

FATORES QUE PODEM AFETAR A CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CARAMUJOS INFECTADOS E A PRODUÇÃO DE CERCÁRIAS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

CECÍLIA PEREIRA DE SOUZA, NEUSA ARAÚJO, LIANA KONOVALOFF JANNOTTI & GIOVANNI GAZZINELLI

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Caixa Postal 1743, 30161, Belo Horizonte, MG, Brasil

Factors that can affect the breeding and maintenance of infected snails and yield of cercariae of *Schistosoma mansoni* – Mass production of *Schistosoma mansoni* cercariae was affected by biological and chemical agents. Rotifers and ostracods, snail predators, were identified in our colony. Rotifers were easily eradicated by washing the aquaria and lettuce with diluted solution of acetic acid. On the other hand, ostracods were difficult to eradicate and led to a high level mortality of infected snails (50-60%). Snails maintained in an incubator at constant temperature and total darkness produced maximum shedding when submitted to brightness and high temperature (about 30°C). The number of cercariae shed was practically the same between pH 5-7. Contaminants such as Cu and Pb added to glass distilled water decreased the cercariae production.

In conclusion, laboratory maintenance of large number of infected snails for mass production of cercariae is much simpler and more efficient than the conventional technique with running tap water although a high rate of mortality is observed in the snail colony.

Key words: *Schistosoma mansoni* – schistosomiasis – cercariae – *Biomphalaria glabrata* – rotifers – ostracods

A produção em massa de cercárias é uma necessidade de vários laboratórios que se dedicam ao estudo da biologia, imunologia e bioquímica do *Schistosoma mansoni*. Os problemas que envolvem a manutenção do ciclo do parasito para esta produção são inúmeros e ainda não estão completamente resolvidos (Sandt et al., 1965; Stirewalt, 1981; Stirewalt & Lewis, 1981; Souza et al., 1985). Cloro, metais pesados e rotíferos na água de manutenção inquestionavelmente afetam, de modo drástico, a produção de cercárias (Stirewalt & Lewis, 1981; Souza et al., 1985). A presença de oligoquetas nos aquários influi negativamente sobre a taxa de infecção dos moluscos com *S. mansoni* (Michelson, 1964). A presença de predadores como hirudíneos e ostracodos (*Cypridopsis*, *Cypricercus* e *Cypretta*), introduzidos acidentalmente nos aquários, põe em risco a criação de caramujos (Chernin et al., 1956; Gonçalves & Pellegrino, 1967; Guimarães et al., 1983; Lewis et al., 1986). Em consequência, as oscilações ocasionais na produção ocorrem em vários laboratórios prejudicando, às vezes, o andamento de projetos que dependem deste material. Embora a dinâmica da produção de cercárias possa ter um componente cronobiológico (Theron, 1980, 1981, Theron & Moné, 1984), este não explica completamente o aumento e a diminuição ocasional na produção, uma vez que o fenô-

meno ocorre mesmo em populações constituídas de grupos de caramujos infectados em épocas diferentes.

Vários também são os fatores que afetam a eliminação de cercárias induzida por exposição à luz. Assim, procurou-se investigar alguns fatores que poderiam influir na liberação de cercárias induzida por exposição à luz, bem como estabelecer condições de manutenção do ciclo biológico que reduzam o risco de oscilações negativas e simplifiquem a rotina para produção em massa de cercárias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Schistosoma mansoni: a cepa utilizada foi a LE de origem local, Belo Horizonte, MG, mantida em laboratório há mais de 20 anos.

Biomphalaria glabrata: os caramujos são mantidos em laboratório há mais de 20 anos, sendo originários do Barreiro de Cima, periferia de Belo Horizonte, MG.

Criação e infecção de caramujos: as técnicas para criação e infecção de caramujos foram descritas em trabalhos anteriores (Souza et al., 1979; 1985).

Manutenção dos caramujos no período pre-patente: após exposição a miracídeos, os moluscos eram mantidos em aquários de plástico, com 95 ml de água/molusco, temperatura constante de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, sistema de água corrente durante 8 horas, terra + carbonato de cálcio e como alimento recebiam alface fresca e ração (aquariol). Decorridos 30 a 35 dias da infecção,

Trabalho parcialmente financiado pela FINEP.

Recebido em 16 de junho de 1986.

Aceito em 29 de dezembro de 1986.

os caramujos eram examinados individualmente em microscópio estereoscópico, após 30 minutos de exposição à luz. Os exemplares positivos eram lavados em solução a 0,05% de ácido acético a fim de remover rotíferos aderidos às conchas e transferidos para outros aquários.

Manutenção dos caramujos no período patente: a) Sistema convencional — parte dos caramujos positivos de cada grupo infectado era mantida nas condições usuais, isto é, aquário de vidro, com tampa de plástico preto, 1.500 ml de água/molusco, água corrente durante 8 horas, aeração constante, temperatura ambiente e sala em semi-obscuridade. O alimento era alface fresca (lavada com solução de ácido acético 0,05 a 0,1%) e ração, para peixe ou para rato (à segunda foi adicionado 10% de carbonato de cálcio). Os exemplares mortos eram retirados duas a três vezes por semana; b) Manutenção em incubadora — outra parte dos caramujos infectados era colocada em aquários de plástico de 31x22x8 cm (3.000 ml de água) com tampa, 50 ml de água/molusco, sem aeração, dentro de incubadora (FANEM), no escuro, a $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A água era trocada três vezes de semana, com retirada dos exemplares mortos. O alimento era alface fresca (lavada com solução de ácido acético 0,05 a 0,1%) e, a partir de fevereiro de 1986, foi adicionada ração de rato mais 10% de carbonato de cálcio.

Eliminação de cercárias induzida por exposição à luz: grupos de 100 a 250 moluscos, mantidos na incubadora ou no sistema convencional, eram colocados em frascos com 4 ml de água destilada por molusco, pH 6, dentro de estufa com iluminação, a 30°C segundo técnica de Kuntz (1946). Após 2 a 4 horas, os moluscos eram retirados e procedia-se à contagem de cercárias em 2 a 5 alíquotas de 1 ml da suspensão.

Descrição dos predadores identificados na colônia de moluscos: a) Rotíferos — os exemplares encontrados em nossos aquários foram *Rotaria rotatoria* e *Philodina acutilaris*, já estudados por Stirewalt & Lewis (1981). b) Ostracodos — os animais observados nos aquários pertencem à classe Crustacea, sub-classe Ostracoda, ordem Podocopa, gênero *Eucypris*. Foram introduzidos nos aquários provavelmente com alface ou moluscos do campo. O animal é pequeno (2,5x1mm), tem carapaça bivalva, alongada, que envolve o corpo, pouco segmentado. Sua cor é cinza clara no jovem e marrom no adulto. Possui apenas dois pares de membros no tronco (Storer & Usinger, 1978). Esse crustáceo reproduz-se ativamente e, durante um ano, grande quantidade de ovos eclodiram nos aquários contendo caramujos adultos ou recém-eclodidos, contaminando gradualmente 80% da criação. O período de incubação dos ovos foi de 20 a 30 dias. Os animais recém-eclodidos eram pequenos e confundiam-se com caramujos

jovens. Ficavam na terra do fundo dos aquários mas subiam à superfície para se alimentar de alface fresca. Cresciam através de muda ou ecdise. Nadavam ativamente movimentando os dois pares de membros.

Técnicas utilizadas para eliminação dos predadores da colônia de caramujos: a) Para eliminar os rotíferos, os moluscos foram lavados com solução de ácido acético (0,05%), com imersão durante um minuto, seguida de lavagem em água corrente. Os aquários também foram lavados com ácido acético. b) Para eliminar os ostracodos, todos os caramujos dos aquários contaminados foram sacrificados e os aquários lavados com álcool e depois água corrente, uma, duas ou mais vezes. Para renovar a criação, utilizaram-se desovas de caramujos procedentes de aquários não contaminados, lavados com solução a 0,5% de hipoclorito de sódio. Diariamente retiravam-se alíquotas de 1 ml de 10 pontos diferentes do fundo de cada aquário para pesquisar a presença de ostracodo recém-eclodido.

Análise estatística — o nível de significância foi determinado pelo test *t* de Student ou pela análise de variância.

RESULTADOS

Comparação da produção de cercárias nos dois sistemas utilizados para manutenção dos caramujos no período patente: preliminarmente, comparou-se a produção de cercárias por caramujo mantido quer no sistema convencional quer na incubadora. Moluscos de várias infecções foram mantidos durante um mês no sistema convencional (651 caramujos) e em incubadora (1.063 caramujos). Caramujos dos dois grupos eram submetidos a exposição à luz e as cercárias eliminadas eram contadas. A eliminação de cercárias pelos moluscos mantidos na incubadora foi cerca de duas vezes maior que pelos mantidos no sistema convencional (Tabela I).

Mortalidade dos caramujos mantidos em incubadora: como a infecção diminui a vida média do molusco e esta influi na produção de cercárias (Souza et al., 1985) procuramos comparar a mortalidade nos dois grupos. Para isso, 424 moluscos de uma mesma infecção foram colocados parte em aquário convencional (212) e parte na incubadora (212). A Fig. 1 mostra o resultado desta experiência. Verifica-se que há um ligeiro aumento na mortalidade do grupo mantido na incubadora. E a mortalidade/dia é maior nos primeiros 30 dias que seguem o período patente. Observando a Fig. 2, que mostra a produção cercária/molusco, verifica-se que a maior produtividade dos caramujos da incubadora ocorre exatamente nos 30 dias que seguem o período prepatente, sugerindo que a mortalidade está relacionada com a liberação

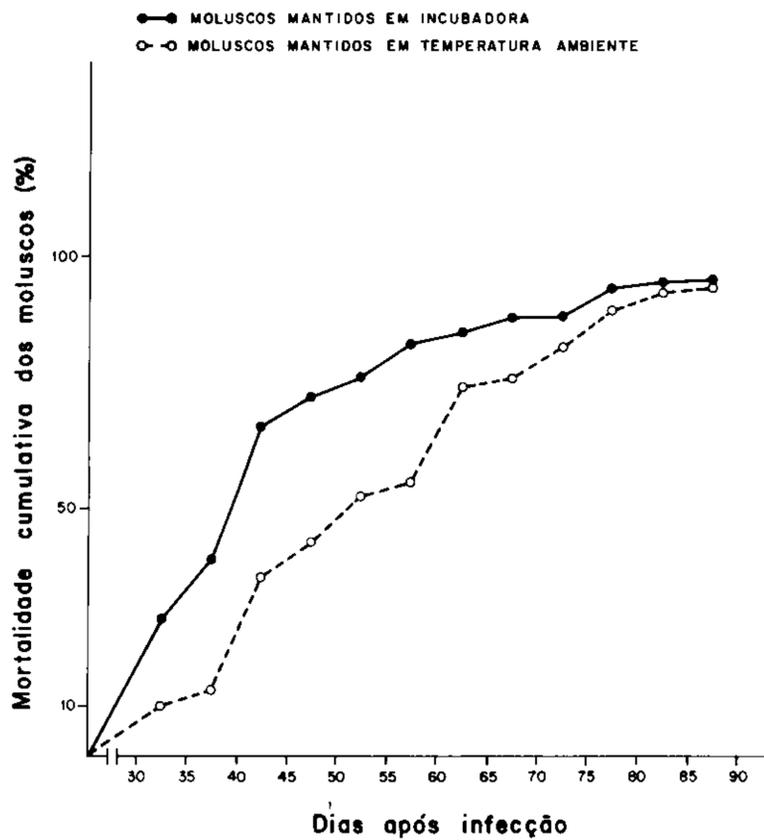


Fig. 1: Mortalidade de dois grupos de 212 moluscos no período patente, infectados na mesma data. Um grupo mantido em aquário com água corrente e a temperatura ambiente (sistema convencional o - - - o) e outro em incubadora ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) (●—●).

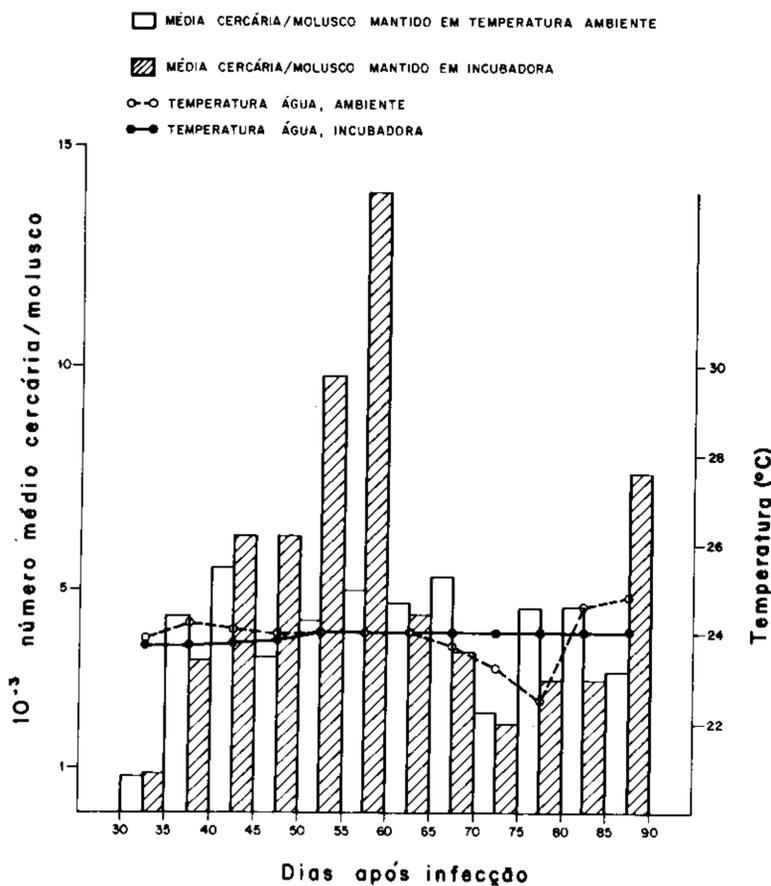


Fig. 2: Capacidade de produção de cercárias de moluscos mantidos no sistema convencional ou em incubadora durante o período patente.

de cercárias, isto é, maior liberação corresponde a maior mortalidade.

Influência da temperatura sobre a eliminação de cercárias, induzida por exposição à luz: a fim de se determinar a temperatura ideal para eliminação de cercárias, moluscos de uma mesma infecção foram divididos em três grupos e

colocados em frascos de vidro contendo cerca de 4 ml de tampão fosfato 0,001 M pH 6 por molusco. Um dos frascos foi colocado em estufa a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente; o segundo foi previamente aquecido a 30°C e deixado à temperatura ambiente e o terceiro deixado à temperatura ambiente durante todo o período de eliminação de cercárias. Os dois últimos foram submetidos ao mesmo tipo de iluminação que o frasco incubado na estufa. Após 4 horas os moluscos foram removidos e as cercárias dos três frascos contadas. A Tabela II mostra que a eliminação de cercárias na estufa e no ambiente de laboratório é praticamente a mesma desde que a temperatura seja mantida próxima de 30°C . Na temperatura inferior a 25°C houve uma diferença na eliminação, estatisticamente significativa ($p < 0,005$).

Influência do pH sobre a eliminação de cercárias induzida por exposição à luz: a fim de se verificar a influência do pH, os moluscos foram distribuídos em frascos de vidro contendo tampão fosfato 0,001M (1 molusco/4 ml) pH ajustado de 5 a 9. Os frascos eram colocados em estufa a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob iluminação. Após 4 horas de exposição os moluscos eram retirados dos frascos e as cercárias eram contadas. A Tabela III mostra que a eliminação de cercárias é praticamente a mesma entre pH 5 e 7, diminuindo significativamente nos pHs 8 e 9 ($p < 0,05$).

Influência de contaminantes químicos da água na eliminação de cercárias por exposição de caramujos infectados à luz: moluscos de uma mesma infecção eram colocados em água destilada proveniente de destilador de metal ou de vidro. Em alguns frascos contendo água destilada de destilador de vidro adicionaram-se soluções de zinco, cobre e chumbo nas proporções indicadas, uma vez que estes metais são sabidamente tóxicos para os moluscos e cercárias (Asch & Dresden, 1977; Mecham & Halliman, 1975; Paulini, 1974; Ritchie et al., 1965; Souza & Paulini, 1966). Verificou-se que água proveniente de destilador de metal influenciava negativamente na eliminação de cercárias. Esse efeito não é devido ao Zn^{++} , uma vez que quando adicionada ao meio quantidade de zinco maior do que a detectada na água destilada nenhum efeito prejudicial foi observado (Tabela IV). Por outro lado, traços de Cu e Pb adicionados à água destilada influíram negativamente na eliminação de cercárias (Tabela IV), aumentando ainda a mortalidade dos moluscos infectados expostos à luz.

Influência de predadores sobre a criação e manutenção do ciclo: a) Grande número de rotíferos foi observado nos aquários em novembro e dezembro de 1983, época em que a média de cercárias/molusco baixou de 4.479 em setembro e 3.600 em outubro para 2.131 e

TABELA I
Eliminação de cercárias durante 30 dias por grupos de moluscos mantidos em incubadora ou pelo sistema convencional

Nº de moluscos expostos	Temperatura média da água (°C)	Sistema de manutenção	Tipo de aquário	Total de cercárias	Nº médio cercária/molusco
659	27,1	convencional	vidro	1.291.585	1.959
1.063	24 ± 0,5	incubadora	plástico	4.031.225	3.792

Foram expostos moluscos de várias datas de infecção.

A diferença entre as médias de cercária/molusco foi significativa estatisticamente, $p < 0,05$.

TABELA II
Influência da temperatura da água na eliminação de cercárias de *S. mansoni*.

Nº de moluscos	Local de exposição	Temperatura da água (°C)			Cercárias eliminadas	
		início	final	Total	Nº médio/molusco	% eliminada
146	estufa	30,0	30,0	331.610	2.271	100,0
146	sala	30,0	27,8	303.110	2.076	91,4
146	pre-aquecida sala	24,7	25,0	191.160	816 *	34,0

Foram realizadas três experiências.

Caramujos expostos à luz durante 4 horas.

(*) $p < 0,005$

TABELA III
Influência do pH da água destilada sobre a eliminação de cercárias de *S. mansoni*

Nº de moluscos expostos	pH água	Volume de água por molusco (ml)	Cercárias eliminadas		
			Nº médio/molusco	Total	% eliminada
120	± 5,0	4,0	3.400	406.130	100,0
120	± 6,0	4,0	3.374	404.520	99,4
120	± 7,0	4,0	3.274	392.860	96,8
120	± 8,0	4,0	2.340	280.800 *	69,2
120	± 9,0	4,0	2.191	262.925 *	64,8

* $p < 0,05$ em relação a pH = 5.

Os caramujos eram expostos à luz em estufa a 30°C por 4 horas. Foram realizadas três experiências.

TABELA IV
Efeito de metais pesados, zinco, cobre e chumbo na eliminação de cercárias

Nº de experiências	Nº de moluscos	Procedência da água	Metal adicionado (mg/l)	Cercárias		
				Nº médio/molusco	Total	% eliminada
4	200	Destilador de metal	—	2.601	520.300	55,6
	200	Destilador de vidro	—	4.680	936.100	100,0
1	50	Destilador de vidro	Zn (0,10)	4.140	207.020	134,0
	50	Destilador de vidro	—	3.089	154.440	100,0
1	50	Destilador de vidro	Zn (0,15)	6.252	312.620	115,5
	50	Destilador de vidro	—	5.412	270.600	100,0
2	90	Destilador de vidro	Pb (0,0125)	1.928	173.580	63,6
	90	Destilador de vidro	—	3.028	272.580	100,0
1	26	Destilador de vidro	Cu (0,00312)	1.014	26.375	30,7
	26	Destilador de vidro	—	3.298	85.750	100,0

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas a 30 ± 1°C.

2.028, respectivamente, em novembro e dezembro. Nesta época o número de rotíferos/molusco foi de 235 em novembro e 832 em dezembro. Em janeiro de 1984, conseguiu-se reduzir o número de rotíferos para 22 e a média de cercárias foi de 3.079 por molusco, com tendência a elevar-se nos meses subseqüentes, alcançando em outubro 6.494 cercárias por molusco. b) Em meados de 1985, concomitantemente com uma queda de produção, constatou-se a presença de ostracodos (1 a 10 por ml) em alguns aquários, passando depois para 80% dos aquários. O efeito da presença do predador na criação de caramujos foi variado. Eles destruíam as desovas, impedindo a eclosão dos ovos, ou não deixavam os exemplares jovens e adultos se alimentarem adequadamente, provocando enfraquecimento e morte precoce dos moluscos. Conseqüentemente, a criação sofreu redução de 70 a 80%. O efeito sobre a manutenção do ciclo do *S. mansoni* foi provocar alta mortalidade dos moluscos no período prepatente (52%). A mortalidade média anual em 1983 e 1984, no período prepatente, foi de 24%, subindo a 52% em 1985. Em decorrência dessa mortalidade, a média anual de cercária/molusco baixou de 3.302 (1983) e 4.222 (1984) para 2.685 (1985). No segundo semestre de 1985, quando aumentou a contaminação dos aquários, aumentaram também as taxas de mortalidade no período prepatente nos meses de setembro, outubro e novembro (59,5, 64,6 e 58,9%) e baixaram as médias de cercária/molusco (1.495, 2.302 e 1.989).

As medidas adotadas para eliminar o crustáceo, no final de 85, possibilitaram a recuperação gradual da criação sem a presença do predador, em janeiro, fevereiro e março de 1986. A mortalidade média dos moluscos no período prepatente, no primeiro trimestre de 86, foi de 20%, comparável à dos anos de 83 e 84 (24%). A média de cercária/molusco no primeiro trimestre de 86 foi de 3.026, superior à de 85 (2.686) e comparável à de 83 (3.302).

DISCUSSÃO

Descrevemos neste trabalho sistema simples e eficiente para produção em massa de cercárias. Os moluscos infectados são mantidos em aquários de plástico contendo 20 moluscos/litro de água sem aeração e em incubadora, com temperatura constante de $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$, renovando-se a água três vezes por semana. Nestas condições pode-se controlar com maior precisão, ao contrário de água corrente, variáveis importantes na manutenção dos caramujos, tais como a obscuridade, cloro, metais pesados, predadores, microorganismos e temperatura da água, evitando, pelo menos em parte, as oscilações ocasionais. Por outro lado, na incubadora, com aumento de

produção ocorre simultaneamente aumento da mortalidade. É possível que a destruição dos tecidos do hospedeiro esteja aumentada em conseqüência da maior produção de cercárias, levando-o à morte precoce (Duke et al., 1952). De qualquer maneira, mesmo que o ritmo de mortalidade nos primeiros 65 dias tenha um ligeiro aumento (de 4,4 para 4,7 caramujos/dia), a manutenção dos caramujos infectados na incubadora ainda é altamente compensadora, uma vez que a produção no segundo semestre de 1984, quando os caramujos foram transferidos para a mesma, foi de 109×10^6 comparado com $51,7 \times 10^6$ no primeiro semestre e $47,1 \times 10^6$ no segundo semestre de 1983 (Lewis et al., aceito para publicação). Durante o ano de 1984, o ciclo foi ampliado apenas em 10% com relação a 1983.

O uso de incubadora à temperatura constante de $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para manutenção dos moluscos na fase patente foi introduzido com base em observações anteriores (Souza et al., 1985), nas quais os autores constataram que havia aumento da média de cercária/molusco em duas épocas do ano (abril/junho e agosto/setembro), quando a temperatura da água alcançava médias de 23 a 25°C . É provável que haja menor perda de cercárias por eliminação espontânea a temperaturas mais baixas.

Os dados aqui apresentados mostram também que a liberação de cercárias induzida por exposição à luz é uma parte operacional do ciclo que deve ser controlada adequadamente para se conseguir uma produção satisfatória de cercárias. O mecanismo pelo qual as cercárias são liberadas não é completamente conhecido (Duke et al., 1952). Acredita-se que a liberação de enzimas proteolíticas pelas glândulas de escape seja necessária para a eliminação (Dorsey, 1974; Stirewalt, 1974). De qualquer maneira, o efeito na eliminação das cercárias apresentado pelo pH, temperatura e metais pesados, sugere o envolvimento, pelo menos em parte, de processo biológico.

A água destilada, proveniente de destilador de metal, bem como a água de torneira, contém substâncias que inibem a liberação de cercárias. A pesquisa de metais pesados, zinco, cobre e chumbo, sabidamente tóxicos para caramujos e cercárias (Asch & Dresden, 1977; Mecham & Halliman, 1975; Paulini, 1974; Ritchie et al., 1965; Souza & Paulini, 1966) revelou a presença de zinco (0,21 mg/l) e de cobre (0,15 mg/l) na água destilada e a presença de chumbo (0,08 mg/l) e zinco (0,15 mg/l) na água de torneira. Ademais, quando cobre e chumbo foram adicionados à água proveniente de destilador de vidro, mesmo em dose subletal para o molusco normal, produziu-se efeito tóxico que se manifestou pela maior mortalidade dos caramujos in-

fectados e inibição parcial da liberação de cercárias. É provável, pois, que o fator inibidor de eliminação, existente na água de destilador de metal e de torneira, seja metal pesado.

Verificou-se ainda que a presença de ostracodos foi negativa não só para a criação em massa do molusco mas principalmente para a manutenção do ciclo do *S. mansoni*. De fato, o enfraquecimento dos moluscos causado pelo predador, somado ao dano causado pelo trematódeo, resultou na morte de 52% dos exemplares no período prepatente. Provavelmente morreram os moluscos com carga parasitária maior. Comparando os totais de moluscos expostos a miracídios em 1984 e 1985, teremos 27.800 e 30.418 exemplares, respectivamente, dos quais obtivemos 17.378 e 12.790 positivos que eliminaram 160.610.142 e 71.046.649 cercárias, respectivamente. Portanto, a presença de ostracodos na criação ocasionou uma perda estimada em mais de 50% de cercárias em um ano.

Os dados apresentados mostram que é importante para o sistema de produção em massa de cercárias o controle, sistemático e contínuo, não apenas sobre a manutenção, mas também sobre a eliminação induzida de cercárias por exposição à luz. A utilização de incubadora à temperatura constante reduz o custo de criação, o espaço, e aumenta a eficiência na produção de cercárias.

RESUMO

Foram estudados fatores que afetam a produção em massa de cercárias do *Schistosoma mansoni*. Rotíferos e ostracodos causaram diminuição de produção em nossa colônia. Os rotíferos foram erradicados facilmente lavando-se os aquários e a alface com ácido acético diluído. Já o ostracodo foi de difícil erradicação, produzindo mortalidade nos caramujos infectados, que alcançou níveis de 50-60% por mês. Moluscos infectados mantidos na incubadora a temperatura constante e em total escuridão apresentaram maior eliminação quando iluminados, a aproximadamente 30°C. A eliminação de cercárias foi praticamente a mesma entre os pHs 5-7. Traços de metais pesados adicionados à água destilada afetaram negativamente a eliminação. Finalmente, a manutenção em incubadora, embora apresentasse maior mortalidade de moluscos, foi mais simples e eficiente para a produção em massa de cercárias que o sistema convencional com água corrente.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni* – esquistossomose – cercária – *Biomphalaria glabrata* – rotíferos – ostracodos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Ernest Pauli-

ni, Coordenador do Núcleo de Assessoramento à Pesquisa da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela análise química da água utilizada. A Srta. Sueleny Silva ferreira pela eficiência nos serviços técnicos e a Srta. Maureen Rodarte pelo serviço datilográfico.

REFERÊNCIAS

- ASCH, J. L. & DRESDEN, N. H., 1977. *Schistosoma mansoni*: effects of zinc on cercarial and schistosomule viability. *J. Parasitol.*, 63: 80-86.
- CHERNIN, E.; MICHELSON, E. H. & AUGUSTINE, D. L., 1956. Studies on the biological control of schistosome-bearing snails. II. The control of *Australorbis glabratus* populations of the leech, *Helobdella fusca*, under laboratory conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5: 308-314.
- DORSEY, C. H., 1974. *Schistosoma mansoni*: ultrastructure of cercarial escape glands. *Exp. Parasitol.*, 36: 386-396.
- DUKE, B. O. L., 1952. On the route of emergence of the cercariae of *Schistosoma mansoni* from *Australorbis glabratus*. *J. Helminthol.*, 26: 133-146.
- GONÇALVES, M. G. R. & PELLEGRINO, J., 1967. Predatory activity of *Helobdella triserialis* (Blanchard, 1849) upon *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. *J. Parasitol.*, 53: 30.
- GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, C. P.; CONSOLI, R. A. G. B. & AZEVEDO, M. L. L., 1983. Controle biológico: *Helobdella triserialis* Blanchard, 1849 (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca: Planorbidae) em laboratório. *Rev. Saúde Públ. São Paulo*, 17: 481-492.
- KUNTZ, R. E., 1946. Effect of light and temperature on shedding of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Nav. Med. Res. Inst. Bethesda*, Rpt. nº 7, 16 p.
- MECHAM, J. A. & HOLLIMAN, R. B., 1975. Toxicity of zinc to *Schistosoma mansoni* cercariae in a chemically defined water medium. *Hidrobiologia*, 46: 391-404.
- MICHELSON, E. H., 1964. The protective action of *Chaetogaster limnaei* on snails exposed to *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 50: 441-444.
- PAULINI, E., 1974. Copper molluscicides. Research and goals. Academic Press, New York, 155-159.
- RITCHIE, L. S.; BERRIOS-DURAN, L. A. & SIERRA, R., 1965. Effects of low concentrations of copper sulfate on emergence of cercariae of *Schistosoma mansoni* from *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 51 (Sect., 2): 31-32.
- SANDT, D. G.; BRUCE, J. I. & RADKE, M. G., 1965. A system for mass producing the snail *Australorbis glabratus* and cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 51: 1012-1013.
- SOUZA, C. P. & PAULINI, E., 1966. Ensaio de laboratório com o moluscicida trifenil-chumbo. *Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.* 18: 247-251.
- SOUZA, C. P.; DIAS, E. P.; AZEVEDO, M. L. L. & PAULINI, E., 1979. Observações sobre alguns fatores que influem na manutenção do *Schistosoma mansoni* em laboratório. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.*, 12: 411-419.
- SOUZA, C. P.; GAZZINELLI, G.; ARAUJO, N.; ROSA CRUZ, O. F. & SILVA, C. R. T., 1985. Criação de caramujos infectados para obtenção em massa de cercárias e esquistossômulos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 55-61.
- STIREWALT, M. A., 1974. *Schistosoma*: cercaria to schistosomule. *Adv. Parasitol.*, 12: 115-182.
- STIREWALT, M. A. 1981. *Schistosoma mansoni*: conditions contributing to maximal cercarial harvests. *J. Parasitol.*, 67: 582-583.

- STIREWALT, M. A. & LEWIS, F. A., 1981. *Schistosoma mansoni*: effect of rotifers on cercarial output, motility and infectivity. *Int. J. Parasitol.*, *11*: 301-308.
- STORER, T. I. & USINGER, R. L., 1978. *Zoologia Geral*, 4ª ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- THÉRON, A., 1981. Dynamics of larval populations of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. I. Rhythmic production of cercariae in monomicrobial infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *75*: 71-77.
- THÉRON, A., 1981. Dynamics of larval populations of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. II. Chronobiology of the intramolluscal larval development during the shedding period. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *75*: 547-554.
- THÉRON, A. & MONÉ, J., 1984. Chronobiological aspects of the host-parasite relationships between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*: cercarial production and infectivity, and growth kinetics of the host. *J. Inv. Pathol.*, *44*: 209-213.