

EFEITO DA RADIAÇÃO EM LINHAGENS DE *Drosophila melanogaster*:  
CÉLULAS GERMINAIS DA FÊMEA

Mara da Silveira Benfato

Dissertação apresentada ao Curso  
de Ciências Biológicas da Univer-  
sidade Federal do Rio Grande do  
Sul, para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas,  
ênfase em Genética.

Orientador: Ms. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade

Porto Alegre

1984

1984

Instituto de Biologia

Nº 22

Reg.

Nº 100

Data

Nº 100

Cód. Barra

Aos meus pais  
Joventino e Guilhermina

e meus irmãos  
Oscar e Márcia.

## AGRADECIMENTOS

- À Ms. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade pela orientação e amizade.
- Ao Dr. Edmundo Kanan Marques pelas sugestões na análise dos resultados.
- À Dra. Maria Luíza Reguly e à Ms. Maria Clara Gimmler pelo incentivo e auxílio em todas as fases deste trabalho.
- Ao Dr. Aldo Mellender Araújo pelo auxílio estatístico.
- Às técnicas Martina da Silva, Juracy Xavier e Maria Francisca de Abreu pela colaboração na parte experimental.
- Aos colegas Rosane, Mara, Gilberto, Cláudia, Fátima, Janice, Nelson e todos aqueles que compartilharam as vitórias e deram apoio nas dificuldades.
- À Kátia, colega de dissertação e amiga, que soube incentivar nos momentos de desânimo.
- À minha irmã Márcia e meu cunhado Celso pela compreensão e solicitude em todas as horas.
- Ao meu pai e a minha mãe pelo amparo e amor manifesto nas pequenas coisas do dia-a-dia.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da UFRGS, subvencionado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do SUL (FAPERGS) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1. Diferenças de sensibilidade .....	7
1.2. Papel do oxigênio sobre a radiosensibilidade inicial .....	11
1.3. Taxa de dose e dose fracionada .....	12
1.4. Objetivos .....	14
2. MATERIAL E MÉTODO .....	17
2.1. Histórico das linhagens .....	17
2.2. Oogênese em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
2.3. Tratamento das fêmeas .....	18
2.3.1. Estágio 7 de oócito .....	18
2.3.2. Estágio 14 de oócito .....	19
2.3.3. Estágio 7 de oócito - dose fracionada .....	20
3. RESULTADOS .....	21
3.1. Estágio 7 de oócito .....	21
3.2. Estágio 14 de oócito .....	26
4. DISCUSSÃO .....	29
5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES .....	35
6. BIBLIOGRAFIA .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

O fato de que estágios oogênicos de *Drosophila melanogaster* apresentam diferenças de radiosensibilidade foi, marcadamente, notado em estudos a partir da década de 20, os quais mostravam que a taxa de mutação é alta nas células germinais primeiramente produzidas e que decresce em ninhadas subseqüentes (Mavor, 1924; Patterson e cols., 1932; Mainx, 1940; Gall, 1950; Müller e cols., 1950; King, 1952; 1955a,b; Novitski, 1953; Parker, 1953, 1954, 1955; Herskowitz, 1954; Kutschera, 1954; Lüning, 1954; Müller e Herskowitz, 1954; King e Wood, 1955; Glass, 1955a,b, 1956).

No entanto, somente com a publicação do trabalho de King e cols. (1956a), relacionando diferentes estágios da oogênese de *D. melanogaster* com a idade das fêmeas, é que foi possível um estudo mais preciso sobre a radiosensibilidade dessas células germinais. Estes autores descreveram a estrutura do ovário da fêmea e estabeleceram 14 estágios de desenvolvimento do oócito. Num trabalho subseqüente, King e cols. (1956b) estudaram a resposta genética destes diferentes estágios a 2KR de radiação, quanto à indução de letal dominante, letal recessivo ligado ao sexo e perda de cromossoma X. Os resultados encontrados permitiram a subdivisão das células germinais em três categorias de acordo com sua resposta mutacional. Células da classe A, ovos produzidos durante as primeiras 24 horas após a irradiação de fêmeas com 3-4 dias, mostraram a mais alta taxa de letal dominante, letal recessivo ligado ao sexo e perda de cromossoma X, correspondendo a oócitos tratados em estágio 14. Células da classe B, ovos produzidos 2-12 dias após a irradiação de fêmeas recém-emergidas, mostraram uma sensibilidade intermediária para os três tipos de dano

genético estudados, correspondendo aos estágios 3-7. Na classe C, ovos postos durante 13-35 dias por fêmeas irradiadas recém-eclodidas, incluíam-se as células menos sensíveis, as quais correspondiam a oogônias.

Nos anos seguintes, surgiram trabalhos de outros autores relacionados com dois estágios específicos descritos por King e cols. (1956b), os estágios 7 e 14 de oócito. Tais estudos, além de confirmarem a maior radiosensibilidade do estágio 14 de oócito, também demonstraram que a magnitude das diferenças de sensibilidade entre os dois estágios depende do tipo de dano genético analisado. Comparações entre os dois estágios permitiram concluir que o estágio 14 é cerca de 6 vezes mais sensível do que o estágio 7 com relação à indução de letais dominantes, 5 vezes mais sensível à indução de intertrocas cromatídicas e 2 a 3 vezes mais sensível para letal recessivo ligado ao sexo e perda de cromossoma X (King e cols., 1956b; Sankaranarayanan e Sobels, 1976).

### 1.1. Diferenças de sensibilidade

Parker (1955, 1959), irradiando fêmeas Oregon-R recém-eclodidas (estágio 7 de oócito) com doses de 900 a 6.000R e fêmeas de 5 ou 7 dias (estágio 14 do oócito) com doses de 50 a 600R de raio-X, demonstrou a existência de uma diferença significativa de radiosensibilidade entre os dois estágios, sendo o estágio 7 mais resistente que o estágio 14 com relação à indução de letal dominante.

King e cols. (1956b) irradiaram fêmeas Oregon-R (0-1 h e 96-97 hs) com doses de 500 a 7.000R de radiação gama. Os resultados obtidos com relação às diferenças de sensibilidade entre os estágios 7 e 14 de oócito confirmaram os obtidos por Parker.

Bateman e Chandley (1963) estudaram a frequência de letal dominante (medida pela postura sucessiva de ovos) induzi-

da por 1.000 a 20.000 rad de radiação em fêmeas heterozigotas (2 ou 7 dias) de uma linhagem marcadora para não disjunção. Os resultados para fêmeas irradiadas com 7 dias mostraram uma hipersensibilidade dos ovos depositados nas primeiras 12 horas após o tratamento. Esta resposta é atribuída à irradiação de oócitos em metáfase I (estágio 14). Em ovos postos nos 6 dias seguintes, ocorreu uma marcada diminuição na frequência de letais dominantes devido a irradiação de oócitos em todos os estágio anteriores à metáfase I (estágios 1-7). Finalmente, foi observada uma incidência residual de letais dominantes em ninhadas de 7 a 12 dias após o tratamento, provavelmente devido a irradiação de oogônias. Fêmeas irradiadas com 2 dias apresentavam uma frequência de eclosão que se elevou levemente entre o segundo e o quinto dia, mas que subiu abruptamente a partir do sexto dia, igualando-se à frequência do controle. Em doses acima de 10.000 rad, foi observada completa esterilidade, com os ovários atrofiados, sem oócitos ou oogônias.

Em 1972, Würigler e Lütolf irradiaram, com 4 doses de raio-X (100-400R), fêmeas diplóides e triplóides de uma mesma linhagem. Os estoques diferiam primariamente no número cromossômico, mas eram idênticos em relação aos genes que poderiam influenciar na radiosensibilidade. Demonstraram que há uma maior sensibilidade de oócitos maduros (estágio 14) de fêmeas triplóides quando comparados com os oócitos de fêmeas diplóides. Würigler e Leuthold (1972), utilizando fêmeas X/X da linhagem Berlim e XY/XY de uma linhagem marcadora, irradiadas com doses de 1.000-6.000R de raio X, concluíram que não ocorre diferença na resposta mutacional destas duas linhagens em oócitos imaturos (estágio 7). No entanto, oócitos maduros de fêmeas XY/XY apresentavam-se mais sensíveis à indução de letal dominante do que os de fêmeas X/X. Esses resultados indicaram que a letalidade em estágio 14 de oócito apresenta como alvo principal o conjunto cromossômico e que em estágio 7 ocorre dano nos cromossomas e em outros alvos dentro da célula. Würigler e cols. (1972), estudando oócitos em estágio 7 e 14 de fêmeas XX/0 e X/X, confirmaram os resultados anteriores.

Osgood e Zimmering (1972) dividiram o período de ovoposição de 24 horas para estágio 14 em duas ninhadas de 5 horas e uma de 14 horas e mostraram que as freqüências de eclosão obtidas com dose de 500R de raio-X aumentavam, respectivamente, de 39% no primeiro período de 5 horas para 57% no segundo e finalmente para 67% na terceira ninhada. Tais resultados, também obtidos por Zimmering e Scott (1968) para perda de cromossoma X em oócito 14, seriam indicativos da existência de uma considerável heterogeneidade das células germinais introduzidas por um período de 24 horas, provavelmente devido a mais de um tipo de estágio 14 em fêmeas de 4 dias.

Nöthel (1970, 1972) testou uma população de *D. melanogaster* na qual oócito de estágios 6 a 14, espermatozôide e espermatide tardia eram irradiados com 2.100R de raio-X por 220 gerações, verificando uma acentuada diminuição da radiosensibilidade desta população (RÖI) quando comparada com uma população controle de mesma origem (+60). Demonstrou, também, que as diferenças de radiosensibilidade observadas estavam confinadas a um único estágio germinal, o de oócito 7, que na população RÖI apresentava uma pronunciada diminuição de sensibilidade com relação a letais dominantes e perda de cromossoma X e um decréscimo menos acentuado com relação a letais recessivos ligados ao sexo. Prosseguindo na investigação, Nöthel mostrou que:

1. Pré e pós-tratamento de oxigênio e nitrogênio modifica a radiosensibilidade absoluta das populações em estágio 7, porém as diferenças entre as linhagens permanecem. Assim, a resposta diferencial entre as duas populações não é devida a um mecanismo de reparo dependente de  $O_2$  ou  $N_2$  (Nöthel, 1973).

2. A radioresistência de RÖI é controlada por um sistema homozigoto estável, e este sistema é semidominante (Nöthel, 1974a).

3. Pelo menos dois mecanismos diferentes e independentes estão envolvidos na radioresistência desta população. Os cromossomas I e II são responsáveis pela resistência à indução de letais dominantes e letais recessivos ligados ao sexo e a-

presentam um efeito aditivo, no qual cada cromossoma contribui com a metade da resistência relativa. A resistência à perda de cromossoma X depende exclusivamente do cromossoma II (Nöthel, 1974a).

4. A radioresistência de RÖI pode estar associada com reparo por recombinação (Nöthel, 1974b).

5. Ocorre um acréscimo na radioresistência relativa para letal dominante, letal recessivo ligado ao sexo e perda de cromossoma X em subpopulações de RÖI: RÖI<sub>4</sub> exposta a 4.000R/geração durante 44-107 gerações e RÖI<sub>4,0</sub> com 4.000R/geração durante 48 gerações com subsequente intervalo sem irradiações de 45-66 gerações (Nöthel, 1974c; Nöthel e Weber, 1976).

6. O sistema de radioresistência relativa para as populações RÖI, RÖI<sub>4</sub> e RÖI<sub>4,0</sub> é "dose-modifying" e pode ser descrito por um fator de redução de dose (DRF = razão entre o incremento, em porcentagem, do dano induzido por 1KR na população controle e o induzido na população irradiada). Este DRF pode ser controlado por três fatores genéticos independentes:

a) o fator genético rar-1, que é responsável pela resistência a indução de letal dominante (DRF = 1,31) e letal recessivo ligado ao sexo (DRF = 1,31) e está localizado no cromossoma I. Este fator não atua em quebras cromossômicas, é inibido por cafeína (0,2%) e supõe-se que ative um processo de reparo que corrige mutações pontuais (Nöthel, 1981a; Nöthel e Abdalla, 1982);

b) o fator genético rar-2, independentemente, diminui ambos os tipos de letal com o mesmo DRF de rar-1 e também afeta a perda de cromossoma X (DRF = 1,72). Supõe-se que este fator reduz a associação de heterólogos, cromossomas quiasmáticos no centrômero no tempo e/ou no espaço e, assim, diminui as pré-condições para a produção de certos tipos de intertrocas e não-disjunção. Está localizado no cromossoma II (Nöthel, 1981a; Rudolph e cols., 1982);

c) o fator genético rar-3 contribui para a radioresistência a letal dominante (DRF = 1,58), intertrocas (DRF = 1,58), não-disjunção (DRF = 1,58) e letal recessivo ligado ao sexo (DRF = 1,87). Está localizado no cromossoma III, na po-

sição 49,8 do mapa e é um fator recessivo que atua independentemente de rar-1 e rar-2. Este fator só foi encontrado na população RÖI<sub>4</sub>, sendo o responsável pela maior resistência desta linhagem em relação a RÖI. Não foram encontradas diferenças no tipo de letal recessivo ligado ao sexo induzidos em RÖI e RÖI<sub>4</sub>, e a frequência de recombinação é a mesma nos dois estoques (Nöthel, 1981a,b,c).

Estudando a especificidade de rar-3, Nöthel (1981d) mostrou que, em fêmea, seus efeitos ocorrem em quase todos os estágios germinais, só não atuando sobre oócitos maduros, ao contrário de rar-1 e rar-2, que têm sua ação restrita a estágios de prófase I da meiose, estendendo-se do período pós-recombinacional até antes da metáfase I. Não foi encontrado nenhum efeito de rar-3 na espermatogênese e em tecidos somáticos (irradiação de larvas de 3º estágio) e também não apresenta efeito materno. É interessante notar que rar-3 não atua em oogônias de estágios larvais, logo sua atividade deve se iniciar durante a formação do pupário ou na metamorfose e persistir até a formação do oócito maduro.

## 1.2. Papel do oxigênio sobre a radiosensibilidade inicial

Em 1964, Rinehart testou o efeito de várias tensões de O<sub>2</sub> e He presentes antes, durante e depois da irradiação de fêmeas adultas Oregon-R em estágios 7 e 14 de oócito. Foram utilizadas fêmeas de 4 1/2-5 dias irradiadas com 300R e fêmeas de 0-5 h irradiadas com 3.000R, cruzadas individualmente. Somente grupos de 24 ou menos ovos foram incluídos na contagem para letal dominante. Rinehart concluiu que: 1) não existe diferença na radiosensibilidade relativa entre os dois estágios testados. As diferenças observadas normalmente são causadas por uma soma diferencial de oxigênio intracelular; 2) o pré ou pós-tratamento com He causa um aumento significativo na mortalidade induzida por raio-X, sendo este aumento proporcional ao tempo de anoxia; 3) o aumento da letalidade dominante do estágio 7 não é evidenciado quando as moscas são expostas a

a anoxia a 40°C; 4) o efeito provocado pela anoxia é reversível quando as moscas são colocadas no ar, após o tratamento por anoxia, mas antes da irradiação; 5) o pré ou pós-tratamento com He não provoca aumento de sensibilidade em estágio 14.

No trabalho de Sankaranarayanan (1969b), foi estudado oócito maduro (estágio 14) de fêmeas Oregon-R expostas a diferentes níveis de radiação em  $N_2$ ,  $O_2$  e ar. Após a irradiação, nos dois primeiros gases, seguiu-se um pós-tratamento com  $N_2$  ou  $O_2$ , e à exposição em ar seguiu-se pós-tratamento com  $N_2$  ou ar. A sobrevivência do ovo foi usada como um critério para estudo dos tratamentos combinados. Foi determinado que: 1) a curva de sobrevivência observada indica cinética de uma quebra; 2) o pós-tratamento por anoxia leva a uma significativa redução de sobrevivência; 3) este efeito em anoxia pode ser reproduzido se as moscas são pós-tratadas com  $O_2$  nos primeiros 45 minutos e então com  $N_2$  nos próximos 45 minutos.

Sankaranarayanan (1969a) estudou a frequência de letais dominantes induzidos por radiação, seguida de pós-tratamento com  $O_2$  e  $N_2$ , em estágio 7 de oócito. Os resultados obtidos indicam que: 1) a curva de sobrevivência obtida é devida a duas quebras: 2) no pós-tratamento em  $O_2$  a sobrevivência do ovo é consideravelmente maior do que a observada no tratamento com  $N_2$ .

Estes resultados mostram, claramente, que em condições normais de ar o estágio 14 é intrinsecamente mais oxigenado do que o estágio 7 e que a taxa de OER ("Oxygen Enhancement Ratio") para estágio 14 é de 3,8 e 2,6 para estágio 7. Assim, as diferenças entre os estágios 7 e 14 são máximas em ar, intermediárias em  $O_2$  e bastante diminuídas em  $N_2$ .

### 1.3. Taxa de dose e dose fracionada

Parker (1959) realizou uma série de experimentos utilizando doses fracionadas. Nestes, irradiou fêmeas Oregon-R em

estágio 7 com uma dose total de 3.000R, subdividida em duas frações de 1.500R, com intervalos de 15, 30, 45 ou 60 minutos entre elas. Para fêmeas em estágio 14, foram utilizados 300R, subdivididos em duas frações de 150R, com intervalos de 15, 30 ou 240 minutos. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo de sobrevivência nas séries do estágio 7 quando o intervalo entre as frações era de 15 minutos. O fracionamento não alterou a sobrevivência em estágio 14. Estes achados são uma extensão de resultados anteriores obtidos por Parker e Hammond (1958) para intertrocas cromatídicas em estágio 7. Parker também determinou que centrifugação com 1.150 g após a irradiação leva a uma diminuição da sobrevivência somente em estágio 7.

Ao contrário do que foi observado por Parker (1959, 1963), de que doses de radiação fracionadas produzem quantidades equivalentes de letais dominantes no estágio 14, Würigler e Matter (1968) observaram uma pequena, mas mensurável diminuição na mortalidade do ovo quando administradas duas doses fracionadas de 300R em intervalos de 2 minutos a 8 horas. O efeito mais pronunciado foi observado no maior intervalo entre as duas doses.

Traut e Schmidt (1967) irradiaram fêmeas da linhagem Berlim de 0-2 1/2 h (estágio 7) com doses de 1.000R a 6.000R administradas em uma dose única ou em duas frações iguais separadas por um intervalo de  $60 \pm 5$  min. Determinaram que em todas as doses fracionadas ocorreu um aumento de sobrevivência quando comparado com seus respectivos controles não-fracionados. Em outro experimento, utilizaram uma dose de 3.000R em velocidades de 5 e 100R/min e determinaram que doses de baixa intensidade aumentam a sobrevivência ainda mais que o fracionamento.

Sankaranarayanan (1974) também notou que as freqüências de letais dominantes induzidos em estágio 7 de oócito são consistentemente mais baixas quando a exposição ao raio-X é de 300 e 50R/min do que de 3.000R/min.

Steiner e Würigler (1979a,b) irradiaram fêmeas de um estoque com cromossoma X ligado e do estoque Berlim analisando a sensibilidade de oócitos da classe B (estágios 5-13). Determinaram que, nestes estágios, há maior resistência de oócitos das fêmeas com cromossoma X ligado em relação às fêmeas Berlim para letal dominante, aberrações cromossômicas e não-disjunção. Utilizando doses agudas de 7.000R e doses fracionadas com intervalo de tempo de uma hora, os autores mostraram que a taxa de letal dominante é menor com exposições fracionadas, quando comparada com doses agudas (1.017R/min e 2.254R/min). Determinaram, também, que em oócitos da classe B o dano subletal é devido a quebras cromossômicas e/ou lesões que levam a quebras e que a letalidade dominante induzida por raio-X é consequência de dano nos cromossomas.

Em outro experimento, expuseram as fêmeas com cromossoma X ligado a uma dose de 5.000R aplicada em dose única ou em 2 frações de 2.000 e 3.000R, separadas por um intervalo de tempo crescente. Demonstraram que, em oócitos da classe B, todo o dano possível de ser reparado (25%) era corrigido entre 20 e 30 minutos e que metade do dano desaparecia entre 5 a 7 minutos.

Sankaranarayanan e Volkers (1980), numa reanálise do fracionamento, confirmaram os resultados dos autores anteriores mostrando que a frequência de letal dominante é maior numa dose única, quando comparada com exposições fracionadas. Conseqüentemente, a redução na letalidade dominante é relativamente maior à medida que aumenta o número de frações.

#### 1.4. Objetivos

As linhagens CO<sub>3</sub> e RC<sub>1</sub> foram analisadas em nosso laboratório com relação a letais recessivos ligados ao sexo e letais dominantes induzidos por radiação gama de <sup>60</sup>Co, etilmetanosulfonato (EMS) e integerrimina (alcalóide pirrolizidíni-

co). Foram estabelecidos os danos induzidos por estes mutagênicos em estágios de espermatogênese.

Andrade (1976) e Andrade e Marques (1980) testaram as linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  para letal recessivo ligado ao sexo. Os resultados indicaram que a linhagem  $CO_3$  é mais resistente a indução deste dano quando exposta a diferentes doses de radiação gama de  $^{60}Co$  (2,5, 5,0, 10,0 e 15 KR) em relação à linhagem  $RC_1$ . Resultado semelhante foi obtido com a indução de letais por EMS (3, 6 e  $12 \times 10^{-3}$  M).

Ramos (1977), utilizando integerrimina em machos e medindo letal recessivo ligado ao sexo, determinou que há diferenças de sensibilidade entre as linhagens, sendo  $RC_1$  mais sensível que  $CO_3$ .

Pacheco (comunicação pessoal), medindo letais dominantes na espermatogênese, confirmou estas diferenças de sensibilidade.

Reguly (1983) verificou que a resistência a letais induzidos por radiação gama (5 KR) ou EMS (0,006 M) em ninhadas sucessivas das linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  é mantida nos estágios pós-meióticos (e meioótico em relação ao EMS), mas não nos pré-meióticos. Determinou, também, que a linhagem  $CO_3$  apresenta resistência à indução de mutação por ambos os mutagênicos quando comparada com a linhagem  $RC_1$ . Pré-tratamento com cafeína não apresentou efeito mutagênico quando administrado isoladamente nas duas linhagens. No entanto, quando administrado antes da irradiação, aumentou a frequência de letais recessivos ligados ao sexo na linhagem resistente, mas não modificou a frequência na linhagem sensível, indicando que as diferenças de sensibilidade entre as linhagens são devidas a diferenças no reparo do dano pré-mutacional.

Tendo em vista estes resultados, o presente trabalho tem como objetivos:

● Determinar se as diferenças de radiosensibilidade observadas em machos das linhagens CO<sub>3</sub> e RC<sub>1</sub> ocorrem também nas fêmeas destas mesmas linhagens.

● Estabelecer se as diferenças de sensibilidade ocorrem em dois estágios específicos da oogênese citados na literatura como radioresistente (estágio 7 de oócito) e radiosensível (estágio 14 de oócito).

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1. Histórico das linhagens

No experimento foram utilizadas duas linhagens de *Drosophila melanogaster* provenientes dos estoques RC<sub>1</sub> (Riverside, Califórnia) e CO<sub>3</sub> (Columbia, New York), cedidas pelo Laboratório de Genética da Cornell University, Ithaca, USA, e mantidas por vários anos em laboratório.

Na análise genética para determinação de letais dominantes (LD), foi utilizada a linhagem marcadora Basc:  $In(1)sc^{S1L} sc^{8R} + S, sc^{S1} sc^{8a} w^B/Y$  (veja Lindsley e Grell, 1968, para descrição dos marcadores).

### 2.2. Oogênese em *Drosophila melanogaster*

O processo de oogênese de *D. melanogaster* foi descrito por King e cols. (1956a), os quais verificaram que cada um dos dois ovários é dividido em 12 ovariolos, e estes são diferenciados num germário anterior e numa série de grupos de ovos. O desenvolvimento do ovo no ovariolo pode ser subdividido em 14 estágios, e o número de grupos de ovos por ovariolo, bem como o estágio em que estes se encontram depende, primariamente, da idade da fêmea.

Distribuição e número médio de ovos nos ovários em relação ao estágio de desenvolvimento em fêmeas de *D. melanogaster* de diferentes idades (segundo King e cols., 1956b)

Idade (h) das fêmeas virgens	Estágio de desenvolvimento									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8-13	14	
0-1	24	25	24	20	16	20	20	0	0	149
96-97	24	25	25	20	10	24	24	0	24	176

Fêmeas de 0-1 h de vida apresentam oócitos em estágios de 1 a 7 e nenhum de 8 a 14. O número de oócitos em estágio 7 é de 20, o que permite afirmar que os primeiros 20 ovos postos por fêmeas tratadas com este tempo de vida se encontravam em estágio 7 durante o tratamento.

Fêmeas de 96-97 hs de vida possuem 24 oócitos em estágio 14 e 24 em estágio 7, além de oócitos em estágios anteriores, porém nenhum em estágios 8 a 13. Foi verificado que um ovo pode desenvolver-se de estágio 7 a 14 num período de aproximadamente 14,5 horas (King, 1957). Assim, os primeiros 24 ovos postos por fêmeas tratadas com 96-97 hs de vida se encontravam em estágio 14 à época do tratamento.

Oócitos em estágio 7 estão em prófase I, provavelmente em diploteno e oócito de estágio 7 em prófase tardia ou metáfase I (King e cols., 1956a,b; Traut, 1967a,b,c,d; Traut e Schmidt, 1967; Traut e Scheid, 1969; Sankaranarayanan, 1969a).

### 2.3. Tratamento das fêmeas

#### 2.3.1. Estágio 7 de oócito

Para irradiar oócito em estágio 7, fêmeas virgens de 0-3 hs das linhagens CO<sub>3</sub> e RC<sub>1</sub> foram colocadas em cápsulas plásticas de 2 cm de altura por 0,6 cm de diâmetro, contendo pequenos orifícios nas extremidades que permitiam a entrada de ar.

Foram irradiadas com doses de 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 e 10,0 KR a uma velocidade de 47,98 a 48,51R/min, usando-se para isto uma fonte de Cobalto 60, modelo RL,CO Radionics Laboratory.

Imediatamente após a irradiação, as fêmeas foram cruzadas em massa com machos Basc não tratados (3-4 dias) e manti-

das por 18 horas a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 60-80% de umidade relativa do ar, em vidros de 1/4 l contendo meio de cultura segundo Marques e cols. (1966). Foi observado que, durante este tempo, as fêmeas não colocavam ovos.

Passado este período, cada fêmea foi cruzada individualmente com 2 machos Basc não tratados e colocada em tubos de coleta de ovos contendo meio de ovoposição. Este meio consiste de uma mistura de agar/ácido acético/álcool: 3 g de agar, 1 ml de ácido acético glacial, 2 ml de álcool etílico e 100 ml de água, escurecido com carvão (Fahmy e Fahmy, 1954), o qual é espalhado sobre tiras de papel de 1 x 5 cm e colocado em vidros de 1/16 l contendo algodão e papel filtro previamente umedecido. Sobre este filme foi colocada uma gota de fermento líquido.

Passadas 25-30 hs do início do experimento, os meios de ovoposição foram examinados de 3 em 3 horas e contados os ovos neles depositados, não ultrapassando 20 ovos por fêmea inseminada, a fim de garantir a coleta exclusiva de ovos que estavam em estágio 7 de oócito à época da irradiação.

Após a contagem, os ovos foram transferidos para vidros de 1/16 l contendo meio de cultura normal e mantidos por 12 dias a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 60-80% de umidade relativa do ar. Os adultos  $F_1$  foram, então, contados para obter dados sobre letalidade dominante.

O grupo controle recebeu o mesmo tratamento, com exceção da irradiação.

### 2.3.2. Estágio 14 de oócito

Para o experimento de estágio 14, fêmeas virgens de 96-99 hs das linhagens  $\text{CO}_3$  e  $\text{RC}_1$  foram irradiadas com doses de 0,125, 0,250, 0,375, 0,500 e 0,625KR, a uma velocidade de 47,98 a 48,51 R/min. Logo após a irradiação, foram cruzadas

individualmente com 2 machos Basc não tratados (3-4 dias) e colocadas em tubos para coleta de ovos contendo meio de ovoposição.

Após 6 hs do cruzamento, os meios foram examinados de 2 em 2 hs e contados os ovos até o número de 24 por fêmea para garantir a coleta exclusiva de ovos irradiados em estágio 14.

Os meios de ovoposição foram transferidos para vidros de 1/16 l com meio de cultura normal e mantidos por 12 dias nas mesmas condições de temperatura e umidade antes descritas, quando então foram contados os adultos da  $F_1$ .

O grupo controle recebeu o mesmo tratamento, com exceção da irradiação.

### **2.2.3. Estágio 7 de oócito - dose fracionada**

Na técnica de dose fracionada para estágio 7 de oócito, fêmeas virgens de 0-3 hs das linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  foram irradiadas com doses únicas de 2,5 e 5,0KR ou doses fracionadas, subdivididas em duas frações iguais separadas por um intervalo de 30 min.

O procedimento posterior foi semelhante ao do experimento para estágio 7 de oócito.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estágio 7 de oócito

Fêmeas das linhagens CO<sub>3</sub> e RC<sub>1</sub> portando oócitos em estágio 7 foram irradiadas simultaneamente com doses de 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 e 10,0KR de radiação gama de <sup>60</sup>Co com o objetivo de detectar diferenças de sensibilidade entre as duas linhagens.

Os resultados obtidos em dois experimentos foram analisados estatisticamente por  $\chi^2$  a nível de 5%, e, como não diferiam entre si, os dados foram somados.

As freqüências de letais dominantes induzidos pelas diferentes doses de radiação foram estimadas pela correção de Abbot (citada por King e cols., 1956a; Proust e cols., 1972; Mendelson, 1974).

$$P_x = \frac{P_t - P_c}{1 - P_c}$$

onde:  $P_x$  = freqüência de letal dominante induzido;  
 $P_t$  = taxa de não eclosão da série tratada;  
 $P_c$  = taxa de não eclosão da série controle.

O valor de  $P_x$  das duas linhagens foi comparado ponto a ponto, e a significância de suas diferenças foi estimada levando em consideração o teste t (Sokal e Rohlf, 1969), como segue:

$$t = \frac{\text{arc sen } \sqrt{P_{x_1}} - \text{arc sen } \sqrt{P_{x_2}}}{\sqrt{820,8 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

onde:  $P_{x_1}$  =  $P_x$  da linhagem RC<sub>1</sub>;

$Px_2$  = Px da linhagem  $CO_3$ ;

$n_1$  = número de ovos do grupo controle + número de ovos do grupo irradiado da linhagem  $RC_1$ ;

$n_2$  = número de ovos do grupo controle + número de ovos do grupo irradiado da linhagem  $CO_3$ .

Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 1. Pode-se verificar que as percentagens de letais dominantes induzidos (Px) pelas 5 doses de radiação são, sistematicamente, mais altas na linhagem  $RC_1$ . A análise estatística destes resultados mostram que as diferenças entre as linhagens são estatisticamente significantes (0,1%) para as 5 doses de radiação estudadas.

**Tabela 1.** Percentagem de letais dominantes (Px) induzidos por diferentes níveis de exposição à radiação  $\gamma$  de  $^{60}Co$  em oócito imaturo (estágio 7) das linhagens  $RC_1$  e  $CO_3$

Nível de exposição (KR)	$RC_1$			$CO_3$		
	nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)	nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)
0	1.895	10,24	-	958	16,60	-
1,25	526	21,48	12,52	528	20,58	4,77
2,5	458	30,35	22,40	544	31,43	17,78
3,75	201	44,28	37,92	273	38,09	25,77
5,0	803	49,44	43,67	815	47,61	37,18
10,0	210	86,20	84,63	62	82,25	78,72

O pequeno número de ovos testados na linhagem  $CO_3$  a 10,0KR (62) foi devido a não postura de ovos ou mortalidade das fêmeas após a irradiação, o que impediu a coleta, apesar de todos os testes terem iniciado com igual número de cruzamentos (80).

A curva dose-resposta destes resultados pode ser vista na Figura 1. Os valores do letal dominante induzido foram corrigidos por  $\text{arc sen } \sqrt{p}$  e determinada a regressão linear entre

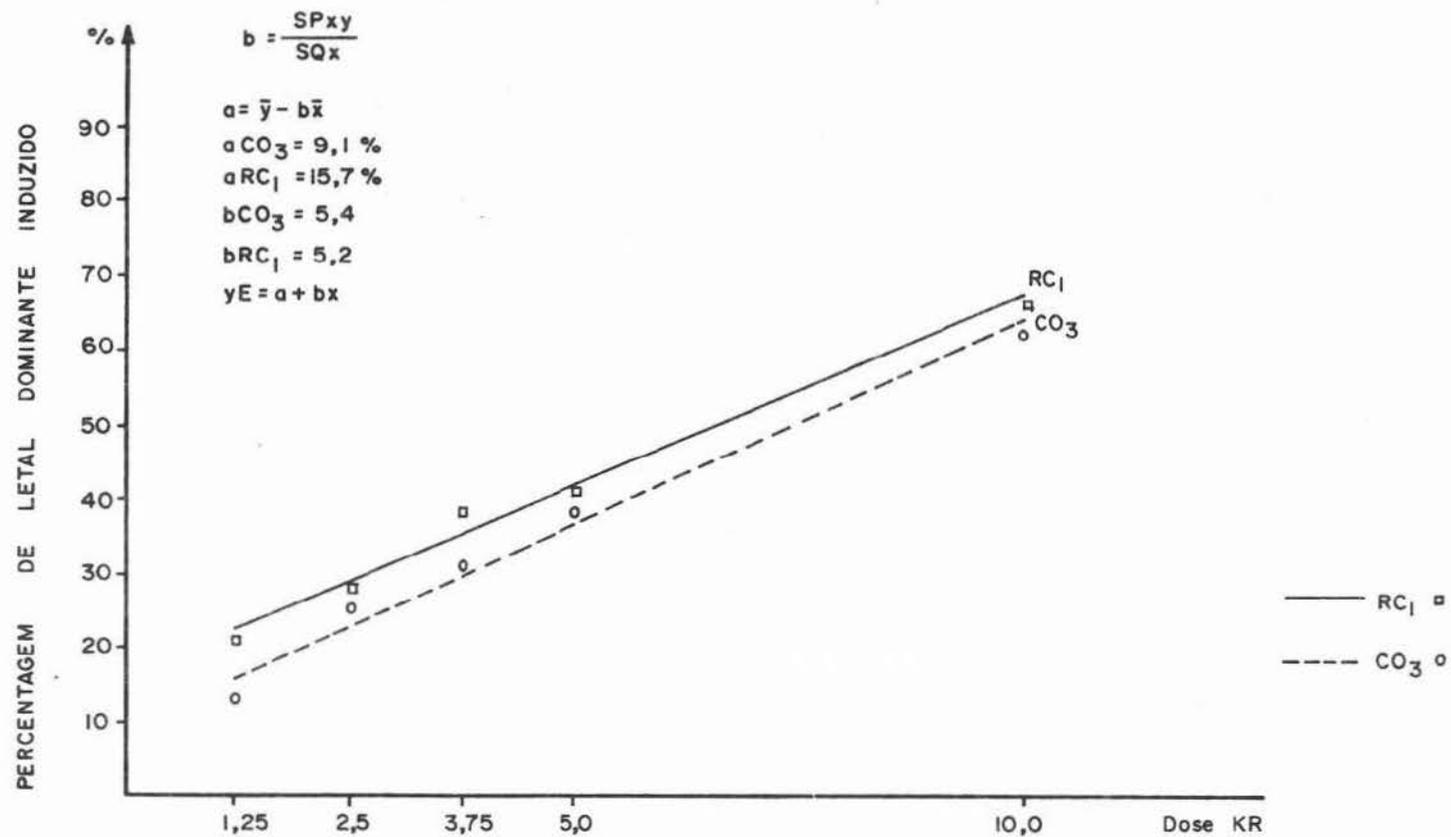


FIGURA 1 - REGRESSÃO NA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES DOMINANTES INDUZIDAS POR DIFERENTES NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}Co$  EM ÓCITO IMATURO (ESTÁGIO 7) DAS LINHAGENS RC<sub>1</sub> E CO<sub>3</sub>.

dose/efeito de radiação. Observa-se que a linhagem RC<sub>1</sub> apresenta maior sensibilidade que a linhagem CO<sub>3</sub>, porém, à medida que as doses aumentam, as diferenças relativas entre as linhagens diminuem, embora permaneçam significantes.

Estes resultados demonstram a existência de sensibilidade diferencial entre as duas linhagens, RC<sub>1</sub> apresentando sensibilidade e CO<sub>3</sub> resistência à indução de mutação letal dominante por radiação gama no estágio 7 de oócito.

Com o objetivo de verificar se a diferença de radiosensibilidade entre as linhagens é devida a algum tipo de mecanismo de reparo do dano pré-mutacional induzido pela radiação, foi realizado um experimento de dose fracionada.

Fêmeas de ambas as linhagens foram expostas a 2,5 e 5,0KR de radiação em dose única ou dose fracionada com intervalo de 30 min entre duas frações iguais (1,25 + 1,25KR ou 2,5 + 2,5KR). Como pode ser observado na Tabela 2 e Figura 2, a linhagem RC<sub>1</sub> mostra acréscimo significativo (0,1%) nas frequências de letais dominantes induzidos pelo fracionamento em relação às respectivas doses únicas, tanto para 2,5 como 5,0KR. Na linhagem CO<sub>3</sub>, de maneira inversa, observa-se uma diminuição nas taxas de letais dominantes para 2,5 (significante a 5%) e 5,0KR (significante a 0,1%).

**Tabela 2.** Frequência de letais dominantes (Px) induzidos em oócito imaturo (estágio 7) das linhagens RC<sub>1</sub> e CO<sub>3</sub> por radiação  $\gamma$  de <sup>60</sup>Co em uma dose única ou uma dose fracionada (2 frações iguais) separada por um único intervalo de tempo (30 min)

Nível de exposição (KR)	dose	RC <sub>1</sub>			CO <sub>3</sub>		
		nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)	nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)
2,5	única	197	27,42	19,14***	284	28,52	14,29*
	fracionada	260	31,54	23,73	170	25,88	11,13
5,0	única	298	47,31	41,30***	354	48,30	38,01***
	fracionada	208	52,40	46,96	72	36,11	23,39

\*Significante ao nível de 5%.

\*\*\*Significante ao nível de 0,1%.

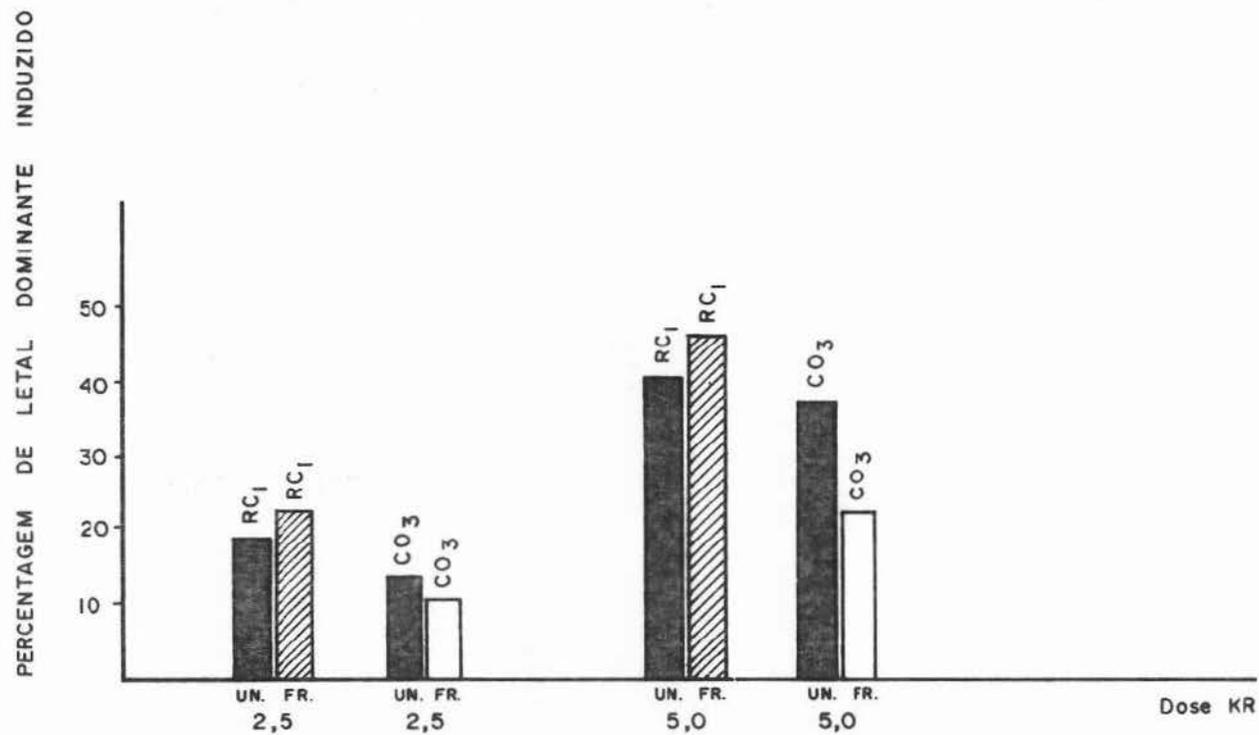


FIGURA 2- PERCENTAGEM DE LETAIS DOMINANTES INDUZIDOS EM OÓCITO IMATURO (ESTÁGIO 7) DAS LINHAGENS RC<sub>1</sub> E CO<sub>3</sub> POR RADIAÇÃO GAMA DE <sup>60</sup>Co EM UMA DOSE ÚNICA OU UMA DOSE FRACIONADA SEPARADA POR UM ÚNICO INTERVALO DE TEMPO.

A percentagem de dano reparado pelo fracionamento foi medida pelo valor REP (Steiner e Würigler, 1979b) e pode ser vista na Tabela 3. Para a linhagem CO<sub>3</sub> obteve-se uma diminuição de 11% da taxa de letal dominante induzido na dose fracionada de 2,5KR em relação à respectiva dose única e 32% na dose de 5,0KR. Na linhagem RC<sub>1</sub> verificou-se um acréscimo de dano de 18% e 16%, respectivamente, para as doses de 2,5 e 5,0KR.

Tabela 3. Percentagem de dano reparado pelo fracionamento

		eclosão (dose única) $\bar{U}$	eclosão (dose fracionada) $\bar{F}$	REP ( $\ln F - \ln U / \ln U$ )
RC <sub>1</sub>	2,5	0,7258	0,6846	0,18
	5,0	0,5269	0,4760	0,16
CO <sub>3</sub>	2,5	0,7148	0,7412	-0,11
	5,0	0,5170	0,6389	-0,32

### 3.2. Estágio 14 de oócito

A descoberta de diferenças de radiosensibilidade nas linhagens RC<sub>1</sub> e CO<sub>3</sub> em estágio 7 de oócito levaram a testar o seu comportamento em outro estágio germinal, o de estágio 14.

Foram realizados dois experimentos consecutivos com doses de 0,125, 0,250, 0,375, 0,500 e 0,625KR. Testados entre si pelo método de  $\chi^2$ , os resultados obtidos para cada dose não mostraram diferenças significantes ao nível de 5%, o que permitiu a soma dos dados.

Através dos resultados apresentados na Tabela 4, mostra-se que, na dose de 0,125KR, as diferenças entre as duas linhagens estão no mesmo sentido das observadas para estágio 7 de oócito (significante a 5%), a linhagem RC<sub>1</sub>, sendo mais sensível do que a CO<sub>3</sub> para a indução de letais dominantes. No entanto, na dose de 0,250KR, estas diferenças desaparecem. Quando se comparam as frequências de mutações obtidas, nas doses

de 0,375, 0,500 e 0,625KR verifica-se que a linhagem RC<sub>1</sub> apresenta valores mais baixos de letal dominante do que a CO<sub>3</sub>, invertendo o padrão de resposta que até agora vinha sendo apresentado pelas duas linhagens. A comparação destas frequências de letais evidencia diferenças significantes (a 5%) nas respostas destas duas linhagens: RC<sub>1</sub> mostra resistência e CO<sub>3</sub> sensibilidade ao dano letal dominante induzido por radiação em estágio 14 de oócito nestas 3 doses.

**Tabela 4.** Percentagem de letais dominantes induzidos (Px) por diferentes níveis de exposição à radiação  $\gamma$  de <sup>60</sup>Co em oócito de estágio 14 das linhagens RC<sub>1</sub> e CO<sub>3</sub>

Nível de exposição (KR)	RC <sub>1</sub>			CO <sub>3</sub>		
	nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)	nº de ovos testados	não eclosão (%)	letal dominante induzido (%)
0	485	9,07	-	567	17,81	-
0,125	825	21,45	13,60	613	26,26	10,28
0,250	925	39,03	32,95	717	47,00	35,51
0,375	918	52,40	47,65	485	66,80	59,61
0,500	1.100	58,73	54,61	550	72,36	66,37
0,625	402	67,66	64,43	562	82,74	79,00

A curva de dose/resposta para estágio 14 (Figura 3) mostra uma relação linear entre dose/efeito de radiação para ambas as linhagens.

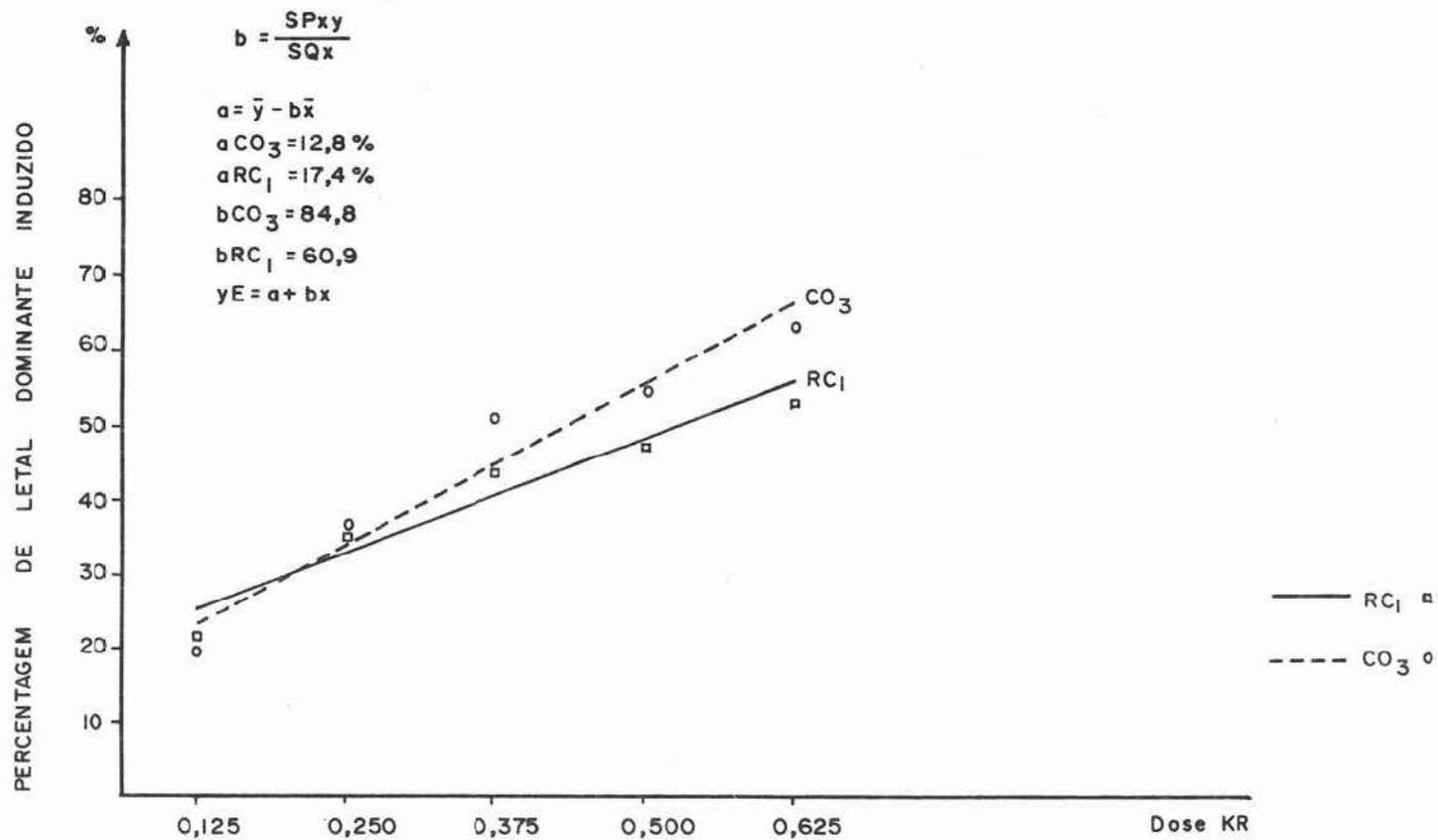


FIGURA 3 - REGRESSÃO NA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES DOMINANTES INDUZIDAS POR DIFERENTES NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO GAMA DE  $^{60}Co$  EM OÓCITO MADURO (ESTÁGIO 14) DAS LINHAGENS RC<sub>1</sub> E CO<sub>3</sub>.

#### 4. DISCUSSÃO

Com a publicação do trabalho de King e cols. (1956a), que relacionou diferentes estágios da oogênese com a idade das fêmeas, foi possível um estudo mais preciso sobre a sensibilidade de diferentes estágios germinais. As atenções se voltaram para dois estágios específicos da oogênese: estágios 7 e 14 do oócito.

Parker (1955, 1959), King e cols. (1956b) e Bateman e Chandley (1963), estudando a radiosensibilidade destes estágios para letal dominante, letal recessivo e perda de cromossoma X em fêmeas Oregon-R e numa linhagem marcadora para não disjunção, determinaram que o estágio 14 de oócito se apresenta altamente sensível a todos os tipos de danos analisados e que o estágio 7 de oócito é resistente a estes mesmos danos.

Além disso, a curva de dose-resposta do estágio 7 para letal dominante é do tipo "dois alvos", e para estágio 14 é de "um alvo".

King e cols. (1956b) relatam que as mutações letais dominantes e perda de cromossoma X resultam de quebras cromossômicas grosseiras, enquanto que letais recessivos ligados ao sexo devem ocorrer por mutações pontuais. Logo, o estágio 7 de oócito apresenta resistência a diferentes tipos de danos induzidos no cromossoma.

Vários autores, na tentativa de determinar as causas que provocam estas diferenças de sensibilidade entre os dois estágios, mostraram que células em estágio 7 se encontram em prófase I da meiose, provavelmente diploteno, apresentando

metabolismo mais ativo, enzimas de replicação presentes e reparo atuante, o que leva à reunião de quebras cromatídicas provocadas pela radiação em 10 a 15 min.

Ao contrário, células em estágio 14 encontram-se em metáfase I, inativas e sem um reparo atuante. Neste estágio, a reunião de quebras cromossômicas induzidas ocorre após a fertilização (Parker e Hammond, 1958; Sankaranarayanan, 1969a,b; Osgood e Zimmering, 1972). Por outro lado, Würigler e Matter (1968) mostraram que 10% do dano oficial provocado pela radiação, em estágio 14, pode ser reparado em até 8 hs.

Nöthel determinou que a população RÖI, selecionada através de radiação, apresentou-se mais radioresistente do que a população controle (+60) para diferentes tipos de danos cromossômicos. Também determinou que a radioresistência observada estava restrita ao estágio 7, sendo controlada por um sistema homozigoto estável composto por três fatores.

O fator rar-1 é o responsável pela resistência à indução de letal dominante e letal recessivo ligado ao sexo. Supõe-se que ative um mecanismo de reparo capaz de corrigir mutações pontuais. Este fator também é inibido pelo pré-tratamento com cafeína.

O fator rar-2 afeta letal dominante, letal recessivo ligado ao sexo, perda de cromossoma X e não é inibido por cafeína (Nöthel, 1970, 1972, 1974a, 1981a; Nöthel e Abdalla, 1982; Rudolph e cols., 1982).

Mendelson (1974), utilizando cafeína como pré-tratamento, nestas mesmas linhagens, observou um aumento na taxa de letal dominante no estágio 7 da população RÖI chegando ao nível da população +60. Um acréscimo semelhante, porém não tão pronunciado, foi observado para perda de cromossoma X. Ele sugeriu que a cafeína inibe um processo de reparo característico do estágio 7 de oócito.

O outro fator (rar-3) é encontrado somente numa subpopulação de RÖI (RÖI<sub>4</sub>), conferindo-lhe maior resistência. É recessivo e atua em letal dominante, letal recessivo ligado ao sexo, intertrocas e não disjunção. A atividade deste fator inicia-se na formação do pupário ou na metamorfose e persiste até oócito imaturo (Nöthel, 1981b,c,d).

Os resultados do presente trabalho sobre a radiosensibilidade das linhagens RC<sub>1</sub> e CO<sub>3</sub> indicam que o estágio 7 de oócito apresenta resistência à letal dominante induzido, quando comparado com o estágio 14, confirmando os resultados de Parker (1955, 1959), King e cols. (1956b), Bateman e Chandley (1963) e Nöthel (1970, 1972) para diferentes linhagens. Foi determinado, também, que neste estágio a linhagem CO<sub>3</sub> é radioresistente quando comparada com a RC<sub>1</sub>.

Estudos em células germinais de machos destas mesmas linhagens mostraram que CO<sub>3</sub> é resistente a diferentes tipos de dano (letal dominante e letal recessivo ligado ao sexo), utilizando-se vários agentes mutagênicos como radiação gama, etilmetanosulfonato (EMS) e integerrimina (Andrade, 1976; Ramos, 1977; Andrade e Marques, 1980; Pacheco, comunicação pessoal).

Reguly (1983), administrando cafeína como pré-tratamento à radiação em machos RC<sub>1</sub> e CO<sub>3</sub>, mostrou que esta causa um aumento na frequência de letais recessivos ligados ao sexo induzidos na linhagem resistente (CO<sub>3</sub>) e que não altera as frequências de letais induzidos na sensível (RC<sub>1</sub>). Assim, sugere a existência de diferenças ao nível de reparo nas duas linhagens, tendo a linhagem CO<sub>3</sub> um nível de reparo maior ou um reparo mais eficiente que a RC<sub>1</sub>. Este reparo, ao ser inibido pela cafeína, leva a um aumento nas frequências de letais da linhagem resistente (CO<sub>3</sub>) com a eliminação das diferenças observadas nas taxas de mutação. Além disso, Reguly (1983) demonstrou que esta resistência está restrita a espermatozóide e espermátide, sugerindo que tal reparo é do tipo excisão. Evidências de efeito da cafeína sobre um processo de reparo

pré-replicativo, provavelmente excisão, sō foram obtidas em linfócitos e fibroblastos humanos (Day, 1975; Faed e Mourelatos, 1978; Ishii e Bender, 1978).

Procurando verificar se a diferença de sensibilidade entre as linhagens, no estágio 7, é devida a um mecanismo de reparo do dano pré-mutacional, realizou-se um experimento de dose fracionada.

Os resultados mostraram uma diminuição significativa da taxa de letal dominante induzida nas doses fracionadas na linhagem CO<sub>3</sub> quando comparada com suas doses únicas. Tal diminuição é indicativa da existência de um mecanismo de reparo, capaz de atuar em 30 min, na linhagem resistente (CO<sub>3</sub>).

Diversos autores, utilizando esta técnica, com diferentes intervalos entre as frações, encontraram resultados semelhantes com significativa diminuição na taxa de letal nas doses fracionadas (Parker, 1959; Traut e Schmidt, 1967; Sankaranarayanan, 1974; Steiner e Würigler, 1979a,b; Sankaranarayanan e Volkers, 1980).

Inversamente, na linhagem sensível (RC<sub>1</sub>) verificou-se um aumento significativo na taxa de letal dominante nas doses fracionadas. A menor freqüência de letal observada na dose única provavelmente decorre da eliminação seletiva das células mais sensíveis sob o ponto de vista da mutabilidade. Quando administrada a dose fracionada, células que seriam eliminadas por seleção, na dose única, permanecem, levando ao acréscimo de letal observado.

Andrade (1976) sugeriu a existência de eliminação seletiva em machos destas mesmas linhagens quando da indução de letal recessivo ligado ao sexo por EMS.

Steiner e Würigler (1979b), usando uma dose única de 5KR ou subdividida em duas frações de 2 e 3 KR, determinaram que 25% do letal dominante era reparado com a exposição fracionada.

No presente trabalho, quando da exposição fracionada, observou-se na linhagem  $CO_3$  uma diminuição de 11% na frequência de letal dominante induzida por 2,5KR e 32% na dose de 5,0KR. Já na  $RC_1$  o fracionamento ocasionou um acréscimo de 16 e 18% nas taxas letais dominantes para as doses acima referidas.

Nöthel (1970, 1972), examinando a radiosensibilidade das populações RÖI e +60 no estágio 14, em ausência de reparo, verificou que as respostas das linhagens não diferiam entre si. Este fato permite interpretar que a resistência da população RÖI, observada em estágio 7, é devida exclusivamente a mecanismos de reparo.

Se as diferenças encontradas no estágio 7 das linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  fossem devidas somente a reparo, seria de esperar que as duas linhagens não diferissem em sua resposta quando testadas em estágio 14, uma vez que, neste estágio, supõe-se ausência de reparo.

No entanto, os resultados obtidos no estágio 14 de oócito mostram que, na dose de 0,125KR, a linhagem  $CO_3$  é resistente quando comparada com a  $RC_1$ . Esta diferença desaparece em 0,250KR, e nas doses subseqüentes as respostas se invertem, sendo a  $RC_1$  resistente e a  $CO_3$  sensível.

A taxa de eclosão, em ausência de tratamento, mostrou que  $CO_3$  tem viabilidade significativamente menor (82,19%) que  $RC_1$  (90,93%). Assim, nas doses de 0,35, 0,5 e 0,625KR, a maior viabilidade da  $RC_1$ , associada com eliminação seletiva das células mais sensíveis, leva a um decréscimo nas frequências de letais observados nesta linhagem. A dose de 0,125KR, por induzir relativamente pouco dano, faz com que a seleção das células potencialmente danificadas seja pequena, acarretando, comparativamente, maior frequência de letal na linhagem  $RC_1$ .

Desta forma, podemos concluir que, em estágio 7, as diferenças entre as duas linhagens ( $CO_3$  e  $RC_1$ ) são devidas a

ação conjunta de reparo, níveis de viabilidade e eliminação seletiva das células mais sensíveis do ponto de vista da mutação. Em estágio 14, as diferenças observadas são ocasionadas por seleção e viabilidade diferencial entre  $CO_3$  e  $RC_1$ .

## 5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  de *Drosophila melanogaster* foram analisadas quanto a diferenças de sensibilidade à indução de letais dominantes em dois estágios da oogênese: estágios 7 e 14 de oócito.

Para o estudo do estágio 7 de oócito, fêmeas das linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  foram irradiadas com 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 e 10,0KR de radiação gama de  $^{60}Co$ . No estágio 14 de oócito, foram utilizadas doses de 0,125, 0,250, 0,375, 0,500 e 0,625KR.

Realizou-se um experimento de dose fracionada no estágio 7 de oócito com doses únicas de 2,5 e 5,0KR ou subdivididas em duas frações iguais separadas por um intervalo de 30 min.

Os resultados obtidos sugerem que:

1. Em estágio 7, a linhagem  $CO_3$  apresenta-se resistente em relação à linhagem  $RC_1$ .

2. Em estágio 14, de maneira inversa, a linhagem  $RC_1$  comporta-se como resistente nas doses de 0,375, 0,500 e 0,625KR, enquanto que na dose de 0,250KR não é encontrada diferença entre as linhagens e em 0,125KR a linhagem  $RC_1$  é sensível em relação à  $CO_3$ .

3. Através do experimento de dose fracionada, evidenciou-se a existência de um mecanismo de reparo atuante em  $CO_3$  e eliminação seletiva de células mais sensíveis sob o ponto de vista da mutabilidade em  $RC_1$ .

4. As diferenças de sensibilidade entre as linhagens  $CO_3$  e  $RC_1$  são devidas a mecanismos de reparo, eliminação seletiva de células sensíveis e viabilidade diferencial.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, H.H.R., 1976. **Efeito conjunto do etilmetanosulfonato e da radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  na indução de letais em *Drosophila melanogaster*.** Porto Alegre, UFRGS. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética.
- ANDRADE, H.H.R. & MARQUES, E.K., 1980. Combined effect of ethylmethanesulphonate and  $^{60}\text{Co}$  gama radiation on the induction of lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. **Rev.Bras.Genet.**, 3:251-64.
- BATEMAN, A.J. & CHANDLEY, A.C., 1963. Effects of X-rays on female germ-cells of *Drosophila melanogaster*. I. Dominant lethal mutation and oviposition in relation to treated stage. **Int.J.Rad.Biol.**, 7(4):385-94.
- DAY III, R.S., 1975. Caffeine inhibition of the repair of ultraviolet irradiated adovirus in human cells. **Mutation Res.**, 321-6. (Citado por Reguly, M.L., 1983)
- FAED, M.J.W. & MOURELATOS, D., 1978. Enhancement by caffeine of sister-chromatid exchange frequency in lymphocytes from normal subjects after treatment by mutagens. **Mutation Res.**, 49:437-40. (Citado por Reguly, M.L., 1983)
- FAHMY, O.G. & FAHMY, M.J., 1954. Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. II. The mechanism of induction of dominant lethals by 2:4:6-tri(ethyleneimino)-1:3:5-triazine. **J.Genetics**, 52:603-19.
- GALL, J.G., 1950. Effects of X-raying copper-fed *Drosophila*. **Dros.Inf.Serv.**, 24-82.
- GLASS, B., 1955a. A comparative study of induced mutations in the oocytes and spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. I. Translocations and inversions. **Genetics**, 40:252-67.
- GLASS, B., 1955b. A comparative study of induced mutations in the oocytes and spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. II. Deficiencies and minutes. **Genetics**, 40:281-96.
- GLASS, B., 1956. Differences in mutability during different stages of gametogenesis in *Drosophila*. In: "Mutation". **Brookhaven Symposia on Biology**, v.8, 148-70.

- HERSKOWITZ, I.H., 1954. The relation between X-ray dosage and the frequency of simulated healing of chromosome breakages in *Drosophila melanogaster* females. **Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.**, 40:576-85.
- ISHII, Y. & BENDER, M.A., 1978. Caffeine inhibition of pre-replication repair of mitomycin-C induced damage in human peripheral lymphocytes. **Mutation Res.**, 51:419-25. (Citado por Reguly, M.L., 1983)
- KING, R.C., 1952. Reduction in productivity and recessive lethal mutation following X-irradiation of female *Drosophila melanogaster*. **Am.Nat.**, 86:391-8.
- KING, R.C., 1955a. A method for studying successive batches of eggs laid by treated or control *Drosophila*. **Am.Nat.**, 89:369-70.
- KING, R.C., 1955b. Dominant lethal mutation and X-chromosome elimination following X-irradiation of female *Drosophila melanogaster*. **Radiation Res.**, 3:143-52.
- KING, R.C., 1957. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. II. Stage distribution as a function of age. **Growth**, 21:95-102.
- KING, R.C.; RUBINSON, A.C.; SMITH, R.F., 1956a. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. **Growth**, 20:121-57.
- KING, R.C.; DARROW, J.B.; KAYE, N.W., 1956b. Studies on different classes of mutations induced by radiation of *Drosophila melanogaster* females. **Genetics**, 41:890-900.
- KING, R.C. & WOOD, E.M., 1955. Sex-linked lethal mutations induced by thermal neutrons in male and female *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 40:490-9.
- KUTSCHERA, G., 1954. Die Strahleninduzierte Trennung des attached-X Verbandes bei *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, 6:371-80. (Citado por Sankaranarayanan, K. & Sobels, F.H., 1976)
- LINDSLEY, D.L. & GRELL, E.H., 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. **Carnegie Inst.Wash.Publ.**, 627.
- LÜNING, K.G., 1954. Effect of oxygen on irradiated males and females of *Drosophila*. **Hereditas**, 40:295-312.
- MAINX, F., 1940. Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Trennung der attached X-chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. **Z.indukt.Abstamm.Vererbungslehre**, 78:238-45. (Citado por Sankaranarayanan, K. & Sobels, F.H., 1976)
- MARQUES, E.K.; NAPP, M.; WINGE, H.; CORDEIRO, A.R., 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. **Drosophila Inform.Serv.**, 41:187.

- MAVOR, J.W., 1924. The production of non-disjunction by X-rays. **J.Expl.Zool.**, **39**:381-432.
- MENDELSON, D., 1974. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of *Drosophila melanogaster*. I. **Mutation Res.**, **22**:145-56.
- MÜLLER, H.J. & HERSKOWITZ, I.H., 1954. Concerning the healing of chromosome ends produced by breakage in *Drosophila melanogaster*. **Am.Nat.**, **88**:177-208.
- MÜLLER, H.J.; VALENCIA, R.M.; VALENCIA, J.I., 1950. The production of mutations at individual loci in *Drosophila* by irradiation of oocytes and oögonia. **Genetics**, **35**:126. (Abstr.)
- NÖTHEL, H., 1970. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. I. Decreased radiosensitivity in stage-7 oocytes of the irradiated population RÖI. **Mutation Res.**, **10**:463-74.
- NÖTHEL, H., 1972. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. II. Restriction of the decrease in radiosensitivity of the irradiated populations RÖI to stage-7 oocytes. **Mutation Res.**, **15**:277-86.
- NÖTHEL, H., 1973. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. III. Persistence of the lower radiosensitivity in stage-7 oocytes of RÖI females after oxygen and nitrogen pre- and post-irradiations treatments. **Mutation Res.**, **19**:187-97.
- NÖTHEL, H., 1974a. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. IV. The genetics of the relative radioresistance in stage-7 oocytes of the irradiated populations RÖI. **Mutation Res.**, **23**:163-77.
- NÖTHEL, H., 1974b. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. V. Relations between the relative radioresistance and some recombination properties in the irradiated population RÖI. **Mutation Res.**, **25**:325-36.
- NÖTHEL, H., 1974c. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. VI. Selection for further increase in relative radioresistance of stage-7 oocytes of the irradiated population RÖI. **Mutation Res.**, **25**:135-9.
- NÖTHEL, H., 1981a. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. VIII. The system of relative radioresistance in immature oocytes of the irradiated population RÖI<sub>4</sub>. **Mutation Res.**, **80**:105-20.

- NÖTHEL, H., 1981b. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. X. The resistance factor rar-3: genetics. **Mutation Res.**, **84**:291-304.
- NÖTHEL, H., 1981c. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. XI. The resistance factor rar-3: effects in immature oocytes. **Mutation Res.**, **84**:305-13.
- NÖTHEL, H., 1981d. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. XII. The resistance factor rar-3: stage specificity. **Mutation Res.**, **84**:315-29.
- NÖTHEL, H. & ABDALLA, H.I., 1982. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. XIV. The genetic factor rar-1: effects in immature oocytes and their inhibition by caffeine. **Mutation Res.**, **92**:123-32.
- NÖTHEL, H. & WEBER, M., 1976. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. VII. High relative radioresistance to the induction of sex-linked recessive lethals in stage-7 oocytes of RÖI<sub>4</sub>. **Mutation Res.**, **36**:245-8.
- NOVITSKI, E., 1953. An attempt to eliminate X-chromosomes from oogonia. **Dros.Inf.Serv.**, **27**:108-9.
- OSGOOD, C. & ZIMMERING, S., 1972. Measurement of radiation-induced dominant lethals in stage-14 oocytes of *Drosophila*. **Mutation Res.**, **15**:355-7.
- PARKER, D.R., 1953. Observations on X-ray induced detachments of attached-X chromosomes in *Drosophila*. **J.Tenn.Acad.Sci.**, **28**:185. (Abstr.)
- PARKER, D.R., 1954. Radiation-induced exchanges in *Drosophila* females. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, **40**:795-800.
- PARKER, D.R., 1955. The origin of dominant lethals in irradiated oocytes of *Drosophila*. **Genetics**, **40**:589. (Abstr.)
- PARKER, D.R., 1959. Dominant lethal mutation in irradiated oocytes. **Univ.Texas Publ.**, **5914**:113-27.
- PARKER, D.R., 1963. On the nature of sensitivity changes in oocytes of *Drosophila melanogaster*. In: **Repair from Genetic Radiation Damage**. (F.H.Sobels, ed.), pp.11-30, Pergamon Press, Oxford. (Citado por Sankaranarayanan, K. & Sobels, F.H., 1976)
- PARKER, D.R. & HAMMOND, A.E., 1958. The production of translocations in *Drosophila* oocytes. **Genetics**, **43**:92-100.

- PATTERSON, J.T.; BREWSTER, W.; WINCHESTER, A.M., 1932. Effects produced by ageing and X-raying eggs of *Drosophila melanogaster*. **J.Hered.**, 23:325-33.
- PROUST, J.P.; SANKARANARAYANAN, K.; SOBELS, F.H., 1972. The effects of treating *Drosophila* females with Actinomycin-D on the yield of dominant lethals, translocations and recessive lethals recovered from X-irradiated spermatozoa. **Mutation Res.**, 16:65-76.
- RAMOS, A.L. de P., 1977. **Ação mutagênica de alcalóides de *Senecio brasiliensis* Less. var. *tripartitus***. Porto Alegre, UFRGS. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética.
- REGULY, M.L., 1983. **Radiorresistência e radiosensibilidade em *Drosophila melanogaster***. Porto Alegre, UFRGS. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética.
- RINEHART, R.R., 1964. Influence of oxygen, helium and metabolic inhibition on X-ray induced dominant lethality in stage 7 and stage 14 oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 49:855-63.
- RUDOLPH, P.; LOTZE, B.D.; NÖTHEL, H., 1982. Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. IX. Differences in relative resistance of  $ROI_4$  to the induction of losses of chromosomes X and 4 in immature oocytes. **Mutation Res.**, 103:83-6.
- SANKARANARAYANAN, K., 1969a. The effects of oxygen and nitrogen post-treatments on the mortality of *Drosophila* eggs irradiated as stage-7 oocytes. **Mutation Res.**, 7:357-68.
- SANKARANARAYANAN, K., 1969b. The effects of oxygen and nitrogen post-treatments on the survival of irradiated stage 14 oocytes and a possible basis for sensitivity differences between stage-7 and stage-14 oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 7:369-83.
- SANKARANARAYANAN, K., 1974. The effects of radiation exposure-rate and exposure fractionation on the frequencies of recessive and dominant lethals in immature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 25:39-51.
- SANKARANARAYANAN, K. & SOBELS, F.H., 1976. Radiation genetics. In: ASHBURNER, M. & NOVITSKI, E., eds. **The genetics and biology of *Drosophila***. London, New York, San Francisco, Academic Press. 1C, p.1090-223.
- SANKARANARAYANAN, K. & VOLKERS, W.S., 1980. Exposure fractionation effects for X-ray-induced dominant lethals in immature (stage-7) oocytes of *Drosophila melanogaster*: a re-analysis. **Mutation Res.**, 69:249-62.

- SOKAL, R. & ROHLF, F.J., 1969. Analysis of frequencies. In: **Biometry**. San Francisco, W.H. Freeman and Company. p.549-610.
- STEINER, T.H. & WÜRGLER, F.E., 1979a. Repair of X-ray induced sublethal damage in class B oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Int.J.Radiat.Biol.**, 36:201-16.
- STEINER, T.H. & WÜRGLER, F.E., 1979b. Time dependence of E1-kind-type recovery in class B oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Int.J.Radiat.Biol.**, 36:217-22.
- TRAUT, H., 1967a. Dose-effect relationship of autosomal translocations induced by X-rays in mature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Int.J.Radiat.Biol.**, 12:583-586.
- TRAUT, H., 1967b. X-Chromosome loss induced by low X-rays doses in mature and immature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 4:510-3.
- TRAUT, H., 1967c. X-ray induced of autossomal translocations in mature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Nature**, 214: 718-9.
- TRAUT, H., 1967d. X-ray induction of 2,3 translocations in mature and immature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 56:265-72.
- TRAUT, H. & SCHEID, W., 1969. The dose dependence of X-chromosome loss induced by X-rays in mature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 7:471-4.
- TRAUT, H. & SCHMIDT, P., 1967. Repair of dominant lethal damage induced by X-rays in immature oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Int.J.Radiat.Biol.**, 13(5):405-15.
- WÜRGLER, F.E. & LEUTHOLD, U., 1972. Radiosensitivity of oocytes of *Drosophila*. II. Sensitivity of class-B oocytes of X/X and XY/XY females. **Int.J.Radiat.Biol.**, 21(5):465-73.
- WÜRGLER, F.E.; LEUTHOLD, U.; GRAF, U.; ULBRICH, H., 1972. Radiosensitivity of oocytes of *Drosophila*. III. Sensitivity of class-B oocytes of XX/0 and X/X females. **Int.J.Radiat. Biol.**, 22(4):367-77.
- WÜRGLER, F.E. & LUTOLF, H.U., 1972. Radiosensitivity of oocytes of *Drosophila*. I. Sensitivity of class-A oocytes of triploid and diploid females. **Int.J.Radiat.Biol.**, 21(5): 455-63.

WÜRGLER, F.E. & MATTER, B.E., 1968. Split-dose experiments with stage-14 oocytes of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, 6:484-6.

ZIMMERING, S. & SCOTT, J., 1968. Measurements of X-ray mutational damage in stage 14 oocytes of *Drosophila*. **Mutation Res.**, 6:179-80.