Winston GW, Moore Di Giulio RT, 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19, 137-161.
- Wirth QJ, Hauser J, 1990. Contribuição à história da sistemática dos turbelários e classificação atual dos paludicola do Rio Grande do Sul. *Acta Biologica Leopoldensia* 12, 39-59.
- Yamashita N, Tanemura H, Kawanishi S, 1999. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutation Res* 425(1), 107-115.