

TAMI BOGÉA

TAMI HELENA PESTANA BOGÉA

RITMOS BIOLÓGICOS NA EMERGÊNCIA DE CERCÁRIAS DE  
SCHISTOSOMA MANSONI SAMBON, 1907 (PLATYHELMINTHES: DIGENEA)  
EM INFECÇÕES MONO E PLURIMIRACIDIANAS DE  
BIOMPHALARIA GLABRATA (SAY, 1818) (MOLLUSCA: GASTROPODA)

RIO DE JANEIRO  
1992

TAMI BOGÉA

Ritmos biológicos na emergência de cercárias de Schistosoma mansoni Sambon, 1907 (Platyhelminthes:Digenea) em infecções mono e plurimiracidianas de Biomphalaria glabrata (Say, 1818) (Mollusca:Gastropoda).

Dissertação apresentada à Coordenação de Pós-Graduação em Zoologia do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Zoologia.

Banca Examinadora:

Prof Anna Kohn Hoineff \_\_\_\_\_  
(Presidente da Banca)

Prof\_ Mirian David Marques \_\_\_\_\_

Prof Frederico A. Simões Barbosa

Rio de Janeiro, 14 de setembro de 1992.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bogéa, Tami

Ritmos Biológicos na Emergência de Cercárias de Schistosoma mansoni Sambon, 1907 (Platyhelminthes:Trematoda) em Infecções Mono e Plurimiracidianas de Biomphalaria glabrata(Say, 1818) (Mollusca:Gastropoda). Rio de Janeiro, UFRJ, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional do Rio de Janeiro, 1992.

xiii, 118 f.

Tese: Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia)

1. Ritmos Biológicos 2. Schistosoma 3. Biomphalaria  
4. Dose miracidiana 5. Tese

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, e contou com o apoio financeiro da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

:  
Orientador: Dr. Otávio Sarmiento Pieri.

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Lúcia Rotenberg.

## AGRADECIMENTOS

. Ao Dr. Otávio Sarmento Pieri e à Prof<sup>ma</sup> Lucia Rotenberg, meus orientadores, que, no momento certo, souberam acreditar neste projeto. O incentivo que recebi, aliado à disposição para o debate, foram fundamentais.

. À Tereza Cristina Favre e à Helen Soares da Silva, companheiras de trabalho, que mantiveram o ânimo mesmo quando as dificuldades surgiam.

. A todos no Departamento de Malacologia da FIOCRUZ, e particularmente ao Dr. Lobato Paraense e à Dr<sup>ma</sup>. Ligia Corrêa, que permitiram o acesso às instalações do departamento bem como o fornecimento das amostras.

. Ao Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos (USP), que, em 1986, introduziu-me na Cronobiologia. Em particular, ao Dr. Luis Menna-Barreto e à Prof<sup>ma</sup> Ana Amélia Benedito-Silva pela análise estatística e discussão dos resultados.

. A todos no "Grupo de Sumidouro" do Departamento de Medicina Tropical da FIOCRUZ e, em particular, ao Prof<sup>co</sup> José Roberto Machado e Silva, que possibilitou a utilização do laboratório durante parte da etapa experimental.

. Aos colegas do Departamento de Biologia da FIOCRUZ, pela

solidariedade e apoio durante a realização deste projeto. Em particular, ao Dr. Pedro Jurberg, pelo uso do computador e aos Profs. Julio Barbosa Vianna e Marisa Soares.

À Jorge Nunes do SICT/FIOCRUZ, sempre pronto a ajudar com os computadores.

À Sebastião Enis Reis Couto e Joel Majerowicz do Biotério Central da FIOCRUZ.

Ao Setor de Multi-Meios da FIOCRUZ, pela elaboração das fotos.

À Rosalinde Rodrigues, pela ajuda durante a confecção dos exemplares finais.

À Lupércio Bogéa Filho, pela confecção das figuras e das tabelas.

Aos amigos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, cuja convivência foi - e continua sendo - imprescindível para a conclusão deste trabalho.

A meus pais e irmãos, que viveram toda esta estória.

À Renato Rodrigues, ... por tudo.

Aos amigos Nelma G. de Medeiros e Ricardo Dannemann, ainda neste "barco", pelo apoio que sempre souberam dar!

"We find no vestige of a beginning -  
no prospect of an end".

James Hutton  
(1788)

A meus pais e irmãos.

A Renato.



## RESUMO

Este trabalho investiga o ritmo diário de emergência de cercárias de S. mansoni em infecções mono e plurimiracidianas de B. glabrata. Com este propósito, foram feitas comparações quanto à emergência de cercárias nas fases clara e escura e à localização temporal do pico de emergência. As comparações foram feitas com auxílio de metodologia cronobiológica. A amostra empregada foi de 19 e 37 exemplares de B. glabrata (Belo Horizonte, MG) infectados com um e cinco miracidios de cepa simpátrica de S. mansoni, respectivamente, e mantidos ao ar livre. Observações adicionais foram feitas quanto aos seguintes parâmetros parasitológicos: taxa de infecção, período pré-cercariano, sobrevivência e número de cercárias emergentes a cada 24 horas. A correlação entre a temperatura do ar e número de cercárias emergentes também foi avaliada.

Observou-se uma predominância marcante na emergência de cercárias na fase clara (entre 6:00 e 18:00 h) em ambos os tipos de infecção. Assim, 96,3% das cercárias emergiram nesta fase nas infecções mono e 94,8% nas plurimiracidianas. Quanto ao pico diário de emergência, não foram observadas diferenças significativas entre as infecções mono e plurimiracidianas. A emergência de cercárias na maioria dos moluscos testados apresentou ritmo de 24 horas, com acrofases entre 14:00 e 17:00 horas. Embora se tenha observado grande proporção de cercárias na fase clara, a emergência na fase escura não foi desprezível, atingindo 3,7% nas infecções mono e 5,2%, nas plurimiracidianas. Dois moluscos apresentaram mais de 30% das cercárias emergentes

nesta fase. Não se deve descartar a possibilidade deste padrão estar relacionado à presença de hospedeiros com hábitos crepusculares ou noturnos ou mesmo a rotinas de infecção no laboratório. Neste sentido, a investigação deste ritmo em linhagens de S. mansoni recém-isoladas do campo deve ser encorajada. O ritmo de emergência de cercárias de S. mansoni apresenta algumas características em comum com os ritmos de portão, em que as cercárias parecem "aguardar" um sinal ambiental para emergir. A importância adaptativa da sincronia na emergência das cercárias refere-se a um aumento nas chances de infecção dos hospedeiros vertebrados por estas formas larvais. Futuros estudos que diferenciem ritmo de produção e ritmo de emergência permitirão verificar se as cercárias emergem assim que são produzidas ou não.

O período pré-cercariano, a sobrevivência e o número de cercárias emergentes a cada 24 horas não foram significativamente diferentes entre ambos os tipos de infecção. A taxa de infecção foi maior nas infecções pluri que nas monomiracidianas. As flutuações encontradas nestes parâmetros podem ser atribuídas a diferenças na infectividade do parasita e/ou na suscetibilidade do molusco. Pesquisas futuras, no entanto, devem avaliar possíveis alterações provocadas a curto prazo por rotinas de manutenção das amostras malacológicas e parasitológicas no laboratório. A emergência de cercárias não esteve associada sistematicamente a variações na temperatura ambiental.

## ABSTRACT

This work aims to study the daily rhythm of emergence of S. mansoni cercariae in mono- and plurimiracidial infections of B. glabrata. For this purpose the emergence at daytime and nighttime and its peaks were compared through a chronobiological methodology. For the tests, 19 and 37 specimens of B. glabrata (Belo Horizonte, MG) infected respectively with one and five miracidia of sympatric schistosome were kept at outdoor conditions. Other observations included the estimations of the infection rate, the pre-cercarial period, the survival of infected snails, and the number of emerged cercariae at each 24-h intervals. The correlation between air temperature and the number of emerged cercariae was also investigated.

Most cercariae emerged at daytime (from 6 a.m. to 6 p.m.) for both miracidial doses. Thus, 96.3% of the cercariae emerged in this phase in monomiracidial infections and 94.8% in the plurimiracidial ones. The daily peaks of cercarial emergence did not differ significantly between mono- and plurimiracidial infections. In most snails, the cercarial emergence showed 24-h rhythms with acrophases between 2 p.m. and 5 p.m. Although most of the cercariae emerged at daytime, some did it at nighttime (3.7% in the mono- and 5.2% in plurimiracidial infections). In two snails more than 30% of the cercarial emergence occurred during this phase. This pattern is possibly associated to some crepuscular or nocturnal activities of the vertebrate hosts or even to some infection procedures in the laboratory. Future studies concerning the investigation of this temporal pattern in

S. mansoni strains just isolated from the field should be encouraged. The rhythm of S. mansoni cercarial emergence is considered to be a gated rhythm since the cercariae seem to "wait" for some environmental signal in order to emerge. The adaptive importance of the synchrony in cercarial emergence refers to better chances of these larval forms to infect the vertebrate hosts. Future studies concerning the differentiation between production and emergence rhythms would make it possible to know whether the cercariae emerge as they are produced or not.

The pre-cercarial period, the survival of infected snails and the number of emerged cercariae per snail at each 24 h interval did not differ significantly between mono- and plurimiracidial infections. The infection rates were higher in pluri- than in monomiracidial infections. The variations in these parameters could be due to parasite infectivity and/or snail susceptibility differences. Future work should also evaluate possible short-term modifications due to some laboratory procedures involving both the snail and parasite samples. The cercarial emergence was not systematically associated to variations in the air temperature.

## ÍNDICE

Capítulo	Página
I INTRODUÇÃO .....	1
1- <u>Interações S. mansoni - B. glabrata com ênfase no desenvolvimento cercariano</u> .....	2
1.1 Caracterização do parasita	
1.2 Estágios de desenvolvimento do <u>S. mansoni</u>	
1.3 Efeito da dose miracidiana sobre o desenvolvimento cercariano	
1.4 Influência de fatores intrínsecos e extrínsecos na emergência de cercárias	
2- <u>O estudo dos ritmos biológicos : a Cronobiologia</u> .....	13
2.1 Definições e conceitos gerais	
2.2 Os ritmos de evento único: ritmos em portão	
3- <u>Ritmos biológicos na emergência de cercárias de Schistosoma spp</u> .....	18
4- <u>Objetivos</u> .....	23
II MATERIAL E MÉTODOS .....	25
1- <u>Animais</u> .....	26
1.1 O parasita	
1.2 O hospedeiro intermediário	
2- <u>Manejo com os miracidios</u> .....	27
3- <u>Manejo com os hospedeiros intermediários</u> ..	28
3.1 Exposição aos miracidios e manutenção dos moluscos	
3.2 Detecção dos moluscos infectados	
3.3 Observações cronobiológicas	

4- <u>Tratamento estatístico</u> .....	35
4.1 Ritmos de emergência de cercárias	
4.2 Dados parasitológicos	
4.3 Correlações com a temperatura	
III RESULTADOS .....	39
1- <u>Ritmos de emergência de cercárias</u> .....	40
1.1 Emergência de cercárias nas fases clara e escura	
1.2 Cronogramas	
1.3 Periodogramas	
1.4 Séries temporais	
1.5 Cosinor individual	
1.6 Cosinor populacional	
2- <u>Resultados adicionais</u> .....	62
2.1 Dados parasitológicos	
2.2 Correlações com a temperatura	
IV DISCUSSÃO .....	70
1- <u>Considerações cronobiológicas</u> .....	71
1.1 Ritmos de emergência de cercárias	
1.2 Aspectos populacionais	
2- <u>Considerações adicionais</u> .....	82
2.1 Análise dos dados parasitológicos	
2.2 Correlações com a temperatura	
CONCLUSÕES GERAIS .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
ANEXOS .....	111

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1- Interações S. mansoni - B. glabrata, com ênfase no desenvolvimento cercariano

1.1 Caracterização do parasita

São quatro as espécies do gênero Schistosoma que constituem os agentes etiológicos das parasitoses humanas de maior endemicidade em regiões tropicais e sub-tropicais: as esquistossomoses. As estimativas apontam para 200 milhões de pessoas infectadas em 76 países das Américas, África e Ásia (REY, 1992).

Os esquistossomos pertencem ao filo Platyhelminthes, constituindo um grupo zoológico de espécies inteiramente adaptadas ao parasitismo e apresentando em muitos casos o homem como hospedeiro habitual ou ocasional (REY, 1992). O Schistosoma pertence à classe Digenea, super-ordem Anepitheliocystida, ordem Strigeatida, família Schistosomatidae (COX, 1982). São parasitas heteroxenos, necessitando de mais de um hospedeiro para atingir a maturação. Seu desenvolvimento ontogenético envolve um hospedeiro intermediário (molusco) no interior do qual desenvolvem-se as etapas larvares. Além deste, um hospedeiro definitivo (vertebrado) abriga a fase adulta do parasita; a reprodução sexuada dos esquistossomos ocorre em seu interior.

As espécies que parasitam o homem encontradas nas regiões Neotropical, Etiópica e no Extremo Oriente, são as seguintes: Schistosoma mansoni (responsável por um tipo de esquistossomose intestinal), Schistosoma haematobium (agente



etiológico da esquistossomose urinária), Schistosoma japonicum (responsável por outro tipo de esquistossomose intestinal) e Schistosoma mekongi (semelhante ao S. japonicum porém com distribuição mais restrita). As espécies parasitas de outros mamíferos são: Schistosoma intercalatum (geralmente parasita de roedores), Schistosoma bovis (parasita do gado), Schistosoma mattheei (encontrado no gado da África do Sul) e Schistosoma margrebowiei (comum em antílopes africanos).

No Brasil, o parasita causador da esquistossomose é o S. mansoni. Segundo DOUMENGE *et al.* (1988), 30 milhões de pessoas estão expostas à infecção neste país. A região Nordeste é a mais atingida, com municípios dos Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe apresentando os maiores índices de infecção (REY, 1992).

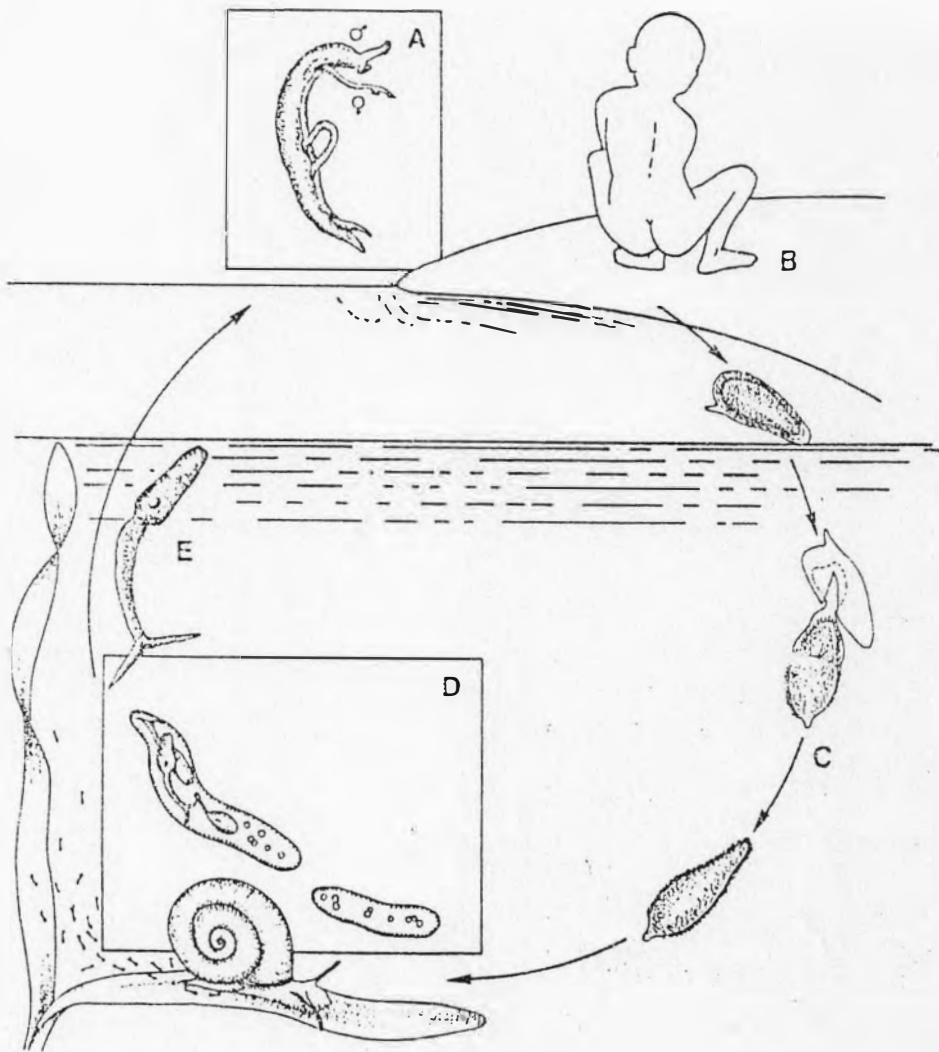
Os hospedeiros intermediários envolvidos na transmissão da doença pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, ordem Pulmonata, sub-ordem Basommatophora, família Planorbidae (PARAENSE, 1972). No Brasil, as espécies vetoras são Biomphalaria glabrata, Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria straminea.

## 1.2 Estágios de desenvolvimento do S. mansoni

A figura 1 apresenta os estágios de desenvolvimento do S. mansoni. Os vermes adultos vivem na luz dos vasos sanguíneos do hospedeiro humano, preferencialmente nas veias da parede intestinal, onde a fêmea põe seus ovos. A fêmea fica alojada no

Figura 1 - Estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*  
(Extraído de Rey, 1991)

- A: Os vermes adultos vivem nas veias da parede intestinal do hospedeiro humano;
- B: Os ovos são conduzidos ao meio externo através da eliminação das fezes;
- C: Os miracidios emergem no meio externo;
- D: As transformações no interior do molusco dão origem aos esporocistos e às cercárias;
- E: As cercárias emergem no meio aquático e penetram ativamente pela pele do hospedeiro humano.



canal ginecóforo do macho (1-A) e produz cerca de 330 ovos por dia. Os ovos apresentam um esporão lateral de aproximadamente 20  $\mu$ m, o que caracteriza a espécie. Os ovos caem na luz do trato intestinal e são conduzidos ao meio externo com a eliminação das fezes (1-B). Há continuidade do desenvolvimento quando as fezes entram em contato com as águas superficiais em tempo útil, permitindo a emergência de uma larva ciliada chamada miracídio (1-C).

O miracídio é o primeiro estágio larvar livre. Ele pode infectar o molusco ao se dispersar no meio aquático. Dentro do molusco, o miracídio sofre uma série de transformações que dão origem aos esporocistos (1-D). Os esporocistos são estágios parasitários decorrentes de multiplicação larval assexuada com base na divisão mitótica (OLIVIER & MAO, 1949). Os esporocistos primários, ou esporocistos-mãe, provenientes da transformação direta do miracídio, produzem os esporocistos secundários, ou esporocistos-filhos, que colonizam a glândula digestiva do molusco. Os esporocistos secundários geralmente produzem um grande número de larvas chamadas cercárias (1-E) que emergem ativamente do molusco para o meio aquático exterior.

As cercárias constituem-se no segundo estágio larvar livre no desenvolvimento dos esquistossomos. Elas dispersam-se no meio aquático e podem infectar o hospedeiro vertebrado por penetração cutânea ativa durante o contato do hospedeiro com a água contaminada. A penetração no hospedeiro deve ocorrer de 6 a 8 horas após a emergência para o meio externo (REY, 1992), já que

o tempo de vida da cercária é reduzido e sua infectividade, decrescente. Durante a penetração pela pele, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que migram para o sistema porta-hepático, onde se desenvolvem e alcançam a maturidade sexual.

### 1.3 Efeito da dose miracidiana sobre o desenvolvimento das cercárias

A influência da dose miracidiana sobre os mecanismos de regulação, produção e emergência cercarianas em S. mansoni é bastante conhecida (FAUST & HOFFMAN, 1934; PAN, 1965; WEBBE, 1965; STURROCK & STURROCK, 1970; MOUGEOT & GOLVAN, 1974; LANCASTRE et al., 1976; CHRISTIE & PRENTICE, 1978; LEWIS et al., 1986). Sabe-se de longa data que a infecção por um miracídio leva à produção de cercárias de um só sexo, já que o sexo do parasita é determinado na fase ovular (LAGRANGE, 1958). No S. mansoni, THERON (1981a, 1982b, 1986a) distinguiu dois mecanismos no interior do molusco que atuam na regulação e na produção cercarianas: a esporocistogênese e a cercariogênese.

A esporocistogênese e a cercariogênese foram investigadas a partir de estudos realizados em infecções monomiracidianas (onde o molusco é exposto experimentalmente a um miracídio) e plurimiracidianas (com o molusco exposto a mais de um miracídio). Estes estudos revelam que a população de esporocistos varia qualitativamente no decorrer da infecção no molusco, em função das diferentes possibilidades de evolução dos esporocistos

secundários. Assim, os esporocistos secundários podem: (a) produzir sucessivas gerações de cercárias -- os esporocistos cercariogênicos -- (CHERNIN, 1964), (b) degenerar e ser encapsulados por células amebocitárias do sistema imunológico do molusco (THERON & JOURDANE, 1979) ou ainda (c) cessar a produção de cercárias para fabricar novas gerações de esporocistos -- os esporocistos replicadores (THERON, 1982b).

Em infecções monomiracidianas, a esporocistogênese é dividida em três etapas distintas (THERON, 1981a). A primeira refere-se à fase de invasão do molusco pelo parasita. Ela compreende a produção de esporocistos secundários a partir de esporocistos primários e a migração daqueles dos órgãos periféricos do molusco para a glândula digestiva. A segunda corresponde à fase de crescimento da população de esporocistos cercariogênicos. Esta é assegurada pelos esporocistos replicadores que aumentam progressivamente a população de esporocistos. Na terceira, a fase de ocupação ótima, a população de esporocistos ocupa ao máximo a capacidade biótica do hospedeiro. A replicação dos esporocistos intervém somente para renovar o estoque deficiente de esporocistos, mantendo a população em seu nível ótimo e, com isso, alterando a produção de cercárias (CHENG & BIER, 1972; DICONZA & HANSEN, 1972; HANSEN, 1973; JOURDANE et al., 1980; THERON, 1981b, 1982b; WARD et al., 1988).

Nas infecções plurimiracidianas, esta dinâmica modifica-se. O aumento da dose miracidiana é responsável por um aumento no estoque de esporocistos secundários durante a fase de invasão do

molusco. Entre um e dois miracídios, a produção de cercárias praticamente dobra. Para doses iguais ou superiores a dois miracídios, as variações na produção são mais restritas. As observações acerca do desenvolvimento de esporocistos primários e secundários em infecções plurimiracidianas mostram que, a partir de dez miracídios, os mecanismos reguladores entram em ação limitando o aumento da produção em um nível compatível com a sobrevivência dos moluscos. Estes mecanismos agem tanto no nível da penetração dos miracídios quanto no desenvolvimento de esporocistos primários e secundários (WEBBE, 1965; THÉRON, 1985b). O aumento no número de miracídios que infectam o molusco é responsável por uma aceleração no crescimento da população de esporocistos. Desta forma, uma forte produção é observada em infecções plurimiracidianas jovens. Após quatro ou cinco meses de infecção, os mecanismos de controle ligados à dose miracidiana são deflagrados. Neste momento, as infecções mono e plurimiracidianas apresentam quantidades equivalentes de esporocistos cercariogênicos, graças à intervenção dos esporocistos replicadores. A produtividade cercariana alcança valores ótimos independente da dose miracidiana, com o parasita explorando toda a capacidade biótica do hospedeiro. A biomassa do molusco passa a ser o fator limitante da produção (THÉRON, 1985b).

A cercariogênese caracteriza-se por uma sincronia no desenvolvimento embrionário que é uma consequência lógica da origem comum dos esporocistos secundários (provenientes de um mesmo esporocisto primário) e do tempo limitado de sua produção pelo esporocisto primário. Assim, ao fim do período pré-

cercariano -- o tempo necessário ao desenvolvimento completo das cercárias dentro dos moluscos (FRANSEN, 1979)--, a maioria dos esporocistos secundários alcança o final da diferenciação. Após a expulsão da primeira leva, há um decréscimo na emergência de cercárias. O conjunto de esporocistos secundários -- ~~em desenvolvimento~~. Ao alcançar a maturação, estas cercárias serão, por sua vez, liberadas pelos esporocistos, sendo responsáveis por uma nova leva de intensa emergência cercariana (THÉRON, 1981a). A diferenciação das cercárias faz-se, portanto, por levadas sucessivas e a manutenção da cercariogênese é assegurada pela renovação periódica do material intra-esporocístico (PAN, 1965; CHENG & BIER, 1972; THÉRON, 1985b).

A influência da dose miracidiana sobre a emergência de cercárias tem sido pouco investigada. Em infecções monomiracidianas de S. mansoni, por exemplo, é observada uma alternância de etapas com alta e baixa emergência a intervalos que variam de 35 a 40 dias (COMBES & THÉRON, 1977; THÉRON & MONÉ, 1984). Estes intervalos correspondem à duração do período pré-cercariano do parasita, que é de 32-33 dias, podendo estar relacionados ao tempo necessário para a maturação das cercárias no esporocisto primário (THÉRON, 1981a). Quando se usa a dose miracidiana de 10 mirácidos, no entanto, esta alternância desaparece (THÉRON, 1981a, 1982b), o que provavelmente relaciona-se à defasagem no desenvolvimento dos estoques de esporocistos vindos de diferentes mirácidos. Observações semelhantes são descritas para S. haematobium (KECHEMIR, 1982).

Diferenças quanto ao número de cercárias emergentes entre as infecções mono e plurimiracidianas são uma controvérsia. THÉRON (1982b) afirma que as infecções monomiracidianas apresentam um menor contingente de cercárias emergentes que as infecções com dois miracídios. Já STURROCK & STURROCK (1970) observaram que os números de cercárias emergentes são semelhantes entre as infecções monomiracidianas e as com quatro miracídios.

Os estudos que envolvem a manipulação da dose miracidiana mostram uma grande variabilidade na produção cercariana, esta indiretamente avaliada através da taxa de emergência de cercárias. MOUAHID & COMBES (1987) observam que o aumento da dose miracidiana de um para cinco miracídios provoca um decréscimo na produção cercariana de S. bovis originário do Sudão e um aumento na de S. bovis proveniente da Espanha. Segundo os autores, as respostas a variações na dose miracidiana dependem de características inerentes à amostra do parasita, o que possivelmente reflete uma variabilidade genética presente nas populações de esquistossomos.

#### 1.4 Influência de fatores extrínsecos e intrínsecos na emergência de cercárias

A emergência de cercária em S. mansoni está sujeita a fatores extrínsecos e intrínsecos (THÉRON, 1982b). Dentre os fatores extrínsecos, a luz e a temperatura são os mais conhecidos. A maioria dos autores aponta a luz como o fator ambiental mais importante (GIAVANNOLA, 1936; LUTTERMOSER, 1955; VALLE *et*



al., 1971, 1973; GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1978, 1982; WILLIAMS & GILBERTSON, 1982; WILLIAMS et al., 1984; RAYMOND & PROBERT, 1987, 1991), embora reconheçam a importância da temperatura (VALLE et al., 1971; NOJIMA & SATO, 1978; WILLIAMS et al., 1984). Para outros, variações na temperatura exercem maior influência (STIREWALT, 1954), já que mudanças bruscas neste fator exercem maiores efeitos sobre a emergência que as mudanças na intensidade luminosa (KUNTZ, 1947). Outros fatores relevantes são o número de moluscos em um só recipiente (COLES, 1973; CARLOS & COELHO, 1978), a idade, o tamanho e a suscetibilidade dos moluscos (ANDERSON et al., 1982), a magnitude da temperatura durante o desenvolvimento cercariano (THÉRON, 1982b) e a composição química do meio aquático (CHRISTENSEN et al., 1979).

Dentre os intrínsecos, a variabilidade interindividual é um fator importante, já que entre os diferentes moluscos infectados com linhagem simpátrica e compatível, a produção cercariana pode até mesmo triplicar. Outro fator intrínseco relevante é a origem geográfica dos moluscos e dos parasitas (THÉRON, 1982a; MOUAHID & COMBES, 1987; CHASSÉ & THÉRON, 1988).

A emergência de cercárias não ocorre em qualquer momento das 24 horas. Em S. mansoni, a quantidade de cercárias na água aumenta gradativamente durante a manhã, é abundante à tarde e diminui no início da noite. Quando analisado ao longo dos dias, observa-se que este padrão temporal é recorrente. O item seguinte apresenta alguns aspectos relevantes que permitem entender os fenômenos biológicos recorrentes, tais como a

emergência cercariana, à luz de uma nova disciplina: a  
Cronobiologia.

## 2- O estudo dos ritmos biológicos : a Cronobiologia

### 2.1 Definições e conceitos gerais

**Ritmo biológico** é definido como a recorrência, a intervalos mais ou menos regulares, de um evento em um sistema biológico (KALMUS, 1935 apud ASCHOFF, 1981). Como exemplos, é possível citar a queda anual das folhas de árvores decíduas, variações anuais em aspectos da reprodução em mamíferos, a alternância diária na abertura e fechamento das folhas em alguns vegetais, a oscilação da temperatura corporal em animais (incluindo o homem) e as mudanças a intervalos de 12 horas observadas no plâncton, em carangueijos e em aves marinhas relacionadas aos movimentos de marés. A divisão celular também constitui um exemplo, já que se repete a intervalos regulares da ordem de segundos (GARFIELD, 1988). Em resumo, a atividade rítmica pode manifestar-se nos níveis celular e sub-celular, em diferentes tecidos, órgãos e sistemas de órgãos, no indivíduo e mesmo em populações de indivíduos (REINBERG, 1977).

O **período** é um parâmetro importante na caracterização de um ritmo, sendo definido como a duração de uma oscilação completa em uma variação rítmica (HALBERG et al., 1977). Tome-se por exemplo a curva diária da temperatura corporal em humanos. Após a escolha de um ponto de referência (que pode ser o ponto em que a temperatura atinge seu valor máximo), observa-se que ela atinge novamente este valor aproximadamente 24 horas depois. Assim, seu período é estimado como de 24 horas.

Durante séculos, acreditou-se que os ritmos detectados nos organismos eram respostas às flutuações ambientais tais como as alterações nos ciclos claro/escuro e de temperatura ao longo das 24 horas (REINBERG & SMOLENSKY, 1983). Hoje, sabe-se que a maior parte dos ritmos biológicos não é diretamente causada por estímulos regularmente recorrentes no ambiente (ASCHOFF, 1967) mas sim gerada no interior dos organismos, conferindo-lhe um caráter endógeno. Alguns ritmos biológicos, entretanto, possuem origem exógena e caracterizam-se por dependerem exclusivamente das variações recorrentes em certos fatores do ambiente (REINBERG, 1977; BRADY, 1982), sendo abolidos na ausência destas variações.

Nos experimentos destinados à detecção dos ritmos endógenos, o organismo analisado é transferido para situações de constância ambiental (p.ex., ausência de ciclos de claro/escuro e de flutuações na temperatura ambiental, de ruídos ou até de interações com outros membros da espécie). Nestes experimentos, o período do ritmo modifica-se gradativamente. No caso dos ritmos diários, ele assume valores próximos a 24 horas (como, por exemplo, 25 horas). O prefixo *circa* foi introduzido em referência a estas situações (HALBERG, 1959). Assim, um ritmo biológico com período de cerca de 24 horas é chamado de **circadiano**. O uso deste prefixo foi posteriormente estendido a outros ritmos endógenos, como os **circamarés**, os **circalunares** e os **circanuais** (ASCHOFF, 1967; 1981). O espectro de frequências também pode ser subdividido em ritmos **ultradianos** e **infradianos** que apresentam, respectivamente, períodos mais curtos e mais longos que os circadianos. A partir deste momento, este item dará maior ênfase

aos aspectos relacionados com os ritmos diários, que são objeto do presente estudo.

O estudo dos ritmos endógenos possibilitou em grande parte o estabelecimento da Cronobiologia como uma disciplina científica nos anos 50. No entanto, esta tomou um grande impulso somente na década seguinte (CAMBROSIO & KEATING, 1983; GARFIELD, 1988). Segundo HALBERG *et al.* (1977), a Cronobiologia é considerada a ciência que quantifica e estuda objetivamente aspectos temporais da matéria viva, dentre os quais os ritmos biológicos. REINBERG (1977) e CAMBROSIO & KEATING (1983) assinalam que alguns autores insistem na necessidade de que este estudo rigoroso e objetivo seja feito nas disciplinas biológicas já existentes, não constituindo, portanto, uma especialidade.

O surgimento da Cronobiologia está estreitamente relacionado ao desenvolvimento de um planejamento e de uma análise estatística que privilegiam o estudo detalhado das variáveis biológicas ao longo do tempo. Procedimentos que envolvem coletas de dados feitas a intervalos tão regulares quanto possível e o controle ou a monitoração das variáveis ambientais são aspectos indispensáveis à metodologia cronobiológica (REINBERG & SMOLENSKY, 1983).

Uma ritmicidade endógena não tem qualquer relevância ecológica a não ser que possa ser "ajustada" aos ciclos ambientais (ENRIGHT, 1970). Este ajuste, denominado **sincronização** (BUNNING, 1960), leva o ritmo endógeno a assumir o período do ciclo

ambiental, favorecendo a ocorrência de um determinado fenômeno no momento adequado. Ciclos de luz e temperatura, a disponibilidade ou não de alimento e as interações sociais podem atuar como **sincronizadores** (HALBERG et al., 1977). Dentre estes, o ciclo de luz é o mais potente para a maioria dos organismos.

Na sincronização dos ritmos endógenos, os ciclos ambientais não atuam diretamente sobre a variável rítmica mas sim sobre as vias de transmissão do **relógio biológico** -- mecanismo interno associado à medição do tempo (BÜNNING, 1967). Por outro lado, a expressão dos ritmos biológicos também é influenciada diretamente por fatores ambientais, cíclicos ou não. Assim, a ritmicidade observada em condições naturais resulta da interação entre efeitos diretos do ambiente e os ritmos gerados endogenamente (WATERHOUSE & MINORS, 1988), promovendo uma melhor integração ecológica entre o organismo e seu ambiente (ASCHOFF, 1987 apud MINORS & WATERHOUSE, 1989).

Como visto anteriormente, os ritmos biológicos são observados em diferentes níveis de organização, podendo também manifestar-se no nível populacional. Uma das modalidades dos ritmos populacionais refere-se a fenômenos envolvidos nas etapas de desenvolvimento ontogenético. Suas características próprias serão apresentadas a seguir, já que as cercárias constituem uma das fases larvares no desenvolvimento dos esquistossomos.

## 2.2 Os ritmos de evento único: os ritmos em portão

Eventos relacionados às etapas de desenvolvimento, tais como a postura de ovos, pupação e eclosão de pupas em insetos,

ocorrem apenas uma vez na vida do individuo. Desde que o processo de desenvolvimento esteja completo, observa-se que o animal emerge ou eclode em um intervalo de tempo restrito (SAUNDERS, 1977), fora do qual o fenômeno não se manifesta. A este intervalo de tempo dá-se o nome de **zona permissiva** ou **portão**. Embora o ritmo não se refira ao individuo, observa-se um ritmo populacional quando um conjunto de individuos em diferentes estágios de desenvolvimento é estudado ao longo do tempo. Este fenômeno é conhecido como **ritmo em portão** (PITTENDRIGH, 1966).

O ritmo em portão foi originalmente descrito por PITTENDRIGH em 1966 quando do estudo do ritmo de emergência do adulto em Drosophila pseudoobscura (PITTENDRIGH & MINIS, 1964; PITTENDRIGH, 1966; PITTENDRIGH & SKOPIK, 1970). Estes ritmos também são descritos para lepidópteros (TRUMAN, 1971, 1972), coleópteros (MINIS, 1965 apud PAGE, 1985) e aracnídeos ectoparasitas (DOUBE, 1975). Neste último estudo, realizado em Ornithodoros gurneyi (carrapatos de canguru), o parasita ajusta seu ritmo ao ritmo circadiano de atividade do hospedeiro.

Os ritmos em portão relacionam-se a eventos cruciais na vida de um organismo, ocorrendo geralmente em animais com tempo de vida curto (ASCHOFF, 1989). Sua importância ecológica refere-se, por exemplo, à concentração de individuos aptos para a reprodução, podendo também contribuir para a redução da competição intraespecífica. Quanto ao controle deste fenômeno, pouco se sabe. Trata-se de eventos que podem ser determinados exógena ou endogenamente.

3- Ritmos biológicos na emergência de cercárias de Schistosoma spp.

A emergência de cercárias nos esquistossomos constitui-se em um exemplo de ritmo diário, sendo caracterizado pela presença de variações recorrentes a períodos de 24 horas, aproximadamente (HAWKING, 1975). Este padrão temporal varia de espécie para espécie e em uma mesma espécie do parasita.

A comparação da emergência de cercárias em S. mansoni entre as fases clara e escura revela que esta ocorre predominantemente na fase clara do ciclo de luz (GIAVANNOLA, 1936; WILLIAMS & GILBERTSON, 1982; WILLIAMS et al., 1984). Porém, os intervalos que correspondem à maior emergência são muito variáveis tanto nos trabalhos conduzidos no campo ou ao ar livre (BARBOSA & COELHO, 1954; ROWAN, 1958; PELLEGRINO & DE MARIA, 1966; PITCHFORD & VISSER, 1966; PITCHFORD et al., 1969) como em estudos de laboratório (LUTTERMOSER, 1955; VALLE et al., 1971, 1973; ASCH, 1972, GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1978, 1982; THÉRON, 1980; MACHADO E SILVA, 1981; THÉRON & COMBES, 1983).

Em estudos realizados ao ar livre em S. haematobium, PITCHFORD & VISSER (1966) e PITCHFORD & DUTOIT (1976) detectaram um pico diurno enquanto que NOJIMA & SATO (1978, 1982) confirmaram a ocorrência deste pico em laboratório, ainda que em horário diferente. Este padrão parece correlacionar-se à atividade do hospedeiro humano nas regiões endêmicas. Já RAYMOND & PROBERT (1987) detectaram no laboratório, um pico na fase clara e outro na fase escura.



Picos diurnos são também descritos tanto no laboratório quanto ao ar livre para S. bovis (PITCHFORD & VISSER, 1966; PITCHFORD et al., 1969; MOUAHID & COMBES, 1987; MOUAHID & THÉRON, 1986), S. mekongi (LOHACHIT et al., 1980), S. matheei (PITCHFORD & VISSER, 1966; PITCHFORD et al., 1969), S. leiperi (PITCHFORD & DUTOIT, 1976) e S. intercalatum (PAGÈS & THÉRON, 1990).

Em S. japonicum, KOMIYA & ISHII (1954) não observaram qualquer ritmicidade no padrão de emergência. THÉRON & MINGYI (1986), no entanto, detectaram picos na fase clara e NOJIMA et al. (1980), em estudos realizados sob condições de ar livre, demonstraram dois picos diurnos sendo um deles não recorrente. KAWASHIMA et al. (1985), contrariamente, atestaram picos na fase escura nesta espécie.

Em S. rodhaini, o pico do ritmo ocorre no crepúsculo vespertino (PITCHFORD & VISSER, 1966; PITCHFORD et al., 1969) e se relaciona à participação de roedores noturnos nos sítios de transmissão da esquistossomose em algumas regiões. Em S. margrebowiei, há um pico diurno e outro crepuscular correspondentes às horas em que os hospedeiros vertebrados (antílopes) bebem água (PITCHFORD & DUTOIT, 1976; RAYMOND & PROBERT, 1991).

Além de variações interespecíficas nos padrões temporais de emergência de cercárias, os estudos acima mencionados revelam também variações intraespecíficas que se traduzem por uma grande

variabilidade no momento em que ocorrem os picos de emergência de cercárias. Esta variabilidade pode ser atribuída às condições experimentais por vezes muito diferentes entre os diversos estudos (VALLE et al., 1973; COMBES & THERON, 1977; FRANSEN, 1979). A utilização de ciclos naturais e artificiais de luz e/ou temperatura, a coleta de dados realizada a cada 12 horas ou a intervalos menores, a idade do molusco empregado e a dose miracidiana a que os moluscos são expostos são possíveis explicações para estas variações.

Já THERON e colaboradores sugerem a existência de um polimorfismo cronobiológico, atribuindo a estas variações uma base genética. Seus estudos foram realizados em populações de S. mansoni provenientes da ilha de Guadeloupe, nas Antilhas (THERON, 1984). Em diferentes sítios de transmissão, populações de S. mansoni apresentaram três fenótipos cronobiológicos distintos. Tais fenótipos caracterizam-se por picos de emergência de cercárias nos horários compreendidos entre 11:00 e 12:00 h, 13:00 e 14:00 h e 16:00 e 17:00 h, sendo classificados como precoces, intermediários e tardios, respectivamente. As frequências destes fenótipos têm sido correlacionadas à importância relativa, nos sítios de transmissão, de diferentes hospedeiros definitivos. Assim, os fenótipos tardios podem ser favoráveis à infecção de roedores cuja atividade é crepuscular ou mesmo noturna. A participação conjunta de homem e roedor nos sítios de transmissão relaciona-se à presença de fenótipos intermediários. Nos sítios nos quais as cercárias apresentam fenotipo precoce, a participação

do homem é essencial para manter a dinâmica da transmissão (THERON, 1980; 1982a,b; 1984; 1985a; 1986a,b; FOURNIER et al., 1984; THERON et al., 1986; CHASSE & THERON, 1988; POINTIER et al., 1988; THERON & COMBES, 1988). Neste contexto, os fenótipos cronobiológicos podem ser considerados marcadores de populações de Schistosoma, o que segundo THERON (1985a), possibilitará um novo enfoque à ecologia e à genética das populações de esquistossomos. Variações cronobiológicas intraespecíficas também foram detectadas em S. haematobium (KECHEMIR, 1990), S. intercalatum (PAGES & THERON, 1990), S. japonicum (THERON & MINGYI, 1986) e S. bovis (MOUAHID & COMBES, 1987).

Os diversos padrões intra e interespecíficos observados nas espécies de Schistosoma ilustram diferentes estratégias de transmissão possivelmente relacionadas ao pequeno intervalo de tempo entre a emergência da cercária e sua penetração no hospedeiro. O curto tempo de vida e a infectividade decrescente das cercárias são "...contrabalançados pela sua concentração nos momentos mais favoráveis à infecção do hospedeiro..." (COMBES, 1990). Isto mostra como os ritmos biológicos podem ser "...cruciais na vida do parasita ao aumentar as chances de encontro com o hospedeiro..." (THERON, 1982b).

Ao se avaliar os riscos de infecção por cercárias de S. mansoni, deve-se levar em conta a correnteza do meio aquático. Quando a correnteza é fraca ou nula, as cercárias acumulam-se na água, sendo mais abundantes no final da tarde. Nestas condições, os riscos de contaminação são maiores neste período (ROWAN, 1958;

MALDONADO, 1959; THERON et al., 1977).

Uma questão ainda em aberto refere-se ao ritmo de emergência como decorrência direta de fatores do hospedeiro ou como uma propriedade intrínseca do parasita. ASCH (1972) considera que o molusco desempenha um papel direto na emergência de cercárias em S. mansoni. Outros autores sugerem que é o parasita que determina o seu próprio ritmo de emergência (THERON, 1980, 1984, 1985a; MOUAHID & THERON, 1986; THERON & MONE, 1986; PAGES & THERON 1990 ; MOUAHID et al., 1991) pois o pico do ritmo permanece o mesmo, independente da linhagem e da espécie de molusco empregada (THERON & COMBES, 1983, 1988). Observações semelhantes foram feitas em S. bovis (MOUAHID & THERON, 1986).

A caracterização de ritmos biológicos sob ciclos ambientais naturais evita artefatos decorrentes de determinados aspectos dos ciclos artificiais de luz e temperatura, tais como as transições abruptas nestes fatores. No caso específico das cercárias de S. mansoni, isto parece particularmente verdadeiro, já que há um aumento imediato no número de cercárias emergentes, em resposta a variações bruscas na luz (ASCH, 1972; GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1978, 1982) bem como na temperatura (KUNTZ, 1947). Dificuldades deste tipo poderiam ser superadas através da simulação dos crepúsculos, que já se mostrou adequada ao estudo da emergência de cercárias nesta espécie (THERON & MONE, 1986), ou da caracterização dos ritmos sob condições de ar livre, raramente presente em estudos que envolvam este parâmetro.

#### 4- Objetivos

Embora se saiba que a dose miracidiana afeta a produção e emergência de cercárias de S. mansoni, pouco se conhece sobre a influência deste fator sobre o ritmo diário de emergência, conforme visto até aqui. Além disto, estudos que envolvam a caracterização deste ritmo sob ciclos naturais de luz e temperatura, bem como os que utilizam um instrumental específico para o estudo de ritmos biológicos, são raramente encontrados na literatura.

Assim, o objetivo deste trabalho é investigar o ritmo diário de emergência de cercárias de S. mansoni em infecções mono e plurimiracidianas de exemplares de B. glabrata mantidos ao ar livre. Para a caracterização, foram determinados para cada molusco:

- (a) o número de cercárias emergentes nas fases clara e escura;
- (b) o período que melhor explica a variação dos dados; e
- (c) o pico de emergência, também comparado entre os moluscos expostos a cada tipo de infecção.

Os conjuntos de moluscos respectivamente expostos às infecções mono e plurimiracidianas foram comparados quanto aos seguintes parâmetros:

- (a) número total de cercárias nas fases clara e escura; e
- (b) o pico de emergência de cercárias.

Foram ainda comparados os seguintes parâmetros

parasitológicos: taxa de infecção, sobrevivência dos moluscos, período pré-cercariano e o número de cercárias emergentes. Também foram efetuadas correlações entre o número de cercárias emergentes e a temperatura ambiental.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

## 1- Animais

### 1.1 O parasita

A amostra de S. mansonii foi cedida pelo Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, sendo proveniente de fezes de camundongos da linhagem Swiss-Webster infectados experimentalmente. Esta amostra foi isolada em 13 de maio de 1985 a partir de exemplares melânicos de B. glabrata naturalmente infectados, originários de um sítio de transmissão humana no bairro da Ressaca, Belo Horizonte, MG. Desde então, ela vem sendo mantida naquela linhagem de camundongos. No presente trabalho, foram utilizadas a quarta e a quinta passagens (PARAENSE & CORRÊA, 1989). Cada passagem compreendeu todos os procedimentos que envolvem desde a exposição dos camundongos às cercárias até uma nova exposição, a intervalos de um ano, aproximadamente.

### 1.2 O hospedeiro intermediário

Exemplares melânicos de B. glabrata foram provenientes de colônias de laboratório originárias de moluscos coletados no bairro da Ressaca em Belo Horizonte, MG. Os moluscos foram cedidos pelo Departamento de Malacologia do IOC.



## 2- Manejo com os miracidios

Fezes de camundongos infectados com S. mansoni eram diluídas em água à temperatura de aproximadamente 4° C. Após execução de técnica de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919), os sedimentos eram distribuídos em placas de Petri com diâmetro de 9 cm. A eclosão dos miracidios era provocada pela exposição das placas a uma lâmpada incandescente (Sylvania 60 w) por 15 a 20 minutos, à distância de aproximadamente 10 cm.

Os miracidios eclodidos eram visualizados com auxílio de microscópio estereoscópico, marca Bausch & Lomb, com aumento de 60 vezes. Com auxílio de pipeta Pasteur, eles eram coletados e depositados em poços de placas para cultura de tecidos tipo 3424 Mark II, marca Costar, até obter-se a dose miracidiana desejada. Apenas os miracidios muito ativos eram coletados. Em cada poço, o excesso de fezes era removido com a pipeta, para evitar a eclosão de novos miracidios.

### 3- Manejo com os hospedeiros intermediários

#### 3.1 Exposição aos miracidios e manutenção dos moluscos

Exemplares de B. glabrata eram distribuídos em dois lotes. O primeiro era exposto a um miracidio (infecção monomiracidiana); o segundo, a cinco miracidios (infecção plurimiracidiana). A dose miracidiana de cinco miracidios foi escolhida pois permite boas taxas de infecção e sobrevividas dos moluscos. A partir deste momento, estes lotes serão referidos como grupos **mono** e **pluri**, respectivamente. Imediatamente após a transferência do(s) miracidio(s), os exemplares de B. glabrata eram colocados cada qual em um poço, onde permaneciam por 12 horas, aproximadamente.

A seguir, os moluscos eram distribuídos em grupos de até trinta exemplares e acondicionados em cristalizadores com 3 litros de água desclorada, conforme recomendações de THOMAS et al. (1975). Semanalmente até o 60º dia, parte da água era renovada para evitar o acúmulo de substâncias tóxicas para os moluscos. Durante as trocas semanais, também era feita a retirada dos moluscos mortos e das massas de ovos depositadas nas paredes dos cristalizadores, o que impedia o nascimento de novos moluscos. A alimentação dos moluscos, à base de alface fresca, era fornecida diariamente ou a cada dois dias. Uma vez por semana, 2 mg de carbonato de cálcio eram adicionados ao meio líquido, servindo de complemento alimentar para os moluscos. Os moluscos eram mantidos em uma sala de criação no Departamento de Biologia do IOC.

### 3.2 Detecção dos moluscos infectados

As triagens para detecção dos moluscos infectados iniciavam-se no 20º dia após a exposição ao parasita. Este procedimento era repetido duas vezes por semana por até 42 dias após a exposição ao parasita. Em seguida a este intervalo, os moluscos eram triados quinzenalmente por até 72 dias após a exposição.

Os moluscos eram alojados individualmente em recipientes de acrílico com capacidade de 8 ml, contendo 3 ml de água desclorada, aproximadamente. Em seguida, eles eram expostos a uma lâmpada incandescente de 60 w a 30 cm de distância por até 1,5 h. A visualização de cercárias na água era feita com auxílio de microscópio estereoscópico. Em caso positivo, o molusco era prontamente identificado por código numérico e individualizado em recipiente de vidro com capacidade de 50 ml e com 40 ml de água desclorada e alface fresca. Os moluscos infectados eram posteriormente transferidos para uma área ao ar livre, coberta por fibra de vidro transparente, localizada no Departamento de Biologia do IOC (Figura 2). Os moluscos permaneciam nesta área por, no mínimo, dois dias antes do teste. Em caso negativo, o molusco retornava para a sala de criação.

Com base nos resultados das triagens, eram estimados o período pré-cercariano (FRANSEN, 1979) e a taxa de infecção -- porcentagem de moluscos que eliminaram cercárias em relação ao número total de moluscos expostos a miracidios.

Dos moluscos que permaneceram vivos e negativos até 72

dias após a exposição aos miracídios, metade do total de moluscos em cada cristalizador era dissecada para exame microscópico. Todos os moluscos que mostravam esporocistos e cercárias do parasita eram considerados positivos.

### 3.3 Observações cronobiológicas

As observações cronobiológicas eram realizadas na área ao ar livre e incluíam a coleta das cercárias emergentes de cada molusco a intervalos de 3 horas durante três dias consecutivos. Este procedimento visava fornecer dados para análise detalhada do padrão de emergência de cercárias ao longo das 24 horas. Com base neste procedimento, também foi possível calcular o número de cercárias emergentes de cada molusco por 24 horas. Para isto, o total de cercárias emergentes de cada molusco foi dividido por três.

Os moluscos infectados eram testados individualmente em recipientes de acrílico contendo 4 ml de água desclorada e alface fresca ad libitum. Estes recipientes eram providos de tampas de plástico perfuradas por alfinetes, de modo a impedir a saída dos moluscos da água. Eles eram colocados dentro de outros maiores, para facilitar a manipulação, sem que ocorresse perda da suspensão de cercárias (Figura 3).

As observações consistiam na transferência dos moluscos para novos recipientes (Figura 4) e no registro das temperaturas do ar, através de um termômetro de máximas e mínimas, e da água (Figura 5). A figura 5 apresenta ainda o termógrafo

Figura 2 - Visão parcial da área ao ar livre, localizada no Departamento de Biologia, IOC, FIOCRUZ, RJ. Nesta área, foram realizadas as observações cronobiológicas. A figura mostra também as fileiras de recipientes onde os moluscos eram testados.

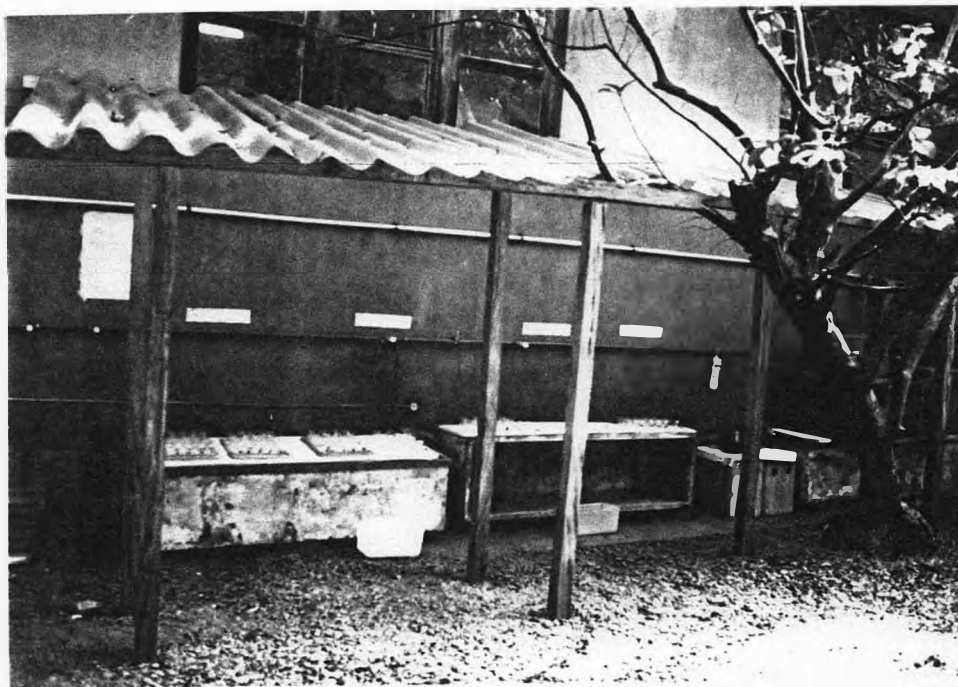


Figura 3- Material utilizado durante as observações cronobiológicas. À direita: recipiente de acrílico provido de tampa perfurada por alfinetes; à esquerda: recipiente de vidro onde era introduzido o recipiente menor, de acrílico, durante as observações.

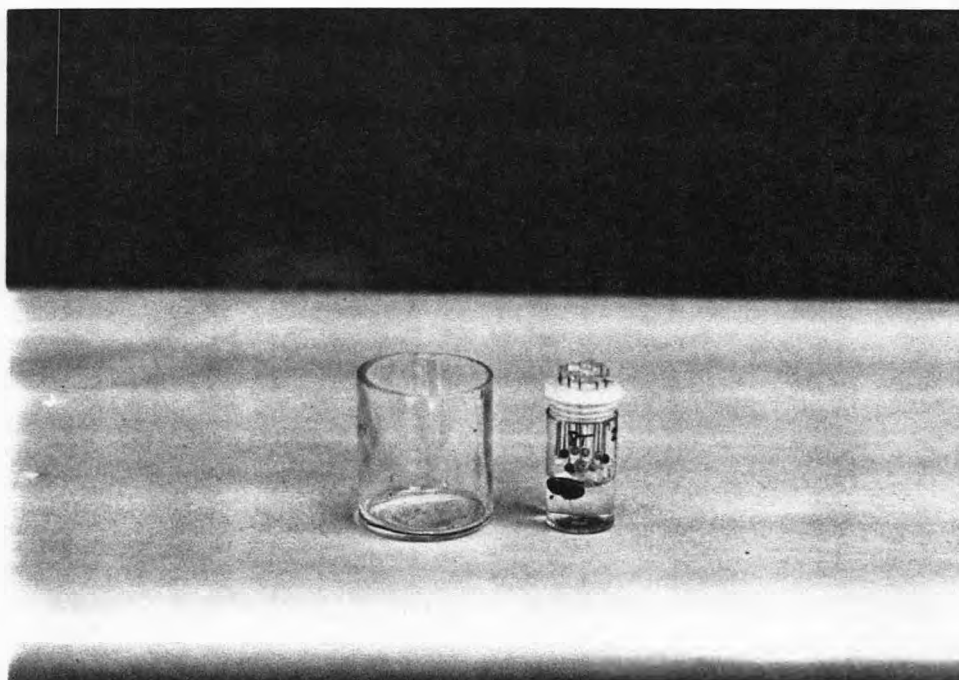


Figura 4 - Transferência do molusco de um recipiente para outro, com auxílio de colher perfurada.



Figura 5 - Registro da temperatura do ar durante as observações cronobiológicas através de um termômetro de máximas e mínimas (em cima) e de um termôgrafo (embaixo). Em primeiro plano, o registro da temperatura da água.



(marca Jules Richard) utilizado para o registro contínuo da temperatura do ar.

Ao término de cada observação, os recipientes eram levados ao laboratório para execução de técnica de filtração de cercárias (PARAENSE & CORRÊA, 1989): adicionava-se a cada recipiente 1 ml de ninhidrina (marca Merk - pro-analysis) e, após a homogeneização, a mistura era despejada em uma placa de Petri (diâmetro de 9 cm) forrada com papel de filtro tipo qualitativo (marca Framex) previamente identificado quanto à data, horário e o código do molusco. As placas de Petri eram introduzidas em um forno Pasteur mantido a 100° C, onde permaneciam por 30 minutos, aproximadamente. Com este procedimento, as cercárias retidas no papel de filtro eram fixadas e coradas pelo calor. Após a secagem, os papéis de filtro eram estocados para posterior quantificação das cercárias com auxílio de microscópio estereoscópico. A contagem exaustiva das cercárias retidas no filtro era feita com auxílio de uma folha de acetato transparente marcada com quadriculas de 0,8 x 0,8 cm sobrepostas ao filtro a ser contado.

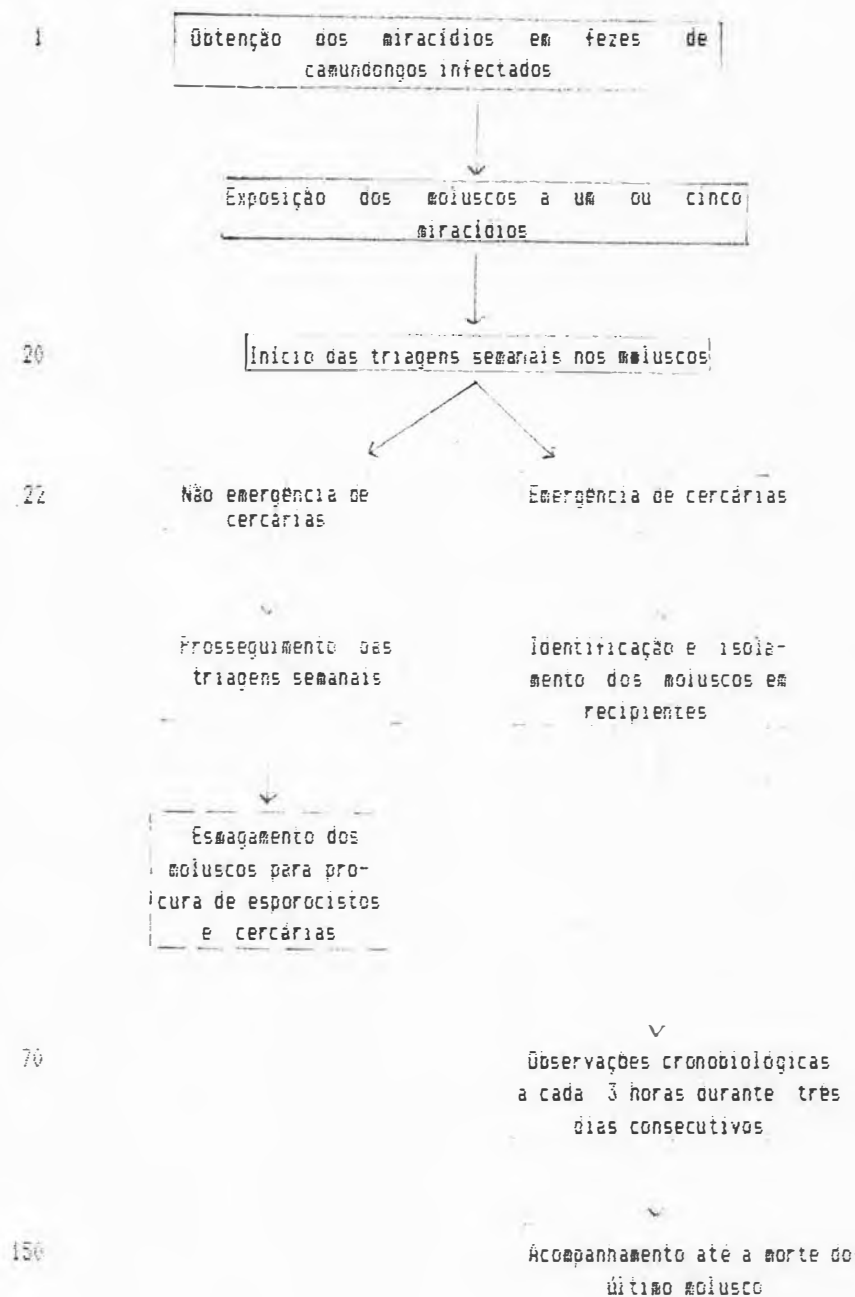
Tais observações eram complementadas por um acompanhamento do número de cercárias emergentes, realizado até a morte do último molusco. O acompanhamento, feito uma ou duas vezes por semana, consistia na quantificação das cercárias emergentes a intervalos de 24 horas através do procedimento descrito. Este procedimento permitiu a obtenção dos dados relativos à sobrevivência de cada molusco (CONCEIÇÃO *et al.*, 1986),

definida como o tempo de vida a partir da primeira detecção de cercárias.

O Quadro 1 resume os procedimentos descritos neste capítulo.

Quadro 1 - Síntese dos procedimentos metodológicos do experimento. À esquerda, o tempo decorrido em dias é mostrado. Os blocos apresentam os procedimentos metodológicos associados à escala de tempo. Os blocos feitos com linha pontilhada indicam que os eventos ocorrem em escala de tempo aproximada.

TEMPO DECORRIDO  
(em dias)





#### 4- Tratamento estatístico

##### 4.1 Detecção dos ritmos de emergência de cercárias

A análise estatística dos dados coletados a cada 3 horas visou a detecção dos padrões rítmicos na emergência de cercárias e envolveu o seguinte procedimento:

(a) Emergência de cercárias nas fases clara e escura:

Para comparar a emergência de cercárias entre as fases clara (de 6 às 18 h) e escura (de 18 às 6 h), foram calculadas as porcentagens cercárias emergentes em cada uma das fases, em relação ao total de cercárias emergentes nos três dias de teste.

(b) Cronogramas: Para a construção dos cronogramas (HALBERG *et al.*, 1977), foram empregadas, para cada molusco, as porcentagens de cercárias emergentes em cada observação em relação ao número total de cercárias emergentes a cada 24 horas. As médias e desvios-padrão destas porcentagens foram dispostos ao longo dos três dias consecutivos de observação. Estes gráficos possibilitaram a inspeção visual dos dados, ressaltando a distribuição temporal da emergência ao longo dos dias, independentemente da quantidade de cercárias.

(c) Periodogramas: Para calcular o período associado à frequência que melhor explica as variações dos dados, foi aplicado o Periodograma (VAN CAUTER & HUYBERECTS, 1973).

(d) Séries temporais: Foram construídas sequências cronológicas de valores pareados (HALBERG *et al.*, 1977), sendo um

deles o tempo e o outro, o número de cercárias emergentes em cada observação nos três dias consecutivos. Caso a distribuição dos dados não fosse normal, os cálculos seriam feitos com base em transformações logarítmicas ( $\log(x + 1)$ ) para cumprir os requisitos do método de Cosinor (ver item (e)).

(e) Cosinor individual: As séries temporais referentes ao número de cercárias emergentes de cada molusco foram submetidas à análise pelo método de Cosinor (NELSON et al., 1979; CORNÉLISSSEN et al., 1980; MONK & FORT, 1983), fixando-se o ajuste em 24 horas e o nível de significância em 5%. Foram calculados os antilog  $(x+1)$  para os valores do mesor já que estes foram estimados a partir dos dados transformados não contendo qualquer significado biológico. As comparações entre as acrofases foram feitas através dos limites dos intervalos de confiança, sendo consideradas estatisticamente distintas as acrofases cujos intervalos não se superpunham (NELSON et al., 1979). Para o conjunto de moluscos expostos a cada tipo de infecção, foi calculado o intervalo das acrofases, definido como o intervalo compreendido entre as acrofases inferiores e superiores nos dois conjuntos de moluscos. Os valores do mesor e da amplitude, que estão associados à quantidade de cercárias emergentes, não foram comparados pelo método de Cosinor. Os dados quantitativos referentes à emergência de cercárias nas infecções mono e plurimiracidianas foram analisados através do parâmetro número de cercárias emergentes (ver item 4.2). Com relação aos dados deste trabalho, o termo ritmo biológico foi empregado apenas quando o ritmo foi detectado pelo método de Cosinor. Para outras

informações a respeito deste procedimento estatístico, ver ANEXO I.

(f) Cosinor populacional: Este método foi empregado para avaliar se os ritmos de 24 h detectados pelo Cosinor individual apresentavam-se semelhantes no conjunto de moluscos expostos a cada tipo de infecção (NELSON et al., 1979). Ele era aplicado nos casos em que se detectava ritmo de 24 h em três ou mais séries temporais referentes à cada tipo de infecção. Para comparar os parâmetros ritmicos das curvas estimadas pelo método de Cosinor populacional, foi empregado o teste de Bingham (BINGHAM et al., 1982). Outras informações estão contidas no ANEXO I.

#### 4.2 Análise dos dados parasitológicos

Os dados parasitológicos foram analisados com base nos seguintes parâmetros: taxa de infecção, período pré-cercariano, sobrevida dos moluscos e número de cercárias emergentes por 24 horas. Eles foram comparados entre os grupos **mono** e **pluri** através dos seguintes testes estatísticos:

(a) Taxa de infecção: Foram comparadas através da prova qui-quadrado para duas amostras independentes (SIEGEL, 1981).

(b) Período pré-cercariano e sobrevida dos moluscos: Foram comparados pelo prova U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1981).

(c) Número de cercárias emergentes por 24 horas: Os

dados referentes à cada molusco foram comparados pela prova de U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1981).

#### 4.3 Correlações com a temperatura

Foi utilizado o coeficiente de correlação por postos de Spearman (SIEGEL, 1981) para testar possíveis correlações entre o número de cercárias emergentes e a temperatura do ar. Os dados relativos às fases clara e escura foram analisados separadamente. Para cada fase, foi calculada a temperatura média relativa a cada intervalo de observação, baseando-se nos dados continuamente coletados pelo termôgrafo. O cálculo da temperatura média baseou-se nos dados registrados de hora em hora em cada intervalo. Por exemplo: o cálculo da temperatura média relativa ao intervalo entre 6:00 e 9:00h foi feito somando as temperaturas registradas às 6:00, 7:00, 8:00 e 9:00 hs e dividindo a soma obtida por quatro .

CAPÍTULO III

RESULTADOS

## 1- Ritmos de emergência de cercárias

A Tabela 1 apresenta o histórico do experimento. As exposições aos miracídios e as observações cronobiológicas foram conduzidas em diferentes momentos, já que não foi possível infectar simultaneamente todos os moluscos. A cada exposição aos miracídios seguiu-se uma etapa de observações cronobiológicas, à exceção da terceira exposição. Esta compreendeu duas etapas (III e IV), já que foram detectados mais quatro moluscos positivos após a realização da Etapa III. Um total de 56 moluscos foi observado cronobiologicamente. Os dados originais referentes ao número de cercárias emergentes de cada molusco nos diferentes intervalos de observação são apresentados nas Tabelas 14, 15, 16 e 17 (ANEXO II).

### 1.1 Emergência de cercárias nas fases clara e escura

A Tabela 2 mostra os dados relativos à emergência de cercárias nas fases clara e escura nas diferentes etapas das observações cronobiológicas. Em todas as etapas, a proporção de cercárias emergentes na fase clara foi acentuadamente maior que na escura em ambos os grupos. As porcentagens de cercárias emergentes na fase clara variaram pouco entre as etapas tanto no grupo **mono** (90,1 a 97,4%) quanto no grupo **pluri** (91,0 a 97,1%). As comparações entre os grupos **mono** e **pluri** quanto ao número de cercárias emergentes serão efetuadas no item 2.1 deste capítulo.

A Tabela 3 mostra o número de moluscos associados à emergência de cercárias na fase escura. Dentre os moluscos

Tabela 1 - Histórico do experimento. São apresentadas as datas em que os exemplares de *E. giabrata* foram expostos a miracidios de *S. mansoni*, as datas das observações cronobiológicas (Etapas), o número de moluscos expostos aos miracidios, infectados e testados cronobiologicamente em cada etapa.

EXPOSIÇÃO	EXPOSTOS		INFECTADOS		ETAPAS MÊS/ANO	TESTADOS	
	MONO	PLURI	MONO	PLURI		MONO	PLURI
AGOSTO 89	117	54	37	21	NOVEMBRO 89 (ETAPA I)	4	5
MARÇO 90	504	165	50	14	MAIO 90 (ETAPA II)	11	7
FEVEREIRO 91	400	200	20	46	MARÇO-ABRIL 91 (ETAPA III)	2	23
					MAIO 91 (ETAPA IV)	2	2

Tabela 2 - Número total de cercárias de *S. mansoni* emergentes nas fases clara e escura em infecções mono e plurimiracidianas (pluri) de *E. giabrata*. As porcentagens correspondentes são apresentadas entre parênteses. Os dados referem-se ao conjunto de moluscos testados cronobiologicamente nas quatro etapas de coleta de dados. N= número de moluscos testados cronobiologicamente em cada etapa.

ETAPAS	N	INFECÇÃO MONO			N	INFECÇÃO PLURI		
		FASE CLARA	FASE ESCURA	TOTAL		FASE CLARA	FASE ESCURA	TOTAL
I	4	6.520 (96,4)	246 (3,6)	6.766 (100)	5	2.138 (97,1)	64 (2,9)	2.202 (100)
II	11	11.682 (97,4)	315 (2,6)	11.997 (100)	7	6.739 (92,5)	550 (7,5)	7.289 (100)
III	2	928 (96,1)	38 (3,9)	966 (100)	23	16.393 (96,4)	612 (3,6)	17.005 (100)
IV	2	2.056 (90,1)	226 (9,9)	2.282 (100)	2	3.248 (91,0)	323 (9,0)	3.571 (100)
TOTAL	19	21.186 (96,3)	825 (3,7)	22.011 (100)	37	28.518 (94,8)	1.549 (5,2)	30.067 (100)

Tabela 3 - Número de exemplares de *S. glabrata* associados à ausência ou presença de cercárias de *S. mansoni* emergentes na fase escura em infecções mono e plurimiracidianas (pluri). Os números de moluscos associados à presença de cercárias são apresentados em classes percentuais de emergência na fase escura.

ETAPAS	INFECÇÃO	SEM EMERGÊNCIA NA FASE ESCURA	COM EMERGÊNCIA NA FASE ESCURA				TOTAL
			0,1-10,0%	10,1-20,0%	20,1-30,0%	> 30,1%	
I	MONO	0	3	1	0	0	4
	PLURI	1	3	1	0	0	5
II	MONO	0	10	0	1	0	11
	PLURI	0	5	0	1	1	7
III	MONO	0	2	0	0	0	2
	PLURI	0	19	3	1	0	23
IV	MONO	0	1	0	0	1	2
	PLURI	0	1	0	1	0	2
TOTAL	MONO	0	16	1	1	1	19
	PLURI	1	28	4	3	1	37



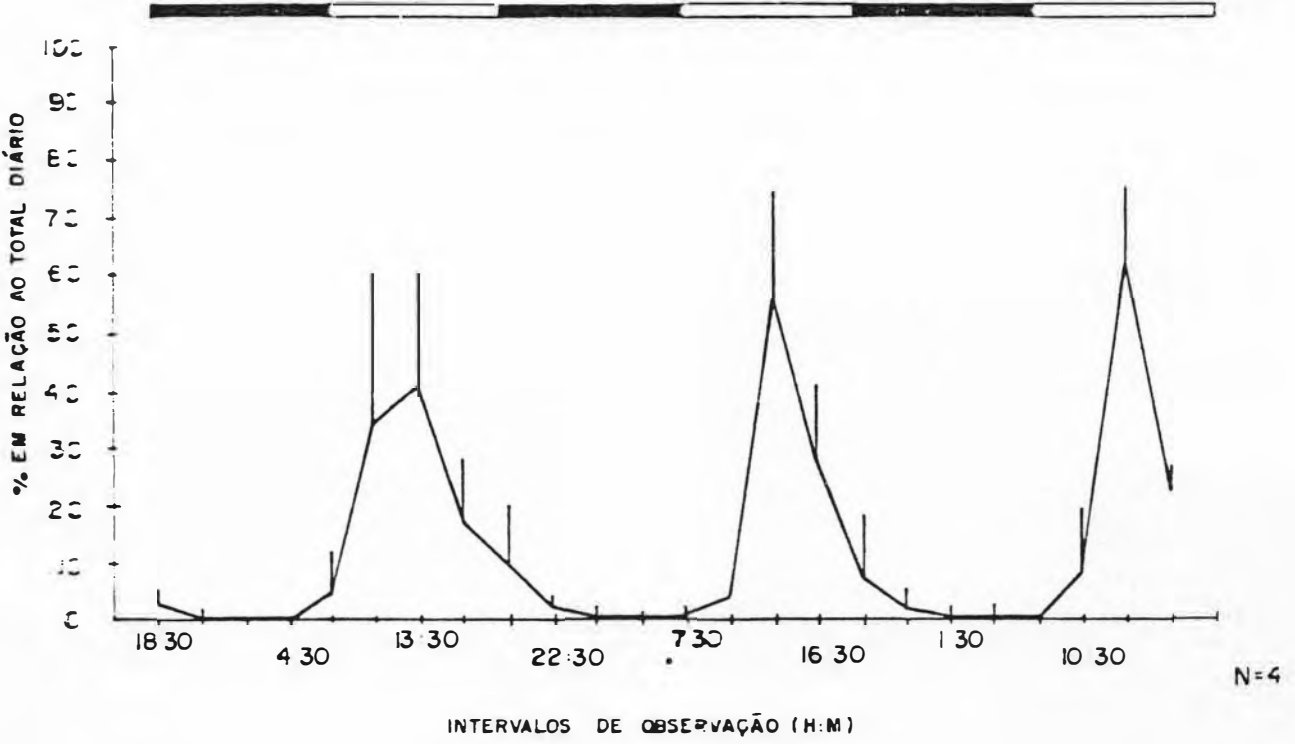
estudados, 19 (100%) moluscos pertencentes ao grupo **mono** e 36 dos 37 (97,3%) pertencentes ao grupo **pluri**, apresentaram cercárias emergentes nesta fase. Do total, 44 (78,6%) apresentaram entre 0,1 a 10% de cercárias emergentes na fase escura, 5 (9,6%) apresentaram entre 10,1 a 20,0% e 4 (7,7%) entre 20,1 a 30,0%. Dois moluscos (3,6%) apresentaram mais de 30% das cercárias nesta fase.

## 1.2 Cronogramas

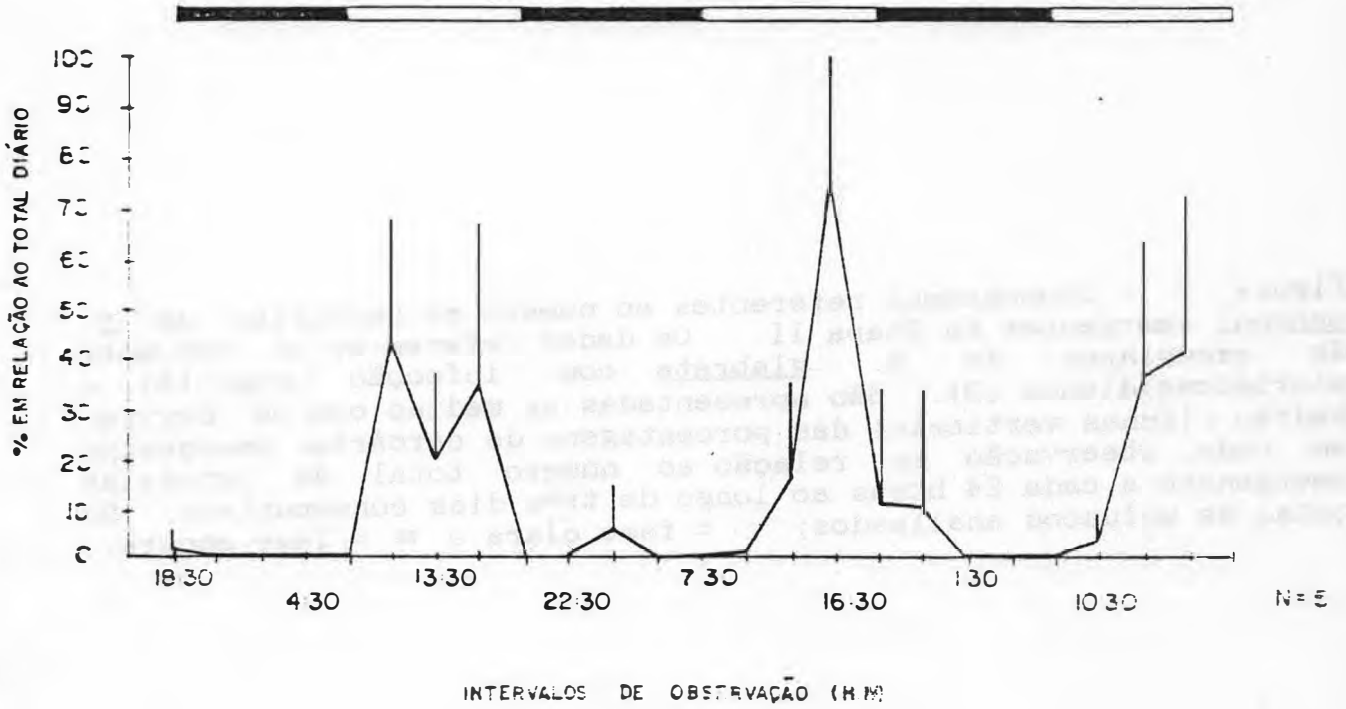
As Figuras 6, 7, 8 e 9 mostram os cronogramas relativos às porcentagens de cercárias emergentes em cada observação, em relação ao número total de cercárias emergentes a cada 24 horas. A inspeção visual dos cronogramas revelou que houve picos recorrentes na fase clara nos dois tipos de infecção. Estes picos repetiram-se nos três dias, ainda que nem sempre no mesmo intervalo de observação. A emergência de cercárias nos diferentes horários foi semelhante entre os dois tipos de infecção nas Etapas I, II e III. Somente para a curva de infecção plurimiracidiana na Etapa IV (Figura 4B), não foram observados picos bem definidos na fase clara. Notou-se ainda em todos os cronogramas desvios-padrão superiores a 10%, o que refletiu a variabilidade na porcentagem de cercárias emergentes em cada observação.

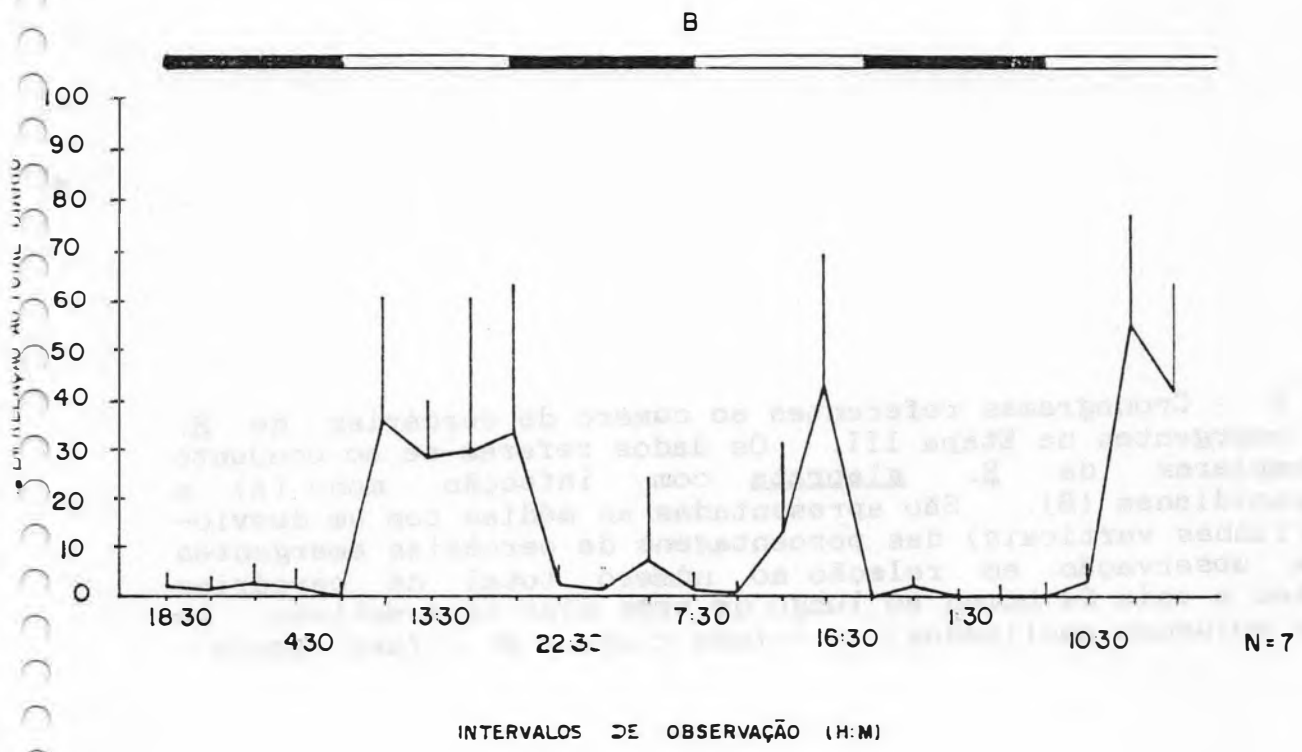
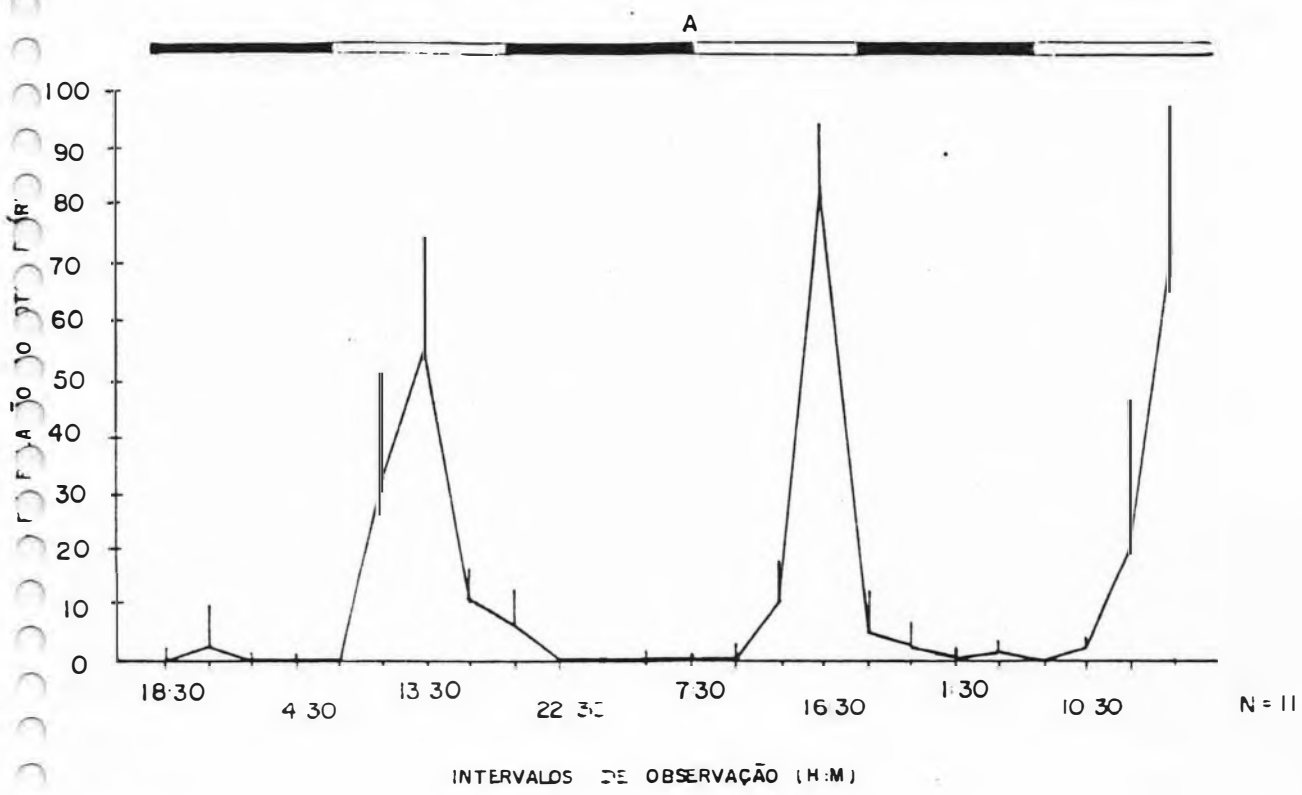
Os resultados apresentados nos itens 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6 a seguir referem-se à análise específica para detecção de ritmos.

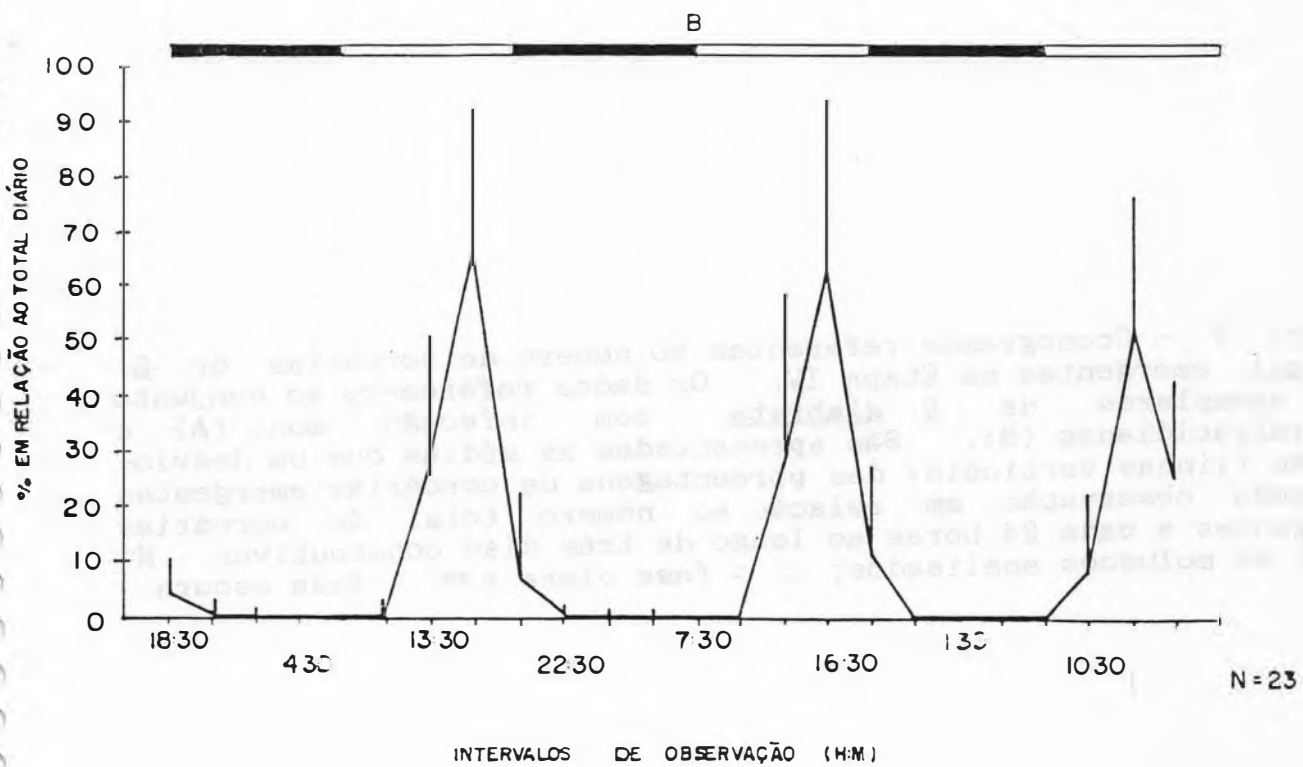
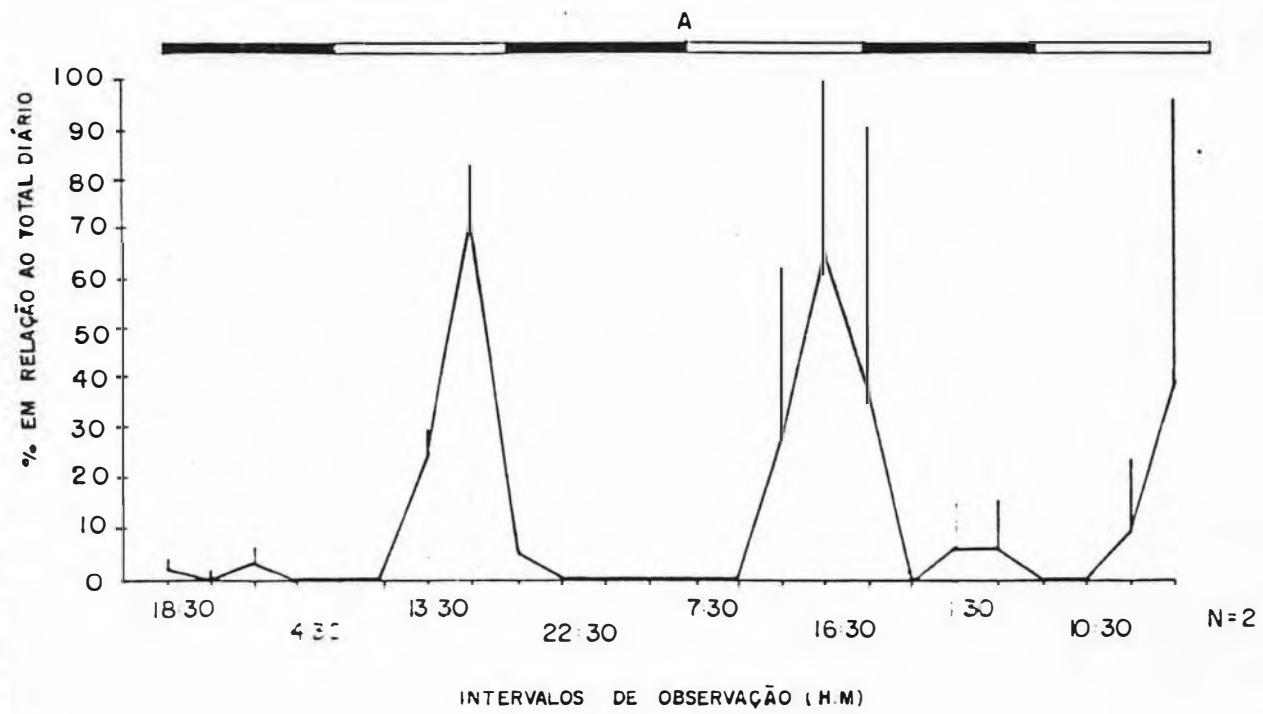
A

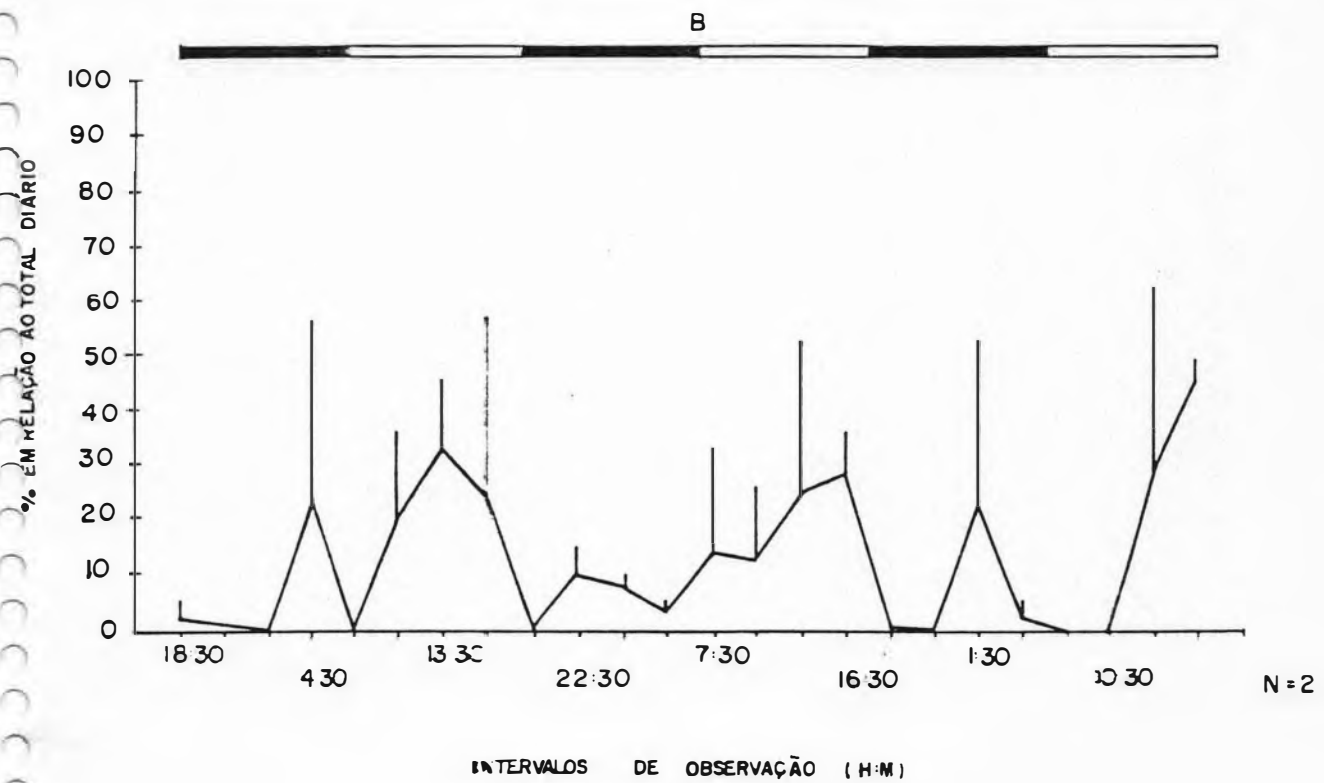
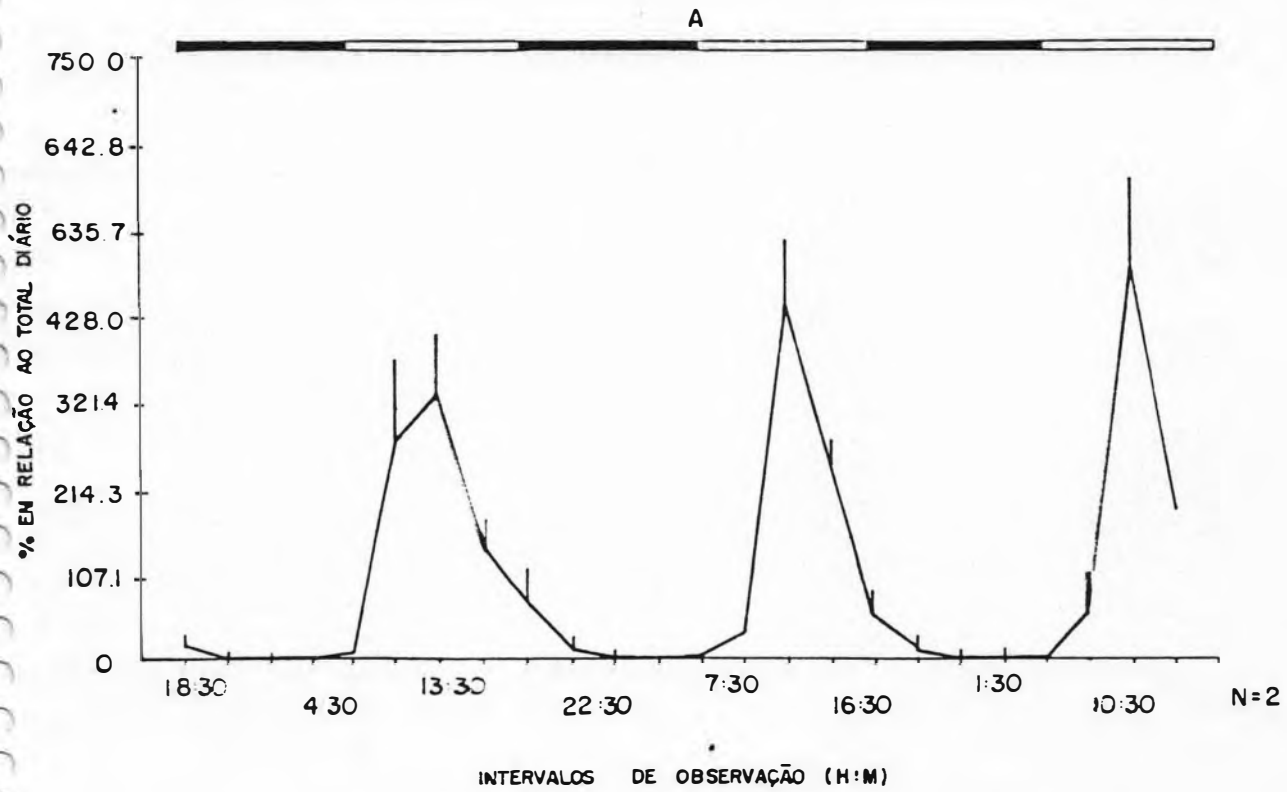


B









### 1.3 Periodogramas

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados das análises feitas pelo Periodograma bem como os do Cosinor individual. São fornecidos os períodos associados às frequências que melhor explicam as variações dos dados relativos à emergência das cercárias .

Na Etapa I (Tabela 4), todos os moluscos infectados com um miracídio apresentaram 24 horas como o período que melhor explica a variação dos dados. Dentre as infecções **pluri**, apenas em um caso o período foi diferente de 24 horas (36 horas). Na Etapa II (Tabela 5), todos os moluscos com infecções **mono** apresentaram períodos de 24 horas. Nas infecções **pluri**, apenas em um caso o período foi diferente de 24 horas (7,2 horas). Todos os moluscos testados na Etapa III apresentaram 24 horas como melhor período (Tabela 6). Os moluscos testados na Etapa IV (Tabela 7) também apresentaram 24 horas como melhor período, à exceção de um deles cujos dados não permitiram a detecção do melhor período por este método.

Os dados relativos ao Cosinor individual serão analisados no item 1.5.

### 1.4 Séries temporais

As Figuras 10, 11, 12 e 13 apresentam as séries temporais referentes ao número de cercárias emergentes de cada molusco nas quatro etapas. A inspeção visual das curvas revelou

Tabela 4 - Resultados do Periodograma e do Cosinor individual nas séries temporais do número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de cada exemplar de *B. glabrata*. Dados relativos à Etapa I. São apresentados o período e os parâmetros mesor, amplitude e acrofase (com seus respectivos intervalos de confiança de 95%).  $p(A=0)$  = probabilidade associada à não-ocorrência de ritmo de 24 horas.

COSINOR INDIVIDUAL							
INFECÇÃO	CÓDIGO DO MOLUSCO	PERIODOGRAMA (período em horas)	$p(A=0)$	MESOR (ng cercárias)	AMPLITUDE (log)	ACROFASE (h:min)	
						ESTIMATIVA	INTERVALOS DE CONFIANÇA
MONO	1	24	0,000	19,50	1,23	14:02	13:04-15:01
	4	24	0,000	3,89	0,60	15:43	14:23-17:03
	5	24	0,000	12,30	0,99	14:22	13:33-15:10
	6	24	0,000	8,13	1,09	13:36	12:28-14:44
PLURI	2	24	0,003	2,09	0,53	14:15	12:22-16:08
	3	24	0,000	7,94	0,84	14:50	13:25-16:14
	4	24	0,000	6,17	1,10	14:25	13:24-15:26
	5	24	0,007	1,91	0,48	15:38	13:31-17:44
	6	36	0,050	1,48	0,18	15:24	12:34-18:15

Tabela 5 - Resultados do Periodograma e do Cosinor individual nas séries temporais do número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de cada exemplar de *B. glabrata*. Dados relativos à Etapa II. São apresentados o período e os parâmetros mesor, amplitude e acrofase (com seus respectivos intervalos de confiança de 95%).  $p(A=0)$  = probabilidade associada à não-ocorrência de ritmo de 24 horas.

COSINOR INDIVIDUAL							
INFECÇÃO	CÓDIGO DO MOLUSCO	PERIODOGRAMA (período em horas)	$p(A=0)$	MESOR (no cercárias)	AMPLITUDE (log)	ACROFASE (h:min)	
						ESTIMATIVA	INTERVALOS DE CONFIANÇA
MONO	14	24	0,000	4,90	0,92	14:48	13:22-16:14
	18	24	0,000	5,37	0,96	15:16	13:58-16:35
	27	24	0,012	1,82	0,38	15:05	12:49-17:21
	29	24	0,000	5,13	1,04	14:32	13:02-16:03
	36	24	0,011	3,72	0,56	16:16	14:02-18:30
	37	24	0,000	5,62	1,10	15:18	14:08-16:28
	38	24	0,000	5,01	1,07	14:59	13:33-16:25
	45	24	0,002	4,57	0,66	15:04	13:17-16:52
	47	24	0,009	5,13	0,68	14:25	12:15-16:36
	72	24	0,001	4,17	0,88	14:27	12:48-16:07
	73	24	0,000	6,17	0,84	14:25	12:53-15:56
PLURI	1	24	0,011	7,76	0,73	15:51	13:38-18:04
	3	7,2	0,209	-	-	-	-
	4	24	0,000	4,17	0,95	14:40	13:16-16:04
	7	24	0,000	5,50	1,05	14:49	13:24-16:13
	8	24	0,001	3,39	0,67	14:56	13:17-16:35
	9	24	0,000	4,57	1,07	14:44	13:33-15:56
	90	24	0,003	2,19	0,40	18:29	14:35-18:22



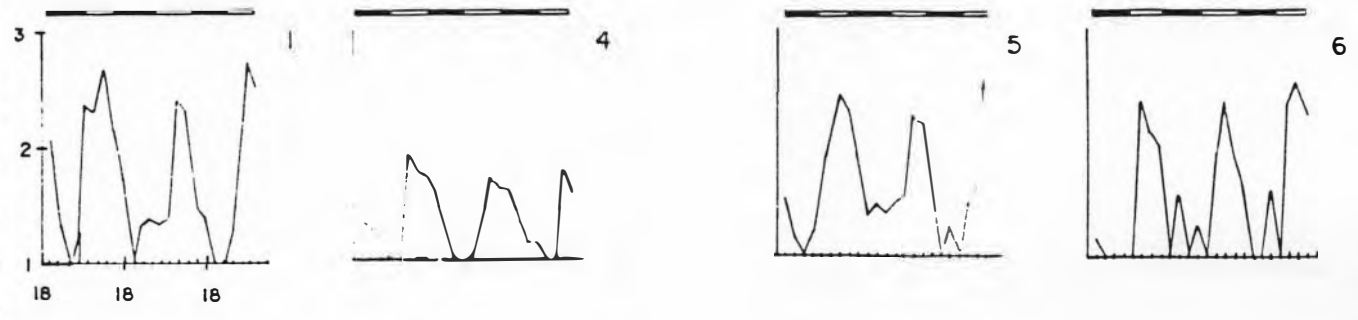
Tabela 6 - Resultados do Periodograma e do Cosinor individual nas séries temporais do número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de cada exemplar de *B. glabrata*. Dados relativos à Etapa III. São apresentados o período e os parâmetros mesor, amplitude e acrofase (com seus respectivos intervalos de confiança de 95%).  $p(A=0)$  = probabilidade associada à não-ocorrência de ritmo de 24 horas.

COSINOR INDIVIDUAL							
INFECÇÃO	CÓDIGO DO MOLUSCO	PERIODOGRAMA (período em horas)	$p(A=0)$	MESOR (no cercárias)	AMPLITUDE (log)	ACROFASE (h:min)	
						ESTIMATIVA	INTERVALOS DE CONFIANÇA
MONO	5	24	0,000	3,89	0,97	15:54	14:47-17:01
	47	24	0,007	2,75	0,51	17:07	15:01-19:12
PLURI	12	24	0,000	5,25	1,15	14:57	13:55-15:58
	13	24	0,000	4,68	1,03	15:16	14:15-16:16
	14	24	0,000	5,62	1,17	15:51	15:00-16:42
	15	24	0,000	5,50	1,11	15:31	14:30-16:32
	16	24	0,000	3,16	0,78	16:05	15:07-17:04
	17	24	0,000	5,01	1,13	15:02	13:59-16:05
	22	24	0,000	5,62	0,77	17:08	15:34-18:41
	23	24	0,000	6,76	1,14	15:05	13:47-16:22
	24	24	0,000	5,50	1,15	15:18	14:18-16:17
	25	24	0,000	4,79	1,02	14:51	13:52-15:49
	29	24	0,008	1,78	0,43	15:19	13:10-17:28
	31	24	0,080	-	-	-	-
	32	24	0,000	4,27	1,08	15:24	14:09-16:38
	33	24	0,000	2,69	0,65	16:08	14:37-17:40
	35	24	0,001	2,51	0,72	15:45	14:07-17:22
	38	24	0,000	3,16	0,87	15:50	14:30-17:11
	40	24	0,001	1,88	0,49	15:33	13:50-17:17
	43	24	0,000	3,55	0,89	15:27	14:01-16:53
	45	24	0,001	2,51	0,56	14:48	13:12-16:23
	49	24	0,000	2,40	0,65	15:54	14:24-17:25
50	24	0,001	1,95	0,51	14:42	12:58-16:25	
51	24	0,001	2,88	0,80	15:29	13:51-17:06	
52	24	0,000	4,47	1,06	16:01	14:53-17:10	

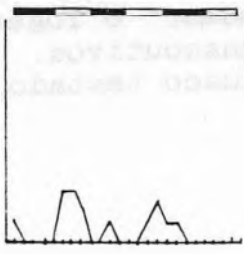
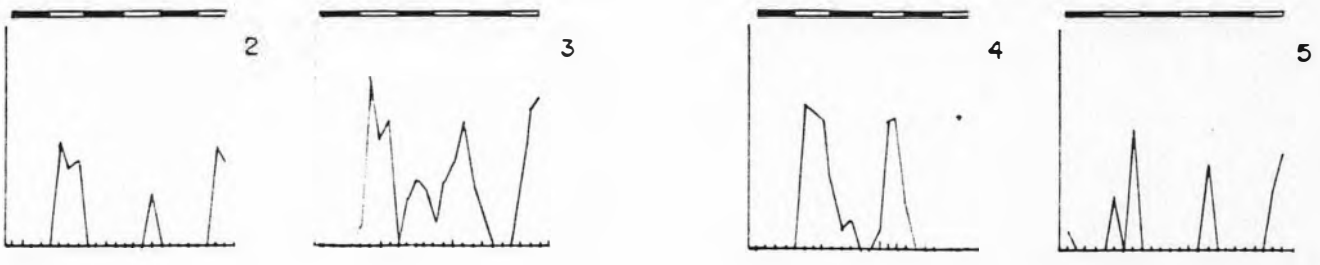
Tabela 7 - Resultados do Periodograma e do Cosinor individual nas séries temporais do número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de cada exemplar de *B. glabrata*. Dados relativos à Etapa IV. São apresentados o período e os parâmetros mesor, amplitude e acrofase (com seus respectivos intervalos de confiança de 95%).  $p(A=0)$  = probabilidade associada à não-ocorrência de ritmo de 24 horas.

INFEÇÃO	CÓDIGO DO MOLUSCO	PERIODOGRAMA (período em horas)	COSINOR INDIVIDUAL				
			$p(A=0)$	MESOR (no cercárias)	AMPLITUDE (log)	ACROFASE (h:min)	
						ESTIMATIVA	INTERVALOS DE CONFIANÇA
MONO	58	24	0,774	-	-	-	-
	60	24	0,000	17,38	0,92	15:45	14:24-17:06
PLURI	62	24	0,004	23,99	0,80	15:41	13:53-17:29
	64	-	0,644	-	-	-	-

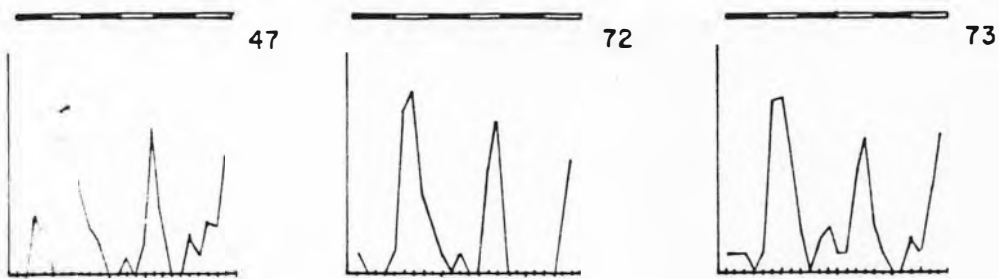
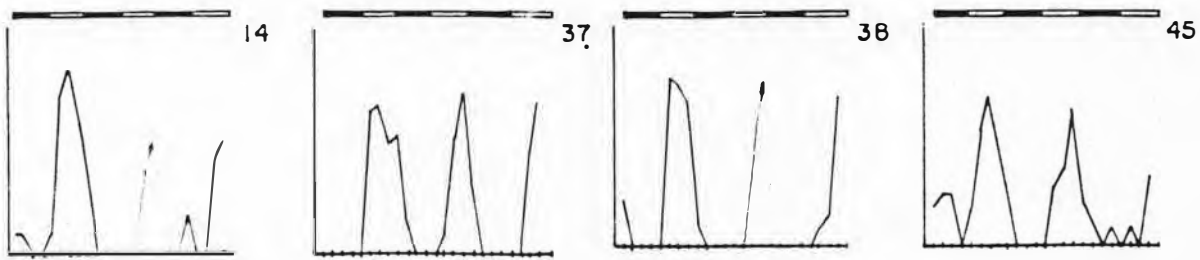
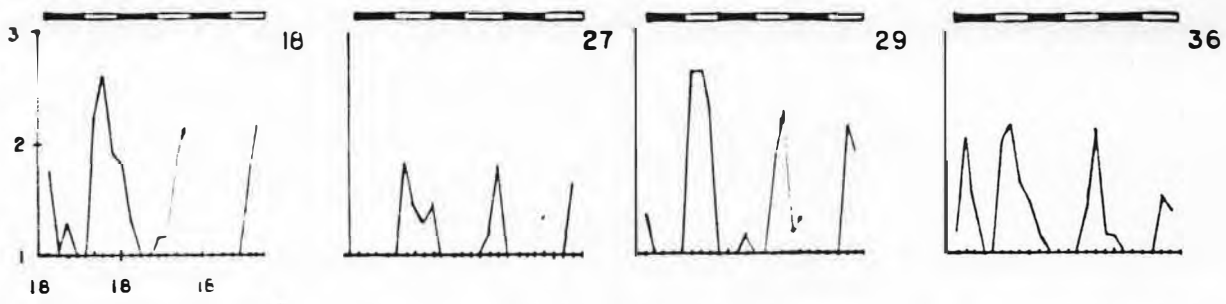
MONO



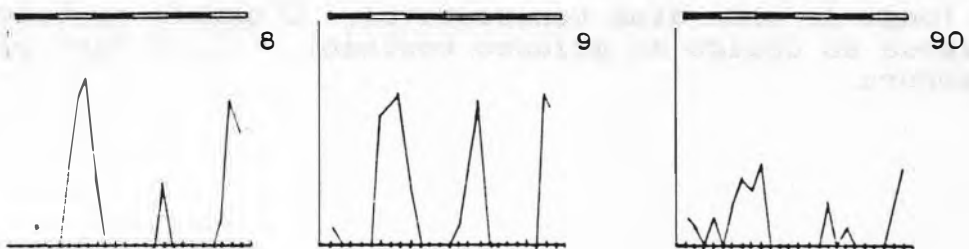
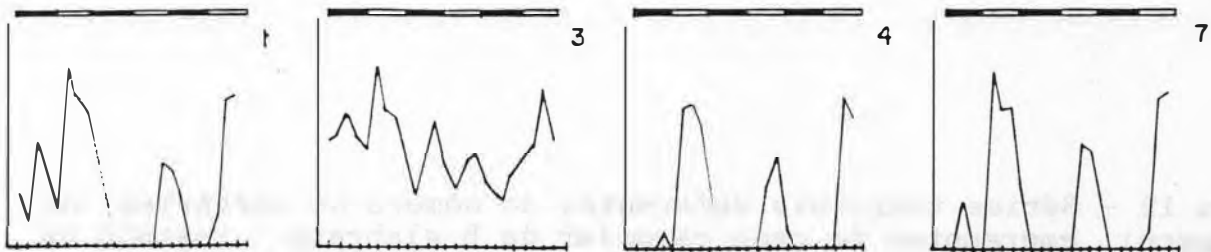
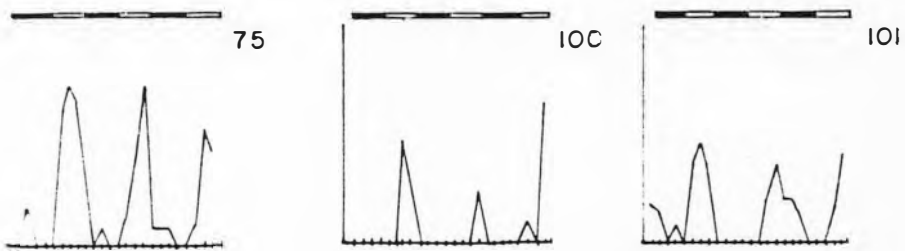
PLURI



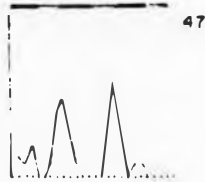
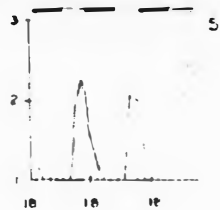
MONO



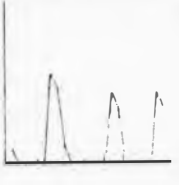
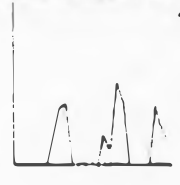
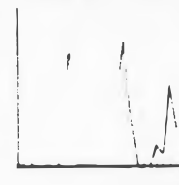
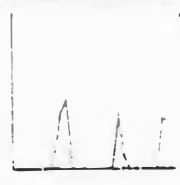
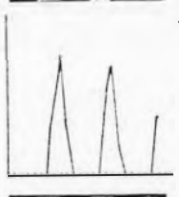
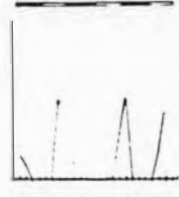
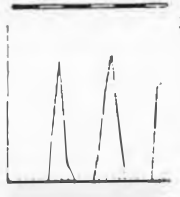
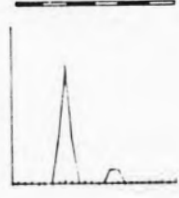
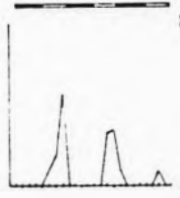
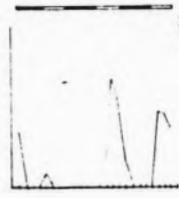
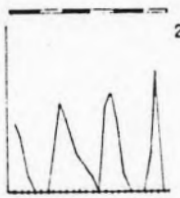
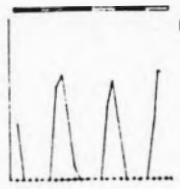
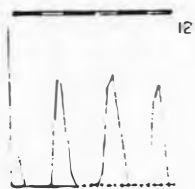
PLURI



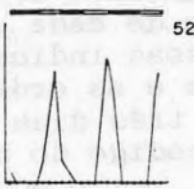
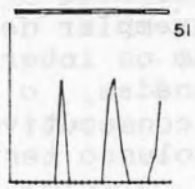
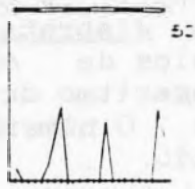
MONO



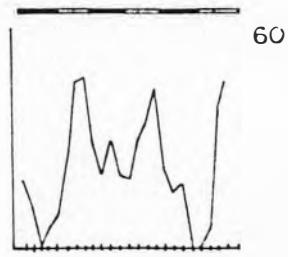
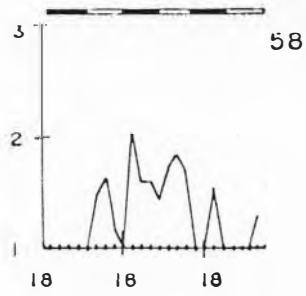
PLURI



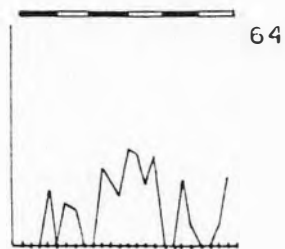
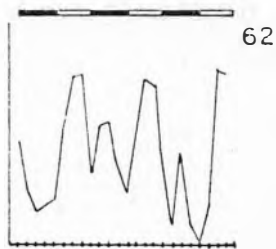
PLURI



MONO



PLURI



picos recorrentes na fase clara nos dois tipos de infecção. Estes picos repetiram-se a cada dia e nem sempre ocorreram no mesmo intervalo. Apesar da variabilidade no formato das curvas, geralmente houve um pico na fase clara tanto para as infecções **mono** quanto para as **pluri**.

### 1.5 Cosinor individual

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados das análises feitas pelo Cosinor individual. Na Etapa I (Tabela 4), foram detectados ritmos em todos os casos. Os valores do mesor variaram de 3,89 a 19,50 nas infecções **mono** e de 1,48 a 7,94 nas infecções **pluri**. A amplitude variou de 0,60 a 1,23 (**mono**) e 0,18 a 1,10 (**pluri**). As estimativas das acrofases estiveram compreendidas entre 13:36 e 15:43 h (**mono**) e entre 14:25 a 15:24 h (**pluri**). As comparações feitas pela superposição dos limites dos intervalos de confiança não revelaram diferenças significativas entre os moluscos quanto às acrofases.

Dos 18 moluscos testados na Etapa II (Tabela 5), em 17 foram detectados ritmos na emergência de cercárias. Os valores do mesor variaram de 1,82 a 6,17 (**mono**) e de 2,19 a 7,76 (**pluri**). A amplitude variou de 0,38 a 1,10 nas infecções **mono** e de 0,40 a 1,07 nas infecções **pluri**. As estimativas das acrofases estiveram entre 14:25 e 16:16 h (**mono**) e 14:40 e 16:29 (**pluri**). Não houve diferenças significativas entre as acrofases referentes aos diferentes moluscos.

Dos 24 moluscos testados na Etapa III (Tabela 6), em

apenas um não foi detectado ritmo de emergência de cercárias. Os valores do mesor variaram de 2,75 a 3,89 nas infecções **mono** e de 1,78 a 6,76 nas infecções **pluri**. A amplitude variou de 0,51 a 0,97 (**mono**) e de 0,43 a 1,17 (**pluri**). As acrofases estiveram compreendidas entre 15:54 e 17:07 h (**mono**) e 14:42 e 17:08 h (**pluri**), não diferindo significativamente entre os moluscos de cada um dos grupos.

Na Etapa IV (Tabela 7), apenas um molusco em cada tipo de infecção apresentou ritmo, não havendo diferenças significativas quanto às acrofases.

Para o conjunto de moluscos analisados, foram detectados ritmos de emergência, com acrofases variando entre 13:36 e 17:07 h para a infecção **mono** e entre 14:15 e 17:08 h para a infecção **pluri**. Os intervalos entre as acrofases foram de 211 e 173 minutos nas infecções **mono** e **plurimiracidianas**, respectivamente. As acrofases dos ritmos de emergência não foram estatisticamente diferentes entre os moluscos.

#### 1.6 Cosinor populacional

A Tabela 8 mostra os resultados do Cosinor populacional. Na Etapa I, foi detectado ritmo de emergência apenas em relação à infecção **mono**. Na Etapa II, houve ritmo na emergência em ambos os tipos de infecção. Na Etapa III, o método só pode ser aplicado nos dados referentes à infecção **pluri** e revelou a ocorrência de ritmo. Na Etapa IV, o método não foi aplicado pois os dados referiam-se a apenas uma série temporal



Tabela B - Resultados do Cosinor populacional para detecção de ritmos de 24 horas nas séries temporais do número de cercárias de S. mansoni emergentes de infecções mono e plurimiracidianas (pluri) de B. glabrata. Os dados referem-se ao conjunto de moluscos com mais de três exemplares. N= número de moluscos analisados; Fzat= razão F; p= probabilidade associada à ocorrência de ritmo de 24 horas.

ETAPAS	INFECÇÃO MONO				INFECÇÃO PLURI			
	N	Fzat	p	ACROFASE (h : min)	N	Fzat	p	ACROFASE (h : min)
I	4	68,57	< 0,05	14:15	5	7,69	> 0,05	-
II	11	47,16	< 0,05	14:58	6	50,00	< 0,05	15:24
III	2	-	-	-	22	98,03	< 0,05	15:30
IV	1	-	-	-	1	-	-	-

para cada tipo de infecção.

O teste de Bingham foi aplicado apenas nos dados da Etapa II, já que nesta etapa o método de Cosinor populacional havia indicado ritmo de 24 h com relação a ambas as infecções. Os parâmetros calculados ( $T = -0,06$ ;  $F = 0,7$ ) não revelaram diferenças significativas entre as infecções mono e pluri.

O Quadro 2 apresenta uma síntese dos resultados cronobiológicos.

Quadro 2 - Sumário dos resultados cronobiológicos.

PARÂMETROS	PRINCIPAIS RESULTADOS
% DE CERCÁRIAS NAS FASES CLARA E ESCURA	96,3% ( <b>mono</b> ) e 94,8% ( <b>pluri</b> ) do total de cercárias emergiu na fase clara; 100,0% ( <b>mono</b> ) e 97,3% ( <b>pluri</b> ) dos moluscos apresentou cercárias emergentes na fase escura.
CRONOGRAMA	Nas infecções mono e plurimiracidianas houve uma recorrência de picos diurnos nos três dias de observações e, apesar das diferentes quantidades de cercárias emergentes, o padrão temporal permaneceu o mesmo.
PERIODOGRAMA	Nas infecções mono e plurimiracidianas, 24 horas foi o melhor período para 95 % dos moluscos testados.
SÉRIE TEMPORAL	Nas infecções mono e plurimiracidianas, geralmente houve uma recorrência de picos diurnos nos três dias de experimento.
COSINOR INDIVIDUAL	Nas infecções mono e plurimiracidianas, foram detectados ritmos de 24 horas para as cercárias emergentes para 93 % dos moluscos testados. As acrofases foram semelhantes e variaram de 13:36-17:07 h nas infecções mono e de 14:15-17:08 h nas infecções plurimiracidianas.
COSINOR POPULACIONAL	Em geral, houve grande homogeneidade entre os parâmetros ritmicos referentes à emergência nos dois tipos de infecção. O teste de Bingham, aplicado nos dados da Etapa II, não revelou diferenças nos ritmos de emergência entre as infecções mono e plurimiracidianas.

## 2- Resultados adicionais

### 2.1 Dados parasitológicos

#### Taxa de infecção

A Tabela 9 mostra que, para o conjunto de exposições realizadas, a taxa de infecção no grupo **pluri** (19,1%) foi significativamente maior que a do grupo **mono** (9,5%) ( $\chi^2 = 19,109$ ;  $p < 0,001$ ). Cabe notar a redução das taxas obtidas nas 1<sup>ª</sup> e 2<sup>ª</sup> exposições em ambos os tipos de infecção.

#### Período pré-cercariano

A Tabela 10 mostra que não foi detectada diferença significativa no período pré-cercariano entre os grupos **mono** e **pluri** ( $U = 2209,4$ ;  $p > 0,05$ ). A mediana foi de 28 dias para o conjunto de moluscos de ambos os grupos.

#### Sobrevida

A Tabela 11 mostra que a sobrevida correspondente ao conjunto de moluscos não foi significativamente diferente entre os grupos **mono** e **pluri** ( $U = 1181$ ;  $p > 0,05$ ), com mediana de 55 dias para o grupo **mono** e 52 dias para o grupo **pluri**.

#### Número de cercárias emergentes

A Tabela 12 mostra que não houve diferença significativa entre os dois tipos de infecção quanto ao número de cercárias emergentes a cada 24 horas. Com relação ao conjunto de moluscos, os valores das medianas foram de 379,7 cercárias e

Tabela 9 - Taxas de infecção de exemplares de B. glabrata por S. mansoni estimadas para as infecções mono e plurimiracidianas em cada exposição. N= número de moluscos expostos;  $\chi^2$ = qui-quadrado; p= probabilidade associada ao valor estimado do qui-quadrado.

EXPOSIÇÃO	INFECÇÃO MONO			INFECÇÃO PLURI			$\chi^2$	p
	EXPOSTOS	INFECTADOS	TAXA DE INFECÇÃO (%)	EXPOSTOS	INFECTADOS	TAXA DE INFECÇÃO (%)		
AGOSTO 89	117	37	31,6	54	21	38,9	0,5760	> 0,05
MARÇO 90	604	50	8,3	165	14	8,5	0,0054	> 0,05
FEVEREIRO 91	400	20	5,0	200	46	23,0	42,3100	< 0,001
TOTAL	1.121	107	9,5	419	81	19,3	26,350	< 0,001

Tabela 10 - Períodos pré-cercarianos (em dias) estimados para as infecções mono e plurimiracidianas de B. glabrata por S. mansoni. N= número de moluscos infectados; Med= mediana; Min e Max= valores mínimo e máximo registrados em cada etapa; U= valor estimado pela prova de Mann-Whitney; p= probabilidade associada ao valor estimado de U. Os dados relativos ao período pré-cercariano não foram coletados em agosto de 1989.

EXPOSIÇÃO	PARÂMETROS	INFECÇÃO	
		MONO	PLURI
AGOSTO 89	-	-	-
MARÇO 90	N	47	9
	MED	28,0	35,0
	MIN	26	28
	MAX	41	42
FEVEREIRO 91	N	20	46
	MED	28,0	26,0
	MIN	26	22
	MAX	70	67
TOTAL	N	67	55
	MED	28,0	28,0
	MIN	26	22
	MAX	70	67
ANÁLISE ESTATÍSTICA		U 2209,4	
		p NS	

Tabela 11 - Sobrevidas (em dias) a partir da primeira emergência de cercárias de *S. mansoni* estimadas para as infecções mono e plurirracidianas de *S. glabrata*. N= número de moluscos infectados; Med= mediana; Min e Max= valores mínimo e máximo registrados em cada etapa; U= valor estimado pela prova de Mann-Whitney; p= probabilidade associada ao valor estimado de U. Os dados relativos às sobrevidas não foram coletados em agosto de 1989.

EXPOSIÇÃO	PARÂMETROS	INFECÇÃO	
		MONO	PLURI
AGOSTO 89	-	-	-
MARÇO 90	N	29	9
	MED	53,0	35,0
	MIN	47	8
	MAX	72	78
FEVEREIRO 91	N	17	44
	MED	56,0	54,5
	MIN	29	25
	MAX	135	150
TOTAL	N	46	53
	MED	55,0	52,0
	MIN	29	8
	MAX	135	150
ANÁLISE ESTATÍSTICA		U 1181	
		p NS	

Tabela 12 - Número de cercárias de *S. mansoni* emergentes por molusco a cada 24 horas nas diferentes etapas em infecções mono e pluri-irracidiana de *S. giabrata*. N= número de moluscos infectados; Med= mediana, Min e Max= valores mínimo e máximo registrados em cada etapa; U= valor estimado pela prova de Mann-Whitney; p= probabilidade associada ao valor estimado de U.

ETAPAS	PARÂMETROS	INFECÇÃO	
		MONO	PLURI
I	N	4	5
	MED	448,2	47,0
	MIN	61,3	43,0
	MAX	1297,7	323,3
II	N	11	7
	MED	379,7	360,0
	MIN	24,7	23,3
	MAX	693,7	502,0
III	N	2	23
	MED	161,0	240,3
	MIN	82,0	30,0
	MAX	240,0	573,3
IV	N	2	2
	MED	380,4	595,2
	MIN	55,0	56,0
	MAX	705,7	1134,3
TOTAL	N	19	37
	MED	379,7	258,0
	MIN	24,7	23,3
	MAX	1297,7	1134,3
ANÁLISE ESTATÍSTICA		U 258	
		p NS	



de 258 cercárias para os grupos **mono** e **pluri**, respectivamente.

#### Deteccão de esporocistos e cercárias

A procura de esporocistos e cercárias após a exposição revelou que, dos 182 moluscos dissecados, apenas um exemplar apresentou cercárias em seu interior.

#### 2.3 Correlações com a temperatura

Na Tabela 13 observa-se correlações positivas entre temperatura do ar e número de cercárias emergentes na fase clara da Etapa IIIa no grupo **pluri**, na fase escura das Etapas IIIb e IV em ambos os grupos e no grupo **mono**, respectivamente. Não foram detectadas correlações significativas quando a análise foi realizada para o conjunto das etapas. Os dados referentes às temperaturas ambientais médias registradas em cada intervalo de observação são apresentados na Tabela 18 do ANEXO II.

O Quadro 3 apresenta uma síntese dos resultados parasitológicos bem como das correlações entre número de cercárias emergentes por molusco e a temperatura do ar.

Tabela 13 - Correlação entre número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de infecções mono e plurimiracidianas (pluri) de *B. glabrata* e temperatura do ar nas fases clara e escura em cada etapa e no total das quatro etapas. São apresentados os coeficientes de correlação de Spearman (Rs). (\*)= p < 0,05; (NS)=não-significativo.

ETAPAS	INFECÇÃO MONO		INFECÇÃO PLURI	
	FASE CLARA	FASE ESCURA	FASE CLARA	FASE ESCURA
I	0,55 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
II	0,53 <sup>ns</sup>	0,57 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>
IIIa	0,57 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>	0,61*	-0,10 <sup>ns</sup>
IIIb	0,22 <sup>ns</sup>	0,60*	0,46 <sup>ns</sup>	0,76*
IV	0,42 <sup>ns</sup>	0,62*	0,41 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>
TOTAL	0,11 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	-0,24 <sup>ns</sup>

a- teste realizado entre 29/03 e 01/04/91; b- teste realizado entre 12/04 e 15/04/91.

Quadro 3 - Sumário dos resultados adicionais.

PARÂMETROS	PRINCIPAIS RESULTADOS
TAXA DE INFECÇÃO	A taxa de infecção foi maior na infecção pluri que nas monomiracidianas.
PERÍODO PRÉ-CERCARIANO	O período pré-cercariano não foi significativamente diferente entre as infecções mono e plurimiracidianas.
SOBREVIDA	A sobrevida não foi significativamente diferente entre as infecções mono e plurimiracidianas.
NÚMERO DE CERCÁRIAS EMERGENTES	O número de cercárias emergentes a cada 24 horas não foi diferente entre as infecções mono e plurimiracidianas.
CORRELAÇÕES COM A TEMPERATURA DO AR	Foram observadas correlações positivas entre a temperatura e número de cercárias emergentes a cada 3 horas na fase clara da Etapa IIIa para o grupo pluri, na fase escura da Etapa IIIb em ambos os grupos e na Etapa IV para o grupo mono. Não foram detectadas correlações significativas quando a análise foi realizada para o conjunto das etapas.

## 1- Considerações cronobiológicas

### 1.1 Ritmos de emergência de cercárias

Uma proporção acentuadamente maior de cercárias de S. mansoni emergiu na fase clara tanto nas infecções mono como nas plurimiracidianas. Estes resultados confirmam os dados obtidos por GIAVANNOLA (1936) e WILLIAMS & GILBERTSON (1982), que observaram, respectivamente, 80 e 95% das cercárias emergindo naquela fase.

Os picos recorrentes na fase clara observados nos cronogramas relativos às infecções mono e plurimiracidianas das Etapas I, II e III confirmam o padrão diário na emergência de cercárias de S. mansoni (BARBOSA & COELHO, 1954; LUTTERMOSER, 1955; GLAUDEL & ETGES, 1973; PITCHFORD & VISSER, 1966). A grande variabilidade entre os moluscos na porcentagem de cercárias emergentes em cada observação havia sido registrada por THERON (1982b) em relação a S. mansoni de Guadeloupe. A ausência de picos nas infecções plurimiracidianas da Etapa IV pode ser explicada pelo fato de que apenas dois moluscos foram testados, sendo que em um deles não foi observado ritmo na emergência das cercárias.

Para 95% dos moluscos analisados, os periodogramas indicaram 24 horas como o período que melhor explica a variação dos dados em ambos os tipos de infecção. A utilização do Periodograma para a análise deste parâmetro era inédita até o momento.

As séries temporais também mostraram a existência de picos recorrentes na fase clara para o número de cercárias emergentes tanto nas infecções mono como nas plurimiracidianas. A inspeção visual das séries temporais, conjugada à análise feita pelo Periodograma, confirma a ocorrência de um só pico na fase clara, ou seja, de um pico a cada 24 horas, aproximadamente.

Foram detectados ritmos de 24 horas pelo Cosinor individual nas cercárias emergentes de 93% dos moluscos testados. As acrofases, geralmente compreendidas entre 14:00 e 17:00 h, não diferiram entre os dois tipos de infecção. Assim, a dose miracidiana, que afeta a produção e a emergência de cercárias (THÉRON, 1981a,b), não influenciou o momento de emergência nem os intervalos das acrofases. A menor variabilidade esperada quanto às infecções monomiracidianas (em que as cercárias originam-se de um único esporocisto por poliembrionia, sendo geneticamente idênticas) não se expressou sobre o pico de emergência, embora este parâmetro seja determinado geneticamente (THÉRON & COMBES, 1983). Fica claro que, independentemente da dose miracidiana, existe uma sincronia entre os diferentes moluscos quanto ao horário de maior emergência de cercárias que possivelmente reflete a importância do aspecto temporal na transmissão molusco-vertebrado. Duas hipóteses alternativas podem ser consideradas: (a) a despeito do momento em que a cercária completa o seu desenvolvimento, a emergência ocorre preferencialmente entre 14:00 e 17:00 h ou (b) as cercárias completam seu desenvolvimento próximo a este intervalo, emergindo

em seguida. Ambas as hipóteses serão discutidas mais detalhadamente no item 1.2.

Há unanimidade na literatura quanto à ritmicidade diária na emergência de cercárias de *S. mansoni* por *B. glabrata*, com predominância no período diurno ou na fase clara do ciclo de luz. No entanto, os intervalos de maior emergência nem sempre coincidem entre os diferentes trabalhos. Estudos realizados ao ar livre revelaram intervalos correspondentes à maior emergência entre 10:00 e 15:00 h (ROWAN, 1958), 11:00 e 14:00 h (PITCHFORD & VISSER, 1966; PITCHFORD *et al.*, 1969), 11:00 e 17:00 h (BARBOSA & COELHO, 1954). Os intervalos também variaram entre os estudos de laboratório, com valores compreendidos entre 9:00 e 15:00 h (LUTTERMOSER, 1955), 10:00 e 15:00 h (ASCH, 1972), 11:00 e 13:00 h (NOJIMA & SATO, 1978) e 13:30 e 14:30 h (NOJIMA & SATO, 1982). Em estudos de laboratório que se referem a estimativas mais precisas, foram detectados picos de emergência às 7:00 (THÉRON & COMBES, 1983), 11:00 h (THÉRON, 1980), 12:00 (GLAUDEL & ETGES, 1973) e 15:30 h (THÉRON, 1980).

No que se refere à linhagem de BH, utilizada no presente trabalho, VALLE *et al.* (1971) observaram maior emergência entre 10:00 e 18:00 h em moluscos mantidos sob ciclos artificiais de luz. MACHADO E SILVA (1981) detectou um pico de emergência às 15:00 sob ciclo natural de luz, com temperatura oscilando entre 25 e 30°C. Picos de emergência na fase clara, também observados no presente trabalho, podem favorecer o encontro do parasita com hospedeiros definitivos com atividade essencialmente diurna. A

procedência da amostra testada parece corroborar esta hipótese: trata-se de parasitas isolados a partir de um foco de esquistossomose humana.

As chances de infecção do hospedeiro humano são maiores nos horários correspondentes à maior densidade de cercárias no meio aquático (REY, 1992). Assim, os picos de emergência em diferentes espécies de Schistosoma geralmente coincidem com a atividade do hospedeiro definitivo, seja ela diurna, como no homem que se infecta com S. mansoni (COMBES et al., 1975; NASSI et al., 1975; COMBES & THÉRON, 1977; THÉRON et al., 1978, 1986; THÉRON, 1984, 1985a; POINTIER et al., 1988), crepuscular, no caso dos antilopes que se infectam com S. margrebowiei (PITCHFORD & DUTOIT, 1976) ou noturna, como nos roedores que se infectam com S. rodhaini (PITCHFORD & VISSER, 1966).

Para 79% dos moluscos testados no presente trabalho, foi observado que até 10,0% das cercárias emergiu na fase escura. Em dois moluscos, a emergência nesta fase superou 30% do total de cercárias. Fora da faixa compreendida entre 14:00 e 17:00 h, a emergência de cercárias diminuiu drasticamente, mas não foi totalmente suprimida, o que confirma a literatura (GIAVANNOLA, 1936; ROWAN, 1958; MALDONADO, 1959; VALLE et al., 1971, 1973; MACHADO E SILVA, 1981; WILLIAMS & GILBERTSON, 1982).

Os ritmos de emergência de cercárias de S. mansoni em linhagens de BH têm sido estudados exclusivamente em amostras mantidas há vários anos no laboratório. Estudos cronobiológicos

com parasitas recém-isolados devem ser encorajados no sentido de confirmar a ocorrência de acrofases entre 14:00 e 17:00 h e a emergência de algumas cercárias à noite. Em caso positivo, deve-se considerar que a transmissão para o hospedeiro vertebrado também possa ocorrer no crepúsculo vespertino ou mesmo à noite, já que algumas cercárias permanecem infectantes na água por até 8 horas (REY, 1992). Embora a transmissão ocorra predominantemente de dia, deve-se investigar hábitos humanos crepusculares ou noturnos no local. Com relação a este aspecto, cabe mencionar os dados de PELLEGRINO & DE MARIA (1966) quanto a infecções experimentais de camundongos realizadas em diferentes momentos do dia em um lago em Sabará, MG. Esses autores observaram taxas de 26,4, 88,9 e 65,5% relativas a infecções efetuadas de manhã, à tarde e à noite, respectivamente, o que mostra que a possibilidade de infecção à noite não deve ser desprezada.

A participação de roedores na transmissão do *S. mansoni* já foi registrada em regiões do Brasil (MACHADO & SILVA, 1981; FAERSTEIN, 1984) e na ilha de Guadeloupe (NASSI et al., 1975; COMBES & THÉRON, 1977; THÉRON et al., 1978, 1986; THÉRON, 1980, 1982a,b, 1984, 1985a, 1986a,b; POINTIER et al., 1988; THÉRON & COMBES, 1988). Nesta região, a infecção dos roedores é explicada pelo papel facilitador dos meios aquáticos com fraca correnteza, que provocam o acúmulo de cercárias na água por muitas horas e possibilitam a infecção de roedores com atividade crepuscular ou noturna (COMBES & THÉRON, 1977; THÉRON, et al., 1977). Neste sentido, a eventual detecção de roedores silvestres infectados no foco de esquistossomose em Belo Horizonte poderia sugerir que,



além do hospedeiro humano, aqueles vertebrados também participem da transmissão do S. mansoni.

Não se deve descartar a hipótese de que o padrão temporal observado tenha sido artificialmente selecionado através de determinadas práticas de laboratório. É possível que a infecção experimental dos camundongos tenha ocorrido predominantemente à tarde, selecionando, ao longo de cinco anos de manutenção desta linhagem em laboratório, as cercárias com emergência neste período. Alterações relativamente rápidas também foram descritas em características morfológicas (COLES, 1971) e enzimáticas (LOVERDE *et al.*, 1985) em adultos de S. mansoni, estando possivelmente associadas ao mecanismo de deriva genética, a ser abordado no item 2.

A ação da seleção artificial sobre os ritmos biológicos já foi descrita em D. melanogaster (CLAYTON & PAIETTA, 1972) e em S. mansoni (REY, 1992). Esse autor, reanalisando os resultados de MACHADO E SILVA (1981), descreveu o fenômeno na emergência de cercárias em linhagens brasileiras (Sumidouro, RJ). Em amostras de S. mansoni isoladas a partir de fezes humanas e mantidas em roedores no laboratório por mais de 10 anos, o padrão temporal assemelhou-se ao observado em amostras isoladas de roedores silvestres. Este padrão caracterizou-se justamente por picos no final da tarde e pela presença de cercárias na fase escura, o que coincide com a atividade crepuscular ou noturna dos roedores.

Os padrões cronobiológicos na emergência de cercárias relacionados à atividade dos hospedeiros vertebrados pode contribuir para o processo de especiação no gênero Schistosoma (THÉRON, 1989). A longo prazo, a colonização de diferentes nichos temporais pode resultar em mudanças micro-evolutivas em populações separadas temporalmente (alocronia), colaborando para processo de especiação simpátrica (BECK, 1980).

### 1.2 Aspectos populacionais

A análise feita pelo Cosinor populacional revelou ritmos de 24 horas em quatro dos cinco casos nos quais o método era aplicável. Isto mostra uma grande homogeneidade entre os parâmetros ritmicos estimados para as populações de cercárias emergentes de cada molusco em cada tipo de infecção. A não detecção de ritmo nas infecções plurimiracidianas da Etapa I pode ser explicada pelo resultado do Cosinor individual em um dos moluscos analisados, no qual a probabilidade associada ao ritmo de 24 horas foi igual ao nível de significância.

A detecção pelo Cosinor Individual de ritmos de emergência de cercárias em 93% dos moluscos havia confirmado claramente a ritmicidade quanto às cercárias emergentes de cada molusco. Do ponto de vista do conjunto de moluscos, a análise cronobiológica revela ainda que a emergência de cercárias, além de ritmica, também é sincrônica. Isto decorre (a) da semelhança nas acrofa<sup>3</sup>ses entre os diferentes moluscos, quando analisados individualmente, (b) da homogeneidade entre os parâmetros ritmicos relativos à cada tipo de infecção e (c) da semelhança nos ritmos

de emergência entre as infecções mono e plurimiracidianas da Etapa II, detectada quando foi possível aplicar o teste de Bingham.

Além da sincronia, os ritmos de emergência de cercárias apresentam algumas características em comum com os ritmos em portão, embora não haja supressão total da emergência em determinadas fases, como nos ritmos de desenvolvimento em D. pseudoobscura (PITTENDRIGH & MINIS, 1964). Assim, eles são ritmos de desenvolvimento e só podem ser detectados quando analisados sob o ponto de vista populacional, já que a cercária emerge uma única vez.

A caracterização do ritmo de emergência como um ritmo em portão estaria relacionada ao fato de que, embora a cercária pudesse completar seu desenvolvimento em diferentes momentos ao longo das 24 horas, sua emergência ocorreria preferencialmente entre 14:00 e 17:00 h, que corresponderia ao portão. Alguns dados da literatura parecem corroborar esta hipótese. A emergência quase imediata de cercárias de S. haematobium em resposta a mudanças bruscas na intensidade luminosa (RAYMOND & PROBERT, 1987) parece indicar que as cercárias já estavam prontas para emergir e efetivamente o fizeram sob determinadas condições ambientais. Resultados semelhantes também são descritos para S. mansoni em resposta a mudanças na iluminação ou na temperatura (ASCH, 1972; GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1978, 1982). Outros digenéticos parecem comportar-se de forma semelhante. Observações em cercárias de Gymnocephala sp. demonstram que a emergência é controlada primariamente pela temperatura ambiente.

As cercárias prontas para sair concentram-se nos vasos sanguíneos do manto dos moluscos, "... aguardando o sinal..." do ambiente (CHERNOGORENKO, 1982).

Uma outra hipótese é a de que as cercárias emergem assim que são produzidas, o que implicaria na ocorrência de um ritmo associado à alguma etapa da produção. Sabe-se que o ritmo circamensal de emergência detectado nas infecções monomiracidianas reflete uma alteração na produção de cercárias ao longo dos dias (THERON, 1981a). Analogamente, o ritmo diário de emergência também poderia decorrer de uma alteração na produção de cercárias ao longo das 24 horas. A diferenciação entre a emergência de cercárias e a sua produção ao longo das 24 horas, esta última estimada com auxílio de técnicas histológicas, permitirá saber se as cercárias emergem assim que são produzidas ou se realmente detectam um sinal ambiental para emergir.

Confirmando-se ou não a existência de um portão para a emergência de cercárias, os sinais ambientais que deflagariam este fenômeno, tais como as variações nos ciclos de luz e temperatura referidas anteriormente (ASCH, 1972; GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1978, 1982; KUNTZ, 1947), poderiam atuar direta ou indiretamente (via molusco) sobre a cercária. A participação de estruturas nervosas do esporocisto secundário nos mecanismos cronobiológicos de emergência em *S. mansoni* (THERON, 1982b; THERON & FOURNIER, 1982) sugere que a cercária levaria algum tempo para alcançar o meio exterior, segundo RAYMOND & PROBERT (1987). Para avaliar se há um efeito direto, seria necessária a manutenção

das cercárias in vitro, simulando o meio interno do molusco, porém manipulando as variáveis ambientais. Por outro lado, a fisiologia do molusco, rítmica em vários aspectos (CHAUDRY & MORGAN, 1983) poderia influenciar a emergência de cercárias. Poucos estudos relacionam ritmos do molusco aos do parasita. WILLIAMS & GILBERTSON (1983) apontam evidências de que os ritmos de batimentos cardíacos, locomoção e alimentação do molusco não se relacionam à emergência. Este aspecto merece ser investigado mais detalhadamente em estudos que envolvam outras variáveis rítmicas presentes no molusco.

THÉRON (1980, 1982a) associa um parâmetro cronobiológico da emergência de cercárias ao grau de compatibilidade entre moluscos e parasitas. Ao comparar a emergência de cercárias por exemplares de B. glabrata infectados com linhagens simpátrica e alopátrica de S. mansoni, aquele autor estimou a dispersão temporal, definida como a faixa de horários em que ocorreu emergência cercariana. A maior dispersão temporal observada nos dados relativos às infecções alopátricas foi atribuída a uma possível defasagem na emergência diária das cercárias neste tipo de infecção. Segundo o autor, o parâmetro pode ser útil para a avaliação da compatibilidade molusco-parasita, sendo tanto menor quanto maior o grau de compatibilidade.

O fato de a emergência de cercárias ser sincrônica, além de rítmica, pode ser fundamental para a manutenção do ciclo da doença (FILE, 1975) e se torna ainda mais importante quando se considera o tempo de vida reduzido e a infectividade decrescente

da cercária (THÉRON, 1982a; FOURNIER et al., 1984). Assim, a importância adaptativa da sincronia para a emergência de cercárias possivelmente relaciona-se a um maior número de cercárias no meio aquático. Este evento minimizaria a importância de indivíduos menos aptos na população emergente durante a fase de maior emergência de cercárias e/ou favoreceria a infecção do hospedeiro vertebrado, já que a probabilidade de infecção aumenta com a densidade de cercárias no meio aquático (REY, 1992).

## 2- Considerações adicionais

### 2.1 Análise dos dados parasitológicos

Os resultados das comparações entre as infecções mono e plurimiracidianas quanto aos parâmetros parasitológicos são discutidos a seguir.

No total de moluscos expostos ao parasita, as taxas de infecção foram significativamente mais altas nas infecções pluri que nas monomiracidianas. Muitos autores afirmam que o aumento da dose miracidiana contribui para aumentar as taxas de infecção em S. mansoni (LIM & HEYNEMAN, 1972; ANDERSON, 1978; LEWIS et al., 1986). Em B. glabrata - S. mansoni, são descritas taxas de 8% para infecções monomiracidianas e entre 50 e 60% em infecções com cinco miracidios (SCHREIBER & SCHUBERT, 1949). STURROCK & STURROCK (1970) observaram taxas de 80% em infecções monomiracidianas e entre 70 e 100% em infecções com cinco miracidios. Taxas de 33,2 e 77,8% foram obtidas por PARAENSE & CORRÊA (1981) em relação a infecções com um e dez miracidios, respectivamente, e MOUGEOT & GOLVAN (1974) obtiveram taxa de 23% em infecções monomiracidianas e de 30% em infecções com dose miracidiana entre 8 e 12 miracidios. É possível que o aumento na dose miracidiana altere a probabilidade de encontro entre miracidios e moluscos bem como o desenvolvimento do parasita dentro deste hospedeiro.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as infecções mono e plurimiracidianas no número de cercárias

emergentes a cada 24 horas. As amplas faixas apresentadas atestam uma grande variabilidade na emergência de cercárias entre os diferentes moluscos testados.

Diferenças no número de cercárias emergentes nas diversas doses miracidianas de S. mansoni permanecem uma controvérsia. THÉRON (1981a), por exemplo, utilizando amostras brasileiras de S. mansoni e de B. glabrata, observou que o número de cercárias emergentes em infecções monomiracidianas é a metade do total emergente de infecções com dois miracidios. THÉRON (1982b) registrou 174 cercárias por molusco a cada 24 horas nas infecções mono e 420, nas infecções com cinco miracidios. Por outro lado, STURROCK & STURROCK (1970) detectaram que o número de cercárias emergentes é semelhante nas infecções monomiracidianas e com quatro miracidios em B. glabrata - S. mansoni originários de Santa Lucia, Antilhas. Eles atribuíram esta semelhança à ausência de interferências no desenvolvimento dos miracidios ou dos esporocistos primários nas infecções monomiracidianas. Resultados discrepantes quanto ao número de cercárias emergentes entre os dois tipos de infecção podem estar relacionados à realização dos experimentos em diferentes fases do ritmo circamensal de produção de cercárias detectado por THÉRON (1981a) em infecções monomiracidianas. Assim, de acordo com os diferentes autores, a invasão do molusco por mais de um miracidio nem sempre é acompanhada por um aumento na emergência de cercárias.

Em estudos realizados em S. mansoni e B. glabrata



(CHRISTIE & PRENTICE, 1978; SLUITERS et al., 1980; LEWIS et al., 1986) e em S. haematobium (LO, 1972), o aumento da dose miracidiana não é linearmente acompanhado por um aumento no número de esporocistos secundários e, conseqüentemente, de cercárias. As explicações para este fenômeno estão nos trabalhos de PAN (1965), que observou que esporocistos primários podem degenerar antes de produzir esporocistos secundários e de CHERNIN & ANTOLICS (1975), onde 30% dos miracidios viáveis não infectam hospedeiros suscetíveis.

O período pré-cercariano não é afetado pela dose miracidiana. Os resultados estão concentrados entre 28-35 dias, período característico para S. mansoni (STURROCK & STURROCK, 1970; MOUGEOT & GOLVAN, 1974; PARAENSE & CORRÊA, 1981; LANCASTRE et al., 1984; LEWIS et al., 1986).

A sobrevivência também não variou com a dose miracidiana. No presente estudo, ela variou numa ampla faixa compreendida entre 5 e 150 dias. Em laboratório, foram observados moluscos infectados com cinco miracidios sobrevivendo por 39 dias (BARBOSA et al., 1954) e até por 147 dias (CONCEIÇÃO et al., 1986), como registrada no presente estudo.

As taxas de infecção obtidas (9,5% nas infecções mono e 19,1% nas plurimiracidianas) são baixas quando comparadas às estimadas para combinações parasito-molusco procedentes de Belo Horizonte, MG: 33,2% em infecções monomiracidianas (PARAENSE & CORRÊA, 1981), 95,1 % em infecções com cinco miracidios

(PARAENSE & CORRÊA, 1963), 77,78% (PARAENSE & CORRÊA, 1981) e 82,0% (DIAS et al., 1988) em infecções com 10 miracidios.

Os moluscos negativos de fato não apresentavam cercárias em seu interior, já que dos 182 exemplares negativos dissecados, apenas um apresentou cercárias. Assim, a não emergência de cercárias refletiu a ausência de infecção, o que pode ter decorrido tanto da não penetração do miracidio como de reação imunológica do molusco (LOKER & BAYNE, 1982).

O número de cercárias emergentes a cada 24 horas em ambos os tipos de infecção foi mais baixo do que os encontrados na literatura: 700 em infecções com doses entre 5 e 7 miracidios (SCHREIBER & SCHUBERT, 1949), 4598 (BARBOSA et al., 1954), 1500 (WEBBE, 1965), entre 1000 e 3000 (MCCLELLAND, 1967) e entre 1115 e 2872 (STURROCK & STURROCK, 1970) em infecções com cinco miracidios e 2648 em infecções monomiracidianas (STURROCK & STURROCK, 1970). Estas comparações, no entanto, devem ser vistas com reservas já que o uso de diferentes procedimentos e amostras influenciam as estimativas do parâmetro em questão (FRANDSEN, 1979; THÉRON, 1982b). Um outro aspecto a ser levantado a partir da literatura é o uso indevido do termo produção de cercárias. A análise da literatura revela que a produção cercariana tem sido indiretamente avaliada através do número de cercárias emergentes de cada molusco em um dado intervalo de tempo. Tal observação é dita indireta pois apenas estudos que envolvam a dissecação de moluscos permitem quantificar o total de cercárias produzidas. Assim, em lugar do termo produção de cercárias, o termo emergência de cercárias tem

sido empregado no presente estudo.

As baixas taxas estimadas tanto no conjunto dos moluscos expostos quanto nas etapas de exposição aos miracídios podem ser atribuídas a menores suscetibilidade do molusco e/ou infectividade do parasita. Além disto, observou-se que estas taxas variaram ao longo dos três anos, oscilando entre 5.0 e 31.6% nas infecções monomiracidianas e entre 8,5 e 38,9% nas infecções plurimiracidianas. A obtenção de baixas taxas e as flutuações observadas possivelmente refletem alterações na interação parasito-hospedeiro. Com relação a este aspecto, LIM & HEYNEMAN (1972) destacam a possibilidade de ter ocorrido seleção nas populações de moluscos e/ou parasitas mantidas no laboratório. Pequenas variações nas práticas de rotina, como o tamanho do aquário, a temperatura ou as condições da água, podem favorecer a curto prazo variantes suscetíveis ou refratárias dentro da população de moluscos pelo mecanismo de deriva genética, que refere-se a flutuações ao acaso nas frequências alélicas relacionadas ao tamanho da amostra. A deriva genética é ainda mais efetiva quando uma nova população é fundada a partir de um pequeno número de indivíduos, podendo ocorrer nas várias passagens em laboratório dos parasitas pelos hospedeiros vertebrados. Populações de S. mansoni mantidas no laboratório podem ter passado por um grande número de "gargalos evolutivos" -- reduções drásticas no tamanho efetivo da população (CARSON, 1990) -- devido a um decréscimo ocasional no número de moluscos infectados. Esta redução poderia fixar um outro alelo ao acaso (LOVERDE et al ., 1985).

Da mesma forma, modificações nos procedimentos de manutenção ou infecção, tais como a passagem da linhagem do parasita por hospedeiros não-naturais, também podem afetar as pressões seletivas que atuam sobre as populações envolvidas, modificando a infectividade do parasita e/ou a suscetibilidade do molusco e permitindo mudanças na taxa de infecção ou até em outros parâmetros. CAPRON et al. (1965) apontaram que, no laboratório, S. haematobium infectou o hamster, hospedeiro definitivo não-natural, mas os miracídidos tiveram os seus potenciais infectantes reduzidos após inúmeras passagens neste vertebrado. LOVERDE et al (1985b) apontaram ainda que os hospedeiros vertebrados não-naturais induziram a um decréscimo no polimorfismo enzimático de S. mansoni. Assim, as baixas taxas de infecção podem refletir um ajuste ao camundongo, sendo resultantes de um processo de seleção artificial relativamente rápido já que a amostra vem sendo mantida em laboratório desde 1985.

A ampla variabilidade, observada nos parâmetros parasitológicos estimados e detectada pela realização das exposições em diferentes momentos, pode ser decorrente de processos tais como a seleção artificial. No entanto, ela parece ser um caráter inerente à espécie estudada, tomando antes parte em uma estratégia evolutiva dos esquistossomatídeos. Estas contradições podem em parte ser explicadas pelo fato de a produção cercariana em Schistosoma também ser determinada geneticamente (RICHARDS, 1975, 1976), variando com os diferentes graus de suscetibilidade do molusco (WARD et al., 1988) e de infectividade

do parasita (RICHARDS, 1975). Segundo COMBES (1991) uma maior variabilidade genética observada entre os parasitas favorece uma evasão imunológica. Em geral, a reprodução sexuada é apontada como o mecanismo gerador de variabilidade, graças ao aumento da recombinação genética (TAIT, 1990). E é justamente a sexualidade observada nos esquistossomos que surpreende, pois contrasta com o hermafroditismo presente não só nos outros digenéticos mas também na maioria dos parasitas (COMBES, 1991). Ao aumentar sua variabilidade genética, a reprodução sexuada nos esquistossomos aumentou as chances de sobrevivência no interior dos hospedeiros vertebrados, cujo sistema imune é evolutivamente mais sofisticado (COMBES, 1990, 1991).

Houve um decréscimo no total de cercárias emergentes de cada molusco, principalmente do primeiro para o segundo dia de experimento (Tabelas 14, 15, 16 e 17 do ANEXO II). Na Etapa I, quando também foram realizadas coletas a cada 12 horas, este decréscimo é bastante nitido. Em algumas etapas, isto ocorre na maioria dos moluscos examinados. Apesar de não ter sido observado de maneira generalizada, este evento sugere um efeito direto da manipulação experimental sobre a variável estudada. THÉRON (1982b), apesar de não ter demonstrado este efeito, não descartava a possibilidade de sua ocorrência. Assim, estudos futuros devem considerar a possibilidade do procedimento experimental afetar a emergência das cercárias, e esforços devem ser feitos no sentido de desenvolver técnicas de coleta de cercárias que não envolvam a manipulação direta do molusco.

## 2.2 Correlações com a temperatura

Dentro das faixas de temperatura estudadas, o número de cercárias emergentes não esteve associado sistematicamente a variações neste fator ambiental. Foram observadas poucas situações em que houve correlações significativas com o número de cercárias emergentes a cada três horas.

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes que atuam sobre a produção cercariana. Este fator ambiental influencia a sobrevivência e a infectividade dos miracídios quando em valores muito extremos (LIM & HEYNEMAN, 1972; ANDERSON et al., 1982), seu aumento estimula o movimento natatório das cercárias (VALLE et al., 1974) e altera a infectividade das mesmas quando fora da faixa ótima (DEWITT, 1965; CHAPPEL & COLES, 1972). É também a temperatura que afeta diretamente o desenvolvimento das etapas larvais do S. mansoni. Seja no interior do molusco (PFLÜGER, 1981), seja no interior do hospedeiro vertebrado (TRIBOULEY et al., 1977), estas etapas são mais sensíveis às condições climáticas e podem ser consideradas o elo mais fraco na cadeia de transmissão (PFLÜGER, 1981).

A produção cercariana não ocorre a temperaturas menores que 16 e maiores que 35° C. Entre 20 e 26° C, o aumento da produção é relativamente pequeno; a 28° C, é acentuado e a 30° C, ótimo (STIREWALT, 1954). Além disto, as flutuações diárias na temperatura estimulam fortemente a produção cercariana em comparação ao que ocorre quando a temperatura é constante e

equivalente à média das temperaturas mínimas e máximas.

Dentre os estudos de laboratório que investigam a influência de fatores ambientais sobre a emergência de cercárias, alguns atestam a importância da temperatura sobre o ritmo de emergência (STIREWALT, 1954; KUNTZ, 1947). No entanto, a maioria dos autores aponta a luz como o fator mais influente (GIAVANNOLA, 1936; LUTTERMOSER, 1955; VALLE et al., 1971, 1973; GLAUDEL & ETGES, 1973; NOJIMA & SATO, 1973, 1982; WILLIAMS & GILBERTSON, 1982; WILLIAMS et al., 1984; RAYMOND & PROBERT, 1987, 1991). Esta controvérsia possivelmente relaciona-se ao fato de que uma metodologia cronobiológica, adequada às manipulações dos ciclos ambientais em laboratório, não tem sido empregada. Embora os resultados do presente estudo não indicaram a temperatura como fator determinante para a ocorrência do fenômeno, pesquisas futuras, que permitam uma melhor quantificação do efeito deste fator ambiental sobre o ritmo de emergência de cercárias, devem ser encorajadas.

## CONCLUSÕES GERAIS

1- Não houve diferença no ritmo de emergência de cercárias de S. mansoni entre as infecções mono e plurimiracidianas de B. glabrata. A dose de cinco miracidios, que altera os mecanismos de regulação e produção de cercárias, não afetou os ritmos de emergência de cercárias nesta amostra.

2- Foram detectados ritmos de 24 horas com acrofases compreendidas entre 14 e 17 horas tanto nas infecções mono quanto nas plurimiracidianas. Embora se tenha observado grande proporção de cercárias na fase clara, a emergência na fase escura não foi desprezível. Isto pode ser atribuído a existência de hospedeiros com hábitos crepusculares ou noturnos ou a rotinas de infecção no laboratório. Neste sentido, pesquisas que envolvam o estudo cronobiológico em linhagens recém-isoladas do campo devem ser encorajadas.

3- Os ritmos de emergência de cercárias de S. mansoni apresentam algumas características dos ritmos em portão. Assim, eles são ritmos de evento único, populacionais, em que as cercárias parecem detectar um sinal ambiental para emergir. A importância adaptativa da sincronia na emergência de cercárias refere-se a um aumento nas chances de infecção dos hospedeiros vertebrados por estas formas larvais. Futuros estudos diferenciando ritmos de produção de ritmos de emergência permitirão investigar se as cercárias emergem assim que são produzidas ou se "aguardam" um sinal ambiental para fazê-lo.



4- O período pré-cercariano, a sobrevivência e o número de cercárias emergentes a cada 24 horas não foram significativamente diferentes entre ambos os tipos de infecção. A taxa de infecção foi maior nas infecções pluri que nas monomiracidianas. As flutuações encontradas nestes parâmetros podem refletir diferenças interindividuais na infectividade do parasita e/ou na suscetibilidade do molusco. Ainda assim, pesquisas futuras devem avaliar possíveis alterações provocadas a curto prazo por rotinas de manutenção das amostras malacológicas e parasitológicas no laboratório.

5- A emergência de cercárias não esteve associada sistematicamente a variações na temperatura ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R.M. Population dynamics of snail infection by miracidia. Parasitology 77 (2): 201-224, 1978.
- ANDERSON, R.M; MERCER, J.G; WILSON, R.A & CARTER, N.P. Transmission of Schistosoma mansoni from man to snail: experimental studies of miracidial survival and infectivity in relation to larval age, water temperature, host size and host age. Parasitology 85: 339-360, 1982.
- ASCH, H.L. Rhythmic emergence of S. mansoni cercariae from B. glabrata: control by illumination. Experimental Parasitology 31:350-355, 1972.
- ASCHOFF, J. Adaptive cycles: their significance for defining environmental hazards. International Journal of Biometeorology 11 (3): 255-278, 1967.
- , A survey on biological rhythms. In: ASCHOFF, J., ed. Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. New York, Plenum Press, 1981. p. 3-10.
- , Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. In: Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Conference on Chronobiology. Leiden, I.S.C., 1987.
- , Temporal orientation: circadian clocks in animals and humans. Animal Behaviour 37: 881-896, 1989.
- BARBOSA, F. S. & COELHO, M. V. Qualidades de vetor dos hospedeiros do S. mansoni no nordeste do Brasil. I. Suscetibilidade de A. glabratus e T. centinentalis à infestação por S. mansoni. Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães 3: 55-62, 1954.
- BARBOSA, F. S.; COELHO, M. V. & DOBBIN Jr., J. E. Qualidades de vetor dos hospedeiros de S. mansoni no Nordeste do Brasil. II. Duração da infestação e eliminação de cercárias em A. glabratus. Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães III (7): 79-92, 1954.

- BECK, S.D. Insect Photoperiodism. 2<sup>nd</sup> Edition. New York, Academic Press, 1980. 387 pp.
- BINGHAM, C.; ARBOGAST, B.; CORNELISSEN, G.; LEE, J.-K. & HALBERG, F. Inferential statistical methods for estimating and comparing Cosinor parameters. Chronobiologia 9: 397-439, 1982.
- BRADY, J., ed. Biological Timekeeping. London, Cambridge University Press, 1982. 197 pp.
- BUNNING, E. Opening address: biological clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (Biological Clocks) 25: 1-10, 1960.
- , The Physiological Clock. Revised 2nd Edition. New York, Springer-Verlag, 1967. Volume 1: 167pp.
- CAMBROSIO, A. & KEATING, P. The disciplinary stake: the case of chronobiology. Social Studies of Science 13: 323-353, 1983.
- CAPRON, A. DEBLOCK, S.; BIGUET, J.; CLAY, A.; ADENIS, L. & VERNES, A. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à Schistosoma haematobium. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé 32: 755-778, 1965.
- CARLOS, M.A & COELHO, P. M. Z. The crowding effect in Biomphalaria glabrata affecting the intramolluscan Schistosoma mansoni. The Journal of Parasitology 64 (6): 1137-1138, 1978.
- CARSON, H. L. Increased genetic variance after a population bottleneck. Trends in Ecology and Evolution 5: 228-230, 1990.
- CHAPPEL, L. H. & COLES, G. C. The effect of cooling on the infectivity of Schistosoma mansoni cercariae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 67 (1): 142, 1972.

- CHASSE, J.-L. & THERON, A. An example of circular statistics in chronobiological studies: analysis of polymorphism in the emergence rhythms of Schistosoma mansoni cercariae. Chronobiology International 5 (4): 433-440, 1988.
- CHAUDRY, M.A. & MORGAN, E. Circadian rhythms in tropical freshwater pulmonates. p. 178 In: LEVER, J. & BOER, H.H., eds. Molluscan Neuro-Endocrinology. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1983. 268pp.
- CHENG, T. C. & BIER, J. W. Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of Schistosoma mansoni. Parasitology 64: 129-141, 1972.
- CHERNIN, E. Maintenance in vitro of larval Schistosoma mansoni in tissues from the snail, Australorbis glabratus. The Journal of Parasitology 50 (4): 531-545, 1964.
- CHERNIN, E. & ANTOLICS, V. M. Penetrative capacity of Schistosoma mansoni miracidia. The Journal of Parasitology 62 (3): 560-561, 1975.
- CHERNOGORENKO, M.I. Periodicity, diurnal rhythm and ecologic factors influencing the rate of issuance of cercarial from mollusk hosts. Hydrobiological Journal 18 (3): 64-72, 1982.
- CHRISTENSEN, N. Ø.; FRANSEN, F. & NANSEN, P. The effect of some environmental conditions and final-host- and parasite-related factors on the penetration of Schistosoma mansoni cercariae into mice. Zeitschrift für Parasitenkunde 59: 267-275, 1979.
- CHRISTIE, J. D. & PRENTICE, M. A. The relationship between numbers of Schistosoma mansoni daughter sporocysts and miracidia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72 (2): 197-198, 1978.
- CLAYTON, D. L. & PAIETTA, J. V. Selection for circadian eclosion time in Drosophila melanogaster. Science 178: 994-995, 1972.

COLES, G. C. Alteration of Schistosoma mansoni malate dehydrogenase isoenzymes on passage in the laboratory. Comparative Biochemistry and Physiology 40B: 1079-1083, 1971.

-----, The effect of diet and crowding on the shedding of Schistosoma mansoni cercariae by Biomphalaria glabrata. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 67 (4): 419- 423, 1973.

COMBES, C. Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. Trends in Ecology and Evolution 5 (10): 334-337, 1990.

-----, The schistosome scandal. Acta Oecologica 12 (1): 165-173, 1991.

COMBES, C. & THÉRON, A. Rythmes d'émergence des cercaires de trematodes et leur intérêt dans l'infestation de l'homme et des animaux. Instituto de Biologia Publicaciones Especiales 4: 141-150, 1977.

COMBES, C.; LÉGER, N. & GOLVAN, Y.L. Le rôle du rat dans la dynamique de l'endemie schistosomienne en Guadeloupe. Comptes Rendus de l'Academie de Sciences du Paris (Série D) 281: 1059-1061, 1975.

CONCEIÇÃO, M. J.; COURA, J. R. & CHEEVER, A. W. Variabilidade de cepas de Schistosoma mansoni na produção de cercárias. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81 (4): 473-474, 1986.

CORNÉLISSEN, G.; HALBERG, F.; STEBBINGS, J.; HALBERG, E; CARADENTE, F. & HSI, B. Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. La Ricerca Clinical Laboratory 10 (2): 333-385, 1980.

COX, F. E. G., ed. Modern Parasitology: a textbook of parasitology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1982. 346 pp.

DEWITT, W. B. Effects of temperature on penetration of mice by cercariae of Schistosoma mansoni. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 14 (4): 579-580, 1965.

- DIAS, L. C. de S.; BRUCE, J. T. & COLES, G. C. Strain variation in the infectivity of Schistosoma mansoni for Biomphalaria glabrata. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 30 (2): 86-99, 1988.
- DICONZA, J. J. & HANSEN, E. L. Multiplication of transplanted Schistosoma mansoni daughter sporocysts. The Journal of Parasitology 58 (1): 181-182, 1972.
- DOUBE, B. M. Regulation of the circadian rhythm of detachment of engorged larvae and nymphs of the argasid kangaroo tick, Ornithodoros gurneyi. Journal of Medical Entomology 12 (1): 15-22, 1975.
- DOUMENGE, J. P.; MOTT, K. E.; CHEUNG, C.; VILLENAVE, D.; CHAPUIS, O.; PERRIN, M. F. & REAUD-THOMAS, G. Atlas of the Global Distribution of Schistosomiasis. Bordeaux, Presses Universitaires de Bordeaux, 1988, p. 1-500.
- ENRIGH, J:T. Ecological aspects of endogenous rhythmicity. Annual Review of Ecology and Systematics 1: 221-238, 1970.
- FAERSTEIN, N.F. Estudo comparativo entre duas amostras de Schistosoma mansoni Sambon, 1907 isoladas de roedores e humanos, em Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1984. (Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- FAUST, E. C. & HOFFMAN, W. A. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 1) The extra-mammalian phases of the life cycle. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine 10 (1): 1-97, 1934.
- FILE, S. K. Superinfection of Biomphalaria glabrata with Schistosoma mansoni. The Journal of Parasitology 61 (1): 75-78, 1975.

- FOURNIER, A.; THÉRON, A.; BERRADA, O. & GABRION, C. Platyhelminthes parasites synchronisation de la rencontre avec la cible. In: CLEMENT, P.; RAMOUSSE, P., eds. La Vision chez les Invertébrés. Paris, Editions du CNRS, 1984. p. 295-298.
- FRANSEN, F. Discussion of the relationship between Schistosoma and their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatibility and evaluation of schistosome taxonomy. Zeitschrift für Parasitenkunde 58 (3): 275-296, 1979.
- GARFIELD, E. Chronobiology: an internal clock for all seasons. Part 1. The development of the science of biological rhythms. Current Contents 1: 3-8, 1988.
- GIAVANNOLA, A. Some observations on the emission of cercariae of S. mansoni, Trematoda, Schistosomatidae, from Australorbis glabratus. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 3 (2): 60-61, 1936.
- GLAUDEL, R.J. & ETGES, F.J. The effect of photoperiod inversion upon Schistosoma mansoni cercarial emergence from Biomphalaria glabrata. International Journal for Parasitology 3 (5): 619-622, 1973.
- HALBERG, F. Physiologic 24-hr periodicity: general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. Zeitschrift für Vitamin-Horm- and Fermentforschung 10: 225-296, 1959.
- HALBERG, F.; CARADENTE, F.; CORNELISSEN, G. & KATINAS, G. S. Glossary of Chronobiology. Chronobiologia 4 (suppl 1): 1-190, 1977.
- HANSEN, E. L. Progeny-daughter sporocysts of Schistosoma mansoni. International Journal for Parasitology 3: 267-268, 1973.
- HAWKING, F. Circadian and other rhythms of parasites. IN: DAWES, B., ed. Advances in Parasitology. London, Academic Press, 1975. v. 13: 123-182.

JOURDANE, J.; THÉRON, A. & COMBES, C. Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of Schistosoma mansoni. Acta Tropica 37: 177-182, 1980.

KALMUS, H. Periodizität und Autochronie (= Ideo-chronie) als zeitregelnde Eigenschaften der Organismen. Biologia Generalis 11: 93-114, 1935.

KAWASHIMA, K.; BAS, B. L. & SANTOS Jr., A. T. The cercarial emergence of Schistosoma japonicum from Oncomelania quadrasi under outdoor conditions in the Philippines. Journal of Helminthology 59 (3): 225-231, 1985.

KECHEMIR, N. Dynamics of cercarial production of S. haematobium by B. truncatus. Molecular and Biochemical Parasitology, suppl: 469, 1982.

-----, Polymorphisme de Schistosoma haematobium (Bilharz, 1852) en Algérie. Bulletin de la Société Française de Parasitologie 8 (supl. 1): 712, 1990.

KOMIYA, Y. & ISHII, K. The shedding aspect of cercariae of Schistosoma japonicum from its snail host, Oncomelania nosophora in Japan. Japanese Journal of Medical Science and Biology 7: 25-37, 1954.

KUNTZ, R. E. Effect of light and temperature on emergence of S. mansoni cercariae. Transactions of the American Microscopy Society 66: 37-49, 1947.

LAGRANGE, E. Infections unisexuées et possibilité de guérison de bilharziose à S. mansoni chez la souris. Rivista di Parassitologia 19 (1): 59-66, 1958.

LANCASTRE, F.; COUTRIS, G.; BOLOGNINI-TRENEY, J.; TRAORE, L. & MOUGEOT, G. Schistosomose expérimentale. III. Observations sur l'infestation de Biomphalaria glabrata par un miracidium de Schistosoma mansoni. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 59 (1): 79-94, 1984.



- LANCASTRE, F.; DEROUIN, F.; BARRIÈRE, L. & GOLVAN, Y. J. Experimental schistosomiasis. II. Infection of Biomphalaria glabrata by two miracidia of Schistosoma mansoni. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 51 (2): 227-239, 1976.
- LEWIS, F. A.; STIREWALT, M. A.; SOUZA, C. P.; GAZZINELLI, G. Large-scale laboratory maintenance of Schistosoma mansoni, with observations on three schistosome/snail host combinations. The Journal of Parasitology 72 (6): 813-829, 1986.
- LIM, H. K. & HEYNEMAN, D. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. Advances in Parasitology 10: 191-268, 1972.
- LO, C-T. Compatibility and host-parasite relationships between species of the genus Bulinus (Basommatophora: Planorbidae) and an aegyptian strain of Schistosoma haematobium (Trematoda: Digenea). Malacologia 11 (2): 225-280, 1972.
- LOHACHIT, C.; SRITABUTRA, P. & BUTRCHAM, P. Pattern of emergence of Schistosoma mekongi cercariae from the beta race of Lithoglyphopsis aperta. Malacological Review, suppl. 2: 47-51, 1980.
- LOKER, E. S. & BAYNE, C. J. In vitro encounters between Schistosoma mansoni primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of Biomphalaria glabrata. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 31: 999-1005, 1982.
- LOVERDE, P. T.; BOSSHARDT, S. C. & DAMIAN, R. T. Evidence for host-induced selection in Schistosoma mansoni. Journal of Parasitology 71 (3): 297-301, 1985.
- LUTTERMOSER, G. W. Studies on the chemotherapy of experimental schistosomiasis. III. Harvest of Schistosoma mansoni cercariae by forced nocturnal emergence from Australorbis glabratus. Journal of Parasitology 41: 201-208, 1955.

- LUTZ, A. Schistosoma mansonii and schistosomiasis observed in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 11: 109-140, 1919.
- MACHADO E SILVA, J.R. Observações sobre a evolução de diferentes amostras de Schistosoma mansonii em Biomphalaria glabrata e Mus musculus. Rio de Janeiro, 1981. (Tese, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz).
- MALDONADO, J. F. The daily emergence of the cercaria Schistosoma mansonii. Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico 51 (9): 336-339, 1959.
- MCCLELLAND, W. J. F. Production of Schistosoma haematobium and Schistosoma mansonii cercariae in Tanzania. Experimental Parasitology 20 (2): 205-218, 1967.
- MINIS, D. H. Parallel peculiarities in the entrainment of a circadian rhythm and photoperiodic induction in the pink bollworm (Pectinophora gossypiella). In: ASCHOFF, J., ed. Circadian clocks. Amsterdam, North-Holland Co., 1965. p. 333-343.
- MINORS, D.S. & WATERHOUSE, J.M. Masking in humans: the problem and some attempts to solve it. Chronobiology International 6 (1): 29-54, 1989.
- MONK, T. H. & FORT, A. "Cosina": a cosine curve fitting program suitable for small computers. International Journal of Chronobiology 8 (4): 193-224, 1983.
- MOUAHID, A. & COMBES, C. Genetic variability of Schistosoma bovis cercarial production according to miracidial dose. Journal of Helminthology 61 (1): 89-94, 1987.
- MOUAHID, A. & THERON, A. Schistosoma bovis: patterns of cercarial emergence from snails of the genera Bulinus and Planorbarius. Experimental Parasitology 62: 389-393, 1986.

- MOUAHID, A.; MONE, H.; CHAIB, A. & THÉRON, A. Cercarial shedding patterns of Schistosoma bovis and S. haematobium from single and mixed infections of Bulinus truncatus. Journal of Helminthology 65: 8-14, 1991.
- MOUGEOT, G. & GOLVAN, Y. Étude des relations entre la longévité de "Biomphalaria glabrata" et son infestation par "Schistosoma mansoni": étude de la variation quantitative de l'émission des furcocercaires. Bulletin de la Société des Sciences, Vétérinaire et Médecine Comparée 76 (2): 119-124, 1974.
- NASSI, H.; LANCASTRE, F. & POIROT, J. Rat et bilharziose en Guadeloupe: Nouvelles données. Annales de Parasitologie 50 (6): 731-733, 1975.
- NELSON, W.; TONG, Y. L.; LEE, J. K. & HALBERG, F. Methods for cosinor-rhythmometry. Chronobiologia 6 (4): 305-323, 1979.
- NOJIMA, H. & SATO, A. The emergence of schistosome cercariae from snails. 1. Hourly response of cercarial emergence of Schistosoma mansoni and S. haematobium and effect of light-cut on their emergence. Japanese Journal of Parasitology 27 (3): 197-213, 1978.
- , Schistosoma mansoni and S. haematobium: Emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. Experimental Parasitology 53: 189-198, 1982.
- NOJIMA, H.; SANTOS, A. T.; BLAS, B. L. & KAMIYA, H. The emergence of Schistosoma japonicum cercariae from Oncomelania quadrasi. Journal of Parasitology 66 (6): 1010-1013, 1980.
- OLIVIER, L. & MAO, C. P. The early larval stages of Schistosoma mansoni Sambon, 1907, in the snail host Australorbis glabratus Say, 1818. The Journal of Parasitology 35: 267-275, 1949.
- PAGE, T. L. Clocks and circadian rhythms. In: KERKUT, G.A. & GILBERT, L.I., eds. Comprehensive Insect Physiology: Biochemistry and Pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 1985. Volume 6: p. 577-652.

PAGÈS, J. R. & THÉRON, A. Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of Schistosoma haematobium, S. intercalatum, S. bovis and their hybrid progeny. International Journal for Parasitology 20 (2): 193-197, 1990.

PAN, C.-T. Studies on the host-parasite relationship between Schistosoma mansoni and the snail Australorbis glabratus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 14 (6): 931-976, 1965.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R. G. & SIQUEIRA JR, W., eds. Introdução à Geografia Médica do Brasil. São Paulo, Ed. Edgard Blücher e Universidade de São Paulo, 1972. p. 213-232.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. Variation in susceptibility of populations of Australorbis glabratus to a strain of Schistosoma mansoni. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 5 (1): 15-22, 1963.

----- Observations on two biological races of Schistosoma mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 76 (3): 287-291, 1981.

----- A potencial vector of Schistosoma mansoni in Uruguay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84 (3): 281-288, 1989.

PELLEGRINO, J. & DE MARIA, M. Results of exposing mice to natural pond water harboring a colony of Australorbis glabratus highly infected with Schistosoma mansoni. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 15 (3): 333-336, 1966.

PFLÜGER, W. Experimental epidemiology of schistosomiasis. II. Prepatency of Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata at diurnally fluctuating temperatures. Zeitschrift für Parasitenkunde 66: 221-229, 1981.

PITCHFORD, R. J. & DUTOIT, J. F. The shedding pattern of three little known african schistosomes under outdoor conditions. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 70 (2): 181-187, 1976.

PITCHFORD, R. J. & VISSER, P. S. The activity of various schistosome cercariae in outdoor aquaria. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 60: 518-521, 1966.

PITCHFORD, R. J.; MEYLING, A. H.; MEYLING, J. & DUTOIT, J. F. Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 63: 359-371, 1969.

PITTENDRIGH, C. S. The circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura pupae: A model for photoperiod clock. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 54: 275-307, 1966.

PITTENDRIGH, C. S. & MINIS, D. H. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clock. The American Naturalist 98: 261-294, 1964.

PITTENDRIGH, C.S. & SKOPIK, S.D. Circadian systems. V. The driving oscillation and the temporal sequence of development. Proceedings of the National Academy of Sciences 65 (3): 500-507, 1970.

POINTIER, J.P.; THÉRON, A. & IMBERT-ESTABLET, D. Decline of a sylvatic focus of Schistosoma mansoni in Guadeloupe (French West Indies) following the competitive displacement of the snail host Biomphalaria glabrata by Ampullaria glauca. Oecologia 75: 38-43, 1988.

RAYMOND, K. M. & PROBERT, A. J. The effect of light and darkness on the production of cercariae of Schistosoma haematobium from Bulinus globosus. Journal of Helminthology 61 (4): 291-296, 1987.

----- The daily cercarial emission rhythm of Schistosoma margrebowiei with particular reference to dark period stimuli. Journal of Helminthology 65: 159-168, 1991.

REINBERG, A. Des Rhythmes Biologiques à la Chronobiologie. 2<sup>ème</sup> Edition. Paris, Gauthier-Villars, 1977. 152pp.

- REINBERG, A. & SMOLENSKY, M. Introduction to Chronobiology  
In: REINBERG, A. & SMOLENSKY, M., eds. Biological Rhythms  
and Medicine. New York, Springer-Verlag, 1983. p. 1-21.
- REY, L. Parasitologia : parasitos e doenças  
parasitárias do homem nas Américas e na Africa. Rio de  
Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1991, 731 pp.
- , Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro,  
Editora Guanabara-Koogan, 1992, 349 pp.
- RICHARDS, C. S. Genetic factors in susceptibility of  
Biomphalaria glabrata for different strains of Schistosoma  
mansoni. Parasitology 70: 231-241, 1975.
- , Variations in infectivity for Biomphalaria  
glabrata in strains of Schistosoma mansoni from the same  
geographical area. Bulletin of the World Health  
Organization 54: 706-707, 1976.
- ROWAN, W. B. Daily periodicity of S. mansoni cercariae in  
Puerto Rican waters. Annals of Tropical Medicine and  
Hygiene 7 (4): 374-381, 1958.
- SAUNDERS, D.S. An Introduction to Biological Rhythms.  
Glasgow, Blackie, 1977. 170 pp.
- SCHREIBER, F. G. & SCHUBERT, M. Experimental infection of  
the snail Australorbis glabratus with the trematode  
Schistosoma mansoni and the production of cercariae. The  
Journal of Parasitology 35: 91-100, 1949.
- SIEGEL, S. Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do  
Comportamento. São Paulo, Editora McGraw-Hill, 1981. 350pp.
- SLUITERS, J. F.; BRUSSARD-WÜST, C. M. & MEULEMAN, E. A. The  
relationship between miracidial dose, production of  
cercariae, and reproductive activity of the host in the  
combination Trichobilharzia ocellata and Lymnaea stagnalis.  
Zeitschrift für Parasitenkunde 63: 13-26, 1980.
- STIREWALT, M. A. Effect of snail maintenance temperatures on  
development of Schistosoma mansoni. Experimental  
Parasitology 33 (6): 504-516, 1954.

STURROCK, B. M. & STURROCK, R. F. Laboratory studies of the host-parasite relationship of S. mansoni and B. glabrata from St. Lucia, West Indies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 64 (3): 357-363, 1970.

TAIT, A. Genetic exchange and evolutionary relationships in protozoan and helminth parasites. Parasitology 100: 575-587, 1990.

THÉRON, A. Mise en évidence de races chronobiologiques de S. mansoni, agent de la bilharziose, à partir des cinétiques d'émission cercarienne. Comptes Rendus, Série D, 291: 279-282, 1980.

----- Dynamics of larval populations of Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. I- Rhythmic production of cercariae in monomiracidial infections. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 75 (1): 71-77, 1981a.

----- Dynamics of larval populations of Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. II- Chronobiology of the intramolluscal larval development during the shedding period. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 75 (5): 547-554, 1981b.

----- Recherches sur la sélection naturelle de "races chronobiologiques" dans la schistosomiase intestinale. Molecular and Biochemical Parasitology (suppl): 451-452, 1982a.

----- Le compartiment cercaire dans le cycle de Schistosoma mansoni Sambon, 1907: Ecologie de la transmission bilharzienne en Guadeloupe. Perpignan, 1982b. (Thèse Docteur d'Etat, Université de Perpignan).

----- Early and late shedding patterns of Schistosoma mansoni cercariae: ecological significance in transmission to human and murine hosts. Journal of Parasitology 70 (5): 652-655, 1984.

----- Polymorphisme du rythme d'émission des cercaires de Schistosoma mansoni et ses relations avec l'écologie de la transmission du parasite. Vie Milieu 35 (1): 23-31, 1985a.

- , Dynamiques de production des cercaires de Schistosoma mansoni en relation avec les variations de la dose miracidiale proposée au mollusque vecteur Biomphalaria glabrata. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 60 (6): 665-674, 1985b.
- , Polymorphisme des oeufs de Schistosoma mansoni dans le foyer guadeloupeen (Antilles Françaises): présence de "S. rodhaini like" parasites? Acta Tropica 43: 335-342, 1986a.
- , Chronobiology of schistosome development in the snail host. Parasitology Today 2 (7): 192-194, 1986b.
- , Sympatric speciation within schistosomes. Bulletin de la Société Française de Parasitologie 8 (supl. 1): 281, 1989.
- THÉRON, A. & COMBES, C. Analyse génétique du rythme d'émergence des cercaires de Schistosoma mansoni par croisement de souches à pics d'émission précoces ou tardifs. Comptes Rendus, Série III 297 (12): 571-574, 1983.
- , Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of Schistosoma mansoni. Behavior Genetics 18 (2): 201-209, 1988.
- THÉRON, A. & FOURNIER, A. Mise en évidence de structures nerveuses dans le sporocyste-fils du Trématode S. mansoni. Comptes Rendus, Série III 294: 365, 1982.
- THÉRON, A. & JOURDANE, J. Séquence de reconversion des sporocysts de Schistosoma mansoni producteurs de cercaires, en vue de la production de nouvelles générations de sporocystes. Zeitschrift für Parasitenkunde 61: 63-71, 1979.
- THÉRON, A. & MINGYI, X. Rythme d'émission des cercaires de Schistosoma japonicum de Chine continentale par des Oncomelania hupensis. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 61 (5): 553-558, 1986.



THÉRON, A. & MONÉ, H. Chronobiological aspects of the host-parasite relationships between Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni: cercarial production and infectivity and growth kinetics of the host. Journal of Invertebrate Pathology 44 (2): 209-213, 1984.

-----  
Shedding patterns of Schistosoma mansoni and Ribeiroia marini cercariae from a mixed infection of Biomphalaria glabrata. Journal of Helminthology 60: 255-259, 1986.

THÉRON, A.; POINTIER, J.P. & COMBES, C. Recherches sur les facteurs responsables des densités de cercaires de Schistosoma mansoni en Guadeloupe. Annales de Parasitologie 52 (4): 421-433, 1977.

-----  
Approche écologique du problème de la responsabilité de l'Homme et du Rat dans le fonctionnement d'un site de transmission à Schistosoma mansoni en Guadeloupe. Annales de Parasitologie 53 (2): 223-234, 1978.

THÉRON, A.; COMBES, C.; IMBERT-ESTABLET, D.; JOURDANE, J.; FOURNIER, A. & MONÉ, H. Connaissances actuelles en biologie des populations de schistosomes. Colletions Naturelles du CNRS "Biologie des Populations": 34-39, 1986.

THOMAS, J. D.; GOLDSWORTHY, G. J. & BENJAMIN, M. Studies on the chemical ecology of Biomphalaria glabrata: the effects of chemical conditioning by the snails kept at various densities on their growth and metabolism. Journal of Zoology of London 175: 421-437, 1975.

TRIBOULEY, J.; TRIBOULEY-DURET, J.; APPRIOU, M.; GUIGUEMIDE, T.-R. & PAUTRIZEL, R. Influence de la température ambiante sur l'évolution de Schistosoma mansoni chez la souris. Annales de Parasitologie 52 (6): 629-636, 1977.

TRUMAN, J.W. Circadian rhythms and physiology with special reference to neuroendocrine process in insects. Proceedings of the International Symposia on Circadian Rhythmicity, 1971. p.111-135.

- , Physiology of insect rhythms. II. The silkworm brain as the location of the biological clock controlling eclosion. Journal of Comparative Physiology 81: 99-114, 1972.
- VAN CAUTER, E. & HUYBERECHTS, S. Problems in the statistical analysis of biological time series: the cosinor test and the periodogram. Journal of Interdisciplinary Cycle Research 4 (1): 41-57, 1973.
- VALLE, C.M.; PELLEGRINO, J. & ALVARENGA, N. Ritmo circadiano de emergência de cercárias (Schistosoma mansoni-Biomphalaria glabrata). Revista Brasileira de Biologia 31: 53-63, 1971.
- , Rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata: Influence of the temperature. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 15: 195-201, 1973.
- VALLE, C.; PELLEGRINO, J. & GAZZINELLI, G. Influence of temperature on the backward propulsion speed of Schistosoma mansoni cercariae. The Journal of Parasitology 60 (2): 372-373, 1974.
- WARD, R.D.; LEWIS, F. A.; YOSHINO, T.P. & DUNN, T.S. Schistosoma mansoni: relationship between cercarial production levels and snail host susceptibility. Experimental Parasitology 66 (1): 78-85, 1988.
- WATERHOUSE, J.M. & MINORS, D.S. Masking and entrainment. Advances in the Biosciences 73: 163-171, 1988.
- WEBBE, G. Transmission of Bilharziasis. 2. Production of cercariae. Bulletin of the World Health Organization 33: 155-162, 1965.
- WILLIAMS, C.L. & GILBERTSON, D. E. Influence of photoperiod on S. mansoni infection in B. glabrata. Molecular and Biochemical Parasitology suppl.: 427-428, 1982.

-----, Effects of alterations in the heart beat rate and locomotor activity of Schistosoma mansoni - infected Biomphalaria glabrata on cercarial emergence. The Journal of Parasitology 69 (4): 677-681, 1983.

WILLIAMS, C. L.; WESSELS, W.S. & GILBERTSON, D.E. Comparison of the rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata in different lighting regimens. Journal of Parasitology 70 (3): 450-452, 1984.

ANEXOS

## ANEXO I

O método de Cosinor é um teste estatístico específico para a análise de ritmos. Ele ajusta os dados de uma série temporal a uma curva sinusoidal através do método dos quadrados mínimos. A curva é caracterizada pelos parâmetros ritmicos **período** (fixado para cada ajuste; no caso, 24 horas), **acrofase** (momento em que a curva atinge seu ponto máximo, sendo expresso em unidades de tempo), **mesor** (valor em torno do qual ocorrem as oscilações, correspondendo a média dos dados no caso de observações feitas a intervalos regularmente distribuídos) e a **amplitude** (diferença entre o valor máximo e o mesor). O método de Cosinor permite a comparação destes parâmetros entre diferentes curvas ritmicas ajustadas para um mesmo período.

A ocorrência ou não de um ritmo é confirmada pelo teste da amplitude nula: quando a probabilidade da amplitude ser igual a zero (indicando a ausência de oscilações) é igual ou inferior ao nível de significância escolhido, pode-se concluir que a ritmicidade encontrada é explicada pelo ajuste a uma função sinusoidal.

O Cosinor individual é um procedimento aplicável a uma única série temporal. Uma outra modalidade é o Cosinor populacional (NELSON et al., 1979), aplicável a três ou mais séries temporais com o objetivo de avaliar as características ritmicas de uma população. Assim, uma população apresenta-se ritmica se o  $F_{\text{stat}}$  calculado pelo método é maior que o valor tabelado de  $F$  para o nível de significância escolhido. Só

participam desta modalidade, os moluscos cujos ritmos de emergência de cercárias foram significativos quando submetidos ao Cosinor individual. A comparação entre os parâmetros calculados pelo Cosinor populacional é feita através do teste de Bingham (BINGHAM et al., 1982). Neste teste, o mesor e a amplitude são comparados pelo parâmetro  $t$  e a acrofase, pela razão  $F$  para o nível de significância escolhido.

ANEXO II

Tabela 14 - Número de cercárias de *S. mansoni* emergentes de exemplares de *B. glabrata* testados durante 4 dias consecutivos (Etapa I).

MOLUSCO	I N T E R V A L O S																D E																O B S E R V A Ç Ã O															
	18-6	6-18	18-6	6-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18																				
161	13	2448	9	98	81	3	0	2	242	206	930	92	17	0	3	4	3	4	337	205	6	4	0	0	2	85	1158	509																				
4	6	410	5	1	3	2	1	0	0	45	23	19	10	2	0	0	0	2	17	12	11	3	1	1	0	0	23	9																				
5	7	426	23	0	6	1	0	1	11	59	267	150	28	3	5	3	5	7	129	105	15	0	2	0	5	9	427	95																				
6	2	448	10	34	1	0	0	0	0	206	80	43	0	8	0	2	0	26	239	27	8	0	0	9	0	173	389	145																				
265	0	15	-	4	0	0	0	0	0	39	14	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	18																			
3	0	150	3	82	14	4	0	0	1	381	39	87	0	4	9	5	1	8	17	82	6	2	0	0	0	6	120	184																				
4	0	171	5	34	0	0	0	0	0	198	152	108	9	1	2	0	0	1	101	107	3	0	0	0	0	32	145	83																				
5	4	42	1	12	1	0	0	0	0	6	0	75	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	8	31																				
6	0	12	0	2	1	0	0	0	0	5	5	2	0	0	1	0	0	0	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0																			

Tabela 15 - Número de cercárias de S. mansoni emergentes de exemplares de B. glabrata testados durante 4 dias consecutivos (Etapa II).

MOLUSCO	I N T E R V A L O S														D E														O B S E R V A Ç Ã O													
	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-6	6-18	18-6	6-18	18-6	6-18	18-6	6-18										
1461	1	1	0	0	1	234	670	101	7	0	0	0	0	0	13	54	5	0	0	3	0	0	31	56	0	4	0	1	0	3	0	16										
18	20	0	2	0	0	113	608	38	27	2	0	0	1	1	27	105	0	0	0	0	0	14	114	0	14	1	10	0	49	0	206											
27	0	0	0	0	0	26	5	2	5	-	0	0	0	0	1	24	0	0	0	0	0	0	11	0	10	0	16	0	22	3	169											
29	3	0	0	0	0	764	818	148	-	0	0	1	0	0	25	171	1	3	0	0	0	106	41	0	15	0	32	0	16	0	50											
36	1	62	5	0	0	52	107	11	5	1	0	0	0	0	4	95	1	1	0	0	0	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-											
37	0	0	0	0	0	166	209	56	72	2	0	0	0	1	55	317	7	0	0	0	0	35	219	0	0	0	48	-	-	-	-											
38	4	0	0	0	0	524	379	218	1	0	0	0	0	0	32	489	5	0	0	0	0	2	245	0	40	0	324	0	83	0	78											
45	3	5	5	0	3	59	222	32	4	0	0	0	0	7	15	146	4	1	0	1	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
47	0	0	6	2	0	345	458	16	4	2	0	0	1	0	2	179	7	0	0	3	1	5	4	61	0	2	0	97	0	89	0	36										
72	1	0	0	0	1	326	692	13	4	1	0	1	0	0	29	235	0	0	0	0	0	6	52	0	18	2	1	0	159	0	55											
73	1	1	1	0	1	425	466	54	4	0	2	4	1	1	23	96	4	1	0	0	2	1	11	129	0	11	11	71	0	83	0	30										
165	5	1	40	8	2	498	186	109	24	5	0	0	0	0	0	17	1	4	0	0	0	2	174	192	61	149	26	79	6	57	455	315										
3	40	47	102	45	26	530	110	90	25	4	17	81	13	5	12	21	7	4	3	9	14	30	218	39	27	139	4	-	3	317	5	181										
4	0	0	0	1	0	163	179	82	10	0	0	0	0	0	9	28	1	0	0	0	0	0	252	121	29	186	32	225	4	176	110	151										
7	0	0	4	0	0	531	166	166	7	0	0	0	0	0	44	36	6	0	0	0	0	1	237	308	31	26	7	148	19	105	12	92										
8	0	0	1	0	0	12	213	564	9	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	2	205	65	6	170	2	124	1	196	8	180										
9	1	0	0	0	0	106	159	218	5	0	0	0	0	1	20	164	0	0	0	0	0	0	240	109	3	9	0	4	-	-	-	-										
90	2	1	0	2	0	4	11	7	21	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	3	14	0	29	0	7	0	0	11	2										



Tabela 16 - Número de cercárias de S. mansoni emergentes de exemplares de B. giabrata testados durante três dias consecutivos (Etapa III).

MOLUSCO	I N T E R V A L O S D E															D I A S									
	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	
561	1	0	0	0	0	0	38	150	7	1	0	0	0	0	71	57	4	1	0	0	0	0	0	77	313
47	2	1	4	0	0	1	23	54	8	1	0	0	0	0	7	137	6	0	1	1	0	0	0	0	0
1265	4	0	0	0	0	0	219	203	1	0	0	0	0	1	140	325	0	0	0	0	0	0	67	177	43
13	19	1	0	0	0	0	188	111	3	0	0	0	0	0	134	45	3	0	0	0	0	0	19	187	35
14	20	0	0	0	0	0	121	222	22	1	0	0	0	0	39	179	9	0	0	0	0	0	9	248	219
15	10	1	1	0	0	0	172	289	6	0	0	0	0	0	140	215	2	1	0	0	0	0	13	212	84
16	21	0	0	0	0	0	30	39	7	0	0	0	0	0	4	39	8	0	0	0	0	0	2	58	12
19	10	0	0	0	0	0	59	295	6	0	0	0	0	1	134	87	0	0	0	0	0	0	35	389	183
22	24	9	1	0	0	0	7	65	32	11	4	2	1	0	54	119	0	1	0	0	0	0	4	329	-
23	67	3	2	1	0	0	443	224	1	0	0	0	0	0	250	139	1	0	0	0	0	0	198	326	65
24	14	0	0	0	0	0	292	510	9	0	0	0	0	0	100	85	4	0	0	0	0	0	65	82	93
25	14	0	0	0	1	0	186	174	4	0	0	0	0	3	230	67	2	0	0	0	0	0	39	37	17
29	0	0	0	0	0	1	3	97	0	0	0	0	0	0	15	17	1	0	0	0	0	0	0	1	0
31	0	0	0	0	0	0	9	426	6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	25	489	1	0	0	0	0	4	99	611	8	0	0	0	0	0	0	118	145
33	2	1	0	0	0	0	51	30	1	0	0	0	0	0	0	5	8	0	0	0	0	0	3	27	29
35	0	0	0	0	0	0	6	309	1	0	0	0	0	0	5	173	2	0	0	0	0	0	0	37	8
38	0	0	0	0	0	0	25	415	8	0	0	0	0	0	34	253	4	0	0	0	0	0	0	16	14
40	0	0	0	0	0	0	15	33	0	0	0	0	0	0	0	17	1	0	0	0	0	0	0	13	11
43	0	0	0	0	0	0	37	462	2	0	0	0	0	0	29	503	1	0	0	0	2	1	53	6	
45	0	0	0	0	0	2	14	18	0	0	0	0	0	3	1	64	3	0	0	0	0	0	17	5	2
49	1	0	0	0	0	0	80	38	1	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0	28	13
50	1	0	0	0	0	1	9	39	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	34	8
51	0	0	0	0	0	0	0	175	0	0	0	0	0	0	61	180	4	0	0	0	0	0	2	65	51
52	1	0	0	0	0	2	27	257	2	1	0	0	0	0	28	562	9	0	0	0	0	0	0	51	244

Tabela 17 - Número de cercárias de S. mansoni emergentes de exemplares de B. glabrata testados durante três dias consecutivos (Etapa IV).

MOLUSCO	I N T E R V A L O S   D E   O B S E R V A Ç Ã O																								
	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-0	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	
5861	0	0	0	0	0	5	12	1	0	59	9	9	4	16	27	14	0	0	7	0	0	0	0	0	2
60	9	3	0	1	2	19	402	499	38	11	46	12	11	52	102	315	3	6	9	0	0	1	143	429	
6265	39	5	2	3	4	81	461	527	10	67	89	16	5	41	439	328	4	1	27	1	0	3	680	560	
64	0	0	0	6	0	4	3	0	0	17	9	5	35	28	7	29	0	0	11	1	0	0	1	12	

Tabela 18- Temperaturas médias registradas para cada intervalo de observação ao longo de três dias consecutivos. São apresentados os valores registrados para as fases clara e escura nas diferentes etapas.

DIA	HORA DO DIA	ETAPAS DA FASE CLARA					HORA DO DIA	ETAPAS DA FASE ESCURA				
		I	II	IIIa	IIIb	IV		I	II	IIIa	IIIb	IV
1	6 - 9	20,5	16,4	21,9	26,1	21,6	18 - 21	21,0	21,4	22,1	28,3	23,1
1	9 - 12	27,0	21,5	23,4	31,3	31,9	21 - 0	20,0	19,9	22,0	26,6	22,1
1	12 - 15	25,9	23,3	25,6	33,5	33,9	0 - 3	18,6	17,9	21,6	25,4	21,8
1	15 - 18	24,3	22,4	24,9	30,8	28,0	3 - 6	17,5	15,5	21,5	25,0	21,1
2	6 - 9	21,5	19,4	23,4	27,3	23,5	18 - 21	21,1	21,1	24,0	27,4	25,1
2	9 - 12	27,8	22,3	24,8	32,3	33,8	21 - 0	19,8	20,8	23,5	26,1	23,8
2	12 - 15	28,1	24,4	25,9	34,5	33,8	0 - 3	18,8	20,0	23,0	25,4	23,0
2	15 - 18	27,4	24,0	26,0	31,5	26,5	3 - 6	18,0	19,5	23,0	25,0	23,0
3	6 - 9	24,8	18,6	25,1	27,9	22,6	18 - 21	23,8	21,1	25,4	28,9	24,6
3	9 - 12	29,5	23,0	29,6	32,9	27,5	21 - 0	22,0	19,8	25,0	27,4	24,0
3	12 - 15	29,6	25,8	32,4	34,5	29,6	0 - 3	22,2	19,0	24,6	26,3	23,4
3	15 - 18	27,9	24,5	29,3	31,3	25,6	3 - 6	21,8	18,1	24,1	25,4	22,5

a- teste realizado entre 29/03 e 01/04/91; b- teste realizado entre 12/04 e 15/04/91.