

VERIFICAÇÃO DA RESPOSTA DE MIRACÍDIOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* A SUBSTÂNCIAS PROVENIENTES DE MOLUSCOS PLANORBÍDEOS

PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS QUIMIOTÁXICAS

Beatriz de Camargo Brasio*
Luiz Augusto Magalhães**
Joseph Miller***
José F. de Carvalho****

BRASIO, B. de C. et al. Verificação da resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáxicas. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 19:154-70, 1985.

RESUMO: Foi testada a atividade miraxonal da água de condicionamento (SCW) e da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* e de *B. tenagophila* frente a miracídios de *Schistosoma mansoni* das linhagens BH e SJ. Foram pesquisados e isolados alguns componentes de SCW. Com os componentes isolados de SCW e com a hemolinfa foram preparados blocos de ágar. Esses blocos, assim preparados, foram colocados frente a miracídios de *S. mansoni* para avaliação da atividade miraxonal. Foram detectadas diferenças entre a ação miraxonal da hemolinfa e das substâncias isoladas de SCW. Observaram-se diferenças significativas entre os efeitos miraxonais das duas espécies de moluscos pesquisados frente a miracídios das linhagens BH e SJ.

UNITERMOS: *Biomphalaria glabrata*. *Biomphalaria tenagophila*. Quimiotaxias. *Schistosoma mansoni*.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (Brasio e col.², 1984) verificamos a atração de miracídios de *Schistosoma mansoni* por moluscos vetores. Verificamos ainda que esta atração ocorre mais intensamente entre o miracídio e seu molusco simpátrico. Na presente experiência procuramos identificar as substâncias quimiotáxicas responsáveis por este fenômeno.

Estudos feitos por Mac Inns⁹ (1965) que utilizou pequenas pirâmides de ágar Oxoid n.º 2, impregnadas com várias substâncias presumivelmente presentes no

muco de caramujos, e por Chernin⁴ (1972), que usou discos de ágar impregnados com água na qual foram mantidos por algum tempo caramujos *Biomphalaria glabrata* (SCW: "snail conditioned water"), mostraram a existência de quimiotaxia e não exclusivamente de tigmotropismo.

Chernin³ (1970) sugeriu que uma ou várias substâncias solúveis em água e emanadas naturalmente por *B. glabrata* e por outras espécies de caramujos, alteravam o comportamento dos miracídios

* Bolsista da FAPESP junto ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — Caixa Postal 6109 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

** Do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

*** Do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

**** Do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — 13.100 — Campinas, SP — Brasil.

de *S. mansoni*, denominou estas substâncias de miraxonais.

Várias substâncias têm sido consideradas possuidoras de ação miraxonal: aminoácidos (Wright e Ronald¹⁷, 1972; Mac Inns e col.¹⁰, 1974; Prechel e col.¹³, 1976); ácidos graxos (Mac Inns⁹, 1965); Mg⁺² (Stibbs e col.¹⁶, 1976); Ca⁺²/Mg⁺² (Spanholtz e Short¹⁵, 1976); ions H⁺ (Mac Inns⁹, 1965); seratina (Etges e col.⁷, 1975); amônia (Manson^{11,12}, 1977 e 1979); peptina (Manson¹¹, 1977). Tais substâncias estão presentes na "SCW" de *B. glabrata*.

Em nossa pesquisa procuramos identificar possíveis substâncias miraxonais presentes na SCW de algumas espécies de vetores e interpretar, a luz de nossos resultados, o desempenho destes vetores no campo e no laboratório.

Recordamos que a incorporação de substâncias miraxonais em moluscidas e larvicidas poderia ser utilizada para atrair tanto a larva do parasito como o vetor para uma área de atividade química. A presença de substâncias miraxonais em venenos insolúveis (que poderiam ser menos agressivos ao ambiente) poderá induzir, no caso das larvas do trematódeo, a perda de sua energia e de suas secreções nas tentativas inúteis para penetrar em partículas que emanassem estes atrativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foram utilizados miracídios de esquistossomos da linhagem paulista (SJ) e da linhagem mineira (BH). Estas linhagens de *S. mansoni* são mantidas na natureza e em nossos laboratórios nos moluscos *B. tenagophila* (SJ) e *B. glabrata* (BH).

Estas espécies de planorbídeos foram utilizadas na experiência para obtenção da água de condicionamento "snail con-

ditioned water" (Chernin⁴, 1972) e da hemolinfa. Os miracídios eram provenientes de camundongos infectados pelas linhagens de *S. mansoni* acima referidas.

As substâncias testadas eram utilizadas dissolvidas em discos de ágar Oxoid (Mac Inns⁹, 1965).

Os discos de ágar foram preparados utilizando-se uma solução estoque de 0,5 g de ágar Oxoid n.º 2 dissolvidos a quente em 50 ml de água destilada. O efeito miraxonal foi verificado dissolvendo-se as substâncias a serem testadas nos discos de ágar. Os experimentos foram feitos em placas de Petri com 45 mm de diâmetro e 20 mm de altura, contendo 10 ml de água. As observações foram feitas através de lupa estereoscópica, usando-se dispositivo que permitisse transluminação uniforme.

Sessenta miracídios foram colocados na placa de Petri com auxílio de seringa hipodérmica. A placa continha um disco de ágar preparado com uma das soluções testes e colocado logo após a deposição das larvas. Foram registrados, durante cinco minutos, o número de "contactos com retorno" e o número de "contactos sem retorno" descritos por Mac Inns⁹ (1965).

Para cada tipo de solução teste foram feitos dez experimentos.

Obtenção e preparação das substâncias de provável ação miraxonal utilizadas na experiência.

As substâncias miraxonais utilizadas na experiência foram isoladas da "água de condicionamento de caramujos", SCW e da hemolinfa dos planorbídeos.

Obtenção e análise da "água de condicionamento dos caramujos" SCW.

As amostras foram preparadas colocando-se vinte caramujos com diâmetro

aproximado de 10 mm em 20 ml de água destilada e mantidos sem alimentação. Estes moluscos foram deixados durante 24 h imersos em água; após esse tempo, foram retirados, colocados durante 10 min sobre papel de filtro e então pesados. Após a retirada dos moluscos, a água era filtrada em papel e utilizada para as análises.

Nos experimentos foram utilizadas SCW de *B. glabrata* e de *B. tenagophila*. Pesquisou-se a constituição de SCW pelos métodos a seguir referidos: para a determinação de polissacarídeos totais o método de Dubois e col.⁶ (1956); para a determinação de amônia o método de Smith¹⁴ (1980); e para a determinação de aminoácidos o método de Kirkman⁸ (1974). Pesquisamos os cátions Ca^{+2} ; Na^{+} ; K^{+} ; e Mg^{+2} . Análises anteriores mostraram que Fe; Cu; P; e NO_2^{-} não são eliminados pelos caramujos.

Para as dosagens de cátions as amostras foram analisadas por absorção atômica. Para a dosagem de aminoácidos utilizamos um cromatógrafo a gás modelo 2.440 ss da Varian.

Obtenção da solução de hemolinfa dos planorbídeos

Para obtenção da hemolinfa foram utilizados espécimens adultos de *B. glabrata* e *B. tenagophila* com diâmetro médio de 25 mm. Com o auxílio de um bastão de vidro, foram fraturadas as conchas, provocando-se desta maneira a liberação de hemolinfa. Para a diluição em ágar utilizou-se 0,4 ml de hemolinfa diluída em 2 ml de água destilada.

Preparo dos discos de ágar para os testes.

Os discos de ágar foram preparados adicionando-se 2 ml da solução estoque de ágar a 2% dissolvida ao banho-ma-

ria em 2 ml de uma destas soluções: SCW de *B. glabrata* ou de *B. tenagophila*; hemolinfa de *B. glabrata* ou de *B. tenagophila*; amônia a 60 ppm e a 15 ppm; cálcio a 20 ppm e 7 ppm; potássio a 18 ppm e a 12 ppm; magnésio a 3,5 ppm e 1 ppm; sódio a 13 ppm e a 10 ppm; água destilada (controle).

Os discos de ágar tinham 7 mm de diâmetro e 3 mm de altura.

RESULTADOS

Análise química da SCW

Observamos, em nossas análises, que o valor médio do pH das amostras mostrou um pequeno aumento em relação à água destilada usada na preparação das amostras, todavia este aumento não se apresentou diferente para as duas espécies de caramujos (Tabela 1).

TABELA 1

Determinação do pH de amostras de SCW de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Amostras de SCW	Peso dos caramujos (g)	pH das amostras
<i>B. glabrata</i>	7,21	7,47
" "	6,83	7,65
" "	6,05	7,30
" "	6,53	7,67
" "	6,87	7,50
Água destilada	—	6,93
<i>B. tenagophila</i>	7,70	7,45
" "	7,22	7,53
" "	8,45	6,90
" "	7,33	7,37
" "	6,59	7,30
Água destilada	—	7,10

pH médio das SCW de *B. glabrata*: $7,52 \pm 0,15$
pH médio das SCW de *B. tenagophila*: $7,31 \pm 0,24$

A análise de polissacarídeos totais mostrou que as duas espécies de caramujo liberam praticamente a mesma quantidade de açúcares na água (Tabela 2).

Pelos resultados das Tabelas 3, 4, 5 e 6 pudemos ver que, em relação aos cátions presentes na SCW, *B. tenagophila* elimina mais Ca^{+2} ; K^{+} ; Mg^{+2} ; Na^{+2} ; e NH_4^{+} do que *B. glabrata*.

TABELA 2
Determinação de polissacarídeos totais na SCW.

Amostras de SCW	Peso dos caramujos (g)	Concentração média ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentração média real ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	μg de polissacarídeos $\times \text{ml}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujo
<i>B. tenagophila</i>	8,43	$29,99 \pm 1,90$	59,98	7,12
" "	8,23	$28,06 \pm 4,59$	56,12	6,82
" "	12,70	$19,12 \pm 2,31$	38,24	3,02
" "	8,65	$31,27 \pm 3,13$	62,54	7,22
" "	7,99	$24,27 \pm 1,95$	48,54	6,08
<i>B. glabrata</i>	11,06	$42,41 \pm 3,10$	84,82	7,66
" "	11,01	$31,89 \pm 0,71$	63,78	5,78
" "	14,50	$46,62 \pm 3,38$	97,24	6,70
" "	15,71	$50,35 \pm 3,04$	100,70	6,40
" "	12,44	$49,25 \pm 4,40$	98,50	7,92

Concentração média de polissacarídeos nas amostras de SCW de *B. tenagophila*: $6,05 \pm 1,75 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujo.

Concentração média de polissacarídeos nas amostras de SCW de *B. glabrata*: $6,89 \pm 0,889 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujo.

Através dos dados da Tabela 5, pode-se notar que SCW de *B. tenagophila* contém, pelo menos, quatro vezes mais amônia, três vezes mais cálcio, duas vezes mais potássio e quatro vezes mais sódio do que a SCW de *B. glabrata*.

As Figs. 1 e 2 mostram os cromatogramas obtidos a partir de amostras de SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila* respectivamente.

A localização do pico relativo a cada aminoácido foi feita comparativamente a um cromatograma padrão.

As Tabelas 7 e 8 dão a altura do pico característico de cada aminoácido, em relação a nor-leucina, relação esta que é diretamente proporcional à concentra-

ção de cada aminoácido nas amostras.

Analisando os dados dessas duas tabelas, observamos algumas diferenças quantitativas entre os aminoácidos presentes na SCW das duas espécies de planorbídeos estudadas. Verificamos que *B. tenagophila* eliminou nitidamente mais alanina, serina, ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutâmico e tirosina. *B. glabrata* eliminou nitidamente mais leucina, prolina e arginina.

Análise do comportamento de miracídios frente a discos de ágar feitos com substâncias miraxonais.

Na tabela 9 está apresentado o panorama global desta fase experimental.

TABELA 3
Cátions presentes na SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila*

Amostras de SCW	Peso dos caramujos (g)	Ca (ppm)	Ca (ppm/g car)	K (ppm)	K (ppm/g car)	Mg (ppm)	Mg (ppm/g car)	Na (ppm)	Na (ppm/g car)
<i>B. tenagophila</i>	8,06	13,80	1,71	17,71	2,19	4,27	0,529	17,36	2,15
"	7,80	11,97	1,53	17,26	2,12	2,61	0,335	10,51	1,35
"	7,81	27,40	3,51	20,39	2,61	3,76	0,481	13,61	1,74
"	7,62	22,49	2,95	17,25	2,26	3,78	0,444	10,14	1,33
"	8,27	23,97	2,89	17,25	2,09	3,17	0,383	12,22	1,48
<i>B. glabrata</i>	8,80	12,41	1,41	8,47	0,962	1,92	0,218	6,26	0,711
"	9,11	6,49	0,712	8,07	0,886	0,59	0,0648	5,20	0,571
"	10,21	5,57	0,545	13,60	1,33	0,94	0,0921	4,55	1,13
"	10,18	4,66	0,458	13,94	1,37	1,12	0,110	14,24	1,39
"	9,87	4,99	0,506	15,23	1,54	0,71	0,0719	12,30	1,25

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídeos de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáxicas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 19:154-70, 1985.

TABELA 4
Determinação de amônia na SCW

Amostras de SCW	Peso dos caramujos (g)	Concentração média ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração média real ($\mu\text{g/ml}$)	μg de amônia $\times \text{ml}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujos
<i>B. tenagophila</i>	8,98	$33,70 \pm 0,68$	68,68	7,65
" "	8,94	$31,16 \pm 0,54$	62,78	7,02
" "	9,45	$34,89 \pm 1,00$	70,62	7,47
" "	9,38	$27,96 \pm 1,73$	57,54	6,87
" "	7,81	$28,51 \pm 0,83$	56,06	7,43
<i>B. glabrata</i>	9,09	$10,88 \pm 4,63$	10,88	1,19
" "	8,26	$11,43 \pm 1,68$	11,43	1,38
" "	8,92	$14,11 \pm 1,53$	14,11	1,58
" "	9,12	$19,65 \pm 2,24$	19,65	2,15
" "	9,69	$25,71 \pm 2,19$	25,71	2,56

TABELA 5
Concentração média de cátions (em ppm) nas amostras de SCW

Cátions	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. glabrata</i>
Ca ⁺⁺	$19,93 \pm 6,70$	$6,82 \pm 3,19$
K ⁺	$17,97 \pm 1,37$	$11,86 \pm 3,34$
Mg ⁺⁺	$3,44 \pm 0,62$	$1,06 \pm 3,52$
Na ⁺	$12,77 \pm 2,92$	$9,91 \pm 3,96$
NH ₄ ⁺		

TABELA 6
Concentração média de cátions em ppm/grama de caramujo nas amostras de SCW.

Cátions	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. glabrata</i>
Ca ⁺⁺	$2,52 \pm 0,86$	$0,76 \pm 0,391$
K ⁺	$2,25 \pm 0,21$	$1,22 \pm 0,28$
Mg ⁺⁺	$0,434 \pm 0,077$	$0,111 \pm 0,062$
Na ⁺	$1,61 \pm 0,34$	$1,01 \pm 0,35$
NH ₄ ⁺	$7,29 \pm 0,33$	$1,77 \pm 0,57$

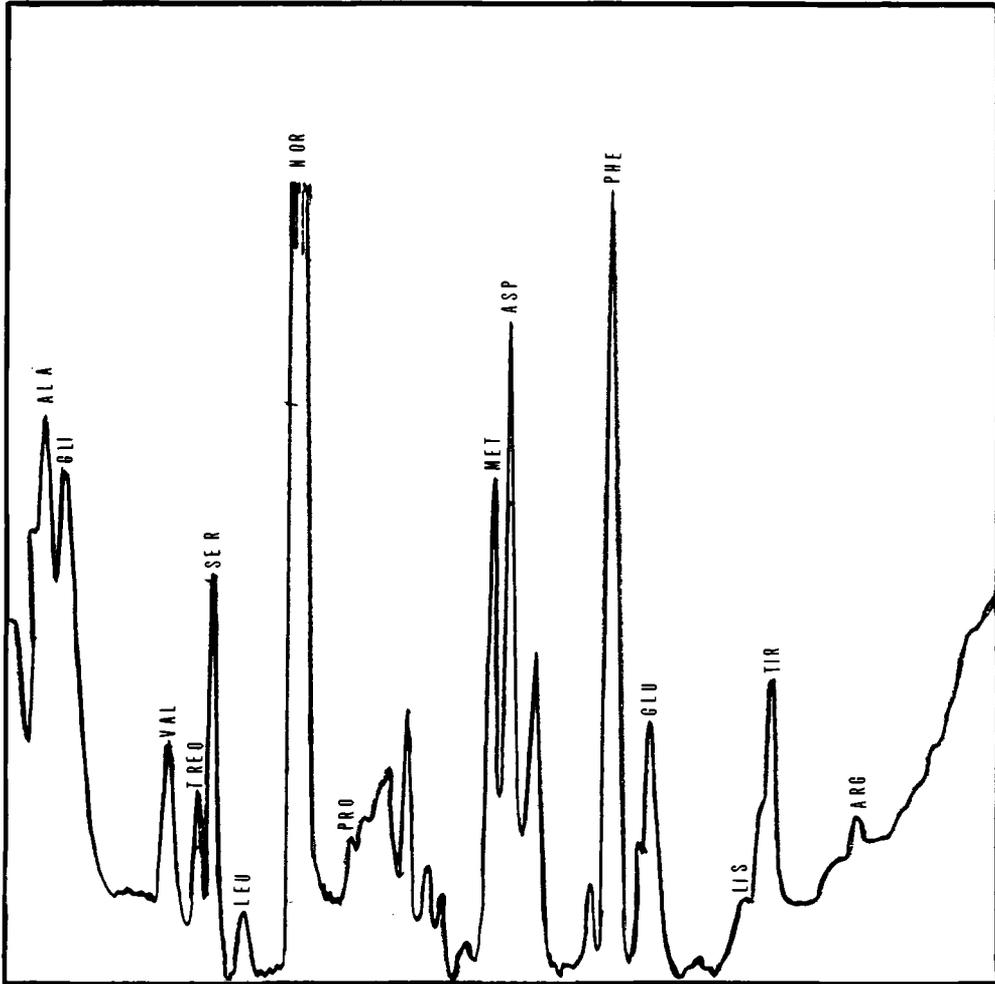


Fig. 1 — Cromatografia de aminoácidos obtidos a partir de SCW de *B. glabrata*

Observamos, na presença dos blocos de ágar, vários comportamentos por parte dos miracídios e que já tinham sido descritos por Mac Inns⁹ (1965).

Pudemos observar que, com exceção dos discos feitos com solução de hemolinfa, o número de tentativas de penetração é muito pequena em comparação com o número de “contatos em retorno”. Já nos blocos feitos com solução de

hemolinfa, observamos um grande número de tentativas de penetração.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Atração de miracídios BH e SJ frente a substâncias quimiotáticas

Descrição do Experimento

Um disco de ágar impregnado com um tipo de substância é mergulhado em

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

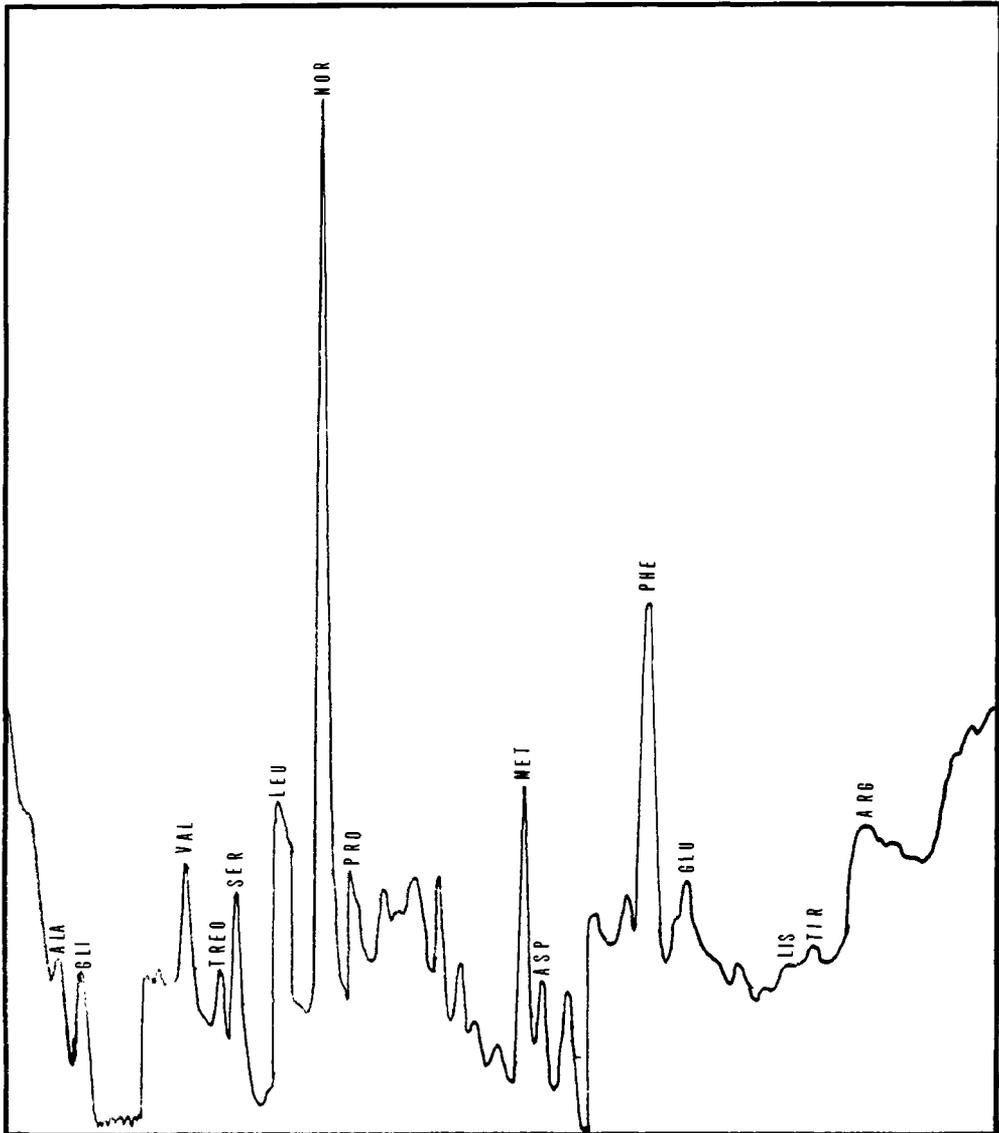


Fig. 2 — Cromatograma de aminoácidos obtidos a partir de SCW de *B. tenagophila*

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 19:154-70, 1985.

TABELA 7

Aminoácidos presentes em SCW de *B. glabrata*

Aminoácido	Altura Aminoácido Nor-leucina	Concentração ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de car).
Alanina	0,0149	37,25	0,6340
Glicina	0,0306	76,50	1,302
Valina	0,0366	91,50	1,557
Treonina	0,0209	52,25	0,8894
Serina	0,0485	121,25	2,064
Leucina	0,0739	184,75	3,144
Prolina	0,0343	85,75	1,459
Metionina	0,0851	212,75	3,621
Ácido aspártico	0,0343	85,75	1,459
Fenilalanina	0,0940	235,00	4,000
Ácido glutâmico	0,0254	63,50	1,081
Lisina	0,00522	13,05	0,2221
Tirosina	0,00821	20,52	0,3493
Arginina	0,0259	67,25	1,145

Aminoácidos totais: 22,89 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujo.

TABELA 8

Aminoácidos presentes em SCW de *B. tenagophila*

Aminoácido	Altura Aminoácido Nor-leucina	Concentração ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de car).
Alanina	0,0291	54,75	1,073
Glicina	0,0288	57,00	1,117
Valina	0,0277	69,25	1,357
Treonina	0,0250	62,50	1,225
Serina	0,0643	160,75	3,151
Leucina	0,0107	26,75	0,5243
Prolina	0,00669	16,73	0,3279
Metionina	0,0723	180,75	3,543
Ácido aspártico	0,0906	226,50	4,439
Fenilalanina	0,128	319,25	6,257
Ácido glutâmico	0,0411	102,75	2,014
Lisina	0,00625	15,63	0,3063
Tirosina	0,0379	94,75	1,857
Arginina	0,00581	14,53	0,2848

Aminoácidos totais: 27,48 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de caramujo

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 19:154-70, 1985.

TABELA 9

Média numérica e coeficiente de variação da percentagem de contatos com retorno aos discos de ágar (em 10 experimentos).

Tipo de ágar	Percentagem de contatos com retorno	
	Miracídios BH	Miracídios SJ
Água destilada	18,31 ± 2,14	16,75 ± 3,35
SCW de <i>B. glabrata</i>	80,71 ± 5,99	74,16 ± 4,12
SCW de <i>B. tenagophila</i>	80,50 ± 0,80	98,48 ± 1,62
Hemolinfa de <i>B. glabrata</i>	49,44 ± 7,44	50,41 ± 9,01
Hemolinfa de <i>B. tenagophila</i>	78,51 ± 6,03	81,25 ± 6,58
Ca++ — 20 ppm	24,45 ± 4,71	54,23 ± 6,16
Ca++ — 7 ppm	29,20 ± 3,82	65,19 ± 4,43
Mg++ — 3,5 ppm	39,77 ± 5,31	78,89 ± 3,66
Mg++ — 1,0 ppm	36,96 ± 5,83	81,25 ± 4,34
K+ — 18 ppm	44,43 ± 6,79	59,24 ± 4,90
K+ — 12 ppm	45,87 ± 5,44	47,45 ± 6,75
Na+ — 13 ppm	32,65 ± 4,71	68,71 ± 8,66
Na+ — 10 ppm	32,92 ± 6,49	76,16 ± 4,46
NH ₄ ⁺ — 30 ppm	34,62 ± 3,52	77,47 ± 4,55
NH ₄ ⁺ — 15 ppm	37,83 ± 2,45	72,35 ± 7,50

água, dentro de recipiente apropriado. Aí são depositados 50 miracídios. Conta-se o número de contatos com retorno (CCR) e de contatos sem retorno (CSR), dos miracídios ao disco, em tempo fixado. Os contatos com retorno indicam atração do miracídio à placa.

Usaram-se as linhagens BH e SJ do *Schistosoma mansoni* e oito substâncias:

- 1) Água pura (controle)
- 2) Água de condicionamento (SCW) de
 - a) moluscos *B. glabrata* (SCWBG)
 - b) moluscos *B. tenagophila* (SCWBT)

- 3) Hemolinfa (HEMO)
 - a) moluscos *B. glabrata* (HEMOBG)
 - b) moluscos *B. tenagophila* (HEMOBT)

- 4) Amônia
 - a) 15 ppm (AMONIA 15)
 - b) 60 ppm (AMONIA 60)

- 5) Cálcio
 - a) 7 ppm (CA7)
 - b) 20 ppm (CA20)

- 6) Magnésio
 - a) 1 ppm (MG1)
 - b) 3,5 ppm (MG3,5)

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

- 7) Sódio
 a) 10 ppm (NA10)
 b) 13 ppm (NA13)
- 8) Potássio
 a) 12 ppm (K12)
 b) 18 ppm (K18)

tâncias na distribuição dos contatos entre CCR e CSR; comparar cada substância com água.

b) comparar os dois níveis de cada substância entre si, determinando possível efeito de dose.

Método de análise

Os objetivos principais são:

- a) verificar possíveis efeitos das subs-

Os resultados do experimento constituem-se numa Tabela (Tabela 10) de frequência a três classificações; substância, tipo de contato e linhagem do miracídio. A Tabela é de um tamanho

TABELA 10

Ação de substâncias contidas em discos de ágar sobre miracídios SJ e BH. Número de contatos observados.

Tipo	SJ		BH	
	CCR	CSR	CCR	CSR
Água	69	318	61	273
SCW (BG)	201	71	278	67
SCW (BT)	437	6	268	65
Hemo (BG)	162	171	141	145
Hemo (BT)	207	48	182	50
Amônia 60 ppm	316	93	138	262
Amônia 15 ppm	220	89	162	301
Ca 20 ppm	207	179	77	230
Ca 77 ppm	261	140	127	295
Mg 3,5 ppm	285	77	136	201
Mg 1 ppm	277	69	122	189
Na 13 ppm	235	97	102	217
Na 10 ppm	366	138	120	236
K 12 ppm	208	234	177	210
K 18 ppm	240	165	141	176

CCR — contatos com retorno

CSR — contatos sem retorno

15x2x2. Nenhuma frequência imaginável é fixada *a priori*.

As frequências observadas podem ser consideradas como observações de processos de Poisson independentes. Sob esta hipótese, podemos usar o modelo log-linear (ver, p. ex.; Bishop, Fienberg e Holland¹ (1975), para estudar os itens *a* e *b*.

Resultados da análise

Inicialmente ajustamos todos os possíveis modelos hierarquizados, usando o programa P3F do BMDP (Dixon⁵, 1979), no computador PDP-11/45 do ICMSC-USP. Verificou-se que os três fatores estão fortemente relacionados. Tivemos, então, de passar a estudar associações parciais entre dois fatores, em cada nível do terceiro. Optamos por estudar Tipo de contato e Linhagem, em cada substância, em separado.

A análise detalhada que foi realizada consiste no estudo de várias tabelas 2x2.

A seguir apresentamos as estatísticas qui-quadrado, de Pearson (X^2) e da razão de verossimilhança (G^2) e seus respectivos níveis de significância (probabilidade de a estatística ser maior do que a observada, supondo-se não haver dependência entre os fatores). O logaritmo da razão de produtos cruzados ($\log \alpha$, com $\alpha = f_{11}f_{22}/(f_{12}f_{21})$) é apresentado junto com um intervalo de confiança assintótico ao nível de 95%. Esse número indica não associação quando $\log \alpha = 0$. Estimativas da probabilidade de CCR (P_{CCR}), com seus respectivos limites de confiança a 95%, também são mostrados.

Quando o teste de associação revelar-se não significativo, consideramos as duas linhagens homogêneas e estimamos P_{CCR} da marginal correspondente, a mesma para as duas linhagens. No caso contrá-

rio, estimamos um valor de P_{CCR} para cada linhagem.

Os resultados encontram-se na Tabela 11.

Pode-se testar se P_{CCR} , por linhagem, quando for o caso, difere daquele de água. Trata-se ainda de formar Tabelas 2x2 e calcular as estatísticas apropriadas. Usaremos a X^2 de Pearson (Tabela 12).

Verifica-se que P_{CCR} de cada linhagem e substância difere de P_{CCR} de água. De fato, inspeção nas colunas de P_{CCR} , na Tabela 11, revela que são todas maiores; isto é, as substâncias empregadas, sem exceção, aumentaram a atração.

Da Tabela 11 nota-se que P_{CCR} de BH é muito maior para SCWBG e SCWBT (cerca de 80%), Já SJ foi atraído por diversas substâncias com $P_{CCR} = 0,70$ ou maior. Entretanto, é notável P_{CCR} (SJ) = 0,99 para SCWBT.

Finalmente resta comparar os dois "níveis" de cada substância entre si, por linhagem (Tabela 13). A mesma técnica é usada: analisam-se as tabelas 2x2 com estatística X^2 de Pearson, para comparar-se P_{CCR} em cada nível de substâncias.

No experimento com SCW verifica-se que a linhagem BH foi igualmente atraída por SCWBG e SCWBT.

A linhagem SJ foi específica: teve atração igual a de BH para SCWBG, mas apresentou $P_{CCR} = 0,99$ para SCWBT.

Com HEMO, verifica-se que HEMOBT atrai mais, porém igualmente ambas as linhagens, de que HEMOBTG.

A amônia teve efeitos iguais nos seus dois níveis.

O cálcio apresentou diferença somente na linhagem SJ: a dose 7 ppm atraiu mais do que 3,5 ppm.

O magnésio não apresentou efeito de doses, do mesmo modo que sódio. Já o potássio apresentou efeito de dose só para a linhagem SJ: a dose 12 ppm atraiu mais do que 18 ppm.

TABELA II
Estatísticas por substâncias, para associação linhagem x tipo de contato

Subst.	X ²		G ²		Log α		BH		P _{CCR}		SJ		
	Valor	P	Valor	P	Valor	L. Inf.	L. Sup	Valor	L. Inf.	L. Sup	Valor	L. Inf.	L. Sup
Água	0,02	0,88	0,02	0,88	-0,03	-0,41	0,35	0,18	0,15	0,21	0,18	0,15	0,21
SCWBG	3,91	0,05	3,89	0,05	-0,38	-0,76	0,00	0,81	0,76	0,85	0,74	0,69	0,79
SCWBT	75,46	0,00	82,56	0,00	2,87	2,01	3,72	0,80	0,76	0,85	0,99	0,98	1,00
HemoBG	0,03	0,87	0,03	0,87	-0,03	-0,34	0,30	0,49	0,45	0,53	0,49	0,45	0,53
HemoBT	0,56	0,45	0,56	0,45	0,17	-0,27	0,61	0,80	0,76	0,83	0,80	0,86	0,83
Amônia 60	150,16	0,00	155,40	0,00	1,86	1,55	2,17	0,35	0,30	0,39	0,77	0,73	0,81
Amônia 15	97,20	0,00	99,63	0,00	1,53	1,21	1,84	0,35	0,31	0,39	0,71	0,66	0,76
Ca 20	57,61	0,00	59,13	0,00	1,24	0,91	1,57	0,25	0,20	0,30	0,54	0,49	0,59
Ca 7	101,04	0,00	103,17	0,00	1,47	1,17	1,76	0,30	0,26	0,34	0,65	0,60	0,70
Mg 3,5	107,29	0,00	110,31	0,00	1,70	1,37	2,03	0,40	0,35	0,46	0,79	0,75	0,83
Mg 1	114,49	0,00	117,99	0,00	1,83	1,48	2,18	0,39	0,34	0,45	0,80	0,76	0,84
Na 13	98,13	0,00	100,73	0,00	1,64	1,31	1,97	0,32	0,27	0,37	0,71	0,66	0,76
Na 10	128,54	0,00	130,86	0,00	1,65	1,36	1,95	0,34	0,29	0,39	0,73	0,69	0,77
K 12	0,39	0,53	0,39	0,53	0,09	-0,19	0,36	0,46	0,46	0,49	0,49	0,46	0,49
K 18	15,59	0,00	15,63	0,00	0,60	0,30	0,89	0,44	0,39	0,50	0,59	0,54	0,64

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídeos de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáxicas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

TABELA 12

Comparação de P_{CCR} por substâncias e linhagem, com controle (água)

Substâncias	BH		SJ	
	X ²	P	X ²	P
SCWBG	263,6	0,00	214,5	0,00
SCWBT	258,2	0,00	497,3	0,00
HemoBG	67,6	0,00	83,3	0,00
HemoBT	202,4	0,00	232,1	0,00
Amônia 60	42,3	0,00	264,8	0,00
Amônia 15	26,9	0,00	243,6	0,00
Ca 20	4,4	0,04	126,6	0,00
Ca 7	14,0	0,00	174,7	0,00
Mg 3,5	39,5	0,00	258,4	0,00
Mg 1	34,8	0,00	261,8	0,00
Na 13	16,4	0,00	193,2	0,00
Na 10	21,2	0,00	262,2	0,00
K 12	57,2	0,00	86,5	0,00
K 18	52,2	0,00	147,9	0,00

TABELA 13

Comparação entre níveis de substâncias, por linhagens.

Substâncias	SJ		BH	
	X ²	P	X ²	P
SCW	107,4	0,00	0,0	1,00
Hemo	65,4	0,00	46,4	0,00
Amônia	3,4	0,07	0,0	1,00
Ca	10,7	0,00	2,2	0,14
Mg	0,2	0,65	0,1	0,75
Na	0,3	0,58	0,2	0,65
K	12,6	0,00	0,0	1,00

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Procuramos identificar substâncias presentes na SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila* que pudessem ser responsáveis por estímulos quimiotáticos. Testamos também a ação da hemolinfa sobre os miracídios.

Após a análise estatística dos resultados pudemos constatar vários aspectos interessantes que passaremos a relacionar.

A SCW de *B. tenagophila* atraiu mais intensamente os miracídios simpátricos. A SCW de *B. glabrata* exerceu atração aparentemente semelhante sobre miracídios BH e SJ.

A hemolinfa de *B. tenagophila* apresentou maior poder de atração sobre miracídios SJ, exercendo também forte poder de atração sobre miracídios BH. A hemolinfa de *B. glabrata* exerceu menor poder de atração sobre os miracídios das duas linhagens. Parece que a hemolinfa das duas espécies de moluscos estudadas contém substâncias capazes de excitar a atividade de penetração dos miracídios BH e SJ.

B. tenagophila eliminou mais Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ que *B. glabrata*. Não conseguimos detectar a eliminação de Fe, Cu, P ou NO_2^- pelas duas espécies citadas de planorbídeos.

Os cátions Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ têm maior poder de atração para miracídios SJ. Exatamente estes cátions são mais eliminados por *B. tenagophila*, hospedeiro natural da linhagem SJ de *S. mansoni*.

Os miracídios SJ foram mais atraídos, em ordem decrescente, por Mg^{++} , NH_4^+ , Na^+ , Ca^{++} e K^+ .

Os miracídios BH foram mais atraídos, em ordem decrescente, por: K^+ , Mg^{++} , NH_4^+ , Na^+ e Ca^{++} .

Nenhum cátion, isoladamente, mostrou poder de atração maior que o poder da SCW das duas espécies de caramujos.

Magnésio, sódio e amônia, não apresentaram diferença de atração devido a concentração nos limites testados no experimento.

Para a linhagem SJ, o potássio apresentou maior atração em concentração de 12 ppm que em 18 ppm.

Para a linhagem SJ, o cálcio apresentou maior atração em concentração de 7 ppm que em 3,5 ppm.

Em análise prévia de aminoácidos observamos que: *B. glabrata* eliminou mais leucina, prolina e argilina; *B. tenagophila* eliminou mais alanina, serina, ácido espártico, fenilalanina, ácido glutâmico e tirosina.

As conclusões acima relacionadas parecem mostrar que *B. tenagophila* elimina no meio ambiente substâncias capazes de atrair mais especificamente as larvas simpátricas de *S. mansoni*. *B. glabrata* elimina no meio ambiente substâncias que atraem larvas de *S. mansoni* porém sem discriminá-las quanto a linhagem simpátrica e alopátrica. Estas substâncias miraxonais, encontradas na água onde vivem os moluscos, estão presentes, em maior concentração, na hemolinfa destes moluscos, comportando-se aí com as mesmas características descritas anteriormente.

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

BRASIO, B. de C. et. al. [Response of *Schistosoma mansoni* miracidia to snail substance. Research on chemiotactic substances]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

ABSTRACT: Several substances isolated from SCW (snail conditioned water) and from snail hemolymph were tested for a possible chemiotactic effect on *Schistosoma mansoni* miracidia. Two strains of miracidia were considered (SJ and BH). Agar plates prepared with one of the substances were exposed to sixty miracidia for five minutes. The number of contacts and contacts with return were counted. Ten replications were made. Eight types (and four sub types) of agar plates were prepared: normal water (control), SCW (*Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila*), hemolymph (*B. glabrata* and *B. tenagophila*) and amonia, calcium, magnesium, sodium and potassium. Log-linear models were fitted to the data to study the proportions of attraction to each substance and to compare them. Any possible differences in proportions of attraction between the two *S. mansoni* strains were tested.

UNITERMS: *Biomphalaria glabrata*. *Biomphalaria tenagophila*. Chemotaxis. *Schistosoma mansoni*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BISHOP, Y.; FIENBERG, S.E. & HOLLAND, P.W. *Discrete multivariate analysis*, Cambridge, Mass., The Mit Press, 1975. p. 557.
2. BRASIO, B.C.; MAGALHÃES, L.A.; MILLER, J. & CARVALHO, J.F. Atração de miracídios de *Schistosoma mansoni* por hospedeiros invertebrados. Comportamento de miracídios frente a girinos de *Hyla fuscovaria*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:18-27, 1985.
3. CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasit.*, **56**:287-96, 1970.
4. CHERNIN, E. Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail conditioned water. *J. Parasit.*, **58**:209-12, 1972.
5. DIXON, W.S. *BMDP — Biomedical Computer Programs*. Berkeley, University of California Press, 1979.
6. DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.*, **28**:350-6, 1956.
7. ETGES, F.J.; CARTER, O.S. & WEBBE, G. Behavioral and developmental physiology of schistosoma larval as related to their molluscan hosts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **266**:480-96, 1985.
8. KIRKMAN, M.A. Comparative determination of protein amino acids in plant material by automated cation exchange and gas liquid chromatography of the acid N-heptafluorobutyl, n-propyl esters. *J. Chromatogr.*, **97**:175-91, 1974.
9. MAC INNS, A.J. Responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemical attractants. *J. Parasit.*, **51**:731-46, 1965.
10. MAC INNS, A.J.; BETHEL, W.M. & CORNFORD, E.M. Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. *Nature*, **248**:361-3, 1974.
11. MANSON, P.R. Stimulation of the activity of *Schistosoma mansoni* miracidia by snail conditioned water. *J. Parasit.*, **75**:325-8, 1977.
12. MANSON, P.R. Amonia excretion by planorbid snail. A possible mechanism for host selection by schistosome miracidia. *J. Parasit.*, **65**:819-20, 1979.
13. PRECHEL, D.P.; CAIN, G.D. & NOLLEN, P.M. Responses of *Megalodiscus temperatus* miracidia to amino and sialic acids found in snail-conditioned water. *J. Parasit.*, **62**:693-7, 1976.
14. SMITH, V.R. A phenol-hypochlorite manual determination of ammonium-nitrogen in Kjeldahl digests of plants tissues. *Communic. Soil Sci. Plant Anal.*, **11**:709-12, 1980.

BRASIO, B. de C. et al. Verificação de resposta de miracídeos de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáxicas. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **19**:154-70, 1985.

15. SPANHOLTZ, G.M. & SHORT, R.B. *Schistosoma mansoni* miracidia: stimulation by calcium and magnesium. *J. Parasit.* **62**:155-7, 1976.
16. STIBBS, H.H.; CHERNIN, E.; WARD, S. & KARNOVSKY, M.L. Magnesium emitted by snails alters swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Nature*, **260**:702-3, 1976.
17. WRIGHT, D.G.S. & RONALD, K. Effects of amino acids and light on the behavior of miracidia of *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1914). *Canad. J. Zool.*, **50**:855-60, 1972.

Recebido para publicação em 08/11/1984

Aprovado para publicação em 21/03/1985