

# Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*

Quantitative study of metal present in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infected and uninfected with *Schistosoma mansoni*

Marco Antonio Vasconcelos Santos<sup>1</sup>, Edilson da Silva Brabo<sup>2</sup>, Bruno Santana Carneiro<sup>2</sup>, Kleber de Freitas Faial<sup>2</sup> e Isabel Raimunda Carvalho Rodrigues<sup>1</sup>

## RESUMO

Inicialmente, desenvolveu-se um estudo para quantificar e comparar as concentrações de alguns metais presentes em duas amostras de hemolinfa do caramujo *Biomphalaria glabrata* (infectados e não-infectados com *Schistosoma mansoni*). A espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma induzido (ICP-OES), foi utilizada para analisar os metais nas duas amostras. Os metais estudados foram: alumínio, cálcio, cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, chumbo e zinco. Os resultados mostram que, a princípio, os metais não são fatores determinantes no processo de defesa desses organismos contra este parasita, quando presente nos seus tecidos.

**Palavras-chaves:** *Biomphalaria glabrata*. Metais. Hemolinfa.

## ABSTRACT

We conducted a preliminary study to quantify and compare two concentrations of the same metals present in the hemolymph of snail *Biomphalaria glabrata*. In this context, we used Induction Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy technique (ICP-OES), to analyze the metals in the two samples (snails infected and not infected with *Schistosoma mansoni*). The metals studied were: aluminum, calcium, cadmium, cobalt, chromium, copper, iron, potassium, magnesium, manganese, lead and zinc. Preliminary results showed that such metals are not involved in the defense of these organisms against the parasite, when present in their tissues.

**Key-words:** *Biomphalaria glabrata*. Metals. Hemolymph.

A defesa interna no molusco *Biomphalaria glabrata* contra a larva do *Schistosoma mansoni*, tem mostrado que o encapsulamento e posterior fagocitose realizada pelos hemócitos sobre o material não-próprio, representaria a resposta imune desenvolvida por estes organismos<sup>8 26 28</sup>. Juntamente com as substâncias citotóxicas que atuam sobre as larvas, que são liberadas pelos hemócitos após o encapsulamento<sup>3 9 22</sup>, os metais também estão presentes e integram-se à hemolinfa para compor o processo de defesa<sup>5 23</sup>. O elemento alvo a ser pesquisado, é a hemolinfa, que funciona como o veículo na qual todos circulam.

Para esse fim, a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma induzido (ICP-OES), pode ser utilizada como boa opção analítica para análise multi-elementar em diversos

tipos de amostras. Nesta técnica, uma fonte de alta energia é usada, para converter as espécies de interesse, presentes na amostra em átomos e íons, que sofrerão transições eletrônicas, gerando um espectro de emissão formado por fótons de luz, com frequência e energia diferentes. Esse feixe de radiação é direcionado para um policromador, onde ocorre a separação em comprimentos de onda, que são focalizados no plano focal e quantificados por um sistema de detecção. Neste estudo, utilizou-se plasma de argônio como fonte de excitação. A vantagem para seu uso, é o fato de possuir energia suficiente para promover a excitação da maioria dos elementos químicos, proporcionando alta sensibilidade, com ampla faixa linear e estabilidade temporal satisfatória.

1. Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. 2. Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.

**Endereço para correspondência:** Dr. Marco Antonio Vasconcelos Santos. Instituto Evandro Chagas. Av. Almirante Barroso 492, Marco, 66090-000 Belém, PA.

e-mail: marcoantonio@iec.pa.gov.br

Recebido para publicação em 31/8/2004

Aceito em 15/12/2004

Diante dos poucos dados disponíveis na literatura, desenvolveu-se um estudo preliminar, onde buscou-se determinar diferenças quantitativas, sobre o maior número possível desses metais presentes na hemolinfa, coletada em caramujos *B. glabrata*, infectados com *S. mansoni*, para comparar com amostras da mesma espécie de moluscos não infectados. A determinação sobre os tipos de metais aqui estudados, foi feita de acordo com a nossa disponibilidade técnica para quantificá-los.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Moluscos utilizados.** Para o desenvolvimento deste estudo, foram usados um total de 300 caramujos *B. glabrata*, sendo 150 infectados e 150 não infectados, todos colonizados em laboratório, a partir de ovas de caramujos da mesma espécie, coletados na região Bragantina, a oeste do estado do Pará. Todos os espécimes apresentavam diâmetro de concha que variava entre 1,8 a 2,2cm, e foram infectados individualmente em laboratório com 5 miracídeos de *S. mansoni*, obtidos de triturado hepático de camundongos infectados com cepa silvestre, isolada da mesma localidade, os quais (caramujo e miracídeos) foram confinados em pequenos vidros contendo 3mL de água potável desclorada, sob luz por 90 minutos. Após esse tempo, os caramujos foram recolhidos em aquário de vidro contendo o mesmo tipo de água, permanecendo no laboratório em ambiente com pouca luz. A água do aquário foi trocada a cada 3 dias, e a alimentação foi realizada com alface fresca e ração de camundongo triturada servidas sempre que necessário. Para o experimento com caramujos não infectados, os moluscos tiveram a mesma procedência, o mesmo tratamento laboratorial, e foram puncionados com a mesma metodologia e livres de infecção.

**Coleta da hemolinfa.** A hemolinfa do caramujo foi obtida com a introdução de uma agulha (30 x 8 21G 1¼) na região cefalopodal, até atingir a cavidade do manto. Esse procedimento de punção foi realizado quebrando-se um pouco a concha na sua abertura, de forma a acompanhar a retração de defesa do animal para dentro da concha. Após a retração se estabilizar, introduzimos a agulha até a cavidade do manto e em seguida retiramos, esse movimento fez com que a hemolinfa saísse do caramujo pelo orifício deixado pela agulha, para depositar-se na curvatura da concha de onde foi aspirada com pipeta de vidro siliconizada. A hemolinfa foi transferida gradativamente para um tubo de vidro de 15ml siliconizado, e mantido em baixa temperatura no laboratório, até atingir o volume final de 10ml, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 223g, para retirada dos hemócitos.

**Determinação quantitativa dos metais nas amostras de hemolinfa.** No procedimento de solubilização da amostra, um volume de 1mL de hemolinfa e 3mL de HNO<sub>3</sub> concentrado de alta pureza, foram adicionados em um tubo de ensaio de 23cm de altura e diâmetro 2,5cm, e levados ao bloco aquecedor de alumínio à temperatura de 90°C por 60 min. Em seguida, a solução foi esfriada à temperatura ambiente, transferida para balões volumétricos com três lavagens nas paredes internas dos tubos, e completada com

água deionizada ao volume final de 50mL. As soluções padrões (curva de calibração) para leitura no ICP-OES dos metais de interesse, foram preparadas a partir de soluções estoque de 100mg/L, após as diluições adequadas (Tabela 1), com água deionizada. Uma alíquota de 10mL da solução amostra foi transferida para tubos de ensaio 13x10cm no Sample Preparation System SPS 5 da VARIAN. Para determinação de metais nas amostras de hemolinfa foi utilizado um Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Induzido (ICP-OES), modelo VISTA CCD simultâneo da VARIAN com configuração axial, equipado com detector MPX, cobertura de comprimento de onda entre 177 a 785nm, o que faz com que as interferências espectrais fossem facilmente eliminadas. Todas as condições operacionais do equipamento são controladas pelo software Vista-MPX. A Tabela 2 mostra as condições instrumentais utilizadas para determinação das dosagens dos metais encontrados na hemolinfa do molusco *B. glabrata*.

**Tabela 1 - Curva de calibração, para análise de metais em amostras de hemolinfa.**

Elementos em mg/L	Concentrações					
	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
Al	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
Ca	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
K	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
Mg	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
Na	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
Cd	25	50	100	200	400	800
Cr	25	50	100	200	400	800
Cu	25	50	100	200	400	800
Mn	25	50	100	200	400	800
Pb	25	50	100	200	400	800
Zn	25	50	100	200	400	800

**Tabela 2 - Parâmetros de operacionalização do sistema de dosagem.**

Parâmetros	Condições
Power	1,0Kv
Fluxo de gás do plasma	15,0(L/min)
Fluxo de gás auxiliar	1,5(L/min)
Pressão do nebulizador	1,0(kPa)
Tipo de nebulizador	Concêntrico
Velocidade da bomba	15 rpm
Delay da amostra	25 seg
Tempo de estabilização	15 seg
Tempo de lavagem	10 seg
Tempo de leitura da replicata	5 seg
Número de replicatas	2
Amostrador automático	SPS-5

## RESULTADOS

Os resultados mostram (Tabela 3) que não houve diferenças significativas, nas determinações dos metais estudados, entre os grupos de caramujos não infectados e infectados. Somente um metal, o chumbo, foi detectado no grupo de caramujos não infectados, mas não foi detectado entre os infectados. O cobalto e cromo não foram detectados em nenhum dos dois grupos.

**Tabela 3 - Quantificação de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* não-infectados e infectados com *Schistosoma mansoni*.**

Metais analisados (mg/l)	Amostras de hemolinfas			
	caramujos não infectados		caramujos infectados	
	média	desvio padrão	média	desvio padrão
Al (E)	0,0469	0,0128	0,0628	-
Ca (E)	1,3100	0,0509	1,377	0,014
Cd (T)	0,0012	0,0011	0,0028	-
Cu (E)	0,0074	0,0005	0,0056	0,0003
Fe (E)	2,1400	0,0707	2,19	-
K (E)	0,1675	0,0064	0,1685	0,0015
Mg (E)	0,8925	0,0233	0,8775	0,0065
Mn (E)	0,0042	0,0011	0,0033	0,0001
Pb (T)	0,0120	0,0128	-	-
Zn (E)	0,0807	0,0101	0,0588	0,0068

(E) = essencial (T) = tóxico (-) = não determinado.

## DISCUSSÃO

Entre as substâncias integrantes da hemolinfa da *B. glabrata*, a hemoglobina constitui 97% das proteínas totais aí presentes<sup>12</sup>, e na sua constituição foram identificados cerca de 19 aminoácidos<sup>1</sup>. Observou-se também, que esta hemoglobina apresentou 0,315% de ferro. Outros estudos mostram que o ferro é, inicialmente, depositado no hepatopâncreas, mas é transferido logo em seguida para outros órgãos, onde o ovoteste recebe a maior parte<sup>15</sup>. Como o hepatopâncreas e ovoteste são anatomicamente contíguos<sup>16</sup>, pode-se imaginar que a passagem de ferro se faça diretamente. Em estudos anteriores, foi demonstrado que ocorre também captação dos metais: zinco, cádmio e cobre pelo hepatopâncreas desse molusco<sup>25-33</sup>. Entretanto, mais estudos para quantificar alguns metais presentes na hemolinfa de *B. glabrata* necessitam ser realizados, para ajudar no entendimento de todo esse processo.

Estudos foram realizados para detalhar bioquimicamente a natureza da hemolinfa em *Biomphalaria glabrata*, como também em outras espécies de moluscos<sup>30-31</sup>. A quantificação de aminoácidos e proteínas também foi realizada<sup>1-10-19</sup>. Vários trabalhos tem procurado estudar substâncias importantes presentes na hemolinfa e procurado determinar o seu papel na questão da interação parasito hospedeiro<sup>4-12-13-17-21-31</sup>. Estudos sobre a participação dos metais em todo esse processo, têm despertado a realização de investigações que tem ajudado no entendimento dessa questão<sup>2-25</sup>. Os efeitos do alumínio nos invertebrados, por exemplo, têm focalizado uma avaliação em crustáceos, alguns moluscos e também larvas de insetos<sup>11-29</sup>. Para peixes e moluscos de água doce a toxicidade do alumínio depende da espécie, estágio de desenvolvimento, composição química da água<sup>7</sup> e principalmente, o pH.

O meio ambiente contém metais pesados, resultantes do uso de métodos químicos em processos industriais, agrícolas e pecuárias<sup>14</sup>, aos quais os moluscos de uma maneira geral estão expostos. Alguns metais como arsênio, berílio, cádmio, cromo, chumbo, mercúrio e níquel são reconhecidamente imunotóxicos, enquanto outros mostram efeitos importantes para as funções celulares, e podem ser considerados como imunomoduladores

essenciais para as funções imunológicas, como ferro, zinco, cobre e manganês<sup>25</sup>. Alguns metais necessitam de uma ingestão adequada para não provocar disfunções no metabolismo dos outros<sup>6</sup>. Assim, uma dieta deficiente de níquel, tem sido associada a distúrbios da absorção de ferro e disfunções no metabolismo do cálcio e zinco<sup>24-32</sup>. O cádmio, presente em pequenas quantidades no ar, água e solo, pode ser ingerido pelos moluscos e interferir na modulação da sua resposta imune<sup>18</sup>. Dessa forma, seu efeito poderá interferir sobre a função dos hemócitos, que em última análise exercem papel fagocitário. O aumento dos níveis de alumínio no ecossistema, resulta em efeitos tóxicos para peixes e plantas<sup>27</sup>, sua ingestão em excesso provoca diminuição na absorção de cálcio e ferro, que para os moluscos, comprometeria a formação da concha e disfunção na hemolinfa respectivamente<sup>2-11</sup>.

O ferro, cobre, zinco, selênio e manganês estão entre os elementos essenciais na manutenção da homeostase celular, incluindo o sistema imunológico<sup>24-27</sup>. Várias enzimas precisam desses metais como co-fatores para suas funções, e, de modo geral, sabemos que esses metais são utilizados em pequenas quantidades e estão presentes nas dietas. Como são essenciais, a deficiência pode determinar disfunções imunológicas, enquanto a superdosagem pode estabelecer estados tóxicos, nem sempre claros quanto ao papel imunossupressor. Dessa forma, a carência de ferro, resulta em produção reduzida de anticorpos, enquanto o excesso provoca tanto deficiência como aumento da função humoral<sup>20</sup>. A carência de cobre leva a uma deficiência humoral, mas as conseqüências da ingestão em excesso não está bem esclarecido. Quanto ao zinco, parece evidente e essencial a sua função para o sistema imunológico, enquanto a sua carência, está associada à imunodeficiência do sistema humoral, celular e fagocítico<sup>24</sup>.

A importância dos metais na vida de muitos organismos é fato comprovado, e, dessa forma, os nossos resultados procuraram mostrar de forma quantitativa, possíveis elevações ou declínios nos níveis de alguns metais presentes na hemolinfa do caramujo *Biomphalaria glabrata*, comparando os resultados entre caramujos infectados e não-infectados.

Concluimos, que os metais parecem não ser determinantes, no processo de defesa desses organismos, no que se refere a uma maior ou menor quantidade dos mesmos, durante a presença do parasita *S. mansoni* nos tecidos do seu hospedeiro *B. glabrata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida AP, Neves AGA. The Hemoglobin of *Biomphalaria glabrata*. Chemical composition and some physicochemical properties. Biochemical and Biophysical Acta 371: 140-146, 1974.
- Balls M, Sabbiioni E. Promotion of research on in vitro immunotoxicology. Science of Total Environment 270: 21-25, 2001.
- Bayne CJ, Buckley PM, DeWan PC. *Schistosoma mansoni*. Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. Experimental Parasitology 50: 409 - 416, 1980.
- Bezerra JCB, Becker W, Zelck UE. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni* resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 92: 421-425, 1997.

5. Bezerra JCB, Becker W, Zelck UE. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 779-784, 1999.
6. Brooks AW, White KN, Bailey SE. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103: 577-583, 1992.
7. Burton TM, Allan JW. Influence of Ph, aluminium, of organic matter on stream invertebrates. *Can J Fish Aquat Sci* 43: 1285 – 1289. *In: Yokel RA, Golub M (eds) Research issues in aluminium toxicity. Ecotoxicology of Aluminium to fish and wild life. Taylor & Francis, USA, p. 48-68, 1997.*
8. Cheng TC, Rifkin E. Cellular reactions in marine mollusks in response to helminth parasitism. *In: A symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes Snieszko ES (ed) American Fisher Society Special Public 5: 443-496, 1970.*
9. Coustau C, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: Modulation of hemocyte surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. *Experimental Parasitology* 79: 1-10, 1998.
10. Dusanic DG, Lewert RM. Alterations to proteins and free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph after exposure to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Journal Infection Diseases* 112: 243-246, 1963.
11. Elangovan R, McCrohan CR, Ballance S, Powell JJ, White KN. Localization and fate of aluminium in the digestive gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Tissue and Cell* 32: 79-87, 2000.
12. Figueiredo EA. Hemoglobina de *Biomphalaria glabrata*: Purificação e propriedades físico-químicas. Separata do III Simpósio de Bioquímica de Planorbídeos. Curitiba, 1966.
13. Gilbertson DE. Free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph: Comparison of four geographic strains and effect of infection by *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 53: 565-568, 1967.
14. Goyer R. Atoxic effects of metal. *In: Amdur MO, Doull, Klaassen CD (eds) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, p. 691-736, 1996.*
15. Heneine IF, Gazzinelli G. Biossíntese de hemoglobina em *Biomphalaria glabrata*. Alguns aspectos do metabolismo do ferro. Separata do III Simpósio de Bioquímica de Planorbídeos. Curitiba, 1966.
16. Heneine IF. Iron metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*: uptake, storage and transfer. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28: 391-399, 1969.
17. Hopkins RG, Failla ML. Chronic intake of marginally low copper diet impairs *in vitro* activities of lymphocytes and neutrophils from male rats despite minimal impact on conventional indicators of copper status. *Journal of Nutrition* 125: 2658-2668, 1995.
18. Koller LD. Cadmium. *In: Zelikoff JT, Thomas PT (eds) Immunotoxicology of environmental and occupational metals. London: Taylor & Francis Ltd. p. 41-62, 1998.*
19. Lee FO, Cheng TC. *Schistosoma mansoni*: Alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* 31: 203-216, 1972.
20. Lee FO, Cheng TC. Incorporation of <sup>59</sup>Fe in the snail *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 58: 481-488, 1972.
21. Michelson EH. Characterization of the hemolymph antigens of *Australorbis glabratus* by electrophoresis and immunoelectrophoresis. *Annals Tropical Medicine Parasitology* 60: 280-287, 1966.
22. Michelson EH, DuBois L. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* 15: 105-111, 1975.
23. Olafsen JA. Invertebrate lectins: Biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. *In: Brehelin M (ed) Immunity in Invertebrates Springer, Berlin, Chap. 8, p. 94-111, 1986.*
24. Omara FO, Brousseau P, Raymond B, Fournier M. Iron, Zinc and Copper. *In: Zelikoff JT, Thomas PT (eds) Immunotoxicology of environmental and occupational metals. London: Taylor & Francis Ltd. p. 231-262, 1998.*
25. Ravera O. Effects of heavy metals (cadmium, copper, chromium and lead) on a freshwater snail: *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Prosobranchia). *Malacologia* 16: 231-236, 1977.
26. Renwantz L, Mohr W. Opsonizing effect of serum and albumin gland extracts on the elimination of human erythrocytes from the circulation of *Helix pomatia*. *Journal Invertebrate Pathology* 31: 164-170, 1978.
27. Rizzo LV, Barbuto JAM. Tolerância imunológica. *In: Calich V, Vaz C (eds) Imunologia. Livraria e Editora Revinter Ltda, Rio de Janeiro, p. 211-222, 2001.*
28. Sminia T, Van der Knaap WPW, Kroese FGM. Fixed phagocytes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Research* 196: 545-548, 1979.
29. Sparling DW, Lowe TP, Campbell PGC. Ecotoxicology of aluminium to fish and wild life. *In: Yokel RA, Golub M (eds) Research issues in aluminium toxicity. Ecotoxicology of Aluminium to fish and wild life. Taylor & Francis, USA, p. 48-68, 1997.*
30. Targett GAT. The amino acid composition from snail hosts of Schistosomiasis. *Annals Tropical Medicine Parasitology* 56: 61-66, 1962.
31. Wright CA, Ross GC. Electrophoretic studies of blood and egg proteins in *Australorbis glabratus* (Gastropoda, Planorbidae). *Annals Tropical Medicine Parasitology* 57: 47-51, 1963.
32. Wolmarans CT. *Biomphalaria glabrata*: respiration, calcium and end products of carbohydrate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87: 785-790, 1987.
33. Yager CM, Harry HW. Uptake of heavy metal ions by *Taphius glabratus*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 19: 174-182, 1966.