

***EURYTREMA COELOMATICUM* (GIARD & BILLET) (DIGENEA, DICROCOELIIDAE) EM *BRADYBAENA SIMILARIS* (FÉRUSSAC) (GASTROPODA, XANTHONYCHIDAE): ALTERAÇÕES NOS DEPÓSITOS DE CÁLCIO E NA FUNÇÃO REPRODUTIVA DO PRIMEIRO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO**

Solange V. Paschoal¹
Suzana B. Amato^{1, 2}

ABSTRACT. *EURYTREMA COELOMATICUM* (GIARD & BILLET) (DIGENEA, DICROCOELIIDAE) EM *BRADYBAENA SIMILARIS* (FÉRUSSAC) (GASTROPODA, XANTHONYCHIDAE): ALTERATIONS IN CALCIUM DEPOSITS AND IN THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF ITS FIRST INTERMEDIATE HOST. The influence of the parasitism by the digenetic trematode *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) over the calcium mobilization and the reproductive function of its first intermediate host, the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) was experimentally studied in infected and uninfected snails maintained in laboratory under controlled conditions of nutrition, humidity and temperature. The calcium of the shells of infected and uninfected snails was quantified by using a technique of volumetric complexation. The amount of calcium present in the tissue was evaluated by using the histochemistry techniques of Dahl and von Kossa. The alteration in the reproductive function was evaluated through the egg production, and by histological follow up of the snails gametogenesis, in the infected and uninfected snails. The Student's test "t" showed that there was no significant difference in relation to size, weight and calcium concentration in the shells of infected and uninfected snails. The analysis of nonlinear regression, polynomial of 4th order, showed a highly positive relation to weight and size of shell to infected and uninfected snails, and an weakly significant relation to calcium concentration in the shells and shells size of infected snails. The histochemistry techniques demonstrated a large calcium deposition in the cells of the digestive glands of the infected snails when compared to the uninfected ones. The histological study of the ovotestis of the infected snails demonstrated that the gametogenesis of these snails was abnormal. The ovulogenesis was the most altered and at 45 days post-infection the histological sections showed no ovocytes present in the ovotestis.

KEY WORDS. *Eurytrema coelomaticum*, *Bradybaena similaris*, calcium deposits, parasitic castration

Gastrópodes terrestres estocam grandes quantidades de sais de cálcio, que são depositados principalmente, na concha e na glândula digestiva (WILBUR & TOMPA 1979). A infecção por estágios larvais de digenéticos, pode provocar uma maior deposição de cálcio nas células da glândula digestiva dos moluscos infectados (MALEK & CHENG 1974). Estes moluscos podem apresentar alterações em seu

1) Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Caixa postal 74555, 23851-970 Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.

2) Pesquisadora do CNPq.

crescimento, o que geralmente é acompanhado pela castração parasitária. Dessa forma, alguns estudos têm sugerido uma interação entre estes dois fatores (STURROCK 1966; JOOSSE & VAN ELK 1986). Para CHENG *et al.* (1983) o gigantismo seria apenas um indicativo da castração parasitária.

SULLIVAN *et al.* (1985) estudaram os mecanismos que induzem à castração parasitária, agrupando-os em duas categorias: (a) como um efeito primário, decorrente de alterações, como ingestão dos tecidos gonadais e produção de substâncias químicas que interferiram na reprodução dos moluscos, e (b) como um efeito secundário, decorrente de alterações no metabolismo do hospedeiro ou inanição, causados pela competição com o hospedeiro por nutrientes. O presente estudo teve como objetivos: 1) avaliar a influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) sobre a deposição de cálcio na concha e na glândula digestiva de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) e 2) verificar possíveis alterações histológicas no ovotéstis de *B. similis* que pudessem ser relacionadas à castração parasitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracóis do grupo controle (não-infectados) e aqueles infectados experimentalmente foram mantidos em terrários separados, sob condições de laboratório. A alimentação básica consistiu de repolho, uma fonte suplementar de minerais e, esporadicamente, alface e cenoura. À medida que os caracóis foram dissecados, suas conchas eram separadas em envelopes etiquetados.

A determinação quantitativa do carbonato de cálcio a partir das conchas dos caracóis foi feita pela técnica volumetria de complexação (MCCORNICK 1973) modificada. As conchas, previamente pesadas e medidas (diâmetro), foram diluídas em 10ml de ácido clorídrico 12N. Foram feitas diluições deste material solubilizado a 1:10 em água destilada. Em seguida foram pipetados 25ml desta solução para um erlenmeyer, aos quais adicionou-se 40ml de água destilada, 30ml de hidróxido de potássio a 10% e o indicador murexida, respectivamente. A titulação da mistura foi feita com EDTA 0,01M. A partir do volume de EDTA gasto na titulação, a massa de carbonato de cálcio foi calculada e expressa em ppm de CaCO_3 /mg de concha. Os resultados obtidos foram analisados pelos testes "t" de Student ($\alpha=5\%$) e regressão não-linear (SNEDECOR & COCHRAN 1967).

Para o estudo histológico e histoquímico, caracóis infectados e não-infectados foram dissecados, fixados com Dubosq-Brasil modificado, processados e corados pelos métodos de Dahl e von Kossa para detecção de cálcio nas células da glândula digestiva, e pela hematoxilina-eosina para o estudo morfológico do ovotéstis (BANCROFT & STEVENS 1977).

RESULTADOS

Os resultados das determinações quantitativas da concentração de cálcio nas conchas dos caracóis do grupo controle (não-infectados) e dos infectados experimentalmente com *E. coelomaticum*, em função do peso e diâmetro das conchas

foram analisados estatisticamente. A análise pelo teste “t” de Student, mostrou que não existe diferença significativa ($\alpha=5\%$) entre caracóis do grupo controle e infectados, no que se refere a diâmetro, peso e concentração de cálcio nas conchas desses caracóis. A análise de regressão não-linear, polinomial de quarta ordem, mostrou uma relação altamente positiva entre diâmetro e peso das conchas, tanto para os caracóis do grupo controle quanto para os infectados. A relação entre diâmetro da concha e concentração de cálcio nas conchas foi altamente significativa para os caracóis não-infectados e pouco significativa para os infectados, conforme figuras 1 e 2.

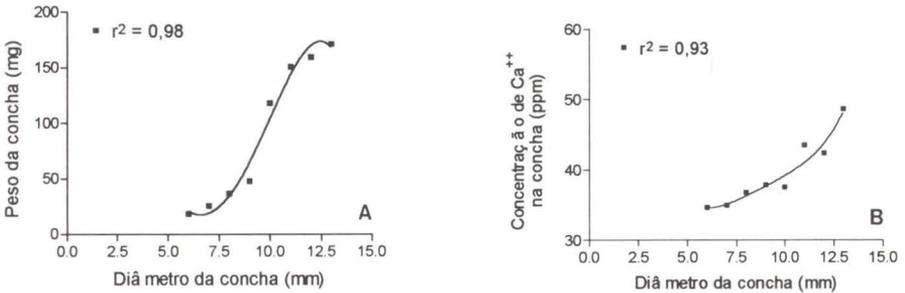


Fig. 1. *Bradybaena similaris* não-infectada (grupo controle). (A) Peso das conchas em função do diâmetro das conchas; (B) concentração de cálcio nas conchas em função do diâmetro das conchas. Valores médios.

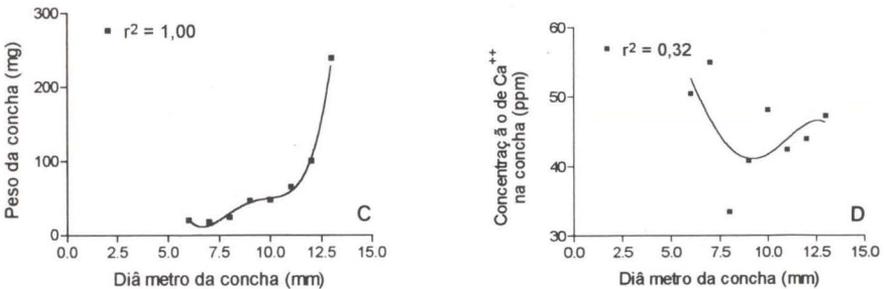


Fig. 2. *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum*. (C) Peso das conchas em função do diâmetro das conchas; (D) concentração de cálcio nas conchas em função do diâmetro das conchas. Valores médios.

Os métodos de Dahl e von Kossa evidenciaram uma maior deposição de cálcio nas células da glândula digestiva dos caracóis infectados. Sendo que, o método de Dahl, mostrou resultado mais intenso do que o método de von Kossa, tanto para caracóis do grupo controle quanto para os infectados.

Com relação à influência do parasitismo por *E. coelomaticum* sobre a gônada de *B. similaris*, observou-se várias alterações celulares, com um acentuado comprometimento do ovotéstis de alguns caracóis infectados com esporocistos de segunda geração em desenvolvimento na glândula digestiva ou em fase de eliminação. Embora, não se tenha encontrado nenhum esporocisto neste órgão, a destruição dos tecidos gonadais foi evidenciada, ao comparar-se cortes histológicos de caracóis não-infectados (Fig. 3A) e infectados (Fig. 3B).

A gametogênese em alguns caracóis infectados, apresentou-se bastante alterada. Foi observada uma redução no processo de espermatogênese. Com relação à ovulogênese, verificou-se a presença de ovócitos anormais e, em alguns casos, a total ausência do processo. Aos 45 dias pós-infecção, não foi observado nenhum ovócito no ovotéstis (Fig. 4).

Entre os caracóis infectados, apenas um realizou postura, durante o período de infecção. Este caracol fez duas posturas, ambas com pequeno número de ovos (5 e 9, respectivamente), os ovos tinham cascas frágeis e deles não eclodiu nenhum caracol.

DISCUSSÃO

Embora alguns espécimes de *Bradybaena similaris* infectados com esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* ou em fase de eliminação destes, tenham apresentado um acentuado comprometimento do ovotéstis, não foram verificadas alterações significativas no peso e tamanho de suas conchas, o que encontra apoio em CHENG *et al.* (1983). Segundo estes autores o gigantismo seria um indicativo mas, de modo algum uma consequência da castração parasitária. De acordo com CREWS & YOSHINO (1989) os esporocistos de segunda geração representariam um mediador primário na inibição e/ou manutenção da interferência sobre a fisiologia gonadal dos hospedeiros.

No presente estudo, verificou-se uma maior deposição de cálcio nas células da glândula digestiva dos caracóis infectados, o que está de acordo com MALEK & CHENG (1974). A grande quantidade de cálcio observada na glândula digestiva desses caracóis, pode ter sido em decorrência da aceleração da via glicolítica, para suprir a demanda de energia pelos caracóis infectados, conforme LIVINGSTONE & DE ZWAAN (1983). Para WIESER (1981) as vias que levam a uma maior produção de energia têm como produtos finais, ácidos orgânicos, que são liberados na hemolinfa e por serem altamente tóxicos necessitam ser neutralizados pela mobilização de carbonato de cálcio e, posteriormente, excretados ou metabolizados em outros tecidos.

O número reduzido de posturas, apresentando ovos com cascas frágeis e inviáveis, observado no presente estudo para os caracóis infectados, aproxima-se dos resultados obtidos por STURROCK (1966). Este autor, verificou que *Biomphala*

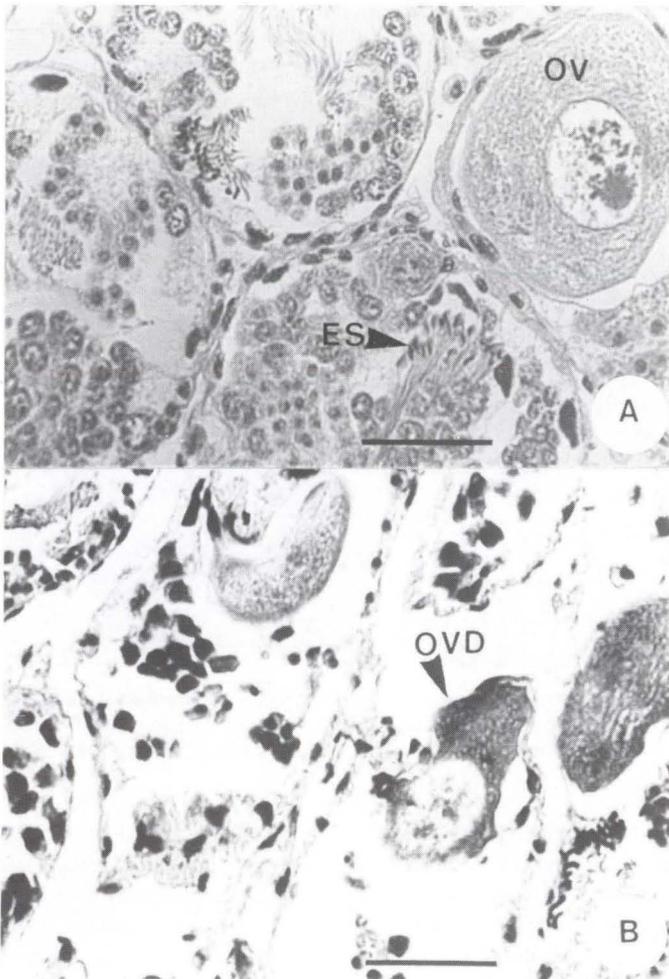


Fig. 3. Corte histológico do ovotéstis de *Bradybaena similaris*. (A) Espécime não-infectado, mostrando o estado perfeito da gônada; (B) espécime infectado experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum*, mostrando o estado degenerativo do tecido gonadal. Coloração HE. (OV) Ovócito normal; (OVD) ovócito degenerado; (ES) espermatozóides. Escala = 33 μ m.

Iaria pfeifferi (Krauss, 1848) infectada com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, apresenta uma redução e, em alguns casos, eliminação total da produção de ovos, sendo que os ovos liberados apresentavam baixa taxa de eclosão.

Segundo WILBUR & TOMPA (1979) o processo reprodutivo em moluscos requer uma grande quantidade de cálcio, essencialmente para a formação da casca do ovo e da concha embrionária. Dessa forma, a utilização de carbonato de cálcio, pelos caracóis infectados, para a neutralização dos produtos tóxicos resultantes da aceleração da via glicolítica, no presente estudo, pode ser responsável pelo baixo

número de ovos produzidos por estes caracóis, os quais apresentavam cascas frágeis e sendo todos inviáveis. Uma vez que este carbonato de cálcio não estaria disponível para ser mobilizado em direção ao ducto genital, para o processo fisiológico da reprodução, conforme foi observado por FOURNIÉ & CHÉTAIL (1982).

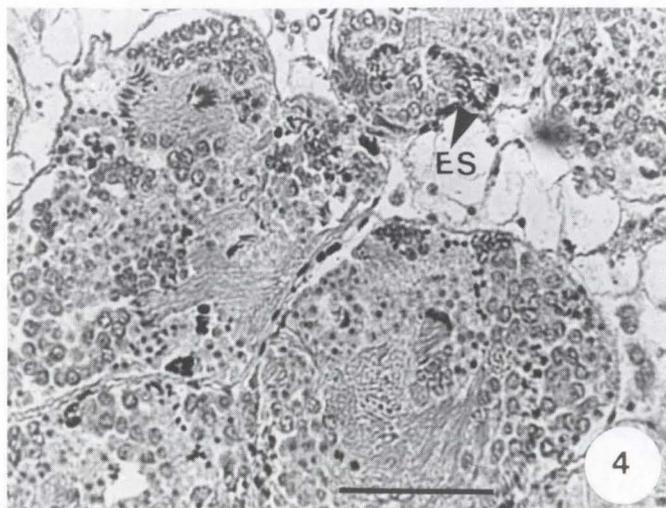


Fig. 4. Corte histológico do ovotéstis de um espécime de *Bradybaena similaris* infectado experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum*, mostrando que após 45 dias de infecção, apenas a espermatogênese foi preservada. Coloração HE. (ES) Espermatozoides. Escala = 53 μ m.

Para BANCROFT & STEVENS (1977) os métodos, von Kossa e Dahl, comumente empregados para a demonstração de cálcio, são distintos na maneira como atuam. O método de von Kossa envolve a redução da prata, o qual na verdade demonstra ânions fosfato e carbonato; mas desde que as formas demonstráveis destes ânions estejam invariavelmente combinadas com o cálcio, este método pode ser utilizado para demonstração de cálcio. O método de Dahl, no qual o cálcio forma um complexo de coloração alaranjada com o corante Alizarina Red "S", é aplicado, particularmente, quando pequenas quantidades de cálcio estão presentes. Ao passo que o método de von Kossa é utilizado quando se quer detectar grandes quantidades de cálcio. O fato do método de Dahl ser mais apropriado para detectar pequenas quantidades de cálcio, indica sua alta especificidade por este cátion, tornando-o, portanto, mais eficiente que o método de von Kossa, neste caso. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo, onde uma reação mais intensa foi verificada com o método de Dahl, tanto para os caracóis infectados como para os não-infectados, podem ser explicados pelas propriedades químicas deste método.

Os mecanismos que levaram à castração parasitária de alguns caracóis infectados, no presente estudo, enquadram-se no que SULLIVAN *et al.* (1985) chamam de categoria "B". Nesta categoria estão agrupados os efeitos secundários, ou alterações no metabolismo do hospedeiro, como estivação por competição por

nutrientes. Dessa forma, as alterações observadas no ovotéstis de alguns caracóis infectados, no presente estudo, podem ter sido produzidas, devido a um bloqueio da hemolinfa feito pelos esporocistos de segunda geração em desenvolvimento na glândula digestiva e serem relacionadas à castração parasitária indireta. Os resultados obtidos no presente estudo também estão de acordo com os de PINHEIRO & AMATO (1995). Segundo estes autores *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum* apresenta uma redução acentuada na oviposição. Estes autores classificaram a castração apresentada pelos caracóis infectados como parcial e nutricional, uma vez que a gametogênese não foi totalmente inibida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANCROFT, J.D. & A. STEVENS. 1977. **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York, Churchill Livingstone, 436p.
- CHENG, T.C.; J.T. SULLIVAN; K.H. HOWLAND; T.F. JONES & H.J. MORAN. 1983. Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasitized by larval trematodes. **J. Invertebr. Pathol.** **42**: 143-150.
- CREWS, A.E. & T.P. YOSHINO. 1989. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.** **68**: 326-334.
- FOURNIÉ, J. & M. CHÉTAIL. 1982. Evidence for a mobilization of calcium reserves for reproduction requirements in *Deroceras reticulatus* (Syn.: *Agriolimax reticulatus*) (Gastropoda: Pulmonata). **Malacologia** **22** (1/2): 285-291.
- JOOSSE, J. & R. VAN ELK. 1986. *Trichobilharzia ocellata*: Physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. **Exp. Parasitol.** **62**: 1-13.
- LIVINGSTONE, D.R. & A. DE ZWAAN. 1983. Carbohydrate Metabolism of Gastropods, p. 177-242. In: K.M. WILBUR (Ed.). **The Mollusca. Vol. 1. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics**. New York, Academic Press Inc., 510p.
- MALEK, E.A. & T.C. CHENG. 1974. **Medical and Economic Malacology**. New York, Academic Press Inc., 398p.
- MCCORNICK, P.G. 1973. Titrations of calcium and magnesium in milk with EDTA. **J. Chem. Educ.** **50**: 136-137.
- PINHEIRO, J. & S.B. AMATO. 1995. *Eurytrema coelomaticum*: Influence of the Infection on the Reproduction and Nucleic Acids Contents in the Albumen Gland and Ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **90** (5): 635-638.
- SNEDECOR, G.W. & W.G. COCHRAN. 1967. **Statistical Methods**. Ames, The Iowa State University Press, 593p.
- STURROCK, B.M. 1966. The influence of infection with *Schistosoma mansoni* on the growth rate and reproduction of *Biomphalaria pfeifferi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **60**: 187-197.

- SULLIVAN, J.T.; T.C. CHENG; K.H. HOWLAND. 1985. Studies on parasitic castration: Castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. **Trans. Am. Microsc. Soc.** **104**: 154-171.
- WIESER, W. 1981. Responses of *Helix pomatia* to anoxia: Change of solute activity and other properties of the haemolymph. **J. Comp. Physiol., ser. B**, **141**: 503-509.
- WILBUR, K. & A.S. TOMPA. 1979. Physiological changes in Gastropods during egg shell calcification. **Malacologia** **18**: 561-562.

Recebido em 28.XII.1995; aceito em 11.X.1996.