

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MARCAÇÃO DE CARAMUJOS *BIOMPHALARIA GLABRATA* COM RADIOESTRÔNCIO

MIGUEL ARCHANJO MUNIZ LEAL*
EDUARDO PENNA FRANCA**

Caramujos *Biomphalaria glabrata* vetor da esquistossomose mansônica, utilizados em experiências de campo, nas quais se faz necessário sua identificação e/ou localização, devem ser marcados com radioestrôncio 85, 89 ou 90. Sua marcação em laboratório deve ser procedida em aquários de vidro sem fundo de areia, temperatura de $26,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH ajustado ao valor encontrado no "habitat", aeração artificial, alimentação diária com pequenas porções de alface fresca e 25 ml de água desionizada por caramujo. O nível de atividade no caramujo pode ser estimado sabendo-se que para o tempo de marcação de 5 dias e atividades iniciais de 0,036 a 0,362 $\mu\text{Ci/ml}$, a captação global para grupos de 10 caramujos está em torno de $84 \pm 2\%$ e que a marcação em água contendo cálcio, praticamente não se altera até concentrações de 50 ppm. A sobrevivência ao longo de nove semanas não foi influenciada pela presença de radioestrôncio no caramujo.

Em trabalho anterior, Leal & Franca (1982) estabeleceram que o radioestrôncio é o elemento mais indicado para marcação de caramujos *B. glabrata* para utilização em trabalhos de campo. Entretanto há necessidade de serem estabelecidos parâmetros que permitam sua aplicação no sentido de marcar caramujos com a quantidade adequada de radioestrôncio, em função dos objetivos do pesquisador. Visando a tal direção, foram realizadas experiências para verificar: 1) a influência do número de caramujos sobre a incorporação de radioestrôncio; 2) a influência da atividade inicial de radioestrôncio na incorporação por um número constante de caramujos; 3) a influência do Ca^{++} na incorporação de radioestrôncio; 4) a sobrevivência de caramujos marcados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados caramujos *B. glabrata* (Mollusca, Planorbidae), provenientes de amostra coletada no rio Beberibe, Recife – PE. Nas experiências iniciais foram utilizados

*Departamento de Biofísica e Radiobiologia do CCB da UFPE, por Convênio trabalhando no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ – Caixa Postal 6034 – 50000 Recife, PE.

**Instituto de Biofísica da UFRJ – Ilha do Fundão – 21091 Rio de Janeiro, RJ.

Trabalho realizado no Laboratório de Radioisótopos do Instituto de Biofísica da UFRJ com auxílios financeiros concedidos pela Comissão de Energia Nuclear (CNEN), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico (BNDE) através dos contratos FUNTEC-74, 143 e 241, Departamento de Biofísica e Radiobiologia do CCB da UFPE e Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco da FFSP.

Recebido para publicação em 26 de outubro de 1981 e aceito em 24 de março de 1982.

caramujos da quinta ou sexta geração em cativeiro e a partir desta data as gerações sucessivas. Um determinado número de caramujos com diâmetros entre 10-12 mm era colocado nos aquários com determinado volume de água por caramujo. Os aquários, de vidro, eram mantidos a temperatura de $26,5 \pm 1^\circ\text{C}$, pH ajustado em 6,5, aeração artificial e alimentação com alface fresca. As demais condições de marcação são apresentadas separadamente para cada experiência. Periodicamente os caramujos marcados em ^{89}Sr eram retirados dos aquários, lavados em água corrente e contados no sistema 972, Nuclear Chicago, associado a um espectrômetro gama com dois canais, Ultrascaler II, provido de trocador automático de amostras, modelo 4216 da Nuclear Chicago. A atividade de radioestrôncio incorporado pelo caramujo, mantido em solução deste radionuclídeo, pode ser expressa em função da contagem da atividade residual na solução, no tempo considerado. Desta forma, alíquotas de 1 ml de água do aquário eram coletadas periodicamente e colocadas em recipientes para cintilação líquida, contendo 5 ml de água destilada. Após intervalo de tempo suficiente para estabelecimento do equilíbrio secular entre o ^{90}Sr e o ^{90}Y , praticamente ao nível de 100%, as amostras eram contadas no sistema LS-250 da Beckman, através da radiação Cerenkov. Para manter a homogeneidade nas contagens foi utilizado um padrão de referência de meia-vida longa (^{137}Cs com $t_{1/2} = 30$ anos), servindo ainda para calibrar espectrômetro ($E = 0,662$ MeV). A homogeneidade das contagens no modelo LS-250 foi realizada pela curva de "quenching".

Para a experiência de sobrevivência foram selecionados 99 caramujos marcados com ^{90}Sr (emissor B com energia máxima de 2,27MeV) durante cinco dias, segundo técnica já descrita. O grupo controle sofreu o mesmo tratamento a menos do radioestrôncio. Posteriormente foram colocados num único aquário, contendo 30 litros de água, aeração artificial, temperatura controlada em $26,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e fundo de aquário com 3 camadas, duas de barro vermelho, com 20% de carbonato de cálcio e uma intermediária de areia de rio, lavada e esterilizada, contendo 10% de carbonato de cálcio, todas com 1 cm de espessura. Os caramujos foram alimentados diariamente com alface fresca e uma vez por semana com uma ração segundo Freitas (1973), modificada. Cada 7 dias os caramujos mortos eram coletados, testados quanto à presença de ^{90}Sr com um monitor portátil, Thiac III Victoreen e não devolvidos ao aquário. As experiências foram realizadas conforme tabelas seguintes.

TABELA I

Condições de marcação com ^{90}Sr utilizando número variável de caramujos

<i>Variável</i> \ <i>Aquário</i>	<i>Controle*</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Volume total de água no aquário (ml)**	250	250	250	250	250
Número de caramujos por aquário	39	5	10	25	50
Atividade total (μCi)	—	97	103	100	106
Concentração ($\mu\text{Ci/ml}$)	—	0,388	0,412	0,400	0,424
Volume de água por caramujo (ml)	6,41	50	25	10	5
Atividade disponível por caramujo (μCi)	—	19,40	10,30	4,00	2,12

* Para controle de mortalidade

** Água desionizada

TABELA II

Condições de marcação com ^{90}Sr em concentração variável

<i>Variável</i> \ <i>Aquário</i>	<i>Controle</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Volume total de água no aquário (ml) *	250	250	250	250	250
Número de caramujos por aquário	10	10	10	10	10
Atividade total (μCi)	—	9,0	18,0	45,3	90,5
Concentração ($\mu\text{Ci/ml}$)	—	0,036	0,072	0,181	0,362
Volume de água por caramujo (ml)	25	25	25	25	25
Atividade disponível por caramujo (μCi)	—	0,9	1,8	4,5	9,05

* Água desionizada

TABELA III

Condições de marcação com ^{89}Sr em presença de Ca^{++}

<i>Variável</i> \ <i>Aquário</i>	<i>Controle</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Volume total de água no aquário (ml) *	750	750	750	750	750
Número de caramujos por aquário	15	15	15	15	15
Atividade total (μCi)	300	150	150	150	150
Concentração ($\mu\text{Ci/ml}$)	0,4	5	5	5	5
Volume de água por caramujo (ml)	50	50	50	50	50
Atividade disponível por caramujo (μCi)	20	10	10	10	10
Concentração Ca^{++} (ppm)	0	50	100	200	400

* Água desionizada

RESULTADOS

TABELA IV

Atividade de ^{90}Sr remanescente no aquário na marcação com número variável de caramujos

		<i>Atividade remanescente no aquário</i>				
		<i>cpm/(cpm)₀</i>				
<i>Aquário</i>	<i>Controle*</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	
<i>Tempo (dias)</i>						
0	—	1,00	1,00	1,00	1,00	
1	—	0,80	0,48	0,21	0,06	
2	—	0,46	0,14	0,05	0,02	
3	—	0,30	0,13	0,04	0,01	
4	—	0,28	0,12	0,04	0,02	
5	—	0,25	0,12	0,05	0,01	
Sobreviventes (%)	66	100	90	64	74	

*Para controle de mortalidade

TABELA V

Atividade remanescente no aquário na marcação com concentração variável de ^{90}Sr

		<i>Atividade remanescente no aquário</i>					
		<i>cpm/(cpm)₀</i>					
<i>Aquário</i>	<i>Controle*</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	\bar{x}	T_{n-1}
<i>Tempo (dias)</i>							
0	—	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	—
1	—	0,33	0,37	0,33	0,35	0,34	0,02
2	—	0,27	0,31	0,32	0,31	0,30	0,02
3	—	0,23	0,25	0,26	0,26	0,25	0,01
4	—	0,17	0,19	0,20	0,16	0,18	0,02
5	—	0,15	0,17	0,18	0,15	0,16	0,02
Sobreviventes (%)	100	100	100	100	100	—	—

*Para controle da sobrevivência

TABELA VI

Comparação de sobrevivência de caramujos marcados com ^{90}Sr e não marcados

Tempo (semanas)	Caramujos Mortos			
	Marcados		Não Marcados	
	(número)	(% acumulada)	(número)	(% acumulada)
0	0	0	0	0
1	2	2,0	4	3,5
2	5	7,0	6	8,8
3	7	14,1	8	15,9
4	7	21,2	7	22,1
5	5	26,2	10	30,9
6	4	30,3	5	35,4
7	9	39,4	9	43,3
8	8	47,5	8	50,4
9	3	50,5	3	53,1

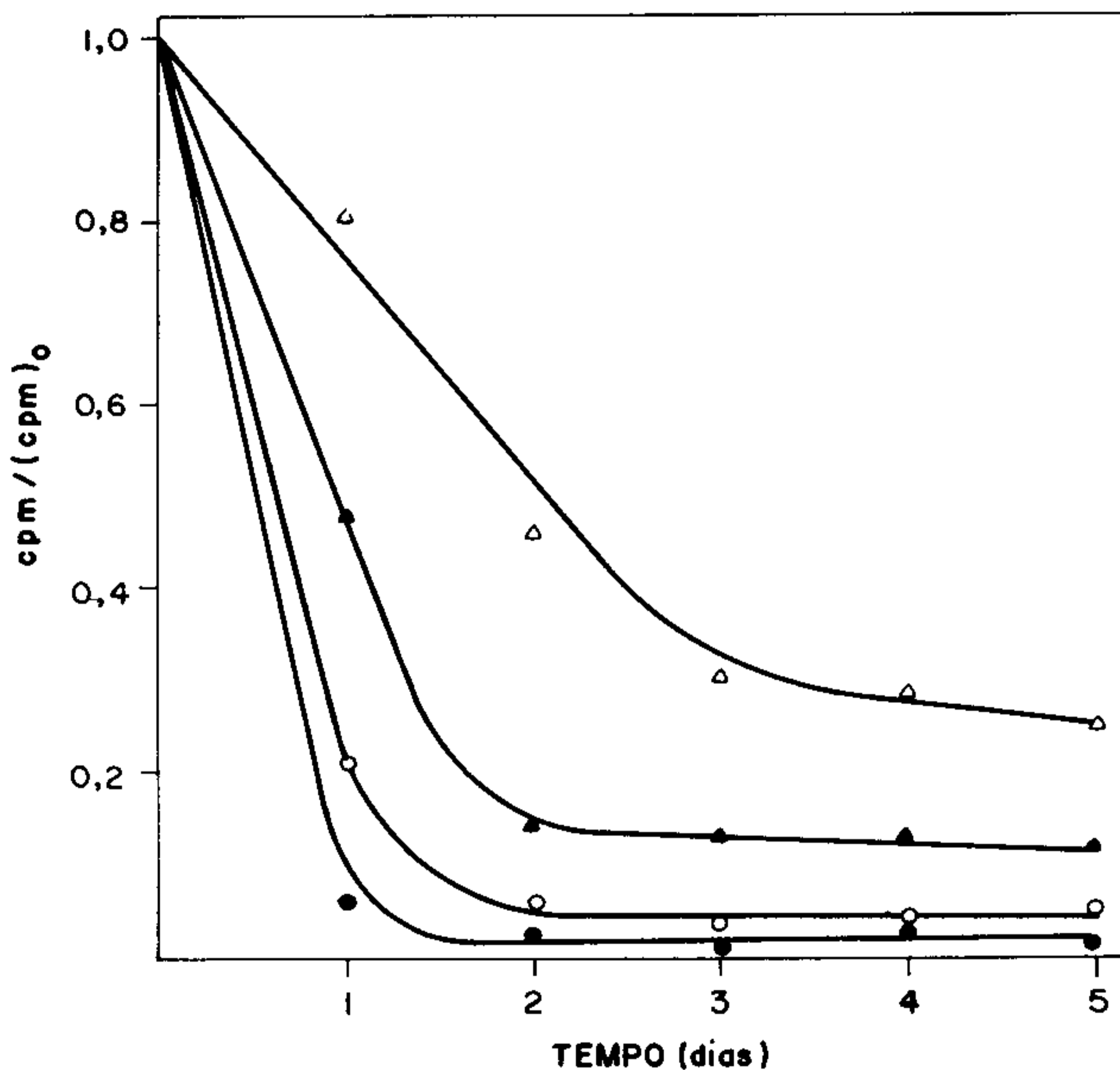


Fig. 1 – Fração da atividade inicial de ^{90}Sr remanescente na água do aquário em experiências de marcação

● 50 caramujos ○ 25 caramujos ▲ 10 caramujos △ 5 caramujos

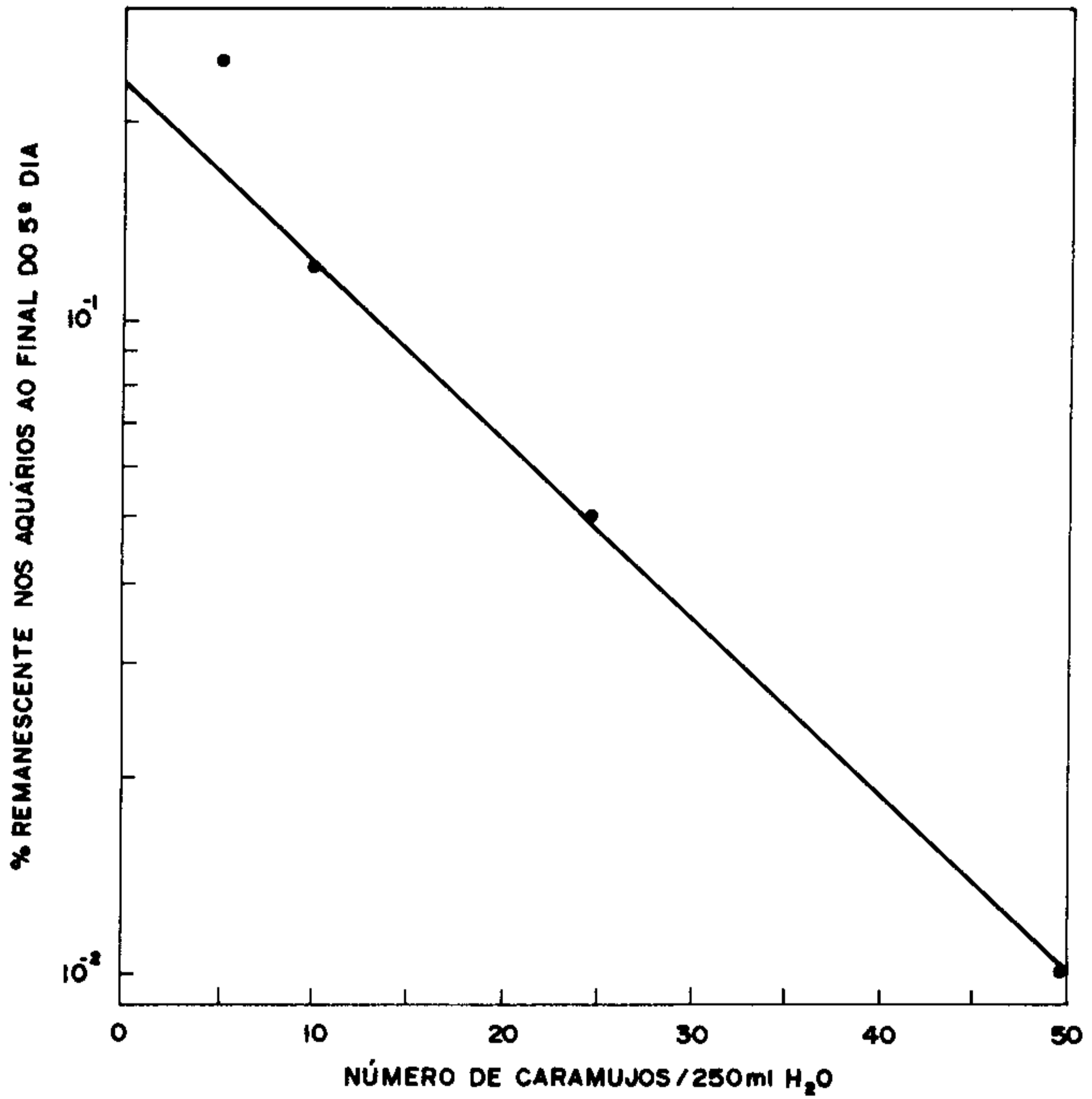


Fig. 2 – Influência do número de caramujos na atividade remanescente, de ⁹⁰Sr, na água dos aquários ao final do 5º dia.

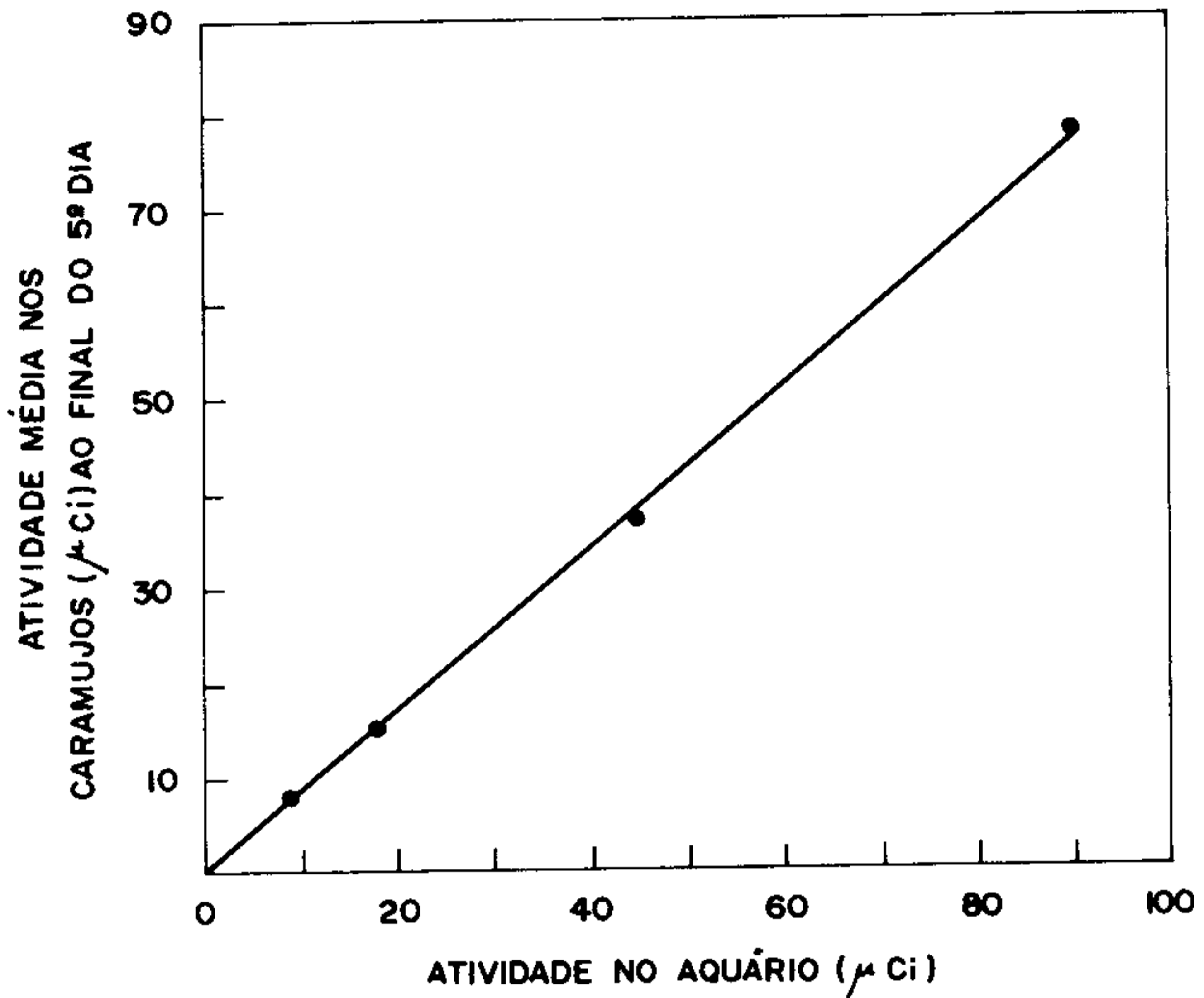


Fig. 3 – Proporcionalidade entre a atividade média retida pelos caramujos ao final do 5º dia de marcação e a atividade inicial colocada nos aquários contendo um número constante de caramujos.

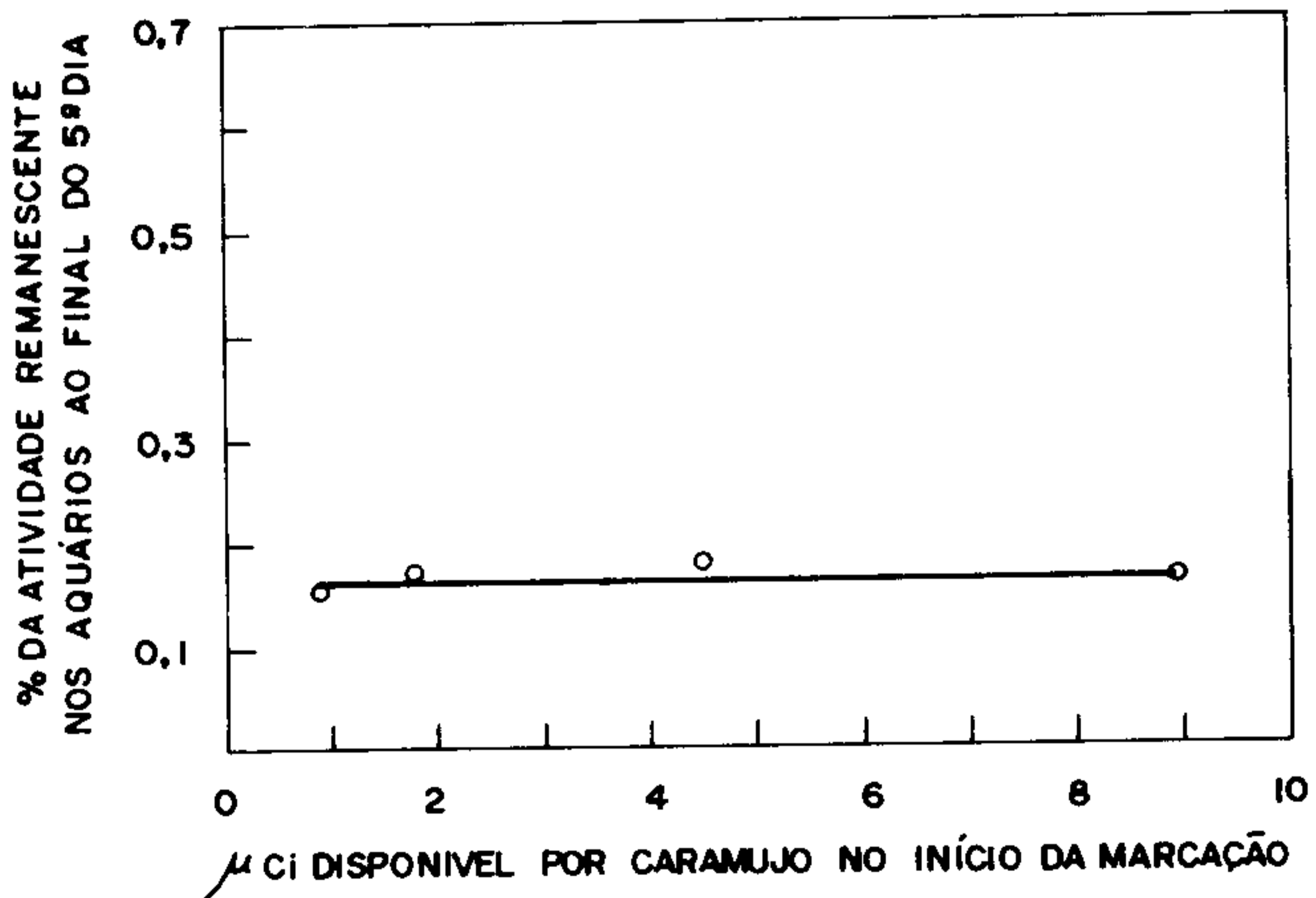


Fig. 4 – Percentagem da atividade remanescente de ^{90}Sr nos aquários ao final do 5º dia em função da atividade inicial disponível por caramujo.

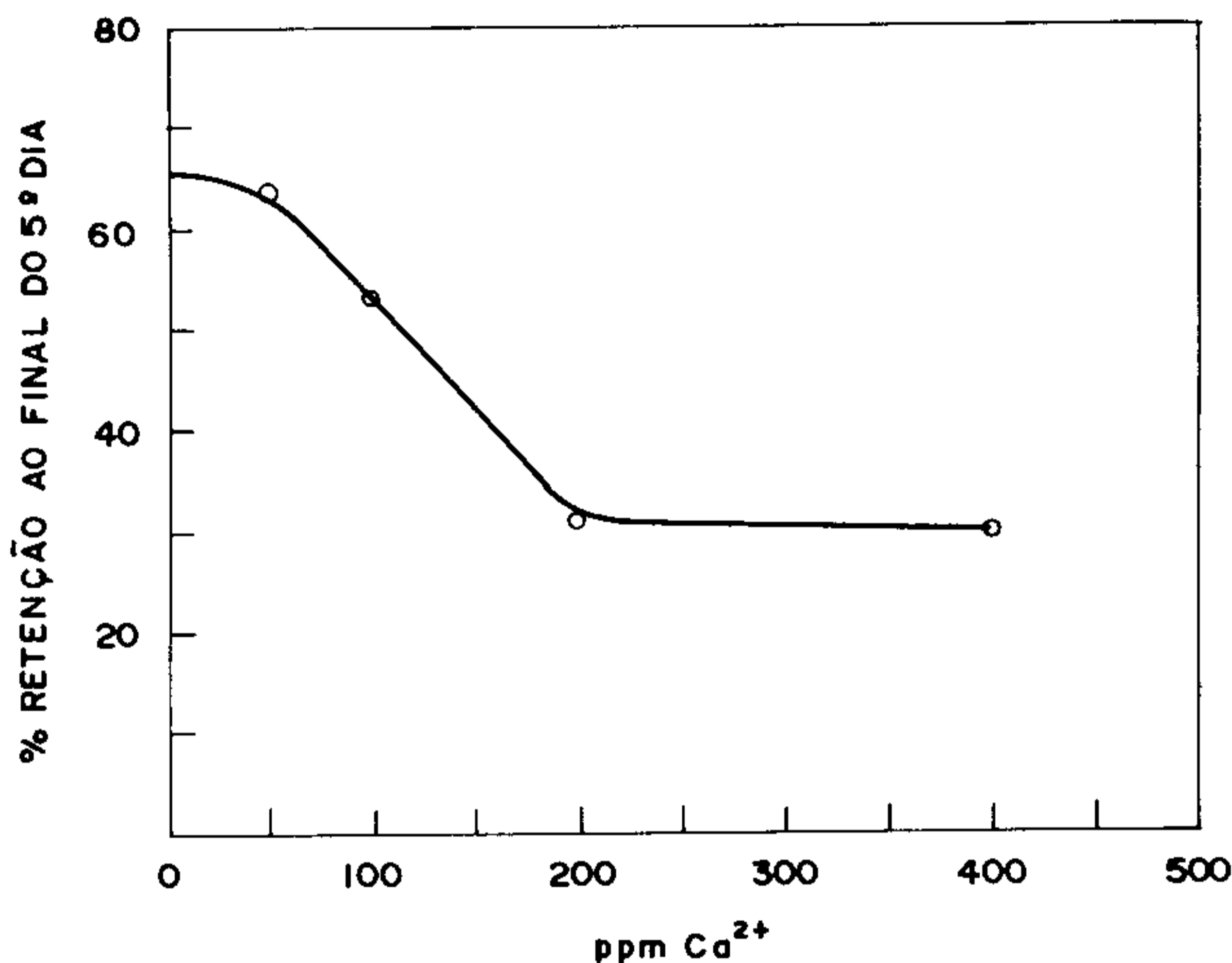


Fig. 5 – Influência da concentração de Ca⁺⁺ na incorporação de ⁹⁰Sr pelos caramujos.

$$R (\%) = \frac{\overline{\text{cpm}} \times 100}{\text{Padrão} \times \text{Volume da solução disponível por caramujo}}$$

DISCUSSÃO

Observando-se as Figs. 1 e 2 e as Tabelas I e IV, pode-se verificar, dentro dos limites estudados, que a mortalidade cresce quando a relação volume de água disponível por caramujo decresce, entretanto este fato ocorre sob a responsabilidade do “efeito de população” (Gazzinelli et al, 1970), pois não há sugestão de que a atividade do radionuclídeo contribua de alguma forma, e que existe uma dependência entre a atividade remanescente no aquário e o número de caramujos por aquário. Desta forma, o volume de 25 ml de água por caramujo (sobrevivência 90%) parece ser a melhor condição, dentre as estudadas, para marcação radioisotópica. Por outro lado a atividade remanescente nos aquários ao final do 5º dia de marcação obedece uma equação exponencial do tipo $A = A_0 e^{-bn}$ sendo A_0 e A as atividades inicial e final, b uma constante própria e n o número considerado de caramujos. Tal fenômeno pode assim ser descrito quando é atingido o equilíbrio dinâmico entre incorporação do radioestrôncio no caramujo e sua eliminação, o que evidentemente não ocorreu para o primeiro ponto da curva. A Fig. 3 mostra que os caramujos captam uma mesma fração do radionuclídeo, independentemente da atividade (concentração) inicial colocada no aquário, isto implica um coeficiente de distribuição constante, confirmando a equação anteriormente proposta.

A presença de Ca²⁺ durante a marcação, praticamente não interfere nos resultados até a concentração de 50 ppm. Esta observação é particularmente importante nos trabalhos em campo, onde a marcação com água desionizada nem sempre é possível, fi-

cando o rendimento de incorporação de Sr^{2+} diminuído, considerando ainda que outros íons na água diminuem ainda mais o rendimento, conforme ficou estabelecido por nós, em trabalhos preliminares. Para o caso do Rio de Janeiro, a marcação em campo é bastante favorável, pois 69% dos "habitats" de *Biomphalaria* apresentam valores de Ca^{2+} menores do que 50 ppm. Uma forma de aumentar o rendimento de incorporação é manter os animais em baixas concentrações dos elementos desejados, segundo Yager & Harry (1966). A sobrevivência dos caramujos marcados e não marcados foi indiferenciável ao longo de 9 semanas, estando ainda dentro do esperado em relação aos outros aquários do moluscário. Foi observado ainda que a oviposição estava dentro dos limites dos outros aquários e que os ovos eram viáveis.

Pelo exposto, é possível obter-se caramujos *Biomphalaria* marcados com a concentração média de radioestrôncio desejada, em função das necessidades do pesquisador. Pode-se inclusive calcular a concentração média desejada em função do tempo de duração da experiência, em função das curvas de decaimento conforme Leal & Franca (1982).

SUMMARY

The vector snail of schistosomiasis mansoni, *Biomphalaria glabrata*, when used in field experiments in which it is to be recovered and/or located, should be labeled with radiostrontium 85, 89 or 90. The labeling in laboratory should be carried out in an artificially aerated aquarium with 25 ml of deionized water per snail, without sand at the bottom, at a temperature of $26.5 \pm 1^{\circ}C$, pH adjusted to the value found in the natural habitat, and the snails should be fed with small pieces of fresh lettuce. The level of snail activity can be estimated taking into account that, for a labeling time of 5 days and initial activities of 0.036 to $0.362 \mu Ci/ml$, the global uptake for groups of 10 snails is about $84 \pm 2\%$, and that labeling in calcium-containing water practically does not change till a 50 ppm concentration. Survival along 9 weeks was not influenced by the presence of radiostrontium in the snail.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FREITAS, J. R., 1973. Ritmo de crescimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Padronização da técnica de criação. Tese de doutoramento. Inst. Ci. Biol., UFMG.
- GAZZINELLI, G.; RAMALHO-PINTO, F. J.; PELEGRINO, J. & GILBERT, B., 1970. Uptake of ^{59}Fe as a tool for study of the crowding effect in *Biomphalaria glabrata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19(6) :1034-1037.
- LEAL, M. A. & FRANCA, E. P., 1982. Marcação de caramujos *Biomphalaria glabrata* por radionuclídeos para trabalhos em campo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77(1) :1-8.
- YAGER, C. M. & HARRY, H. W., 1966. Uptake of heavy metal ions by *Taphius glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 19(2) :174-182.