

## PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DE $^{59}\text{Fe}$ , EM *BIOMPHALARIA GLABRATA*, PARA ESTUDOS DE EFEITOS DE DENSIDADE POPULACIONAL

Paulo Marcos Zech COELHO (1), Giovanni GAZZINELLI (2), J. PELLEGRINO (3) e Leógenes Horácio PEREIRA (1)

### RESUMO

Foram realizados estudos sobre o método de incorporação de  $^{59}\text{Fe}$  por *Biomphalaria glabrata*, visando sua padronização. Os resultados obtidos estabelecem relações entre diversas variáveis e mostram que as contagens de radiação devem ser feitas nas partes moles do molusco. Resultados reprodutíveis são obtidos quando o tempo de incubação é fixado em 24 horas e o isótopo usado na concentração de  $2,0 \mu\text{Ci}/300 \text{ ml}$ .

### INTRODUÇÃO

O crescimento ponderal e numérico de uma população de planorbídeos está condicionado a múltiplos fatores, tais como a oferta de alimento, número de indivíduos, tamanho do espaço, inimigos naturais, competidores. Este crescimento parece ser também limitado por substâncias eliminadas pelos próprios moluscos. WRIGHT<sup>5</sup> sugere que os efeitos decorrentes da densidade populacional de moluscos de habitat aquático são devidos a substâncias tóxicas eliminadas pelos próprios caramujos possivelmente hormônios. BERRIE & VISSER<sup>1</sup> extraíram de um lago onde se encontrava *Biomphalaria sudanica* uma substância inibidora do crescimento do referido molusco. Em concentração mais elevada, tal substância era letal para o caramujo.

Baseando-se em estudos sobre captação de ferro por *Biomphalaria glabrata*, feitos por HENEINE & col.<sup>3</sup>, GAZZINELLI & col.<sup>2</sup> verificaram que populações de moluscos de maior densidade incorporavam menos  $^{59}\text{Fe}$  que populações menos densas. Estes Autores con-

cluíram que a incorporação de  $^{59}\text{Fe}$  é método útil para o estudo dos efeitos da densidade populacional em *B. glabrata*. No presente trabalho, este método é estudado com maior detalhe, visando sua padronização.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Moluscos

Os exemplares de *Biomphalaria glabrata* eram provenientes de criação mantida em laboratório durante um tempo superior a 10 anos.

#### Alimentação

Para a alimentação dos moluscos foi usada alfaca seca, desidratada e pulverizada. A desidratação foi feita a  $50^\circ\text{C}$ . A ração preparada da forma acima descrita era administrada, em algumas experiências, na dose de  $8 \text{ mg/caramujo/dia}$ ; em outras, a dose foi reduzida à metade (para moluscos de menor tamanho).

Contribuição n.º 33 do Grupo Inter-Departamental de Estudos sobre Esquistossomose, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

- (1) Departamento de Zoologia e Parasitologia do ICB, UFMG
- (2) Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG
- (3) Grupo Inter-Departamental de Estudos sobre Esquistossomose, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Endereço para separatas: Caixa Postal 1404, 30000 Belo Horizonte, Brasil

### Água utilizada

Os caramujos eram colocados, em cada experiência, em 300 ml de água deionizada.

### Temperatura e aeração

A temperatura da água era mantida constante ( $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ). A aeração era feita continuamente, utilizando ar bombeado por compressores.

### Isótopo usado — $^{59}\text{Fe}$

O material empregado foi o citrato ferroso (Ferrutope Squibb) acondicionado em frascos contendo 250  $\mu\text{Ci}$ .

A atividade específica inicial foi de 4,98 mc/mg e o ferro radioativo só foi usado quando apresentava mais de 30% de atividade inicial.

### Aparelho medidor de radioatividade

O rádio analisador usado foi de marca Nuclear Chicago — mod. 181-B, calibrado para detectar partículas gama. A calibração foi fixada nos seguintes valores:

#### Rádio analisador

Ajustador de alta voltagem ... posição	900
Abertura da janela ..... posição	6
Nível da base ..... posição	650
Aumento ..... posição	2

#### Contador

Teste ..... posição	ligado
Escala ..... posição	1000
Operação ..... posição	tempo
Voltagem .....	1200 volts

O material a ser estudado era introduzido no poço do aparelho sendo feita a contagem em cpm.

Todas as contagens foram feitas no aparelho calibrado conforme esquema descrito acima.

### Avaliação da incorporação do $^{59}\text{Fe}$ pelos moluscos

*Caramujos inteiros:* após cuidadosa lavagem em água corrente, os moluscos eram colocados nos tubos de plástico do aparelho e a seguir feitas as contagens.

*Partes moles dos caramujos:* os moluscos eram mortos em água quente ( $70^\circ\text{C}$ ), onde eram deixados durante 30 segundos. As partes moles eram então retiradas da concha, colocadas em tubos de hemólise e estes nos tubos de plástico do aparelho.

*Conchas:* em alguns casos, as medidas eram feitas com a concha íntegra. Em outros, as conchas eram trituradas e os fragmentos colocados dentro de tubos de hemólise.

### RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram haver uma relação direta entre a concentração do isótopo e sua incorporação pelo caramujo (Tabela I). Da mesma forma, há uma incorporação proporcional ao tempo de incubação quando se usa uma concentração determinada (Tabela II). Os resultados são satisfatórios usando-se a concentração de 2,0  $\mu\text{Ci}$  e o tempo de incubação de 24 horas.

Pelos dados da Tabela III pode-se verificar que praticamente não houve diferença na incorporação entre as partes moles dos moluscos de 1,5 e 2,5 cm, embora os moluscos inteiros de 2,5 cm pesassem três vezes mais que os moluscos de 1,5 cm. A relação incorporação (cpm)/peso total (mg) das partes moles foi de 1,17 para os caramujos de 1,5 cm de diâmetro e 0,36 para os caramujos de 2,5 cm de diâmetro.

Os resultados apresentados na Tabela IV demonstram que houve contaminação de isótopo na concha dos moluscos, podendo esta mascarar comparações estatísticas entre médias com valores próximos, quando se avalia a radioatividade do animal inteiro.

Dos dados da Tabela V conclui-se que as conchas dos moluscos se contaminam propor-

COELHO, P. M. Z.; GAZZINELLI, G.; PELLEGRINO, J. & PEREIRA, L. H. — Padronização do método de incorporação de  $^{59}\text{Fe}$ , em *Biomphalaria glabrata*, para estudos de efeitos de densidade populacional. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:417-420, 1973.

TABELA I

Incorporação do  $^{59}\text{Fe}$  pela *B. glabrata* em função da concentração do isótopo

Grupo	Quantidade de $^{59}\text{Fe}$ ( $\mu\text{Ci}$ )	N.º de caramujos	Incorporação Média $\pm$ desvio-padrão (cpm)	Coefficiente de variação (%)
1	0,35	10	577 $\pm$ 130	23
2	0,70	10	1.263 $\pm$ 222	18
3	1,05	10	2.118 $\pm$ 719	34
4	1,40	10	2.832 $\pm$ 674	24
5	1,75	10	3.576 $\pm$ 752	21
6	2,10	10	3.843 $\pm$ 838	22

TABELA II

Relação entre incorporação e tempo de incubação. Concentração de 2,0  $\mu\text{Ci}$  (do  $^{59}\text{Fe}$ )

Grupo	Incubação (horas)	N.º de caramujos	Média $\pm$ desvio-padrão (cpm)	Coefficiente de variação
1	16	10	596 $\pm$ 109	18
2	26	10	1.006 $\pm$ 119	12
3	40	10	1.321 $\pm$ 185	14

TABELA III

Relação entre o peso, tamanho e incorporação do  $^{59}\text{Fe}$

Tamanho (cm)	N.º de caramujos	Peso do caramujo inteiro (gr)	Incorporação nas partes moles média $\pm$ desvio-padrão (cpm)
1,5	10	0,516 $\pm$ 0,80 CV = 16%	603 $\pm$ 176 CV = 29%
2,5	10	1,680 $\pm$ 0,210 CV = 13%	604 $\pm$ 217 CV = 36%

CV = Coeficiente de variação

TABELA IV

Relação entre a radioatividade da concha e partes moles, em caramujos de 1,2 cm de diâmetro

Material	N.º de caramujos	Média $\pm$ desvio-padrão (cpm)	Coefficiente de variação (%)
Concha	14	591 $\pm$ 107	18
Partes moles	14	377 $\pm$ 86	23

TABELA V

Relação entre o tamanho do molusco e a incorporação do  $^{59}\text{Fe}$  na concha

Diâmetro da concha (cm)	N.º de caramujos	Média $\pm$ desvio-padrão (cpm)	Coefficiente de variação (%)
1,5	10	306 $\pm$ 62	20
2,5	10	1.235 $\pm$ 272	22

cionalmente à sua área. Assim, para se obter resultados válidos na comparação da incorporação entre dois grupos, quando as contagens são feitas em animais inteiros, os animais devem ter o mesmo diâmetro da concha.

S U M M A R Y

*Standardization of the  $^{59}\text{Fe}$  uptake method, by Biomphalaria, for studies on the crowding effect*

Studies were undertaken aiming to the standardization of the  $^{59}\text{Fe}$  uptake method. The results obtained demonstrated that the radiation counts should be done in the soft parts of the mollusc. Reproducible data are obtained when the incubation period is 24 hours and the isotope concentration 2.0  $\mu\text{Ci}/300$  ml.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERRIE, A. D. & VISSER, S. A. — Investigations of a growth-inhibiting substance affecting a natural population of fresh-water snails. *Physiol. Zool.* 36:167-173, 1963.
2. GAZZINELLI, G.; RAMALHO-PINTO, F. J.; PELLEGRINO, J. & GILBERT, B. — Uptake of  $^{59}\text{Fe}$  as a tool for the study of the crowding effect in *Biomphalaria glabrata*. *Amer. J. Trop. Med. and Hyg.* 19:1034-1037, 1970.
3. HENEINE, I. F.; GAZZINELLI, G. & TAFURI, W. L. — Iron metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*: uptake, storage, and transfer. *Compt. Biochem. Physiol.* 28:391-399, 1969.
4. WRIGHT, C. A. — The crowding phenomenon in laboratory colonies of fresh-water snails. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 54:224-232, 1960.

Recebido para publicação em 27/2/1973.