UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES (PROTEN)

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA DE ALTA TAXA DE DOSE NA SOBREVIVÊNCIA E NA REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata*

REBECA DA SILVA CANTINHA

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
FEVEREIRO-2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA DE ALTA TAXA DE DOSE NA SOBREVIVÊNCIA E NA REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata*

REBECA DA SILVA CANTINHA

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA DE ALTA TAXA DE DOSE NA SOBREVIVÊNCIA E NA REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata*

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL (DEN-UFPE)

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA MARIA MENDONÇA DE ALBUQUERQUE MELO (DBR-UFPE)

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL

FEVEREIRO-2008

C235i **Cantinha, Rebeca da Silva.**

Influência da radiação gama de alta taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de Biomphalaria glabrata / Rebeca da Silva Cantinha. - Recife: O Autor, 2008.

vi, 57 folhas, il : figs., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2008.

Inclui Bibliografia.

1. Energia Nuclear. 2.Biomphalaria glabrata. 3.Irradiação de moluscos. 4.Radiação gama. 5. Reprodução de moluscos. 6. Radiobiologia animal. 7. Controle ambiental. I. Título.

UFPE

621.4837 **CDD (22. ed.)** **BCTG/2008-049**

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA DE ALTA TAXA DE DOSE NA SOBREVIVÊNCIA E NA REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata*

Rebeca da Silva Cantinha

APROVADA EM: 26.02.2008

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Edvane Borges da Silva – CAV/UFPE

Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta – DBR/UFPE

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio – DBR/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis, os seus caminhos! Porque quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém. (Romanos 11:33-36).

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, todo poderoso, por sua infinita bondade e amor na minha vida, sua fidelidade e misericórdia, permitindo-me chegar até aqui e ensinando-me que nada foge ao seu controle. Obrigada Senhor, é teu amor que me sustém; tua é a minha vitória.

A **Painho** e **Mainha**, pelo apoio e carinho quase incondicionais, por sempre acreditarem em mim e lutarem comigo pelo sucesso. Amo muito vocês, vocês são a minha mais preciosa riqueza.

A **Raquel**, minha grande amiga, meu tesouro incalculável e raio de sol que abrilhanta minha vida. Amo você demais.

Aos **meus familiares** (**voinho, voinha, meus tios e primos queridos**), pelo carinho, pelo apoio e pelo amor. Vocês são maravilhosos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ademir Amaral**, por tudo que me ensinou; pelo exemplo de competência e seriedade no trabalho científico ao longo desses 22 meses de trabalho, e por ter me mostrado que muitas vezes mais importante do que construir uma grande obra arquitetônica é ter condições de colaborar com qualquer edificação. Foi uma riqueza estar sob sua orientação.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Ana Mendonça**, pelo carinho, pela atenção, por ter plantado em mim o amor pela radiobiologia, e por tudo que me ensinou ao longo do mestrado; e na realidade já bem antes, durante toda a graduação. Obrigada principalmente por me mostrar que o prazer no trabalho, a competência, a alegria e a humildade profissional estão acima de qualquer titulação acadêmica. Você será sempre um exemplo para mim.

Ao **Prof. Dr. Amancio** e ao **Dr. Aristides** por terem sido meus primeiros orientadores na vida acadêmica e terem colocado os primeiros tijolos na construção da minha vida profissional, especialmente como entusiasta no estudo dos efeitos das radiações nos sistemas biológicos. O lugar de vocês ninguém toma!

A todos os membros das bancas examinadoras, **Profa. Dra. Edvane Borges da Silva, Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta, Prof. Dr. Francisco Fernandes Amancio, Profa. Dra. Mônica Pessoa de Azevedo, Profa. Dra. Vlaudia Costa, Prof. Dr. Cleomácio Miguel da Silva** e **Prof. Dr. Waldeciro Colaço**, por suas valiosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos **professores do DEN**, e ao **Prof. Dr. Paulo Santos** da pós-graduação em Biologia Animal, pela bagagem científica que me concederam neste mestrado.

A todos os **funcionários do DEN**, em especial a **Maria (Lia), Magali, Nilvânia, Égita, Ana Dayse, Macilene** e **Seu Zacarias**, pela amizade e por tornarem minha jornada muito mais agradável.

Aos **colegas do GERAR**, pela companhia e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos **colegas do DEN** pela amizade e companhia neste caminho.

A **Jonas (meu companheiro de almoços), Cinthia, Léo, Marcos, Flavinho, Aldo, Abene, William, Carlas, Poliana, Will, Bráulio** e **Wagner**, pela amizade, pela diversão e pelo exemplo. Carregarei vocês sempre no meu coração.

A **Clarinha, Lú** (grande responsável pela dissecação do aparelho genital apresentada na página 10 desta dissertação)**, Ronaldo** e **Monalisa**, pelo carinho, pelo apoio, pela amizade, pelo amor que tiveram por mim. Beijos. Amo vocês demais.

Aos **meus queridos amigos** (**Tati, Cris, Maga, Danielle, Daniel (Deidei), Fabinhos, Elayne, Clayton, Henrique, Adriana, Mércia, Marluce**,..., graças a Deus são tantos que não dá pra lembrar de todo mundo de uma vez só), por serem um presente de Deus na minha vida.

A **Rute** e **Mônica**, as duas mãezonas que Deus me deu; pelo afeto, pelo apoio, pelas orações, pelos puxões de orelha! Amo vocês muito, muito, muito!

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ii

LISTA DE TABELAS iii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS iv

RESUMO v

ABSTRACT vi

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1 O *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) 4

2.1.1 Características gerais do molusco *Biomphalaria glabrata* 6

2.1.1.1 Fisiologia e habitat do *Biomphalaria glabrata* 14

2.2 Principais alternativas moluscicidas 16

2.3 Aspectos gerais da ação da radiação ionizante sobre os sistemas biológicos 18

2.3.1 Radiobiologia dos moluscos 23

3 MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 Origem, Criação e Manutenção dos Moluscos 31

3.2 Metodologia de irradiação dos moluscos 32

3.3 Análise da fecundidade, fertilidade e sobrevivência dos moluscos irradiados 33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

4.1 Análise dos efeitos da radiação gama sobre a fecundidade do *Biomphalaria glabrata*. 36

4.2 Análise dos efeitos da radiação gama sobre a fertilidade do *Biomphalaria glabrata*. 41

4.3 Análise das taxas de mortalidade dos animais adultos irradiados 46

5. CONCLUSÕES 49

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caramujo *Biomphalaria glabrata* adulto 5
Figura 2 - A. Sistema genital dissecado do molusco *Biomphalaria glabrata*. B. Esquema do sistema genital do *Biomphalaria glabrata* 10
Figura 3 - Ciclo embrionário do *Biomphalaria glabrata* 13
Figura 4 - Típica curva de sobrevivência das células expostas às radiações de alto e baixo LETs 19
Figura 5 - Alterações observadas nos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos a agentes teratogênicos 25
Figura 6 - Aquários de criação dos caramujos *Biomphalaria glabrata* adultos no moluscário do DBR-UFPE 31
Figura 7 - Fonte Gammacell ^{60}Co, utilizada na irradiação dos animais 32
Figura 8 - Tubos cônicos onde os moluscos foram mantidos durante a irradiação 33
Figura 9 - Aquários individuais utilizados para a manutenção do isolamento sexual dos caramujos após a irradiação 34
Figura 10 - Desova de um animal irradiado contendo apenas ovos vazios 38
Figura 11 - Representação gráfica da influência da radiação gama de alta taxa de dose sobre a fecundidade dos animais 40
Figura 12 - Modelo Gaussiano dos efeitos da radiação gama de alta taxa de dose sobre a produção de embriões pelos animais irradiados. 41
Figura 13 - Desovas de caramujos *Biomphalaria glabrata* irradiados, demonstrando os efeitos da radiação gama sobre sua progênie 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de massas ovíferas depositadas pelos caramujos, segundo cada dose de radiação administrada. 36

Tabela 2 - Número de embriões originários de *Biomphalaria glabrata* irradiados e não irradiados. 39

Tabela 3 - Percentuais de embriões eclodidos, mortos e malformados, em função das doses de radiação absorvidas pelos caramujos adultos. 42

Tabela 4 - Porcentagem de moluscos *B. glabrata* mortos, até 15 dias após a irradiação..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B. glabrata	*Biomphalaria glabrata*
B. occidentalis	*Biomphalaria occidentalis*
B. straminea	*Biomphalaria straminea*
^{60}Co	Cobalto-60
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DBR	Departamento de Biofísica e Radiobiologia
DL	Dose Letal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eV	Elétron-volt
Gy	Gray
ICRU	Comissão Internacional de Medidas e Unidades de Radiação
kGy	Kilo Gray
keV	Kilo elétron-volt
LET	Tranferência Linear de Energia
MeV	Mega-elétronvolt
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase por Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição
R	Roentgen
rad	Dose de Radiação Absorvida
RBE	Eficiência Biológica Relativa
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA DE ALTA TAXA DE DOSE NA SOBREVIVÊNCIA E NA REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata*

Autora: Rebeca da Silva Cantinha
Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

RESUMO

As radiações ionizantes são conhecidas como agentes mutagênicos e causadores de infertilidade, devido às alterações genéticas que ocasionam. Esta característica tem motivado o emprego dessas radiações no controle biológico de animais, particularmente em situações envolvendo saúde pública. Neste contexto, o molusco *Biomphalaria glabrata* pode ser considerado um excelente modelo experimental. Este trabalho buscou avaliar os efeitos biológicos da radiação de uma fonte de ^{60}Co com alta taxa de dose sobre a sobrevivência e reprodução do *Biomphalaria glabrata*. Para tanto, foram selecionados grupos de caramujos adultos, expostos e não expostos a doses entre 20 e 60 Gy, com intervalos de 10 Gy. Para todos os níveis de dose estudados, verificou-se que a radiação estimulou a produção de embriões, apesar dos índices de viabilidade terem sido inferiores a 6%. Por outro lado, os grupos irradiados com doses de 50 e 60 Gy tiveram percentuais de animais mortos da ordem de 30 e 35%, respectivamente. Os resultados obtidos são sugestivos de que doses de 20 e 30 Gy são ideais para o controle populacional desta espécie de animais, visto que ocasionaram a diminuição na fertilidade dos mesmos, sem levá-los à morte. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, ficou evidente o grande potencial da aplicação da radiação gama de alta taxa de dose no controle reprodutivo do *Biomphalaria glabrata*.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*, Irradiação de moluscos, Radiação gama, Reprodução de moluscos, Radiobiologia animal, Controle ambiental.

INFLUENCE OF HIGH DOSE RATE GAMMA RADIATION ON SURVIVAL AND REPRODUCTION OF *Biomphalaria glabrata*.

Author: Rebeca da Silva Cantinha
Adviser: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
Co-adviser: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

ABSTRACT

The ionizing radiations are known as mutagenic agents, also causing infertility due to the molecular alterations they induced. This characteristic has motivated the application of this radiation on animal biological control, mainly in situations that involves public health. In this context, the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* can be considered as an excellent experimental model. This work was designed to evaluate biological effects of ionizing radiation, as a result of exposition to a ^{60}Co source with high dose rate, on *Biomphalaria glabrata* survival and reproduction. For this purpose, adult snails were selected and exposed to dosis ranging from 20 to 60 Gy, with 10 Gy interval; one group not irradiated was kept as control. On all dose levels studied, it was perceived that the radiation improved the embryos production for all exposed individuals. However, the viability indexes were below 6%. On the other hand, the groups irradiated with 50 and 60 Gy presented percentiles of dead animals at the magnitude of 30 and 35%, respectively. Based on these research results, the doses of 20 and 30 Gy are ideal for *Biomphalaria glabrata* populational control, considering that they caused fertility decrease without killing the exposed snails. More deeply studies are needed; nevertheless, this research evidenced the great potential of high dose rate gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* reproductive control.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, Molluscs irradiation, Gamma radiation, Molluscs reproduction, Animal radiobiology, Environmental control.

1 INTRODUÇÃO

A sociedade atual vem fazendo uso pacífico das radiações ionizantes devido aos seus efeitos de interesse médico, industrial e ambiental sobre o organismo vivo. Como alguns exemplos dessas aplicações, podemos citar a radioterapia, a irradiação de alimentos, os radiodiagnósticos e a esterilização de insetos (THRALL; ZIESSMAN, 2003; DYCK et al., 2005; BITELLI, 2006; CAMARGO, 2007). Por essa ampla faixa de aplicações, recentemente há um grande empenho no desenvolvimento de técnicas que auxiliem na compreensão dos possíveis danos biológicos que surgem após exposições dos organismos a certas doses de radiação ionizante.

Sabe-se que os efeitos da radiação sobre os seres vivos dependem de sua interação com a matéria, da intensidade, bem como da taxa de dose da fonte utilizada; além da distribuição e absorção da energia (POUGET; MATHER, 2001; BITELLI, 2006). A radiação pode induzir modificações estruturais notadas em diversos intervalos de tempo que vão de poucos minutos até anos, variando em seus efeitos segundo a dose aplicada e a molécula atingida, culminando em alterações permanentes ou não do organismo exposto (TAUHATA et al., 2003; BITELLI, 2006).

Por sua ampla distribuição ambiental e interferência sobre a dinâmica humana (como fontes de alimentação, hospedeiros de microorganismos patogênicos e agentes de superpopulação ambiental, por exemplo), os moluscos são considerados excelentes para experimentação, ganhando interesse não apenas como modelo de alterações fisiológicas induzidas por estímulos externos; mas também na padronização de metodologias para controle populacional, ou como bioindicadores de interferentes ambientais. Entre as diversas espécies de moluscos conhecidas, ganha destaque a utilização do caramujo *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*), principal hospedeiro intermediário no ciclo do *Schistosoma mansoni*

(*S. mansoni*) no Nordeste do Brasil (MELO et al., 1996; MELO, 1998; MOTTA et al., 2001).

Devido às suas características fisiológicas, seu papel ecológico e na saúde pública; além de sua praticidade para experimentação, diversos trabalhos têm investigado os efeitos da exposição do *B. glabrata* a variados agentes, sejam eles físicos, químicos ou biológicos (FARVAR; CEMBER, 1969; EKABO et al., 1996; MELO et al., 1996; OKAZAKI et al., 1996; MOTTA et al., 2001; NAKANO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004; LUNA et al., 2005; ESTEVAM et al., 2006; RUELAS et al., 2006). Os resultados alcançados são valiosos em diversas aplicações práticas, ora como fonte de atualização sobre o funcionamento básico dos seres vivos e suas respostas aos estresses ambientais, ora como instrumento de monitoração, ou mesmo no controle populacional de espécies no meio ambiente.

O objetivo geral deste trabalho é fornecer subsídios para a padronização do uso da radiação gama de alta taxa de dose no controle populacional de moluscos aquáticos, com o intuito de colaborar com o controle biológico não só da espécie *B. glabrata*, mas de outros moluscos aquáticos que representam pragas em diferentes setores da economia nacional.

Neste contexto, esta pesquisa busca especificamente estudar os efeitos da radiação gama do ^{60}Co sobre a reprodução de moluscos *B. glabrata*, analisando as alterações por ela causadas sobre a fecundidade e fertilidade dos indivíduos expostos. Levando em consideração que as radiações ionizantes, dependendo da dose, podem ocasionar a morte dos indivíduos, a influência da radiação gama sobre a sobrevivência dos animais irradiados também foi analisada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os seres vivos estão expostos à ação das radiações ionizantes, sejam provenientes de fontes naturais ou artificiais (FRANTSEVICH et al., 1995; BROWN et al., 2004; BITELLI, 2006). Trabalhos que esclareçam os possíveis efeitos biológicos causados por elas tornam-se extremamente importantes. Diversos estudos foram realizados após os acidentes nucleares, constatando que muitos desses efeitos estão associados à exposição a altas doses de radiação (THRALL; ZIESSMAN, 2003). Assim, o desenvolvimento de modelos experimentais capazes de analisar a ação desta forma de energia sobre os seres vivos é de grande valia.

Okazaki et al. (1996) afirmaram que mudanças induzidas pela radiação são qualitativamente semelhantes em diversas espécies, quando os animais irradiados encontram-se em estágios similares do desenvolvimento embrionário.

Em adição, diversos organismos como peixes, anfíbios e insetos têm se mostrado eficazes como indicadores dos efeitos biológicos das radiações ionizantes, similarmente ao que ocorre com os agentes químicos (KUBOTA et al., 1995; ROY, 2002; CHATY et al., 2004; SHAW et al., 2004; DYCK et al., 2005). Estudos realizados por Melo et al. (1996) e Okazaki et al. (1996) demonstraram que embriões de moluscos são sensíveis a diferentes doses de radiação ionizante; Nakano et al. (2003) também demonstraram que não apenas embriões de moluscos são sensíveis a agentes mutagênicos, mas que os adultos apresentam esta mesma característica.

Assim, moluscos vêm sendo utilizados como modelo experimental para estudo dos efeitos danosos de agentes físicos (radiação) (MOTTA; MELO, 1997a; MOTTA et al., 1999; MOTTA et al., 2001) e químicos (agrotóxicos) (NAKANO et al., 2003; ESTEVAM et al, 2006). Neste sentido, os caramujos da espécie *B. glabrata*, de fácil cultivo em laboratório, têm

demonstrado elevada sensibilidade à toxicidade induzida pela presença de elementos químicos, radioativos ou não, quando em contato com o meio aquático (NAKANO et al., 2003).

Esta característica, aliada ao seu fácil manuseio, o coloca na condição de excelente biosensor natural (MÜNZINGER, 1987). Outras vantagens apresentadas por estes moluscos incluem sua ampla distribuição geográfica, reprodução ao longo de todo o ano; reduzido espaço físico para criação, ciclo de vida curto, oviposição quase diária de massas transparentes com 20 a 50 ovos; além do fato de que sua embriologia já foi bem determinada, representando assim um grande interesse para estudos embrionários (KAWANO, 1992; OKAZAKI et al., 1996, DEJONG et al., 2001; ESTEVAM et al., 2006).

Tais características do *B. glabrata* justificam sua aplicação em protocolos experimentais, não apenas para o controle da esquistossomose mansônica, doença endêmica em diversos países do mundo, cujo gênero *Biomphalaria* é o hospedeiro intermediário do parasito; mas, ao mesmo tempo, como bioindicador de contaminação ambiental, bem como modelo de controle populacional para diferentes moluscos aquáticos que representem prejuízos financeiros para homem. Podemos citar como exemplo o molusco *Limnoperna fortunei*, que originário da Ásia, adaptou-se muito bem ao clima tropical do Brasil, acarretando desequilíbrios ambientais decorrentes de sua superpopulação, além de danos às embarcações e obstruções em turbinas de centrais hidrelétricas (BRUGNOLI et al., 2005; GIORDANI et al., 2005).

2.1 O *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)

O B. *glabrata* (Figura 1) é conhecido como o principal transmissor da esquistossomose mansônica nas Américas, sua classificação taxonômica compreende: reino ANIMALIA, filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommathophora, família Planorbidae, sub-família Planorbinae, gênero *Biomphalaria*, espécie *Biomphalaria glabrata* (REY, 1991; NEVES, 2004; LUNA et al., 2005).

Figura 1 - Caramujo *Biomphalaria glabrata* adulto.
Fonte: http://genome.wustl.edu/genome.cgi?GENOME=Biomphalaria%20glabrata

É encontrado em todos os estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná e, recentemente, foi observado também no Rio Grande do Sul (CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2004). Encontram-se presentes ainda em algumas áreas do Pará, Maranhão e Piauí; sua ocorrência já foi constatada também na Venezuela, Suriname, Porto Rico e Ilhas Caribenhas (MÜNZINGER, 1987; REY, 1991; DEJONG et al., 2001; NEVES, 2004).

Em laboratório, infecta-se em proporções próximas de 100% e nos ambientes naturais já foram encontradas taxas de positividade da ordem de 70%, sendo considerada a espécie de caramujos mais susceptível ao *Schistosoma mansoni* (REY, 1991; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001). Juntamente com o *Biomphalaria tenagophila* (*B. tenagophila*) e o *Biomphalaria straminea (B. straminea*) constituem as espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*, embora a espécie *Biomphalaria peregrina* e a *Biomphalaria amazonica* possam ser consideradas vetores potenciais por já terem sido infectadas em laboratório (PESSÔA; MARTINS, 1988; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; DEJONG et al., 2001; SOUZA et al., 2001; NEVES, 2004; VIDIGAL et al., 2004).

A diferenciação entre as diversas espécies do gênero *Biomphalaria* já foi estabelecida através de biologia molecular; Vidigal et al. (1998) utilizando técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) identificaram, através da análise de variações genéticas, espécies de *Biomphalaria* provenientes do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai.

Utilizando a metodologia da PCR, DeJong et al. (2001) realizaram o estudo filogenético de 23 espécies de *Biomphalaria*, 16 neotropicais e 7 africanas, montando ao final um panorama das relações evolucionárias e biogeográficas do *Biomphalaria*, com especial interesse em seu papel como hospedeiro do *S. mansoni*.

Através da PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase por Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição), Vidigal et al. (2004) conseguiram diferenciar as três espécies hospedeiras do *S. mansoni* no Brasil.

Também através da PCR-RFLP, Spatz et al. (1994) conseguiram diferenciar geneticamente a espécie *B. occidentalis* (*Biomphalaria occidentalis*) de subespécies da espécie *B. tenagophila*, o que recebe grande importância científica, levando-se em consideração a semelhança morfológica entre a concha destas duas espécies, e a aparente resistência do *B. occidentalis* ao *S. mansoni* (SOUZA et al., 2001).

2.1.1 Características gerais do molusco *Biomphalaria glabrata*

Sua concha sinistrógira[1] é uma estrutura com função protetora, fortemente mineralizada, constituída em mais de 95% por carbonato de cálcio; em geral é abrigo permanente de uma parte do corpo do molusco onde se encontram as vísceras envolvidas pelo **manto** (delicada prega do tegumento, em forma de saco, que recobre toda a massa visceral do animal, e depois se projeta como viseira sobre a cabeça do animal). Três camadas são observadas em sua constituição: o *perióstraco* (camada mais externa, muito delgada e de coloração variada), a *camada calcária* (forma a maior parte da espessura da concha, é constituída por prismas verticais de carbonato de cálcio, cristalizado sob a forma de

[1] As conchas são classificadas de acordo com a direção da espira em dextrógiras e sinistrógiras. Nas conchas dextrógiras, com o vértice voltado para cima, supondo-se um observador colocado no eixo da concha, este veria seus giros crescerem da esquerda para a direita; enquanto que nas conchas sinistrógiras o sentido de crescimento dos giros seria da direita para a esquerda, conforme observado no *B. glabrata* (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991).

aragonita), e o *nácar* (camada mais interna, lisa, brilhante, ás vezes de aspecto irisado) (REY, 1991; FRANTSEVICH et al., 1995; STRZELCZAK et al., 2001).

O rim é uma estrutura alongada, iniciando-se na parede da cavidade pericárdica e continuando-se na espessura da parede pulmonar até a borda do manto, onde termina por um curto ureter. Na luz do órgão, projetam-se numerosos septos revestidos por um epitélio de células ciliadas ou não, com inúmeras granulações e concreções que vão sendo expulsas para dentro da cavidade renal; vê-se ao longo do rim uma prega mucosa, saliente e pigmentada, denominada crista renal (REY, 1991; NEVES, 2004).

O corpo desses moluscos apresenta dois sistemas de cavidades (câmaras viscerais) inteiramente distintos e sem comunicação entre si. O primeiro é representado por espaços livres deixados pelas vísceras e pelo tecido conjuntivo, sendo em parte irregular, constituído por lacunas, e revestido de paredes próprias. O segundo sistema comunica-se com o meio exterior através de nefrídias, assim considerado uma câmara excretora; ele se reduz à pequena cavidade existente na região pericárdica, envolvendo o coração, por isso denominado pericárdio (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991).

O coração possui duas cavidades: aurícula e ventrículo; o sangue ou hemolinfa compõe-se de elementos amebóides (hemócitos), um plasma rico em água, cloreto de sódio, bicarbonatos e hemoglobina dissolvida, que contendo ferro, permite a utilização do oxigênio dissolvido à baixa tensão (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; VERRENGIA GUERRERO et al., 1997).

Seu principal órgão respiratório é o saco pulmonar (que se abre na cavidade paleal, sob o manto, através de uma prega denominada pneumóstoma), embora possam coexistir pregas tegumentares ricamente vascularizadas, denominadas pseudobrânquias (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2004).

A organização nervosa destes moluscos tem como centro um conjunto de gânglios dispostos em torno do esôfago, atrás do saco bucal. Os órgãos dos sentidos são: um par de olhos, um receptor olfativo (osfrádia), um par de órgãos do equilíbrio e orientação locomotora (otocistos), receptores de contato sob a forma de elementos sensitivos (ex.: tentáculos); além de quimioreceptores morfologicamente diferenciados ou não, denominados

rinóforos (REY, 1991; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001).

O aparelho digestivo desses animais começa com a abertura bucal, localizada, por vezes, na extremidade da tromba ou prosbócida; espessamentos cuticulares denominados mandíbulas, e um par de glândulas salivares que se abrem na cavidade bucal (REY, 1991).

No interior do saco bucal encontra-se a rádula, fita alongada e revestida de numerosos dentes quitinosos, cujos dentículos, em forma de ganchos têm as pontas dirigidas para trás (PESSÔA; MARTINS, 1988). A rádula se movimenta para diante e para trás através de músculos protatores e retratores, que movimentam tanto a rádula como o suporte cartilaginoso que a sustém. Todo esse conjunto faz com que os alimentos sejam ralados e ao mesmo tempo, dragados em direção ao esôfago (REY, 1991), alguns autores consideram a rádula como estrutura responsável pela eclosão dos ovos embrionados, sendo assim classificada como um órgão radiosensível (OKAZAKI et al., 1996; MELO, 1998).

O esôfago, bastante longo, conduz os alimentos até um musculoso estômago, que se comunica com o hepatopâncreas, um órgão localizado na região pilórica do estômago, onde são produzidas numerosas enzimas digestivas pelas células constituintes de seu epitélio, que também se encarrega da absorção, acúmulo de reservas nutritivas e excreção. No caso de contaminações ambientais, foi verificado o hepatopâncreas como órgão que retém as maiores quantidades do poluente (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; VERRENGIA GUERRERO et al., 1997).

Os resíduos da digestão são evacuados pelo intestino, onde ocorre também a reabsorção de água (REY, 1991). Este longo intestino parte do estômago, percorrendo um trajeto, inverso ao do esôfago, indo se abrir ao nível da pseudobrânquia (PESSÔA; MARTINS, 1988).

Esses moluscos são seres hermafroditas, com gônada única, em forma de glândula em cacho, provida de numerosos ácinos, denominada ovoteste, onde óvulos e espermatozóides formam-se lado a lado (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; MONTEIRO; KAWANO, 1998; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001); essa é uma outra razão pela qual esses animais são práticos para a experimentação, considerando que não existem interferentes relacionados

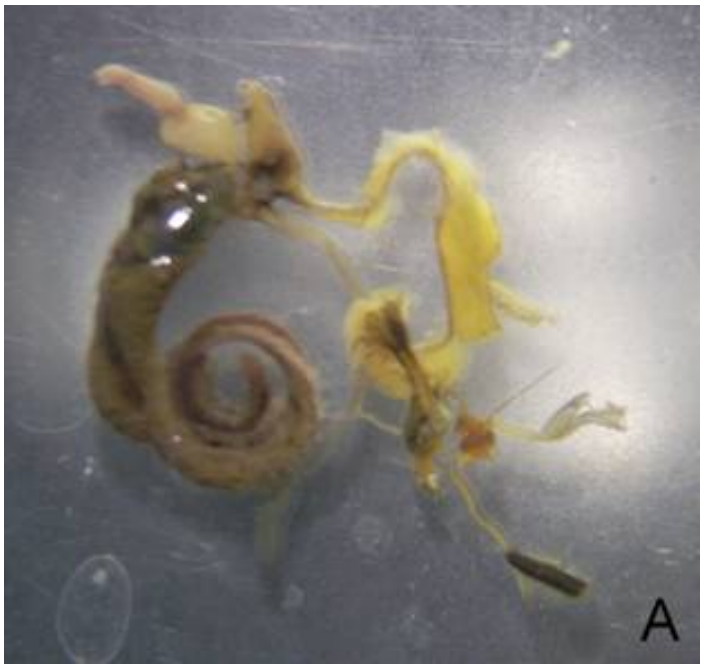
ao gênero da espécie (MÜNZINGER, 1987; NAKANO et al., 2003).

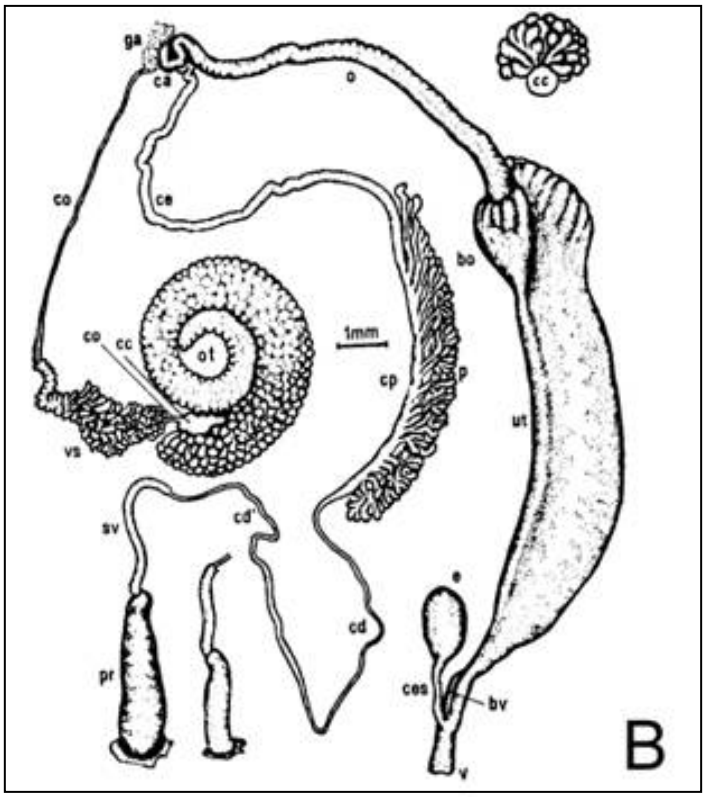
O número de folículos da ovoteste varia, significativamente, durante o crescimento do animal; cada folículo representa uma unidade de produção de gametas masculinos e femininos, assim o aumento no número de folículos influencia no aumento do diâmetro ou comprimento da ovoteste. Comparado com a espécie *B. tenagophila*, o *B. glabrata* possui número expressivamente maior de folículos da ovoteste e de divertículos da próstata, servindo essa diferença como uma das características auxiliares na diferenciação entre as duas espécies (MONTEIRO; KAWANO, 1998).

Os ductos genitais raramente são simples, o conduto ovispermático bifurca-se produzindo as vias femininas e as vias masculinas independentes; o oviduto recebe em seu início o canal da glândula do albúmem, que depois de certo trajeto torna-se um canal mais dilatado, denominado glândula nidimental, esta é seguida pelo útero e vagina, onde desemboca o duto da espermateca (local onde os materiais excretados pelas diferentes partes do sistema genital se acumulam) (REY, 1991; MONTEIRO; KAWANO, 1998).

Os espermatozóides se acumulam em divertículos irregulares do conduto ovispermático, na porção hermafrodita do sistema; aí tanto os gametas masculinos autóctones, como aqueles recebidos durante a cópula são armazenados (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991), sendo que é sabido que estes últimos têm prioridade na fecundação, prevalecendo assim a reprodução cruzada; além disso, em um par de moluscos, ambos podem atuar como macho ou fêmea (CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NAKANO et al., 2003; COSTA et al., 2004; NEVES, 2004).

As vias masculinas compreendem o espermiduto, a glândula prostática (ou próstata), o canal deferente e o complexo peniano, onde encontramos duas formações invaginadas, a bolsa do pênis (contendo o órgão intromitente no seu interior) e o prepúcio (mais calibroso, musculoso e o primeiro a se exteriorizar durante a cópula) (Figuras 2A e 2B). A extroversão da bolsa do pênis e a penetração deste no aparelho genital feminino ocorrem depois que o prepúcio localizou a abertura vulvar. Uma característica que difere a sub-família Planorbinae das demais, é a ausência de glândula peniana no prepúcio e de flagelos na bolsa do pênis (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991).





bo- *bolsa da glândula nidimental;*

bv- *bolsa vaginal;*

ca- *conexão entre os canais ovispermático e da glândula albuminosa, o oviduto e o espermiduto;*

cc- *canal coletor do ovotestis;*

cd- *canal deferente;*

ce- *espermiduto;*

ces- *canal da espermateca;*

co- *canal ovispermático ou canal hermafrodita;*

cp- *canal prostático;*

e- *espermateca**;***

ga- *glândula do albúmen;*

o- *oviduto;*

ot- *ovotestis;*

p- *próstata, com divertículos prostáticos;*

pr- *prepúcio;*

ut- *útero ou glândula nidimental;*

v- *vagina;*

vs- *saco vérgico ou bolsa do pênis.*

Figura 2 - A. Sistema genital dissecado do molusco *Biomphalaria glabrata* (35X). B. Esquema do sistema genital do *Biomphalaria glabrata* (REY, 1991).

Tallarico et al. (2004) realizando o teste do letal dominante em *B. glabrata*, estimaram o período de espermatogênese da espécie em 36 dias, com a seguinte distribuição por estágios: espermatogônia (1-13º dia), espermatócito (14-20º dia), espermátide e espermatozóide (21-36º dia).

A embriogênese destes animais também já foi descrita em todas as suas etapas por Kawano et al. (1992), ficando assim cronometrada:

- *Primeira clivagem*: Ocorre após a fusão dos pró-núcleos masculino e feminino;

- *Segunda clivagem*: Acontece 80 minutos após a primeira clivagem;

- *Terceira clivagem*: Após 160 minutos da primeira clivagem;

- *Quarta clivagem*: Ocorre 230 minutos depois do início da primeira clivagem;

- *Blástula*: De 10 a 23 horas após a primeira clivagem; observamos um emaranhado de células em forma de cruz, que originarão quase toda a região da cabeça do molusco (Figura 3. A);

- *Gástrula*: Dá-se cerca de 24 a 39 horas da primeira clivagem. A supressão da gastrulação leva à ocorrência de anomalias tais como malformações de cabeça (monoftalmia, reduplicação dos olhos,...) e exogástrulas (OKAZAKI et al., 1996) (Figura 3. B);

- *Trocófora jovem*: Surge após 40 a 65 horas da primeira clivagem, é caracterizada pelos primeiros movimentos embrionários (Figura 3. C);

- *Trocófora*: Ocorre aproximadamente 65 a 80 horas após a primeira clivagem, onde observamos que o embrião adquiriu um aspecto levemente alongado em forma de rim (Figura 3. D);

- *Véliger jovem*: Entre as 80 e 100 horas que sucedem a primeira clivagem; podemos ver a concha e os pés mais desenvolvidos, com desvios dessa concha para a direita (Figura 3. E);

- *Véliger*: Ocorre em torno de 120 horas após a primeira clivagem; os olhos se tornam mais visíveis e a elevação da região dos tentáculos pode ser observada, assim como a boca, pés e concha (ESTEVAM et al., 2006) (Figura 3. F);

- *Hipo*: Esse estágio ocorre dentro das 144 horas posteriores à ocorrência da primeira clivagem; os olhos e tentáculos já estão bem desenvolvidos, o pé aumentado de tamanho e muito mais diferenciado. A concha começa a enrolar e envolver quase todo o corpo do animal (Figura 3. G). Entre o sexto e o nono dia da primeira clivagem, a 25°C, o jovem caramujo eclode da cápsula (Figura 3. H).

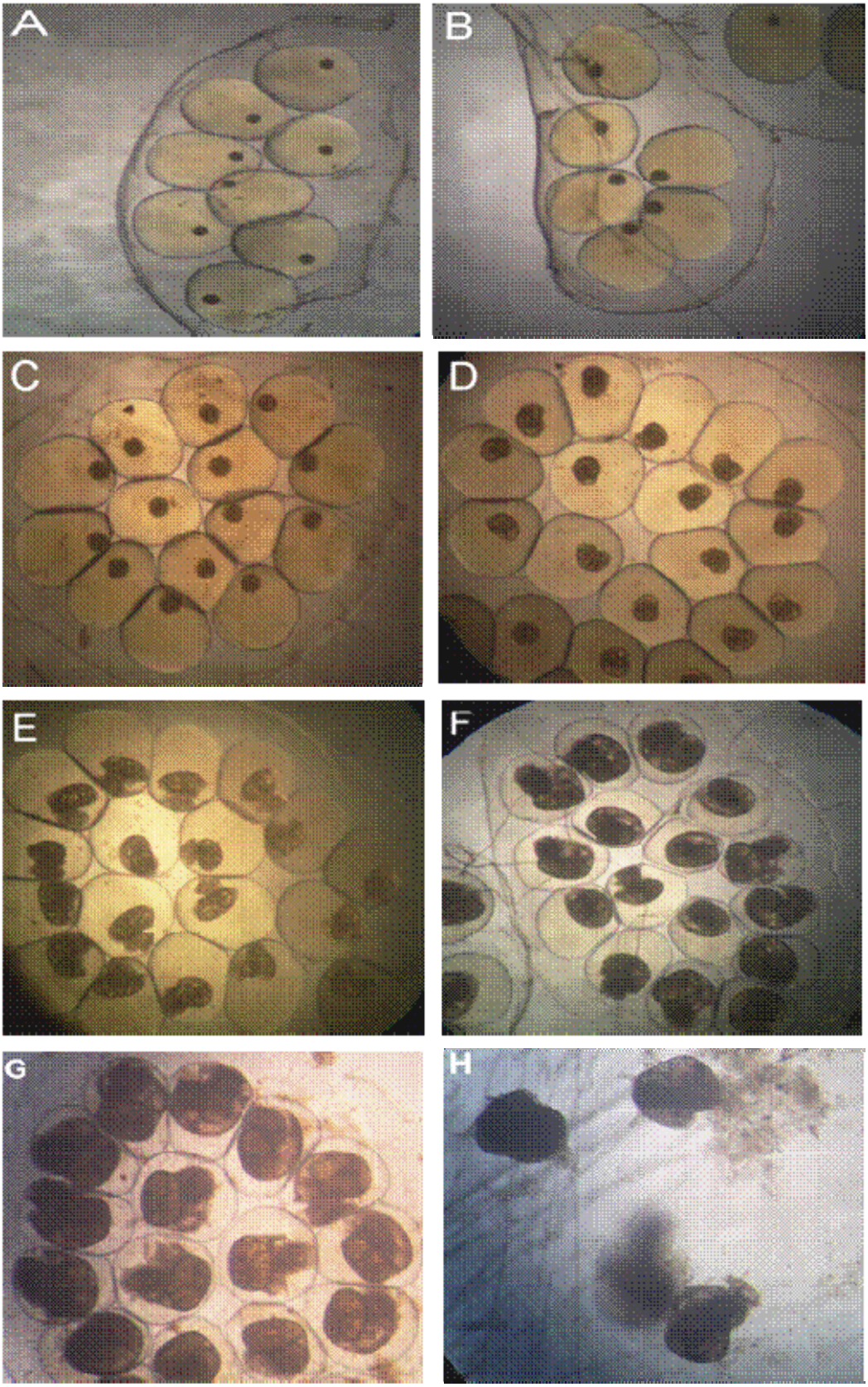


Figura 3 - Ciclo embrionário do *Biomphalaria glabrata*. Fases: A - Blástula (40X); B - Gástrula (40X); C - Trocófora jovem (40X); D - Trocófora (40X); E - Véliger jovem (40X); F - Véliger (40X); G - Hipo (40X); H - Animais recém-eclodidos (45X).

2.1.1.1 Fisiologia e habitat do *Biomphalaria glabrata*

Essa espécie possui um tempo de vida médio de aproximadamente um ano (CIMERMAM; CIMERMAM, 2001). Quando encontrada no ambiente natural caracteriza-se por possuir uma concha grande (chegando a 3 ou 4 cm de diâmetro, com 6 a 7 giros), enquanto que quando obtida em criadouros sua concha apresenta-se um pouco menor (com 1 a 2,5 cm de diâmetro, e 4 a 6 giros) (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; NEVES, 2004).

Os moluscos da família planorbidae são predominantes nas regiões litorâneas, permanecendo a até 5 metros de profundidade, dentro dos limites da vegetação fixada com raízes. A freqüência máxima do molusco no meio ocorre a menos de 2 metros de profundidade, ou seja, os principais tipos de criadouros são córregos, valas de irrigação, brejos, poços e valas de drenagem; embora possam ser encontrados ainda em outras coleções de água como lagoas, açudes e represas (PESSÔA; MARTINS, 1988; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001).

O *B. glabrata* é fototrópico, alimentando-se predominantemente de vegetais. Em laboratório consomem folhas de couve, alface, agrião ou cenoura fatiada. Em seu habitat natural, o principal alimento é constituído pelos resíduos vegetais mortos, abundantes no fundo e às margens das coleções líquidas, embora na ausência destes resíduos os caramujos ataquem também outras folhas verdes. Os caramujos recém-eclodidos dependem da abundância de algas unicelulares no meio. Foi observado que animais letalmente irradiados diminuem ou cessam a alimentação antes da morte (PESSÔA; MARTINS, 1988; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2004; RUELAS et al., 2006).

Os sais de cálcio utilizados na elaboração da concha provêm dos alimentos e ficam reservados no hepatopâncreas sob a forma de fosfatos. São transportados pelo sangue até o manto e transformados em carbonatos pela ação das fosfatases (REY, 1991).

Esses moluscos são capazes de viver em criadouros com condições bastante variáveis: pH entre 5,6 e 8,4; concentração de matéria orgânica de 8 a 306 mg/L e cloretos de 75 a 2.100 mg/L (MÜNZINGER, 1987; PESSÔA; MARTINS, 1988; NEVES, 2004).

Os animais vêm à superfície em intervalos regulares para respirar o oxigênio livre do ar, renovando seu conteúdo pulmonar, embora sejam capazes de absorver o oxigênio à baixa tensão, retirando-o da água através do tegumento (REY, 1987; PESSÔA; MARTINS, 1988).

O *B. glabrata* não suporta temperaturas elevadas por muito tempo, refazendo-se do calor excessivo através do abaixamento de sua temperatura durante a noite; as temperaturas baixas reduzem o metabolismo e as posturas; as chuvas intensas também influenciam de maneira negativa na manutenção dos moluscos no ambiente. Em situações adversas o animal retira todo o seu corpo para dentro da concha (KAWAZOE, 1976; PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 1991; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2004).

Nos moluscos gastrópodes os hemócitos (células de defesa), associados com fatores humorais da hemolinfa tais como lecitinas, proteinases alfa-macroglobulinas, TNF-α (*Fator de Necrose Tumoral*-α) e similares da interleucina 1, representam os elementos fundamentais de defesa do molusco contra patógenos, especialmente o *S. mansoni* (VASQUEZ; SULLIVAN, 2001; BEZERRA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004).

O *B. glabrata* pode começar sua oviparidade com 5 a 7 semanas de vida, embora normalmente o faça mais tarde, quando já atingiu 6 a 8 mm de diâmetro (3 ou 4 meses de vida) (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964b; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1966; PESSÔA; MARTINS, 1988). As desovas são feitas em intervalos regulares, geralmente à noite, com emissão de um número variado de ovos, medindo aproximadamente 100 μm de diâmetro, envolvidos em uma cápsula elástica e resistente, transparente, que fica presa à vegetação aquática, ou em qualquer superfície sólida submersa ou flutuante (KAWANO et al., 1992; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2004; ESTEVAM, 2006).

Em 5 a 12 dias todos os ovos terão eclodido, embora em condições desfavoráveis esse período possa aumentar para 15 a 20 dias; normalmente observa-se a eclosão dos ovos dentro de 6 a 9 dias, entretanto raramente todos os embriões de uma mesma cápsula eclodem ao mesmo tempo (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964a; OKAZAKI et al., 1996). A duração dos ciclos de clivagens também varia em diferentes cápsulas de ovos, contudo dentro de uma mesma cápsula de ovos a duração dos ciclos de clivagens é a mesma para todos os ovos (LABORDUS; DEUMER, 1982). Como já mencionado, a oviparidade sofre influência de fatores ambientais como a temperatura, turbidez da água, presença de substâncias tóxicas

no ambiente, ou mesmo parasitismo do molusco pelo *S. mansoni* (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964b; KAWAZOE, 1977; PESSÔA; MARTINS, 1988; MAGALHÃES et al., 2003).

Segundo Perlowagora-Szumlewicz (1966) o amadurecimento sexual da espécie *B. glabrata* pode ser analisado pelas primeiras oviposições, bem como pela viabilidade das desovas. Ao chegarem à idade de 14 a 15 meses de vida os espécimes alcançam seu comprimento máximo, juntamente com a perda ou diminuição considerável de sua capacidade reprodutiva.

Um fato interessante sobre os sentidos deste animal é que quando em coleções de águas pouco profundas, o *B. glabrata* rasteja preferencialmente com o lado direito do seu corpo voltado para cima (RUELAS et al., 2006).

2.2 Principais alternativas moluscicidas

As principais características requeridas em moluscicidas[2] incluem: alta efetividade, não interferência nas populações vegetais e animais do ambiente, baixo custo, praticidade e facilidade de aplicação (PESSÔA; MARTINS, 1988; GIORDANI et al., 2005).

A eficácia dos moluscicidas no combate a uma determinada espécie pode variar desde a obtenção de sucesso em algumas áreas até o completo fracasso em outras. Fatores responsáveis pelo fracasso de um moluscicida, estão relacionados com o comportamento do caramujo, as características do habitat, e as características físicas e químicas do componente utilizado (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ; BERRY, 1964).

As principais classes de moluscicidas utilizados no combate ao caramujo *B. glabrata* são as seguintes:

---

[2] Moluscicidas são agentes utilizados para eliminar populações de moluscos.

Moluscicidas biológicos: Existem muitos registros do uso de diferentes vegetais no combate aos moluscos vetores da esquistossomose, tais como a castanha do caju (*Anacardium occidentale*), o cipó mata fome (*Serjania salzmanniana*), a graviola (*Annona muricata*), o cipó-seda (*Marsdenia altissima*) e o jacarandá-banana (*Swartzia langsdorffii*) (REY, 1987; SOUZA et al., 1992; EKABO et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2003; LUNA et al., 2005).

Outra forma de controle biológico se dá pela utilização de predadores naturais do molusco *B. glabrata* que englobam diversas classes de animais como aves (ex.: patos, marrecos, gansos, gavião caracoleiro), peixes (ex.: *Tilapia*, peixe-paraíso, apaiari), insetos (ex.: hemípteros aquáticos, larvas da mosca *Sciomizidae*, larvas de libélula), quelônios (cágado e tartaruga), sanguessugas e moluscos competidores (*B. straminea, B. occidentalis*, *Helisoma duryi*, *Melanoides tuberculata*; além de espécies como *Pomacea sp*. e *Marisa cornuaretis*, que chegam a devorar exemplares e desovas do *B. glabrata*) (PESSÔA; MARTINS, 1988; ELMOR et al., 1992; GIOVANELLI et al. 2002; GIOVANELLI et al. 2003; COSTA et al., 2004; NEVES, 2004). A implantação destes predadores, porém, exige precisão e cuidados, a fim de se evitar um desequilíbrio no ecossistema (POINTIER, 2001; BRUGNOLI et al., 2005).

Moluscicidas químicos: O grande problema dos métodos químicos é a alta probabilidade de interferências no meio ambiente, quando utilizados diretamente nele; no combate ao *B. glabrata* ganham destaque compostos de cobre, cal, pentaclorofenato de sódio, compostos orgânicos do estanho e a niclosamida, sendo esta última a mais atualmente utilizada; entretanto nenhum destes possui especificidade para o *B. glabrata* (REY, 1987; PESSÔA; MARTINS, 1988; SOUZA et al., 1992; GIOVANELLI et al., 2002; NEVES, 2004; GIORDANI et al., 2005).

Métodos físicos: Outra possibilidade para eliminar a presença dos moluscos no ambiente é a alteração física dos habitats através de drenagens, retificações de cursos d´água, modificações de canais, remoção de vegetação aquática, remoção manual dos moluscos, etc. Esses métodos freqüentemente têm efeitos colaterais benéficos sobre o melhor aproveitamento das áreas para fins agrícolas; seu custo porém é elevado, e seu êxito está condicionado a prévios estudos ecológicos (REY, 1987; PESSÔA; MARTINS, 1988).

Diversos métodos como ultra-som, radiações ultravioleta, radiações ionizantes, correntes elétricas e campos magnéticos podem também ser empregados no combate aos moluscos, porém sua aplicabilidade depende da conveniência e eficiência dos resultados alcançados (LABORDUS; DEUMER, 1982; OKAZAKI et al., 1996; GIORDANI et al., 2005; RUELAS et al., 2006). Farvar e Cember (1969), por exemplo, consideram que as radiações ionizantes só podem ser consideradas moluscicidas efetivos, quando 100% da letalidade é conseguida dentro de oito dias.

Contudo, já foi demonstrado que as radiações ionizantes constituem um método eficiente de controle da proliferação de outras espécies, como por exemplo, os insetos, devido às mutações nas células germinativas, atuando como mutágenos diretos, com latência mínima de ação, não requerendo distribuição ou metabolismo pelo organismo (TALLARICO et al., 2004; DICK et al., 2005); desta forma, estudos com moluscos podem ser desenvolvidos com o mesmo intuito.

2.3 Aspectos gerais da ação da radiação ionizante sobre os sistemas biológicos

As radiações são caracterizadas como a difusão de energia a partir de uma fonte, sendo classificadas como ionizantes aquelas responsáveis por interagir com a constituição atômica básica da matéria, e não ionizantes aquelas que interagem com a matéria sem alterar suas características atômicas (TAUHATA; ALMEIDA, 1984b; OKUNO, 1988; CNEN, 2005).

Entre as radiações ionizantes, cinco são as mais estudadas, classificadas em eletromagnéticas (raios X e γ) e corpusculares (α, β e nêutrons). Estas radiações podem ser naturais ou artificiais (TAUHATA; ALMEIDA, 1984a; CNEN, 2005; BITELLI, 2006).

Um parâmetro biológico conseqüente à interação da radiação com os sistemas biológicos é o RBE (Eficiência Biológica Relativa, do inglês *Relative Biological Effectiveness*), definido como a eficácia biológica concernente a cada tipo de radiação, que significa a dose de radiação necessária para se obter o mesmo efeito biológico obtido com a dose unitária de uma radiação tomada como padrão; essa radiação padrão é caracterizada como raios X de 250 kVp (ALPEN, 1998; POUGET; MATHER, 2001; CNEN, 2005). O

efeito biológico considerado pode ser a morte celular, indução de danos ao DNA, aberrações cromossômicas ou mutações (ROCHA, 1976; DOWD; TILSON, 1999).

Outro parâmetro também de interesse no estudo dos efeitos biológicos das radiações ionizantes é o LET (Transferência Linear de Energia, do inglês *Linear Energy Transfer*), definido como a medida da faixa de energia absorvida pelo meio (keV/μm), devido às ionizações causadas pela radiação ionizante (CEMBER, 1996; BUSHONG, 1998; DOWD; TILSON, 1999; BARACAT, 2000). Depende do tipo de radiação e de sua energia, ou seja, quanto menor a energia da radiação, maior será a probabilidade de interação com os átomos do meio absorvedor, por permanecer próxima destes por mais tempo (Figura 4) (ROCHA, 1976).

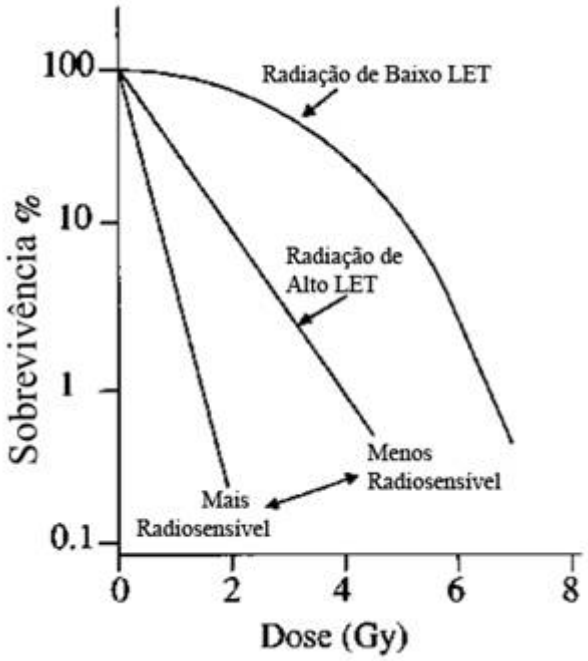


Figura 4 - Típica curva de sobrevivência das células expostas às radiações de alto e baixo LETs. Adaptada de POUGET; MATHER, 2001.

O dano biológico é maior, e a recuperação é mais lenta para radiações de alto LET, do que para radiações de baixo LET (TAUHATA, 2003). A seguir um breve resumo das características gerais das cinco radiações ionizantes mais estudadas:

Radiação X e gama (γ): São radiações eletromagnéticas, diferindo principalmente quanto à origem; os raios X têm origem na eletrosfera, enquanto que a radiação γ origina-se no núcleo do átomo. Possuem alto poder de penetração, baixo LET, interagindo com a matéria através de três processos básicos: efeito fotoelétrico, efeito compton e produção de pares (KELLER, 1981). A energia dos raios gama varia, em média, dentro de uma faixa de 10 keV a 3 MeV, enquanto que os raios X podem ter qualquer energia, desde valores próximos de zero, até um valor máximo, determinado pela energia do elétron incidente (OKUNO et al., 1986; POUGET; MATHER, 2001). Sua blindagem é realizada com materiais de alto número atômico como o chumbo e a barita (GARCIA, 1998; BARACAT, 2000).

Radiação alfa (α): Partícula similar ao núcleo do hélio, com dois prótons e dois nêutrons, carga positiva (2+) e massa cerca de 7000 vezes a massa do elétron. Possui trajetória quase retilínea e de curto alcance, com alto LET; podendo ser blindada com uma folha de papel (TAUHATA; ALMEIDA, 1984a; OKUNO et al., 1986; BARACAT, 2000). A influência da radiação alfa sobre a matéria se dá pela interação com a eletrosfera do alvo, através da excitação[3] e da ionização[4] (KELLER, 1981; CEMBER, 1996; GARCIA, 1998; POUGET; MATHER, 2001).

Radiação beta (β): Termo utilizado para descrever elétrons de origem nuclear, carregados negativamente (β^-) denominados négatrons, ou positivamente (β^+), neste caso denominados pósitrons (TAUHATA; ALMEIDA, 1984a). Uma vez que as partículas beta são leves, sua velocidade para uma determinada energia é muito maior, com poder de ionização superior ao das radiações X e γ. Possuem trajetória tortuosa, podendo ser blindadas com plástico ou alumínio (TAUHATA; ALMEIDA, 1984b; OKUNO et al, 1986; CEMBER, 1996; BARACAT, 2000).

---

[3] A excitação caracteriza o estado no qual os elétrons de um átomo com excesso de energia, saltam para orbitais mais externos, deixando assim um espaço vazio na eletrosfera; ao retornarem para seus orbitais de origem esses elétrons emitem o excesso de energia sob a forma de luz ou raios-x, denominados característicos (ROCHA, 1976; SCAFF, 1997; GARCIA, 1998; TAUHATA et al. 2003).

[4] Ionização é o processo no qual elétrons são arrancados do átomo ao receberem energia da radiação incidente, formando-se assim o par iônico (elétrons errantes + átomo, agora positivamente carregado), elétrons livres ou radicais livres, quando ocorre a quebra das ligações químicas. A ionização é denominada direta quando ocasionada pela radiação incidente, e indireta quando é ocasionada por produtos secundários à ação dessa radiação incidente. A energia média aproximada para a produção de um par de íons no ar é de 34 eV (ROCHA, 1976; TAUHATA; ALMEIDA, 1984a; OKUNO, 1988; SCAFF, 1997; GARCIA, 1998).

Nêutrons: São partículas que não possuem carga, com alto poder de penetração e alto LET (BARACAT, 2000); percorrem grandes distâncias no meio antes de interagir com o núcleo dos átomos que o compõem (OKUNO et al., 1986). A exposição a estas partículas é perigosa, levando em consideração sua intensa penetração, devendo ser blindadas com materiais ricos em hidrogênio (ex.: água ou parafina), devido à alta seção de choque que o hidrogênio possui para nêutrons. Sua absorção é acompanhada pela emissão de raios gama, assim recomenda-se utilizar também materiais de alto número atômico na blindagem (OKUNO, 1988).

A ação das radiações sobre os seres vivos ocorre em parte pelos efeitos diretos, onde a energia da radiação é transferida diretamente à molécula alvo, causando ionização ou excitação; ou em sua maioria, pelos efeitos indiretos, que consistem na interação da radiação com as moléculas do meio, principalmente a água, originando subprodutos denominados radicais livres (ex.: OH·, H·) (ROCHA; HARBERT, 1979; BARACAT, 2000; STRZELCZAK et al., 2001; BITELLI, 2006). Estes por sua vez são compostos altamente reativos que interagem com as biomoléculas alvo (GARCIA, 1998).

A presença de oxigênio no ambiente irradiado induz à formação de radicais livres peroxidantes, os quais não permitem a recombinação da estrutura atingida para a molécula original, e levam ao aumento de radicais livres no meio, potencializando os efeitos danosos ao sistema biológico (GAYARRE, 1994; GARCIA, 1998; BITELLI, 2006).

A radiação ionizante provoca nas células diversas respostas que podem ou não levá-las à morte, dependendo da estrutura atingida e da reparação celular dos danos radioinduzidos (TAUHATA; ALMEIDA, 1984c; BARACAT, 2000; MOORE, 2002).

Outros aspectos inerentes às radiações ionizantes, e interferentes sobre seus efeitos biológicos devem ser observados, tais como: o tipo de radiação empregada, a quantidade de energia liberada no percurso desta (LET), a atividade da fonte radioativa e a dose aplicada (POUGET; MATHER, 2001). Pode-se observar ainda, que o dano biológico produzido pela radiação ionizante aumenta com o aumento da dose, ou seja, com a quantidade de energia absorvida da radiação; assim podemos definir o conceito de dose absorvida como a quantidade de energia depositada por unidade de massa do material irradiado (ROCHA, 1976; TAUHATA; ALMEIDA, 1984a; ALPEN, 1998; CNEN, 2005).

A unidade antiga de dose absorvida era o rad (Dose de Radiação Absorvida, do inglês *Radiation Absorbed Dose*), que está sendo substituída pelo Gray (Gy), equivalente a um joule (J) por quilograma (kg) de massa, conforme descrito na eq. (1) (TAUHATA; ALMEIDA, 1984a; ALPEN, 1998; ICRU, 1998).

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J. kg}^{-1} \qquad (1)$$

Outra unidade importante para avaliar os efeitos biológicos das radiações ionizantes é a taxa de dose da fonte de radiação, definida como a quantidade de dose depositada pela fonte em um dado intervalo de tempo. Quanto maior for a taxa de dose, menor será o tempo de exposição (ROCHA, 1976; ICRU, 2005).

Existem, no entanto, modificadores das respostas biológicas à radiação ionizante, como já mencionado o oxigênio que aumenta em aproximadamente três vezes os efeitos da radiação sobre a célula, e os seqüestradores de radicais livres, que, por outro lado, protegem as células de tais efeitos (GAYARRE, 1994; BUSHONG, 1997; DOWD; TILSON, 1999; BITELLI, 2002; MOORE, 2002).

Analisando o surgimento de uma radiolesão, o primeiro fenômeno que ocorre na interação da radiação com o ser vivo é físico, e consiste da ionização e excitação dos átomos com a absorção de energia da radiação pelas biomoléculas. Este fenômeno se processa no curto intervalo de tempo de 10^{-16} segundos. Em seguida ocorre o estágio físico-químico (10^{-6} segundos) caracterizado pelo rompimento das ligações químicas das moléculas, com formação de radicais livres.

Na seqüência, iniciam-se os danos químicos, ou seja, o estágio no qual os radicais livres produzidos interagem com as moléculas orgânicas vitais para a célula, danificando-as; este fenômeno dura alguns poucos segundos. Finalmente tem-se o estágio biológico que pode ser imediato ou tardio, o primeiro ocorrendo até 60 dias após a exposição, e o segundo refletindo-se ao longo dos anos ou gerações, caracterizando as manifestações fisiológicas dos

efeitos da radiação ionizante sobre o organismo (ROCHA; HARBERT, 1979; TAUHATA; ALMEIDA, 1984c; OKUNO, 1986; OKUNO, 1988; TAUHATA, et al. 2003).

Em 1906, Bergonié e Tribondeau postularam que um tecido é tanto mais sensível ao efeito das radiações, quanto mais imaturas e menos diferenciadas as células que o compõem, mais intensa sua atividade metabólica, e mais longo o seu futuro cariocinético (ROXO-NOBRE; JUNQUEIRA, 1967; MOSS; BRAND, 1973; BUSHONG, 1997; DOWD; TILSON, 1999).

Diversos autores têm avaliado os moluscos como possíveis modelos biológicos em estudos sobre a interação da radiação com os organismos vivos, conforme apresentado a seguir.

2.3.1 Radiobiologia dos moluscos

Os parâmetros utilizados na radiobiologia de moluscos para análise dos efeitos das radiações ionizantes podem ser observados por meio da mortalidade dos animais expostos, assim como por meio da inviabilidade de seus descendentes, observada através das mortes e malformações dos embriões produzidos por esses animais irradiados.

A mortalidade é o critério utilizado para determinar a letalidade de uma população exposta à radiação ionizante. Este parâmetro é analisado pela dose letal (DL) para 50% da população exposta, dentro de períodos de tempo pré-determinados; as mais utilizadas consistem da $DL_{50/30}$, definida como a dose na qual observa-se a morte de 50% dos organismos, após 30 dias da exposição às radiações ionizantes; a $DL_{50/60}$ representando a dose na qual 50% dos organismos morre em 60 dias pós-irradiação; e a $DL_{50/90}$ caracterizando a dose na qual 50% dos indivíduos morre em 90 dias após a administração da dose (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964a; ROCHA, 1976).

A inviabilidade é caracterizada por alterações observadas nos embriões originários dos indivíduos expostos, classificadas segundo os critérios de Geilenkirchen (1966):

- Embriões Mortos → Aqueles que não conseguem sobreviver, culminando em um aspecto entumescido (Figura 5. A).

- Exogástrulas → Embriões vesiculares, que não sofreram invaginação do arquêntero[5] (Figura 5. B).

- Embriões Malformados ou Teratomorfos → Todas as malformações visíveis ao microscópio estereoscópico; tanto as específicas como, por exemplo, as malformações de cabeça, olhos e concha; como as inespecíficas, caracterizadas pelo desenvolvimento anormal do embrião, impossibilitando a identificação da malformação (Figuras 5. C e 5. D).

A eclosão é caracterizada como a etapa final do desenvolvimento embrionário normal, quando os caramujos alcançam o meio exterior (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964b).

---

[5] Arquêntero ou intestino primitivo é a cavidade da gástrula nos embriões dos animais. Comunica-se com o exterior por um orifício denominado blastóporo. À medida que ocorre o dobramento do embrião, pela divisão dos macrômeros e micrômeros, forma-se uma nova cavidade no interior do mesmo, sendo o arquêntero o responsável pela formação da cavidade digestiva dos animais adultos. Em alguns grupos o blastóporo originará a boca, enquanto que em outros dará origem ao ânus.

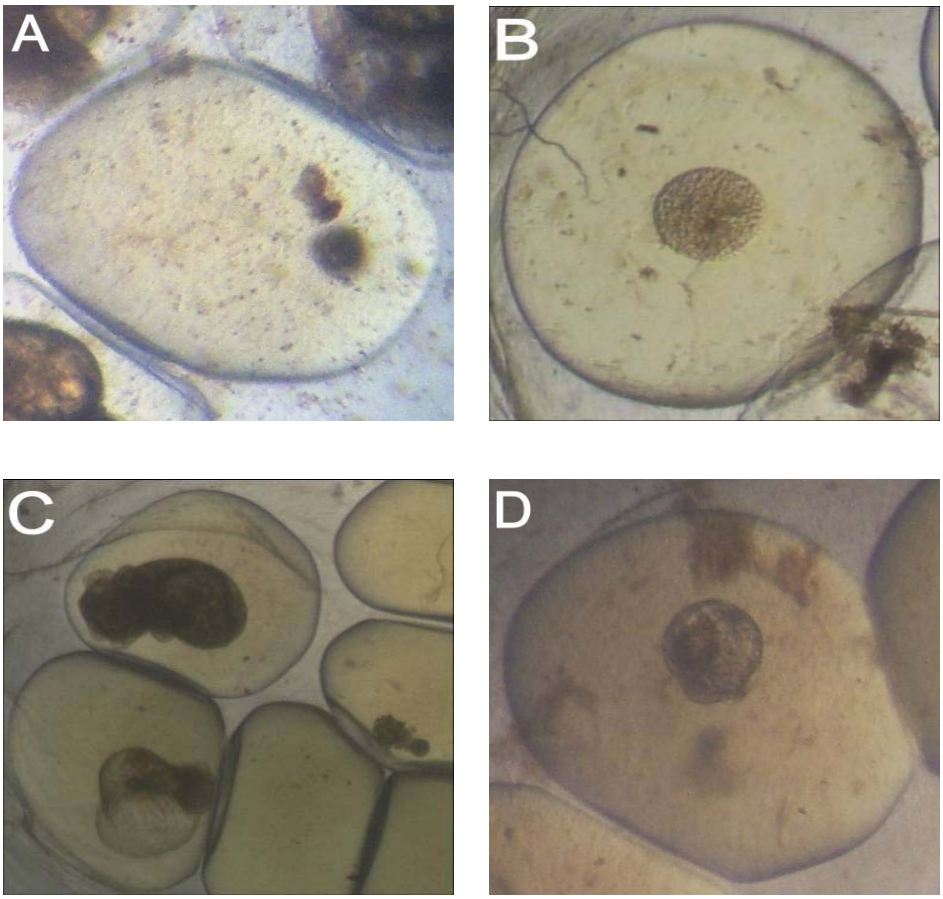


Figura 5 - Alterações observadas nos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos a agentes teratogênicos. A – Embrião morto (35X); B – Exogástrula (40X); C e D – Embriões malformados (35X).

Tallarico et al. (2004), trabalhando com moluscos *B. glabrata*, afirmaram que as células germinativas em estágios mais jovens são mais sensíveis aos efeitos letais da radiação, enquanto que as células nos estágios de espermatogênese mais avançados são mais sensíveis às mutações letais dominantes ocasionadas pelas radiações ionizantes.

Através do teste do letal dominante, utilizando doses de radiação gama de 2,5; 10 e 20 Gy, de uma fonte de ^{60}Co, a uma taxa de dose de 0,40 Gy/min, esses autores conseguiram estimar o período de espermatogênese do caramujo *B. glabrata*. Trouxeram, assim, grande contribuição na padronização de novos testes para estudos de agentes físicos e químicos capazes de alterar a reprodução desses animais, causando infertilidade, mesmo que temporária, considerando que após 36 dias os animais irradiados recuperaram os níveis normais de fertilidade.

Confirmando este efeito esterilizador das radiações ionizantes, Motta e Melo (1997a) encontraram reduções na fecundidade de moluscos *B. straminea*, isolados e em colônia, irradiados com doses de 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 Gy, com fonte de ^{60}Co a uma taxa de dose de 0,97 Gy/min. Esta redução na fecundidade, porém, mostrou-se aleatória, com picos de altos e baixos em relação à dose de radiação recebida; entretanto, para a dose de 15 Gy foi observado um aumento no número de massas de ovos e número de ovos produzidos pelos animais irradiados em relação ao grupo controle; efeito não observado para nenhuma outra dose a que os animais foram expostos, sugerindo que esta dose de 15 Gy produziu um aumento no estímulo hormonal, ou na atividade reprodutória hermafrodita destes indivíduos.

Trabalhos desenvolvidos por Motta e Melo (1997b) observaram que caramujos *B. straminea* quando em colônias apresentaram maior radiosensibilidade que os moluscos mantidos sob isolamento reprodutivo, denotando uma possível produção de fatores radiosensibilizadores orgânicos ou hormonais, quando os animais encontram-se em reprodução sexuada.

Ainda neste trabalho, os referidos autores acharam uma $DL_{50/30}$ de 70 Gy para os grupos colonizados e uma $DL_{50/30}$ de 107 Gy para os grupos isolados, quando irradiados com fonte de ^{60}Co a uma taxa de dose de 0,97 Gy/min (MOTTA; MELO, 1997b).

Realizando experimentos com o molusco *B. glabrata*, Motta et al. (2001), encontraram resultados semelhantes aos achados com o *B. straminea*. Irradiando com fonte de ^{60}Co, taxa de dose de 0,97 Gy/min, grupos de moluscos em colônias e grupos em isolamento reprodutivo; estes autores encontraram uma maior sensibilidade dos animais em colônia quando comparados aos animais isolados; achando uma $DL_{50/30}$ de 59 Gy para os grupos em colônias e uma $DL_{50/30}$ de 218,2 Gy para os grupos em isolamento.

Levando-se em consideração que no ambiente natural estes animais encontram-se agrupados, além de sua preferência pela reprodução cruzada, e seu maior índice reprodutivo quando em grupos, do que em isolamento (COSTA et al., 2004), tais resultados ganham maior importância quando se deseja padronizar um protocolo para o controle populacional de moluscos aquáticos.

No entanto, as pesquisas têm demonstrado que, embora a radiosensibilidade dos moluscos seja diretamente proporcional à dose de radiação administrada, deve-se levar em consideração que a manipulação dos moluscos durante as exposições pode contribuir para a mortalidade dos mesmos (MOTTA; MELO, 1997b; MOTTA et al., 2001).

A fim de analisar as interferências da radiação ionizante sobre o crescimento dos caramujos, Motta et al. (1999) irradiaram exemplares de *B. straminea* em fonte de ^{60}Co (taxa de dose de 0,97 Gy/min), com doses de 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 80; 160; 320 e 640 Gy. Os resultados encontrados mostraram que apenas para doses de 20 e 80 Gy, o tamanho da concha dos caramujos foi superior ao do grupo controle, tanto para os animais em isolamento, como para aqueles em colônias; sendo, no entanto, que a curva de crescimento para os animais isolados alcançou uma maior amplitude do que a observada para os animais em colônias.

Segundo esses autores, a radiação estimularia no animal uma tentativa de garantir a perpetuação de sua espécie através da reprodução hermafrodita, justificando o aumento das conchas devido ao aumento na ovotestis dos moluscos; a ausência de estímulo para crescimento das conchas nas doses acima de 20 Gy seria justificada pela morte dos animais durante a análise, graças aos efeitos letais da radiação, ocasionando variações no diâmetro médio do comprimento das conchas (MOTTA et al.; 1999).

Utilizando raios X com doses entre 3000 R[6] (26,4 Gy) e 30.000 R (264 Gy), Perlowagora-Szumlewicz (1964a) observou que moluscos *B. glabrata* com 2 a 7 dias de vida mostraram-se mais radiosensíveis do que moluscos adultos jovens com 44 dias de vida. Seus resultados indicaram uma $DL_{50/90}$ entre 6000 R (52,8 Gy) e 9000 R (79,2 Gy) para uma população heterogênea de moluscos adultos e jovens.

Observando os embriões originários de ovos irradiados, Perlowagora-Szumlewicz (1964b) constatou diminuição na sobrevivência destes, com aumento no número de embriões malformados e mortos. Entretanto, os moluscos que sobreviveram à irradiação apesar do

---

[6] 1 R = 8,8 x 10^{-3} Gy

retardo em atingir sua maturidade sexual, e da infertilidade observada nos primeiros meses de maturidade sexual, apresentaram recuperação após o início de sua vida reprodutiva.

Corroborando estes dados, Perlowagora-Szumlewicz e Berry (1964) irradiando ovos de *B. glabrata*, em diferentes períodos embrionários, com fonte de raios X, encontraram que doses sub-letais de radiação retardam o desenvolvimento dos embriões. A eclosão dos embriões foi inversamente proporcional à dose e diretamente proporcional à idade do embrião.

Também estudando os efeitos da radiação ionizante sobre embriões de *B. glabrata*, Okazaki et al. (1996) analisaram as malformações, morte e eclosão dos embriões expostos à radiação gama do ^{60}Co (taxa de dose 136 Gy/h) no estágio de clivagem, blástula, gástrula, trocófora jovem e trocófora. Os resultados demonstraram que no estágio de clivagem o embrião foi aproximadamente 4 vezes mais radiosensível que no de trocófora. Os estágios de blástula, gástrula e trocófora jovem apresentaram uma maior susceptibilidade à indução de malformações.

Em relação às malformações, esses autores observaram que aquelas consideradas inespecíficas predominaram em todos os estágios embrionários e em todas as doses investigadas, em uma freqüência dose dependente; já as malformações específicas tais como duplicação dos olhos e malformações de cabeça como monoftalmia foram observadas nos ovos irradiados nos estágios mais precoces, enquanto que os estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário apresentaram malformações de concha e inversão do estomodeu (OKAZAKI et al., 1996).

O trabalho de Okazaki et al. (1996) mostrou ainda que a freqüência de malformações aumentou rapidamente com o aumento das doses de radiação administradas, alcançando o máximo entre o 5º e o 8º dia após a irradiação, e posteriormente decrescendo devido à morte gradual dos embriões. O estágio de trocófora apresentou maior freqüência de eclosão, provavelmente porque nos estágios mais precoces as malformações levaram à morte prematura dos embriões, de tal modo que estes nem alcançavam o período de eclosão.

Entretanto, tais malformações responsáveis por impedir que os embriões completem seu período de evolução, culminando na eclosão, não são características apenas das radiações

ionizantes; diversas outras fontes de mutações como a cafeína, o ultra-som e as radiações ultravioleta podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embrionário normal do molusco (LABORDUS; DEUMER, 1982; OKAZAKI et al.; 1996).

Sabendo-se que os hemócitos e os produtos de sua secreção são elementos fundamentais no processo de imunidade dos moluscos, Bezerra et al. (2003) tentaram, através da irradiação com 10 krad (100 Gy) de uma fonte de ^{60}Co, interferir em sua função, de forma que uma linhagem de *B. tenagophila* resistente à infecção pelo *S. mansoni*, se tornasse susceptível. Seus resultados demonstraram que a radiação ionizante não interferiu no sistema de defesa desta linhagem resistente ao helminto transmissor da esquistossomose mansônica.

Com o intuito de explorar mais profundamente o mecanismo de defesa dos moluscos para erradicar a primo-infecção pelo *S. mansoni*, Azevedo et al. (2004) irradiaram caramujos *B. glabrata* por meio de uma fonte de Cs^{137}, com taxa de dose de 2,72 Gy/min[7], com doses de 20, 30, 40 e 50 Gy. Foi confirmado, através de estudo histológico, que a ovotestis foi o órgão mais sensível à irradiação; entretanto, contrariando os achados de Bezerra et al. (2003), seu estudo revelou um aparente decréscimo no número e função dos hemócitos como resultado da irradiação.

Embora diversos trabalhos tenham sido realizados investigando os efeitos da exposição de moluscos *Biomphalaria* às radiações gama, até o presente momento não encontramos nenhuma referência sobre os efeitos da radiação gama de alta taxa de dose atuando sobre a reprodução destes animais.

Apenas Farvar e Cember (1969) utilizaram fonte de cobalto-60 de alta taxa de dose (1,25 kGy/h) no controle de moluscos *B. glabrata*; entretanto como seu objetivo era a mortalidade da espécie, as altas doses utilizadas e o curto espaço de tempo nos quais os animais morreram não permitiram o estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante, seja sobre a reprodução da população exposta, seja sobre qualquer outra função fisiológica normal do organismo. Os resultados mostraram que doses de radiação entre 1500 Gy e 2500 Gy são capazes de destruir completamente uma população inteira de *B. glabrata* em

---

[7] Comunicação pessoal de ANDRADE, Z. A. (um dos autores do trabalho citado).

menos de 19 horas após a irradiação.

Ainda que os trabalhos aqui apresentados denotem uma alta sensibilidade dos moluscos do gênero *Biomphalaria* a doses de radiação maiores que uma centena de grays, vale ressaltar que esse padrão não é seguido por todo o filo Mollusca. Moraes et al. (2000) e Collins et al. (2005), por exemplo, irradiando ostras com doses da ordem de kilograys, a fim de eliminar microorganismos patogênicos, conseguiram abolir o risco de contaminação alimentar, sem, no entanto, inviabilizar a sobrevivência do molusco.

Da mesma forma, Harewood et al. (1994), irradiando mariscos *Mercenaria mercenaria* encontraram correlações negativas significantes entre as doses de radiação administradas e as concentrações bacterianas nas amostras analisadas; entretanto doses maiores que 0,5 kGy acarretaram prejuízos nas taxas de sobrevivência dos mariscos, não sendo suficientes para inviabilizar as formas vegetativas das bactérias e os vírus nas amostras.

Conquanto moluscos sejam úteis como possíveis bioindicadores de contaminação ambiental, devido à capacidade que têm de acumular produtos excedentes no ambiente em que vivem (FRANTSEVICH et al.; 1995), sabe-se que determinadas espécies se tornaram verdadeiras pragas, representando perdas econômicas e ambientais significativas (BRUGNOLI et al., 2005).

Para o estabelecimento de uma técnica visando o controle dessas espécies consideradas pragas, se faz necessário maiores estudos com diferentes agentes. A radiação ionizante, por exemplo, vem se mostrando eficiente no controle de insetos considerados danosos para a agricultura. Os resultados desta técnica indicam esterilidade temporária ou permanente, em machos ou fêmeas, conforme a espécie objetivada. Estes estudos foram iniciados em 1916 por Runner, e hoje a sociedade usufrui dos benefícios implementados por eles (DICK et al., 2005).

Em relação à extrapolação da técnica de esterilização através das radiações ionizantes para moluscos, ainda são necessários diversos aprimoramentos, para que em um futuro bem próximo a sociedade possa ser beneficiada também com estas aplicações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem, Criação e Manutenção dos Moluscos

Moluscos *B. glabrata* oriundos de São Lourenço da Mata - Pernambuco/Brasil, e mantidos no moluscário do Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foram utilizados neste trabalho. Os caramujos adultos, pigmentados, mantidos em laboratório e negativos quanto à presença do *S. mansoni*, foram cultivados em aquários plásticos (capacidade para 20 litros) com água filtrada e declorada (filtro Purity-Bella Fonte®), trocada semanalmente, com pH ≅ 7,0 e temperatura média de 25 °C. Os moluscos foram alimentados diariamente com alface fresca (*Lactura sativa*) (Figura 6).

Figura 6 - Aquários de criação dos caramujos *Biomphalaria glabrata* adultos no moluscário do DBR-UFPE.

3.2 Metodologia de irradiação dos moluscos

Foram pré-selecionados 90 moluscos *B. glabrata* e mantidos em isolamento reprodutivo durante 5 dias para verificação da maturidade sexual. Para os experimentos foram selecionados 60 indivíduos, sexualmente maduros, com diâmetro de concha entre 10 e 16 mm. Os animais foram separados em 6 grupos de 10 animais cada; sendo 1 grupo tomado como controle (não irradiado), e os demais irradiados através de uma fonte Gammacell ^{60}Co (modelo 220 Excel-MDS Nordion; taxa de dose de 10,040 kGy/h, em 23 de março de 2007) do Departamento de Energia Nuclear da UFPE (Figura 7). Os grupos foram irradiados com 20, 30, 40, 50 e 60 Gy.

Figura 7 - Fonte Gammacell ^{60}Co, utilizada na irradiação dos animais.

Inicialmente, em um projeto piloto, os animais foram irradiados com doses de 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 Gy, e os embriões originários destes moluscos foram coletados e analisados quanto à viabilidade. Pequenas diferenças percentuais foram observadas nos efeitos da radiação gama sobre os grupos nos intervalos de 5 Gy, com isso, optou-se por manter um intervalo de 10 Gy entre as doses investigadas, evitando o sacrifício desnecessário dos animais de laboratório.

Esse maior intervalo entre as doses proporcionou também melhores condições logísticas para a realização do trabalho, evitando partições das amostras e subdivisões dos experimentos.

Durante a irradiação, os caramujos foram mantidos em tubos cônicos (Falcon®) de 50 mL, em grupos de 5 caramujos por tubo, intercalados com finas camadas de gaze embebidas em água destilada, para a manutenção da umidade e do isolamento reprodutivo dos animais. Os tubos que receberiam doses iguais foram irradiados simultaneamente (Figura 8).

Figura 8 - Tubos cônicos onde os moluscos foram mantidos durante a irradiação.

3.3 Análise da fecundidade, fertilidade e sobrevivência dos moluscos irradiados

Após a irradiação, os animais foram mantidos em aquários individuais (capacidade para 180 mL), com água filtrada e declorada (filtro Purity-Bella Fonte®), pH em torno de 7,0; temperatura média de 25 °C e alimentados diariamente com alface fresca (*Lactura sativa*); foi realizada a troca semanal da água dos aquários. Pequenas folhas quadradas de plástico, de dimensões aproximadas de 2 x 2 cm, foram colocadas sobre a superfície da água para facilitar a coleta das desovas (Figura 9).

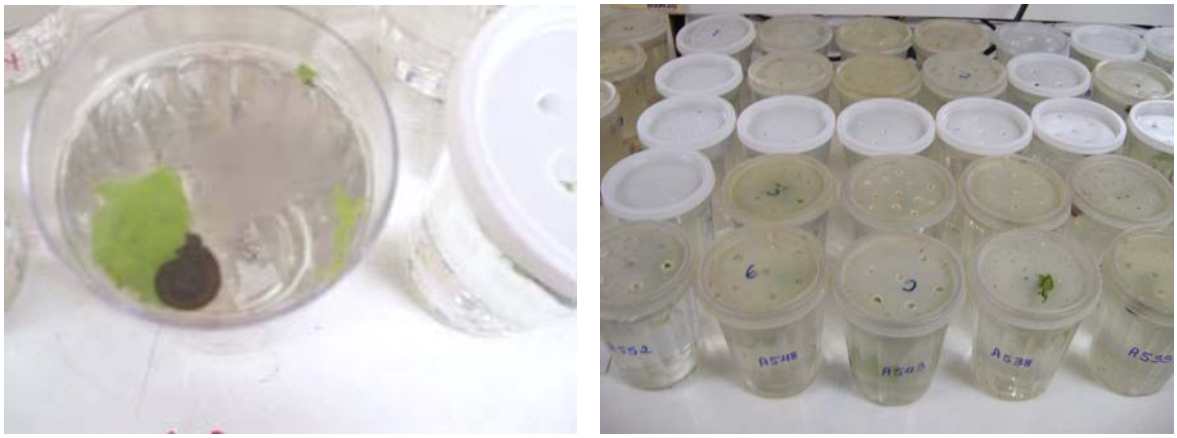


Figura 9 - Aquários individuais utilizados para a manutenção do isolamento sexual dos caramujos após a irradiação.

As desovas dos animais, tanto dos irradiados como dos controle, foram coletadas diariamente durante 8 dias, colocadas em uma placa de cultura de células com 24 poços (TPP® e Costar®), preenchidos com água destilada, e analisadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Wild-M_3B Heerbrugg® ou Tecnival®) para determinação da fecundidade e fertilidade dos animais.

A fecundidade foi determinada pelo número de embriões produzidos por cada animal no período de tempo de 8 dias, estipulado para a coleta dos ovos; seguindo-se de uma análise das desovas por 10 dias, para a determinação da fertilidade, que por sua vez representa a quantidade de embriões viáveis em cada desova, segundo os critérios estabelecidos por Geilenkirchen (1966).

Durante o período de análise, as desovas foram mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) (Eletrolab-122FC®) com temperatura média de 25 °C, para acompanhamento do desenvolvimento embrionário através de análises no 1º, 2º, 6º, 8º, 9º e 10º dia após a irradiação, quando então a análise era encerrada.

Em nossa análise, os embriões aparentemente normais que não haviam eclodido até o 10º dia, bem como aqueles que apresentavam malformações de cabeça, olhos, concha e as exogástrulas, assim como malformações inespecíficas, foram considerados sob a denominação geral de embriões malformados.

No intuito de confirmar as observações de Talarico et al. (2004), no que diz respeito à recuperação da fertilidade dos animais irradiados, mantivemos os caramujos sob observação durante 60 dias, com coleta e análise das desovas a cada dois dias.

Os animais adultos irradiados foram observados durante 15 dias para determinação da porcentagem de indivíduos sobreviventes.

Todo o protocolo experimental desenvolvido neste trabalho foi realizado em duplicata para confirmação da reprodutibilidade dos resultados. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, analisado através do programa BioEstat, versão 5.0 (AYRES et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos efeitos da radiação gama sobre a fecundidade do *Biomphalaria glabrata*.

As Tabelas 1 e 2 mostram a fecundidade dos moluscos irradiados e não irradiados. Pode-se observar um aumento no número de ovos e embriões, respectivamente, produzidos pelos indivíduos expostos à radiação gama.

Levando-se em consideração que não foi incomum encontrarmos ovos de *B. glabrata* vazios, ou com dois ou mais embriões, a análise do número de embriões mostrou-se um parâmetro mais eficaz no exame das alterações ocasionadas pela radiação ionizante na fecundidade do animal.

Tabela 1 - Número de massas ovíferas depositadas pelos caramujos, segundo cada dose de radiação administrada.

Dose de radiação administrada (Gy)	Quantidade de massas ovíferas	Média de ovos/massa ovífera
0	95	13,1 ±6,7
20	110	14,5 ±5,5
30	142	13,4 ±6,4
40	118	16,4 ±7,1
50	133	16,0 ±7,7
60	131	13,6 ±6,3

O teste de Kruskal-Wallis, demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) apenas entre a quantidade de massas ovíferas produzidas pelos animais controle e os animais irradiados com 30, 40, 50 e 60 Gy; e entre a quantidade de massas ovíferas produzidas pelos animais irradiados com 20 e 30 Gy.

Observa-se que os animais irradiados produziram maior quantidade de massas ovíferas que os animais controle. Analisando o número de ovos por massa ovífera, o Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre os animais controle e apenas os irradiados com 40 e 50 Gy. Quando se comparou os grupos irradiados com 20 e 40 Gy; 30 e 40 Gy; 30 e 50 Gy; 40 e 60 Gy e 50 e 60 Gy, o teste também revelou diferenças significativas ($p<0,05$) entre esses grupos.

Essas observações diferem dos resultados encontrados por Motta e Melo (1997a), quando compararam os efeitos da radiação gama de baixa taxa de dose sobre a fecundidade de caramujos *Biomphalaria straminea* em colônia e isolados, encontrando que a radiação diminuiu a quantidade de massas ovíferas e ovos produzidos pelos animais expostos.

Embora a literatura científica afirme que moluscos *B. glabrata* desovem em média 20 a 50 ovos por massas ovíferas (ESTEVAM et al., 2006), neste trabalho foi encontrado que mais de 65% das massas ovíferas produzidas, tanto pelos indivíduos irradiados como pelos não irradiados, apresentavam menos de 20 ovos; tais resultados diferem também dos achados de Costa et al. (2004), que encontraram uma média de 4,6 ovos por cápsulas ovíferas depositadas por caramujos *B. glabrata* quando em isolamento individual.

Nenhum dos animais, em cada um dos grupos analisados, chegou a produzir desovas com 50 ovos; a quantidade máxima de ovos encontrada por desova em cada grupo de animais foi 35, 27, 27, 34, 44 e 29 ovos por massa ovífera, para os grupos controle e irradiados com 20, 30, 40, 50 e 60 Gy respectivamente.

Dificuldades surgiram durante o exame das desovas; assim como Elmor et al. (1992), encontrou-se neste experimento desovas globosas que demandaram mais tempo de análise para certificação da quantidade de ovos presentes na massa gelatinosa; devido à forma dessas desovas, houve uma sobreposição dos ovos, atrapalhando a contagem.

Observou-se também que um mesmo animal poderia depositar cápsulas grandes e pequenas, com número variado de ovos, em um mesmo dia de coleta. A vivência no laboratório sugeriu ainda que, concordando com os achados de Kawazoe (1977) e Elmor et al. (1992), o processo de deposição dos ovos sofreu influência de fatores externos tais como as estações do ano e a temperatura ambiente; sendo constatado que em determinados períodos do ano a freqüência com que os animais desovavam diminuía.

Algumas desovas apresentaram ovos vazios com tamanhos menores e formas anormais; o número de ovos vazios apresentou-se maior para os animais que receberam doses maiores de radiação, aumentando em freqüência à medida que passavam mais tempo no isolamento (Figura 10).

Figura 10 - Desova de um animal irradiado contendo apenas ovos vazios.

A Tabela 2 apresenta o número de embriões produzidos por cada grupo de caramujos ao longo dos 8 dias de coleta.

Tabela 2 - Número de embriões originários de *Biomphalaria glabrata* irradiados e não irradiados.

Dose de radiação administrada (Gy)	Número de embriões produzidos
0	1251
20	1619
30	1756
40	1968
50	2107
60	1771

Observa-se uma maior produção de embriões pelos animais irradiados em relação aos animais controle. Quando foi analisada a quantidade de embriões produzidos por cada um dos 20 animais testados em cada grupo, o teste estatístico de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças significativas ($p<0,05$) entre os animais controle e os irradiados com 40, 50 e 60 Gy. Comparando as doses de 20 e 50 Gy também foram encontradas diferenças significativas no número de embriões produzidos.

Com base nos dados apresentados na Tabela 2 acima, aplicando-se a fórmula de regressão linear simples foi obtido um coeficiente de determinação igual a 67,27%. A partir desse resultado, pode-se afirmar que a exposição à radiação gama de alta taxa de dose explica aproximadamente 70% do aumento na fecundidade dos animais irradiados.

Esse aumento na fecundidade dos animais, decorrente da exposição à radiação gama de alta taxa de dose, está representado na Figura 11 abaixo, confirmando que a reta permanece dentro da faixa de erro estipulada para cada grupo.

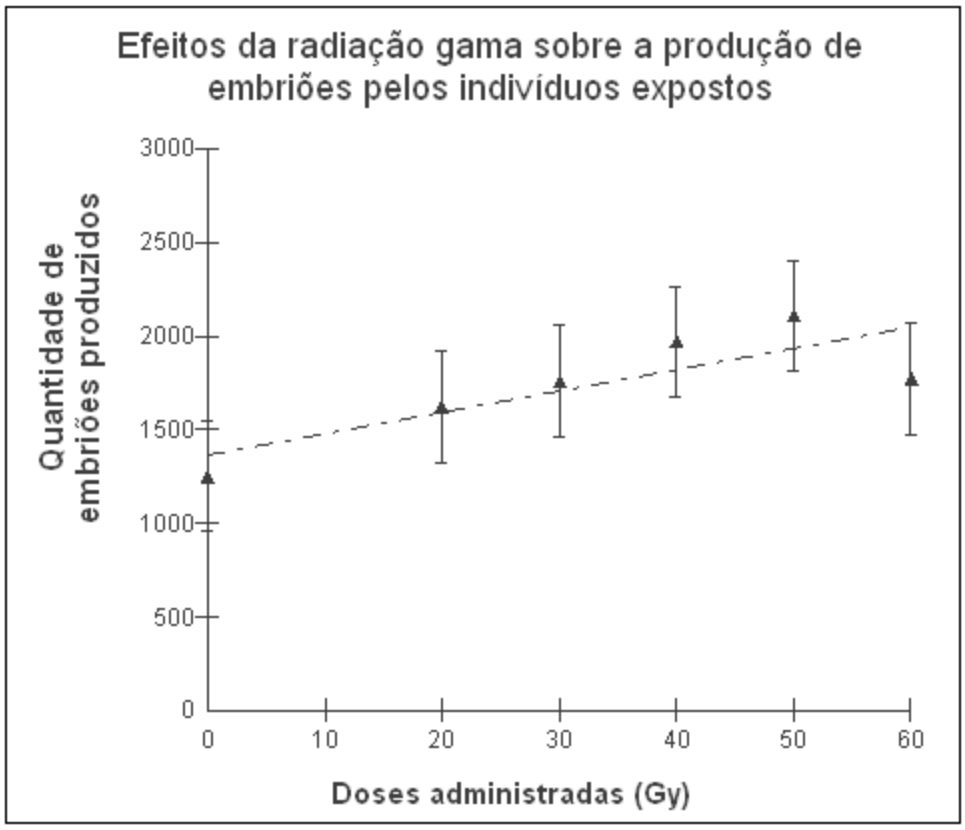


Figura 11 - Representação gráfica da influência da radiação gama de alta taxa de dose sobre a fecundidade dos animais.

A Figura 12 a seguir, sugere que o efeito estimulador da radiação gama de alta taxa de dose sobre a produção de embriões nos indivíduos irradiados tende a se adequar ao modelo gaussiano.

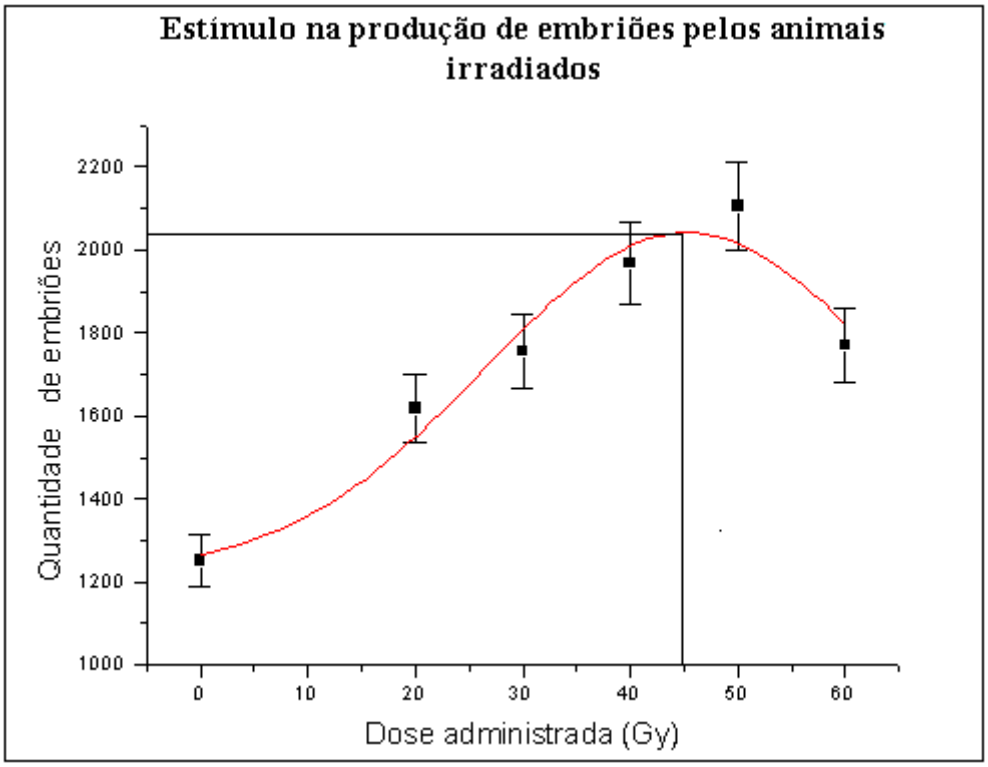


Figura 12 - Modelo Gaussiano dos efeitos da radiação gama de alta taxa de dose sobre a produção de embriões pelos animais irradiados.

Segundo a Figura 12 acima, pode-se inferir que o número de embriões produzidos aumenta proporcionalmente com a dose até alcançar seu ponto máximo na dose de 45 Gy, onde começa a decrescer.

4.2 Análise dos efeitos da radiação gama sobre a fertilidade do *Biomphalaria glabrata*.

Embora a irradiação tenha ocasionado um aumento na fecundidade dos animais expostos, seus descendentes não chegaram aos estágios finais do desenvolvimento embrionário, morrendo antes da eclosão, conforme apresentado na Tabela 3. Nesse caso, os efeitos da radiação ionizante sobre a fertilidade dos caramujos podem ser observados segundo os parâmetros: percentual de embriões eclodidos, mortos e malformados.

Tabela 3 - Percentuais de embriões eclodidos, mortos e malformados, em função das doses de radiação absorvidas pelos caramujos adultos.

Dose (Gy)	Embriões eclodidos (%)	Embriões inviáveis	
		Mortos (%)	Malformados (%)
0	97,4	0,9	1,7
20	5,2	8,9	85,9
30	3,6	10,6	85,8
40	0,3	20,7	79,0
50	0,2	24,2	75,6
60	0,1	26,7	73,2

Os resultados da Tabela 3 mostraram que menos de 6% da progênie dos indivíduos expostos chegou à eclosão, indicando assim uma pequena taxa de reparo celular das lesões ocasionadas pela radiação. Observou-se ainda que, para as doses acima de 40 Gy, a proporção de embriões sobreviventes foi mínima, com menos de 0,4% dos embriões eclodidos, sendo observado também que a dose de 60 Gy ocasionou a menor quantidade de embriões sobreviventes (0,1%).

A porcentagem de embriões malformados também acompanha um decréscimo à medida que as doses vão se tornando mais altas; possivelmente devido ao fato de que, para tais doses, o número de embriões mortos já no início do ciclo embrionário é maior, impedindo que esses animais alcancem os estágios mais avançados do desenvolvimento, onde são caracterizadas as malformações. Entretanto, a proporção de malformações tende a crescer à medida que passa mais tempo após a irradiação. Foi averiguado que após o terceiro dia de coleta a proporção de embriões malformados sofria um aumento em relação aos dois primeiros dias.

A quantidade de embriões mortos mostrou-se diretamente proporcional às doses de radiação administradas; entretanto foi observado que ao contrário do percentual de embriões malformados, a porcentagem de embriões mortos encontrados nas desovas tende a diminuir após o 3º dia de coleta.

Tomando como base a descrição de Geleinkirchen (1966) para as anormalidades e mortalidade dos embriões, considerou-se que para a obtenção de resultados fidedignos, cada desova coletada deveria ser observada pelo menos no 2º dia e no 10º dia após a ovoposição.

O 2º dia caracteriza o momento no qual os embriões encontram-se na fase de gástrula (KAWANO et al., 1992), e a partir de então começam a surgir as malformações, seguindo-se da morte do embrião. O 10º dia após a ovoposição determina aqueles embriões que apresentaram dificuldades para eclodir, considerando que todos os embriões controle já estavam eclodidos, assim seriam também incluídos na categoria de malformados (Figura 13).

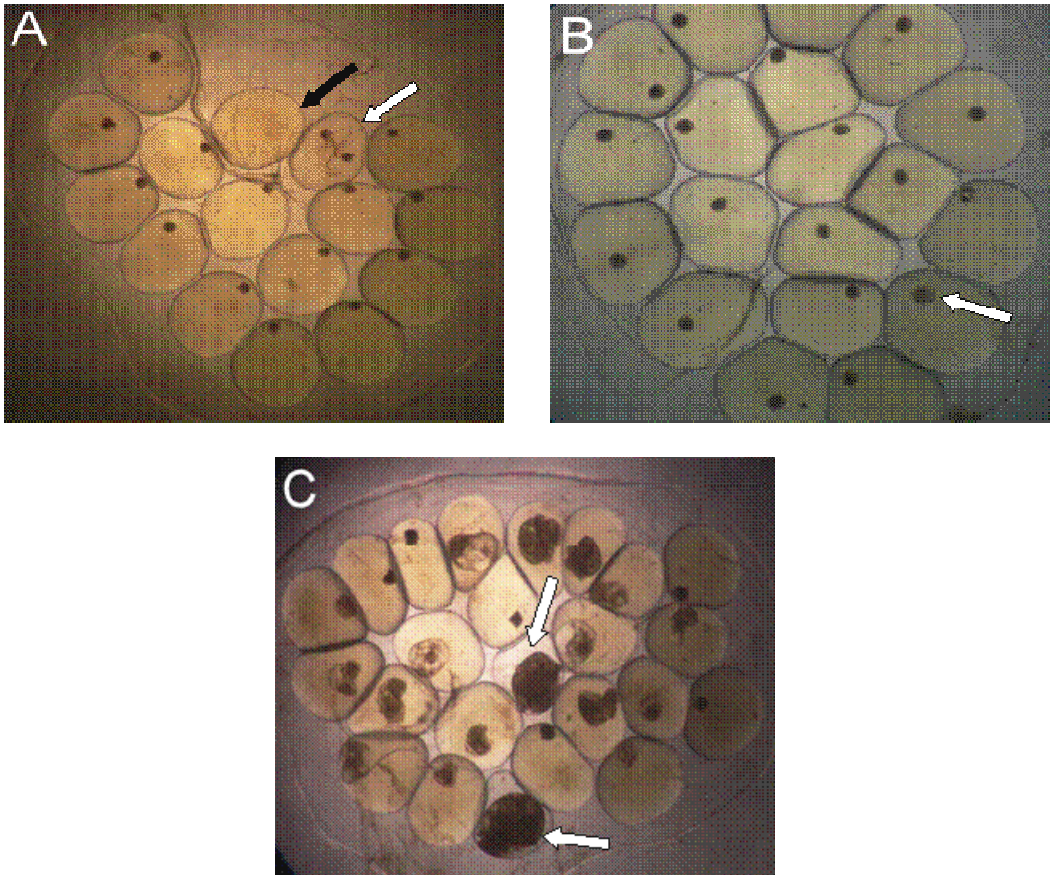


Figura 13 - Desovas de caramujos *Biomphalaria glabrata* irradiados, demonstrando os efeitos da radiação gama sobre sua progênie. A - Desova apresentando embriões mortos. Destaque para um ovo vazio (seta preta) e outro com embriões gêmeos (seta branca) (35X); B - Desova mostrando uma exogástrula (seta) e os demais embriões mortos (35X); C - Desova contendo diversas malformações e dois embriões aparentemente normais (setas) (35X).

Uma dificuldade encontrada durante a execução deste trabalho foi a ausência de registros iconográficos na literatura dos efeitos da radiação ionizante sobre a fertilidade dos moluscos.

A literatura consultada sequer dispunha de registros fotográficos coloridos das fases embrionárias do caramujo *Biomphalaria glabrata*, de modo que torna-se bastante difícil a análise de mutações, quando não se tem registro dos padrões normais. Apenas Magalhães et al. (2003) apresentam fotografias das desovas observadas em seu experimento, porém essas fotografias registram apenas algumas fases do ciclo embrionário do animal, não demonstrando mortes ou malformações, em vista da ausência de atividade do extrato testado sobre as desovas.

Assim, é de grande importância as fotos aqui publicadas de todas as fases do ciclo embrionário do molusco *B. glabrata*, bem como o registro de algumas das mutações que podem ocorrer quando da exposição destes animais a agentes teratogênicos.

A observação dos moluscos durante 60 dias, para registro da recuperação dos índices normais de fertilidade, permitiu averiguar que no decorrer do experimento, a quantidade de ovos produzidos pelos animais vai diminuindo à medida que passam mais tempo no isolamento. Por esse efeito ser observado tanto nos animais controle, quanto nos animais irradiados, existem indicações de que o isolamento é um fator inibidor da fecundidade, levando-se em consideração a preferência desta espécie pela reprodução cruzada (CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NAKANO et al., 2003; NEVES, 2004).

Conforme aumentava o tempo em que os animais encontravam-se separados do grupo, o número de desovas diminuía, sendo constatada uma diminuição em 90% na quantidade de embriões produzidos pelos animais durante esse período de 60 dias de observação.

Os resultados da recuperação da fertilidade dos animais irradiados, não ratificaram os achados por Tallarico et al. (2004); contrariando os resultados deste trabalho, não foi encontrada recuperação completa da fertilidade. Porém, vale salientar que no experimento desenvolvido por Tallarico et al. (2004), os animais não ficavam isolados durante todo o período de observação, sendo colocados em companhia de outro indivíduo para a fecundação cruzada, em média

a cada 7 dias; permanecendo acompanhados por 24 horas. Além disso, a taxa de dose da fonte radioativa utilizada foi consideravelmente menor que a utilizada neste trabalho, assim como as doses de exposição.

Apesar do melhoramento na qualidade dos embriões produzidos ao longo dos 60 dias posteriores à exposição radioativa, esta melhoria não foi constatada em todos os animais do grupo; de fato mesmo aqueles que se recuperaram, não o fizeram na totalidade da desova depositada, sendo observado que sempre estavam presentes embriões inviáveis que não conseguiam se desenvolver.

A porcentagem de inviabilidade variou de indivíduo para indivíduo; e em cada uma das semanas de observação. Em algumas semanas os índices de embriões inviáveis estavam em torno de 30%, em outras, porém, os índices de inviabilidade alcançaram 70%, sem que fosse observado o seguimento de um padrão nessas oscilações.

O período de aumento no número de embriões viáveis produzidos por cada grupo de animais analisados também não foi uniforme. Os animais irradiados com 20 e 30 Gy apresentaram melhoria na viabilidade das desovas 40 dias após a irradiação; os animais irradiados com 40, 50 e 60 Gy apresentaram aumento nos índices de embriões viáveis após 50 dias da irradiação.

Deve ser levado em consideração na análise dos embriões sobreviventes à irradiação, que conforme a literatura, nem todos os animais de uma mesma massa de ovos eclodem ao mesmo tempo (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964a; OKAZAKI et al., 1996). Essa característica foi constatada também neste trabalho, onde cerca de 90% dos embriões controle contidos nas desovas eclodiram em torno do 8º dia, e os demais no 9º ou 10º dia, quando a análise foi finalizada, e os animais não eclodidos foram incluídos na categoria de malformados.

Em relação ao tempo de eclosão, observou-se que alguns embriões originados dos indivíduos irradiados apresentavam-se aparentemente normais no interior do ovo, embora retardados em seu período de eclosão. Alguns chegavam à eclosão dentro de 12 a 15 dias, outros porém não conseguiram eclodir, até que morreram dentro da cápsula ovífera. Este fato indica uma possível alteração, na função da estrutura responsável por proporcionar a eclosão

do embrião no período oportuno. Esta observação está de acordo com teorias apresentadas por Perlowagora-Szumlewicz (1964a); Okazaki et al. (1996) e Melo (1998).

Embora não se conheça até o momento qual estrutura é a responsável por proporcionar a eclosão dos animais, alguns autores estimam que seja através de movimentos contínuos da rádula que a membrana do ovo seja rompida (OKAZAKI et al., 1996; MELO, 1998).

Todas as observações aqui descritas dos efeitos da radiação gama de alta taxa de dose sobre a fecundidade e fertilidade de moluscos *B. glabrata*, corroboram as observações de Azevedo et al. (2004) sobre a alta radiosensibilidade da ovotestis.

4.3 Análise das taxas de mortalidade dos animais adultos irradiados

A Tabela 4 apresenta os percentuais de animais adultos que morreram dentro de 15 dias após a irradiação. Pode-se observar que a radiação teve efeitos letais sobre os animais, principalmente para as maiores doses administradas.

Tabela 4 - Porcentagem de moluscos *B. glabrata* mortos, até 15 dias após a irradiação.

Dose administrada por grupo (Gy)	Mortalidade por grupo (%)
0	0
20	10
30	10
40	10
50	30
60	35

Os dados da Tabela 4 demonstram o aumento na taxa de mortalidade dos caramujos adultos expostos às maiores doses de radiação, indicando assim a ação letal da radiação gama sobre esses animais, corroborando com os dados encontrados por Farvar e Cember (1969) e

Motta et al. (2001). Os dados indicam ainda, que nenhuma das doses testadas conseguiu eliminar mais de 35% da população exposta dentro do período de 15 dias de observação.

Despertou interesse neste trabalho o fato de que as mortes dos animais adultos irradiados só começaram a aparecer 6 dias após a exposição, sendo que mais de 90% dessas mortes ocorreram 8 dias após a irradiação.

Segundo Ruelas et al. (2006), os caramujos letalmente irradiados cessam ou diminuem sua alimentação antes da morte. Esse fenômeno foi confirmado neste experimento, onde se observou que os animais encontrados mortos não haviam se alimentado da alface.

No intuito de avaliar qual a dose mínima de radiação que deve ser utilizada para que sejam observados efeitos de infertilidade nos animais expostos, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis analisando as diferenças entre as respostas ocasionadas pelas diferentes doses de radiação administradas neste experimento. Os resultados indicaram que entre as doses de 20 e 30 Gy, e entre as doses de 40, 50 e 60 Gy não existiram diferenças significativas nos efeitos ocasionados sobre a fertilidade dos indivíduos expostos, representados através do percentual de descendentes mortos, malformados e eclodidos ($p>0,05$).

Esta informação tem particular importância quando se almeja estabelecer protocolos para controle de populações, onde se faz necessária a obtenção de resultados em um tempo mínimo possível, com menor manipulação da fonte radioativa. O baixo índice de embriões viáveis produzidos pelos animais irradiados com 20 e 30 Gy também ganha importância como uma maneira efetiva de controlar a propagação da espécie no ambiente, sem ocasionar desequilíbrios ecológicos decorrentes da morte dos animais irradiados.

Levando-se em consideração a maior radiosensibilidade do *B. glabrata* quando em colônia do que em isolamento sexual (MOTTA; MELO, 1997b; MOTTA et al., 2001), espera-se que no seu habitat natural, no qual os caramujos encontram-se agrupados, os efeitos da radiação gama de alta taxa de dose sejam ainda mais expressivos sobre a fecundidade e fertilidade dos mesmos.

Os resultados obtidos sugerem a continuidade dessa pesquisa através de estudos utilizando doses maiores de radiação, para obtenção da mortalidade de

50% dos indivíduos expostos em 15 dias; bem como estudos dos efeitos da radiação gama sobre caramujos *B. glabrata*, em intervalos de doses menores do que 10 Gy.

Estudos de biologia molecular, mais direcionados para o aprofundamento no conhecimento dos efeitos biológicos das radiações ionizantes sobre os seres vivos; assim como o estudo dos efeitos da radiação gama de alta taxa de dose sobre o controle populacional de moluscos *B. glabrata* em seu habitat natural, levando em consideração seus hábitos e interações com o ambiente, serão de grande valia.

5. CONCLUSÕES

- A radiação gama de alta taxa de dose ocasionou um aumento na fecundidade dos animais irradiados com 20, 30, 40, 50 e 60 Gy, quando comparados aos indivíduos controle;

- A radiação gama de alta taxa de dose, contudo, acarretou uma diminuição nos níveis de fertilidade dos animais irradiados, sendo observado que mais de 94% de seus descendentes não chegaram aos estágios finais do desenvolvimento embrionário, morrendo antes da eclosão;

- Com base na metodologia proposta nesta pesquisa, os resultados indicam que as doses de 20 e 30 Gy são as mais adequadas no controle da reprodução dos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata,* sem que ocorram taxas de morte significativas entre os animais expostos;

- As doses de 50 e 60 Gy devem ser empregadas com cautela, com o intuito de se evitar desequilíbrios ecológicos, visto que levaram à mortalidade de pelo menos 30% da população exposta;

- A radiação gama de alta taxa de dose apresentou grande potencial como agente moluscicida ou de controle populacional de caramujos *Biomphalaria glabrata*, podendo vir a auxiliar no controle da esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPEN, E. L. **Radiation biophysics**. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 1998. 484p.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat:** Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 2007. 324 p. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/noticias.php?cod=3>. Acesso em: 03 Out. 2007.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, nº 3, p. 218-221. Mai./Jun., 2004.

BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual:** um enfoque multidisciplinar. São Paulo: ROCA, 2000. p. 99-103.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CHAVES, M. M.; CORREA, R. F.; COELHO, P. M. Z. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n° 1, p. 73-75. Jan. 2003.

BITELLI, T. **Física e dosimetria das radiações**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 442 p.

BROWN, J. E.; JONES, S. R.; SAXÉN, R.; THORRING, H.; VIVES i BATLLE, J. Radiation doses to aquatic organisms from natural radionuclides. **Journal of Radiological protection**, Washington, v. 24, n° 4A, p. A63-A77. Dec. 2004.

BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, L. B.; BORTHAGARAY, A.; SCARABINO, F. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of the Uruguay: update and predictions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n° 2, p. 235-244. Jun. 2005.

BUSHONG, S. C. Health physics. In:_ **Radiologic science for technologists:** physics, biology and protection. 6th ed. St.Louis: Mosby, 1997. p. 430-493.

CAMARGO, A. C. **Irradiação de alimentos**. Banco de dados. Disponível em: <http://www.cena.usp.br/irradiacao/irrad_alim.htm>. Acesso em: 18 Jul. 2007.

CEMBER, H. **Introduction to health physics**. 3rd ed. New York: MCGraw-Hill, 1996. p. 75-97, 148-161.

CHATY, S.; RODIUS, F.; VASSEUR, P. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (fresh mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, London, v. 69, n° 1, p. 81-94. July 2004.

CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p. 216-219.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). **Diretrizes básicas de proteção radiológica (CNEN-NN-3.01)**. Rio de Janeiro: CNEN, 2005. 26 p. Disponível em: <www.cnen.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm301.pdf>. Acesso em 18 Jul. 2007.

COLLINS, M. V.; FLICK, G. J.; SMITH, S. A.; FAYER, R.; RUBENDALL, E.; LINDSAY, D. S. The effects of E-beam irradiation and microwave energy on eastern oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Oxford, v. 52, n° 6, p. 484-488. Nov. 2006.

COSTA, M. J. E. S.; GRAULT, C. E.; CONFALONIERI, U. E. C. Comparative study of the fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in a laboratory through self-fertilization and cross-fertilization. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, nº 3, p. 157-163. May/June, 2004.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; PARAENSE, W. L.; POINTIER, J; AMARISTA, M.; AYEH-KUMI, P. F. K.; BABIKER, A.; BARBOSA, C. S.; BRÉMOND, P.; CANESE, A. P.; SOUZA, C. P.; DOMINGUEZ, C.; FILE, S.; GUTIERREZ, A.; INCANI, R. N.; KAWANO, T.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N. J. S..; MIMPFOUNDI, R.; NJIOKOU, F.; PODA, J. N.; SENE, M.; VELÁSQUEZ, L. E.; YONG, M.; ADEMA, C. M.; HOFKIN, B. V.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 18, n° 12, p. 2225-2239. Dec. 2001.

DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (eds.). **Sterile insect technique:** principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht: Springer, 2005. 787 p.

DOWD, S. B.; TILSON, E. R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. p. 22-126.

EKABO, O. A.; FARNSWORTH, N. R.; HENDERSON, T. O.; MAO, G.; MUKHERJEE, R. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 59, nº 4, p. 431-435. Apr. 1996.

ELMOR, M. R. D.; VAZ, J. F.; GONÇALVES, L. M. C. Contribuição ao estudo da biologia de *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e de *Biomphalaria tenagophila* (d´Orbigny, 1835), em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n° 5, p. 343-349. Out. 1992.

ESTEVAM, E. C.; NAKANO, E.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutation Research**, London. v. 611, n° 1-2, p. 83-88. Dec. 2006.

FARVAR, M. A.; CEMBER, H. Lethal effects of gamma radiation on the Schistosome larva carrier snail (*Australorbis glabratus*). **American Journal of Public Health**, Washington, v. 29, p. 2077-2080. Nov. 1969.

FRANTSEVICH, L. I.; PAN'KOV, I. V.; ERMAKOV, A. A.; KORNYUSHIN, A. V.; ZAKHARCHUK, T. N. Molluscs as indicators of environmental pollution by radionuclides. **Russian Journal of Ecology**, Yekaterinburg, v. 26, nº 1, p. 47-52. 1995.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier. 1998. p. 275-362.

GAYARRE, M. G.; MACÍAS, M. T. D.; MORILLO, M. M.; SÁNCHEZ, C. O. **Manual de radiología clinica**. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1994. p.16-35.

GEILENKIRCHEN W. L. Cell division and morphogenesis of *Limnaea* eggs after treatment with heat pulses at successive stages in early division cycles. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Hamilton, v. 16, n° 2, p. 321-337. Oct. 1966.

GIORDANI, S.; NEVES, P. S.; ANDREOLI, C. V. *Limnoperna fortunei* ou mexilhão dourado: impactos causados, métodos de controle passíveis de serem utilizados e a importância do controle de sua disseminação. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 23., 2005, Campo Grande.

GIOVANELLI, A.; SILVA, C. L. P. A. C; MEDEIROS, L.; VASCONCELLOS, M. C. The mollusccicidal activity of niclosamide (Bayluscide WP70®) on *Melanoides tuberculata* (thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, nº 5, p. 743-745. July 2002.

GIOVANELLI, A.; VIEIRA, M. V.; SILVA, C. L. P. A. C; Apparent competition through facilitation between *Melanoides tuberculata* and *Biomphalaria glabrata* and the control of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, nº 3, p. 429-431. Apr. 2003.

HAREWOOD, P.; RIPPEY, S.; MONTESALVO, M. Effect of gamma irradiation on shelf life and bacterial and viral loads in hard-shelled clams (*Mercenaria mercenaria*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n° 7, p. 2666-2670. July 1994.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). **Fundamental quantities and units for ionizing radiation**. **ICRU Report 60**. Bethesda: ICRU. 1998. p.13-16.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). Quantities and units for measurement and calculation in medical x-ray imaging. ICRU Report 74. **Journal of the ICRU**, Oxford, v. 5, n° 2, p. 25-34. Dec. 2005.

KAWANO, T.; OKAZAKY, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a pratical guide to the main stages. **Malacologia**, Michigan, v. 34, n° 1-2, p. 25-32. Sept.1992.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d´Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). I - Duração do período embrionário. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.10, n°1, p.57-64. Mar. 1976.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d´Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II - Fecundidade e fertilidade. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 11, n° 1, p. 47-64. Mar. 1977.

KELLER, C. **Radioquímica**. Tradução de Carlos Costa Dantas e Manfred Hubert. Recife: Editora Universitária, 1981. p. 9-17, 48-111.

KUBOTA, Y.; SHIMADA, A.; SHIMA, A. DNA alterations in the progeny of paternally irradiated japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n° 1, p. 330-334. Jan. 1995.

LABORDUS, V.; DEUMER, H. Replication and recovery of nuclear DNA in UV-irradiated eggs of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, gastropoda). **Experimental Cell Research**, London, v. 142, n° 1, p. 25-30. Nov. 1982.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT´ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some plants from northeast Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, County Clare, v. 97, n° 2, p. 199-206. Feb. 2005.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SANTOS, C. C.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, L. A. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n° 5, p. 713-718. July 2003.

MELO, A. M. M. A.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T. Effect of Co-60 gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) embryos. **Journal of Medical and Applied Malacology**, Santiago, v. 8, n. 1, p. 58-59, 1996.

MELO, A. M. M. A. **Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co sobre larvas de "*Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)"**. São Paulo: IPEN. 1998. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações. 64 p.

MONTEIRO, W.; KAWANO, T. Crescimento de órgãos do aparelho reprodutor durante o desenvolvimento de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 58, n° 4, p. 693-705. Nov. 1998.

MOORE, A. S. Radiation therapy for the treatment of tumors in small companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 164, nº 3, p. 176-187. Nov. 2002.

MORAES, I. R.; MASTRO, N. L.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Estudo da sensibilidade ao ^{60}Co do *Vibrio cholerae* incorporado em ostras. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, v. 34, n° 1, p. 29-32. Fev. 2000.

MOSS, W. T.; BRAND, W. N. **Radioterapia clínica**. Barcelona: Salvat Editores, 1973. p. 7-22; 363-386.

MOTTA, M. A.; MELO, A. M. A. Fecundity changes induced by low-doses of gamma radiation on *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1948). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n° 4, p. 559-561. Jul./Aug. 1997a.

MOTTA, M. A.; MELO, A. M. A. $DL_{50/30}$ of Gamma ^{60}Co radiation on *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). **Bulletin of the Institute of Malacology of Tokyo**, Nishi-Tokyo, v. 3, n° 4, p. 59-63. 1997b.

MOTTA, M. A.; CATANHO, M. T. J.; MELO, A. M. A. Growth changes induced by Gamma radiation on *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n° 6, p. 841-844. Nov./Dec. 1999.

MOTTA, M. A.; CARVALHO, E. B.; MELO, A. M. A. DL_{50} of ^{60}Co Gamma rays applied on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Bulletin of the Institute of Malacology of Tokyo**, Nishi-Tokyo, v. 3, n° 8, p. 125-129. 2001.

MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. **Environmental Technology Letters**, Hamilton, v. 8, p. 141-148. 1987.

NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research**, London, v. 536, n° 1-2, p. 145-154. Apr. 2003.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 194-202.

OKAZAKI, K.; ANDRADE JR., H. F.; KAWANO, T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 29, nº 8, p. 1057-1067. Aug. 1996.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: HARBRA, 1986. p. 2-79.

OKUNO, E. **Radiação**: efeitos, riscos e benefícios. São Paulo: HARBRA, 1988. 81p.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Schistosomiasis: age of snails and susceptibility to X-irradiation. **Science**, Washington, v. 17, n° 3616, p. 302-304. Apr. 1964a.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Survival, growth, and fecundity of *Australorbis glabratus* snail developed from eggs exposed to ionizing radiation. **Experimental Parasitology**, London, v. 15, n° 3, p. 232-241. June 1964b.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Estudos relativos aos efeitos da radiação ionizante sobre caramujos com vistas ao combate a estes hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 18, n° 1, p. 139-152. Jan./Mar. 1966.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; BERRY, E. C. Effects of ionizing radiation on *Australorbis glabratus* eggs. **Experimental Parasitology**, London, v. 15, n° 3, p. 226-221. June 1964.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1988. p. 407- 420.

POINTIER, J.- P. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French west Indies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, suppl., p. 67-74. Sept. 2001.

POUGET, J. –P.; MATHER, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. **European Journal of Nuclear Medicine**, New York, v. 28, nº 4, p. 541-561. Apr. 2001.

REY, L. Estratégias e métodos de controle da esquistossomose. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, nº 1, p. 38-55. Jan./Fev. 1987.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1991. p. 109, 110, 665-677.

ROCHA, A. F. G. **Medicina nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p. 12-27, 66-90.

ROCHA, A. F. G.; HARBERT, J. C. **Medicina nuclear**: bases. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 77-95.

ROXO NOBRE M. O.; JUNQUEIRA, A. C. C. **Cancerologia prática**. Vol. 1. São Paulo: Fundo Editorial Procienx, 1967. p. 106-114, 157,158.

ROY, D. Amphibians as environmental sentinels. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 27, n° 3, p. 187-188. June, 2002.

RUELAS, D. S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J. T. Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **Journal of Invertebrate Pathology**, London, v. 93, nº 3, p. 192-200. Nov. 2006.

SCAFF, L. A. M. **Física da radioterapia**. São Paulo: Sarvier. 1997. p.1-17.

SHAW, J. P.; LAWRENCE, D. P.; CHIPMAN, J. K. CYP1A- and CYP3A-immunopositive protein levels in digestive gland of the mussel Mytilus galloprovincialis from the Mediterranean Sea. **Marine Environmental Research**, Plymouth, v. 58, n° 2-5, p. 649-653. Aug./Dec. 2004.

SOUZA, C. P.; MENDES, N. M.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; PEREIRA, J. P. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, nº 5, p. 459-466. Set./Out. 1992.

SOUZA, C. P.; CALDEIRA, R. L.; DRUMMOND, S. C.; MELO, A. L.; GUIMARÃES, C. T.; SOARES, D. M.; CARVALHO, O. S. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, nº 3, p. 293-302. Apr. 2001.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; NETO, E. D.; CAPPA, S. M. G.; CARVALHO, O. S. Molecular study of similar *Biomphalaria* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, suppl.1, p. 169-170. 1998.

STRZELCZAK, G.; VANHAELEWYN, G.; STACHOWICZ, W.; GOOVAERTS, E.; CALLENS, F.; MICHALIK, J. Multifrequency EPR study of carbonate- and sulfate-derived radicals produced by radiation in shells and corallite. **Radiation Research**, Washington, v. 155, n° 4, p. 619-624. Apr. 2001.

TALLARICO, L. F.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Dominant lethal effect of ^{60}Co gamma irradiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research**, London, v. 561, n° 1-2, p. 139-145. Jul. 2004.

TAUHATA, L.; ALMEIDA, E. S. **Radiações nucleares:** usos e cuidados. Vol.1. Rio de Janeiro: CNEN, 1984a. 47p.

TAUHATA, L.; ALMEIDA, E. S. **Radiações nucleares:** usos e cuidados. Vol.2. Rio de Janeiro: CNEN, 1984b. p. 1-15.

TAUHATA, L.; ALMEIDA, E. S. **Radiações nucleares:** usos e cuidados. Vol.4. Rio de Janeiro: CNEN, 1984c. p. 1-25.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, M. A. R. R. **Radioproteção e dosimetria**: fundamentos. 5ª revisão. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetira (IRD)/CNEN, 2003. 242 p. Disponível em: <http://ird.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=45&Itemid=64>. Acesso em: 26 maio 2006.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina nuclear**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 426 p.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. **Developmental and Comparative Immunology**, London, v.25, n° 7, p. 561-564. Sept. 2001.

VERRENGIA GUERRERO, N. R.; MOZZARELLI, M. N.; GIANCARLO, H.; NAHABEDIAN, D.; WIDER, E. *Biomphalaria glabrata*: Relevance of albino organisms as useful tool for environmental lead monitoring. **Bulletin of Environmental Contamination and toxicology**, New York, v. 59, n° 5, p. 822-827. Nov. 1997.

VIDIGAL, T. H. D. A.; NETO, E. D.; SPATZ, L.; NUNES, D. N.; PIRES, E. R.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Genetic variability and identification of the intermediate snail hosts of Schistosoma mansoni. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, Suppl. 1, p. 103-110. Out. 1998.

VIDIGAL, T. H. D. A.; MAGALHÃES, K. G.; CARVALHO, O. S. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n° 4, p. 351-353. Jul./Aug. 2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo