

NOVAS OBSERVAÇÕES SÔBRE O TROPISMO DO MIRACÍDIO DE *S. MANSONI* PELO MOLUSCO *A. GLABRATUS*

Kurt KLOETZEL ⁽¹⁾

RESUMO

Em experiências planejadas para a complementação de observações anteriores, tentamos averiguar se o quimiotropismo entre miracídios de *S. mansoni* e exemplares adultos de *A. glabratus* só se exerceria nas imediações dêste último ou fôsse eficaz também através de distâncias maiores.

Colocando larvas e hospedeiro intermediário em compartimentos comunicantes de uma placa de Petri de pequenas dimensões e criando diversos graus de oportunidade para o encontro entre ambos os organismos, pudemos concluir que é tanto maior a penetração quanto menor a distância que os separa. Por conseguinte não acreditamos na existência de uma "atração miracidiana", conquanto a idéia de um tropismo químico nas proximidades do caramujo nos pareça inconteste.

Pudemos também colher dados numéricos relativos à elevada proporção de miracídios que conseguem a penetração nas condições da experiência, mais um argumento contrário à simples casualidade como único fator responsável por êste setor do ciclo evolutivo do *S. mansoni*.

INTRODUÇÃO

Em 1958, publicamos ⁴ os resultados de uma primeira investigação relativa a um dos aspectos das relações hospedeiro-parasito na esquistossomose, concluindo pela existência de um quimiotropismo entre miracídio e hospedeiro intermediário. Não investigamos a especificidade dêste tropismo, admitindo que seria "possível que outros organismos exerçam atração sôbre as larvas de *S. mansoni*".

Recentemente WRIGHT ⁵ passou em revista o assunto e mostrou-se concorde com as nossas idéias. BARBOSA ³, porém, em tese de Livre-Docência, discorda do termo "atração miracidiana", afirmando pela existência apenas de um "tropismo de penetração" e êste altamente inespecífico.

Tínhamos concluído ⁴ que havia um "tropismo entre larva e hospedeiro, eficiente pelo menos nas imediações do molusco", mas

por diversas vêzes empregamos a palavra "atração" em nosso trabalho. Para BARBOSA ² "atração" necessariamente implicaria numa ação à longa distância e discorda do uso dêste termo; parece-nos ainda que o autor nega a existência de qualquer tropismo outro que o reconhecimento por parte do miracídio de uma superfície que consegue perfurar, conquanto não conseguiu reproduzir em suas três experiências os achados que nos pareciam incontestes: a concentração de miracídios na vizinhança de seu hospedeiro intermediário.

Deliberamos reencetar a investigação do problema, precipuamente visando determinar se o quimiotropismo entre larva e caramujo se fazia sentir à distância do mesmo. Os métodos usados anteriormente não se prestavam à solução desta pergunta e fazia-se

Fac. Medicina da Univ. São Paulo — Clínica de Mol. Trop. e Infectuosas (Prof. J. A. Meira).
(1) Médico da Clínica de Mol. Trop. e Infectuosas.

mister idealizar outras condições experimentais que, dificultando o contato casual entre miracídio e molusco, permitissem aquilatar que papel desempenharia uma “atração” específica.

Em nossa placa (Fig. 1), dois compartimentos iguais comunicam-se através de uma fenda, os miracídios sendo colocados em um dos compartimentos. Nas experiências da série A contamos os miracídios que, movidos pela casualidade, conseguem migrar em tempo-padrão para o lado oposto. Aumentará esta migração se colocarmos um caramujo neste lado oposto? Procuramos responder a esta pergunta por intermédio das experiências da série B.

Quantos miracídios conseguem a penetração na série B? Aumentará esta cifra se facilitarmos o encontro entre larva e hospedeiro intermediário, colocando metade dos miracídios em cada compartimento (série C) ou então juntando no mesmo compartimento miracídios e caramujos (série D)?

MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram realizadas nos meses de setembro e outubro do corrente ano (1960).

Utilizávamos como hospedeiro intermediário exemplares grandes de *A. glabratus* capturados em Paulista (Pernambuco) e mantidos dois anos em nossos aquários. Para obtenção de ovos de *S. mansoni* fizemos uso das fezes de um mesmo paciente, um menino de 11 anos, oriundo de Alagoas. Após repetidas sedimentações lavava-se o sedimento debaixo de uma luz intensa, fazendo-se a eclosão dos miracídios a uma temperatura aproximada de 30°C. As larvas eram colhidas uma a uma com auxílio de pipeta capilar e transferidas para a placa da experiência.

A figura 1 mostra o recipiente que utilizamos. No centro de uma placa de Petri fixávamos com parafina uma lâmina de vidro, sendo esta provida de chanfradura pela qual se criava comunicação entre os dois compartimentos iguais.

A figura 2 ilustra a esquematização das experiências.

Após a transferência de 20 miracídios para a placa de Petri e introdução de caramu-

jo (com exceção da série A), acrescentávamos cerca de 25 ml de água de torneira. Esta era colocada no compartimento oposto aos miracídios, para impedir que fôssem

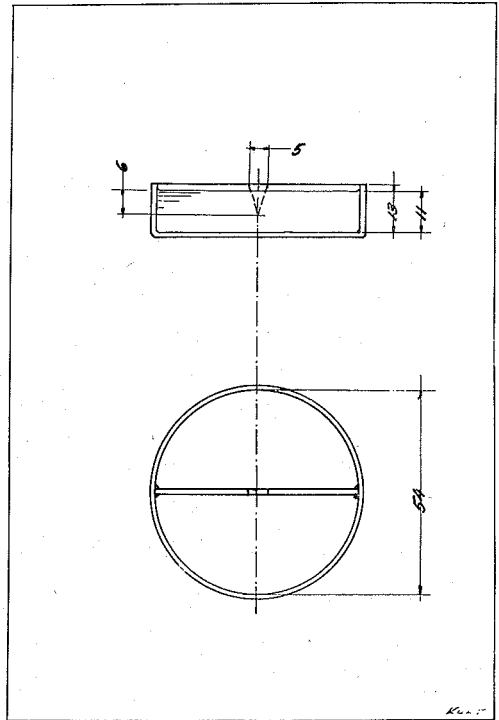


Fig. 1 — O recipiente de vidro utilizado nas experiências.

SÉRIE	ESQUEMA	MIRACÍDIOS EM	
		I	II
A		0	20
B		0	20
C		10	10
D		20	0

Fig. 2 — Esquematização das quatro séries de experiências. (Nota-se que nas séries B, C e D um caramujo foi colocado no compartimento I).

arrastados através da fenda. Na série C obturávamos primeiro a fenda com um pedaço de borracha esponjosa, a seguir introduzindo água simultaneamente em ambos os compartimentos da placa de Petri. A cunha de borracha era removida em seguida.

Cada experiência durava 30 minutos. Terminado êste período a fenda era novamente obturada e, debaixo do microscópio entomológico (aumento 8×), contávamos e removíamos um a um os miracídios dos compartimentos I e II, demorando exatamente 5 minutos para cada compartimento. Antes do início da contagem no compartimento I o caramujo era vigorosamente sacudido dentro da água, a fim de libertar os miracídios ainda não penetrados.

Para impedir que o fototropismo viciasse os resultados, a placa era iluminada por igual.

Com raras exceções efetuávamos sempre seqüências de experiências das quatro séries, alternando a ordem das mesmas. Para cada seqüência utilizávamos o mesmo caramujo, com exceção de duas ocasiões em que êste se retraiu para dentro da concha.

Destarte pensamos haver assegurado condições experimentais idênticas às quatro séries. A série A serviria de contrôle para as demais, permitindo fôsse computado o erro decorrente da delicada metodologia, especificamente da contagem e pipetagem das larvas.

Os parâmetros que escolhemos para expressar nossos resultados foram "deficit em II" e "deficit total". O primeiro é a diferença entre o número de miracídios colocados (20) e o número efetivamente recuperado no compartimento II. Expressa, portanto, não só o erro experimental mas o número de miracídios que migrou para o compartimento anexo. "Deficit total" é a diferença entre o número total de miracídios colocados (20) e o número recuperado em tôda a placa; presumivelmente compreenderá além do erro experimental o número de miracídios já penetrados no caramujo.

A análise estatística obedeceu às normas usuais para séries dêste tipo¹. Duas séries de 15 experiências terão diferenças estatisticamente significativas quando a diferença entre as médias fôr pelo menos 3 vezes o erro-padrão desta diferença.

RESULTADOS

Os resultados das quatro séries estão compreendidos nos Quadros I a IV e a análise estatística das séries reunida no Quadro V.

QUADRO I

Resultado das experiências da série A.

Exper. nº	Contagem final em		Deficit	Total
	I	II	II	
1	5	10	10	5
2	—	15	5	5
3	6	13	7	1
4	2	8	12	10
5	1	14	6	5
6	—	19	1	1
7	6	13	7	1
8	4	13	7	3
9	3	14	6	3
10	4	10	10	6
11	3	14	6	3
12	2	17	3	1
13	2	12	8	6
14	4	12	8	4
15	5	13	7	2
Médias	3,1	13,1	6,9	3,7

QUADRO II

Resultado das experiências da série B.

Exper. nº	Contagem final em		Deficit	Total
	I	II	II	
1	—	12	8	8
2	4	14	6	2
3	4	6	14	10
4	—	8	12	12
5	—	15	5	5
6	1	13	7	6
7	2	9	11	9
8	2	12	8	6
9	3	4	16	13
10	—	12	8	8
11	3	7	13	10
12	1	6	14	13
13	1	12	8	7
14	3	3	17	14
15	4	10	10	6
Médias	1,9	9,5	10,5	8,6

QUADRO III

Resultado das experiências da série C.

Exper. nº	Contagem final em		Deficit total
	I	II	
1	2	7	11
2	—	5	15
3	2	5	13
4	2	7	11
5	5	4	11
6	4	9	7
7	7	3	12
8	2	3	15
9	3	6	11
10	1	8	11
11	5	10	5
12	5	2	13
13	6	4	10
14	1	5	14
15	3	7	10
Médias	3,1	5,7	11,1

QUADRO IV

Resultado das experiências da série D.

Exper. nº	Contagem final em		Deficit total
	I	II	
1	—	1	19
2	1	2	17
3	11	—	9
4	5	1	14
5	1	2	17
6	2	1	17
7	1	—	19
8	6	3	11
9	9	2	9
10	4	1	15
11	3	1	16
12	1	—	19
13	4	—	16
14	4	2	14
15	4	—	16
Médias	3,7	1,1	15,1

QUADRO V

Análise estatística dos resultados das quatro séries de experiências.

Série	Desvio-padrão		Diferença entre médias (a)		Erro-padrão diferença (b)		Relação a/b	
	Def. II	Def. total	Def. II	Def. total	Def. II	Def. total	Def. II	Def. total
A	± 2,7	± 2,5	3,6	4,9	± 1,2	± 1,1	3,0	4,5
B	± 3,7	± 3,4	2,5		± 1,1			2,3
C		± 2,7	6,5		± 1,1			5,9
D		± 3,2						

DISCUSSÃO

Verificamos que na série A um deficit de $3,7 \pm 2,5$ foi registrado em tôda a placa, representando esta cifra o êrro experimental. No compartimento II, todavia, a redução do número de miracídios foi de $6,9 \pm 2,7$,

porquanto inclui a migração de larvas para o compartimento oposto.

Se procedermos como na série B e colocarmos um caramujo no compartimento I, tanto se reduzirá o número de miracídios recuperados em II (deficit de $10,5 \pm 3,7$) como o número total recuperado (deficit to-

tal de $8,6 \pm 3,4$). A diferença entre as duas séries é estatisticamente significativa para ambos os parâmetros, significando que a maior migração de miracídios através da fenda e o desaparecimento de maior quantidade de miracídios do campo visual com toda a probabilidade não se deva ao acaso.

À base de uma análise mais superficial provavelmente estaríamos autorizados a concluir que, a despeito do obstáculo constituído pela fenda estreita, os miracídios "presentem" a existência de um caramujo no compartimento vizinho, o que seria verdadeira "atração à distância".

Todos nós apanhamo-nos freqüentemente no ato de "humanizar" um fenômeno biológico, esta tentação sendo especialmente insinuante no fenômeno do tropismo, ao qual a nossa imaginação sem querer atribui consciência e infalibilidade. WRIGHT⁵ mostrou que a razão pela qual certos pesquisadores negavam o tropismo era a trajetória aparentemente errática e titubeante do miracídio em presença do caramujo, certamente esperando que tropismo implicasse num movimento direto, pronto e infalível em direção ao hospedeiro. Na realidade inúmeras observações científicas mostram que o animal ou a planta que se movem na procura de determinadas condições que lhe assegurem a sobrevivência o fazem erraticamente, o feliz resultado final nada mais sendo que a somatória de grande número de tentativas aparentemente casuais, na rejeição de soluções erradas e aproveitamento das soluções que lhes possam constituir passo em direção ao alvo. À luz desta interpretação o tropismo seria um verdadeiro "jogo de cabra cega", uma busca orientada pelas "informações" captadas, uma trajetória constantemente corrigida. Na ausência destas "informações" o resultado final dependeria da pura casualidade.

Parece-nos já haver provado em nosso trabalho anterior⁴ que existem "informações" para o encontro do miracídio e caramujo. O problema que ora enfrentamos é saber se destes dados a larva já se percebe de longe ou se lhe é preciso chegar à vizinhança do hospedeiro intermediário para que possam ser de utilidade para ela. Em verdade, um organismo com a extraordinária atividade física do miracídio de *S. man-*

soni, não "precisa" de atração à distância para a penetração em seu hospedeiro; mais cedo ou mais tarde encontrar-se-á próximo a êle.

As diferenças estatisticamente significativas entre as séries A e B, verificando-se aumento na migração de larvas quando um molusco estiver presente do lado oposto, poderiam ser explicadas independentemente de uma atração à distância. Verificamos numa série de experiências aqui não incluídas que o movimento através da fenda se faz em ambos os sentidos durante os 30 minutos da experiência, a freqüência destas migrações sendo teoricamente proporcional ao número de larvas que se encontram no compartimento em questão. Fosse idêntica a atividade física de todos os indivíduos e não fosse o esgotamento das reservas nutritivas e deveríamos encontrar no término de algumas horas metade dos miracídios em cada compartimento. Ora, o miracídio que, impellido pela casualidade de seu movimento, consegue atravessar a fenda e, encontrando-se na vizinhança do caramujo, consegue penetração, não migra de volta para II. Será maior nestas circunstâncias o "deficit em II", porquanto a migração praticamente só se fará num sentido.

Para determinar se as "informações" sobre o paradeiro do caramujo são transmitidas à distância será preciso introduzir modificações às condições da série B, facilitando ou dificultando o encontro entre larva e hospedeiro intermediário. Nas séries C e D facilitamos o encontro entre os dois indivíduos, aproximando-os mais. Se fosse verificado que a maior oportunidade para o encontro casual não conferisse vantagem com relação à série B, então poderíamos concluir que o miracídio não necessita de aproximação para atingir o seu alvo, porquanto à distância já tinha conhecimento de sua localização. A comparação entre os "deficits totais" das séries B, C e D nos permitiria decidir esta questão.

Este parâmetro é de $8,6 \pm 3,4$ na série B e de $11,1 \pm 2,7$ na série C. A diferença não é estatisticamente significativa.

O "deficit total" na série D, porém, é $15,1 \pm 3,2$, diferença altamente significativa para com a série B.

Concluimos que, com toda a probabilidade, o quimiotropismo não é eficaz a grandes distâncias e concordamos com BARBOSA² quando afirma que o termo "atração miracidiana" levaria a interpretações errôneas. Mantemo-nos fiel à expressão anteriormente⁴ empregada: "A atividade própria da larva leva-a para junto de seu hospedeiro potencial; a presença de substâncias libertadas pelo molusco a retém".

Esta é a nossa interpretação do tropismo entre miracídio de *S. mansoni* e *A. glabratus*. Segundo nosso conceito, tropismo é a soma de diversos fatores: a enorme atividade da larva, a sua capacidade de rejeitar conchas vazias⁴ ou as paredes de vidro da placa como soluções úteis, a sua habilidade em reconhecer a "informação química" que lhe é comunicada nas proximidades do hospedeiro intermediário. Atração não precisa ser infalível e pode ser exercida por uma série de estímulos parecidos; neste sentido a penetração de miracídios em caramujos em que será fagocitado e mesmo girinos³ não nega a existência de tropismo.

As nossas experiências mostram ainda a grande frequência com que larvas trazidas às imediações de caramujo conseguem a penetração ("deficit total") e aqui não concordamos com BARBOSA³ quando diz: "Mesmo em moluscos muito suscetíveis, poucos são os miracídios que conseguem penetrar". Obviamente não podemos garantir a bem sucedida penetração por parte da grande maioria dos miracídios; mas também não aceitamos a explicação de BARBOSA³, que afirma perderem a atividade e caírem ao fundo do frasco após pouco tempo, porquanto a nossa série A, controle para as demais, mostra um deficit total de apenas $3,7 \pm 2,5$ larvas ao cabo dos trinta minutos.

As técnicas empregadas neste trabalho merecem aproveitamento em outras pesquisas semelhantes, tanto para comparação da especificidade no tropismo entre miracídios e organismos outros que o habitual hospedeiro intermediário, como na determinação da "avidéz" dos miracídios para com caramujos bons ou maus hospedeiros.

SUMMARY

New observations on chemiotaxis between miracidia of S. mansoni and A. glabratus snail.

The present series of experiments was designed so as to extend the scope of a recent paper⁴ and to determine if chemiotaxis between miracidia of *S. mansoni* and the snail *A. glabratus* was effective only in the immediate vicinity of the latter or could reach farther.

Miracidia and snail were put into communicating compartments of a Petri dish and migration of larvae as well as the number succeeding in penetrating their intermediate host were determined under different experimental conditions. We have to conclude that the chance of penetration is proportional to the proximity of snail and larvae and that, therefore, no "attraction" is to be expected.

The high proportion of larvae accomplishing penetration argues against random meetings between miracidia and the intermediate host and, while no far-reaching tropism could be found, we have to confirm our past findings⁴ that there is a definite chemiotaxis, effective only in the vicinity of the snail.

REFERÊNCIAS

1. DAHLBERG, G. — Statistical methods for medical and biological students. London, George Allen & Unwin, 1940.
2. BARBOSA, F. A. S. — Comunicação pessoal.
3. BARBOSA, F. A. S. — Alguns aspectos das relações hospedeiro-parasito entre as fases larvárias do trematódeo *Schistosoma mansoni* e o molusco *Australorbis glabratus*. Recife, 1959. Tese Fac. Med. Univ. Recife.
4. KLOETZEL, K. — Observações sobre o tropismo do miracídio de *Schistosoma mansoni* pelo molusco *Australorbis glabratus*. Rev. brasil. Biol. 18:223-232, 1958.
5. WRIGHT, C. A. — Host-location by trematode miracidia. Ann. trop. Med. & Parasitol. 53:288-292, 1959.

Recebido para publicação em 4 novembro 1960.