
A MOBILIZAÇÃO DO CÁLCIO

EM *Biomphalaria glabrata*

EXPOSTA A DIFERENTES QUANTIDADES

DE CARBONATO DE CÁLCIO

Aline Cristina Magalhães,¹ Jairo Pinheiro² e Clélia Christina Mello-Silva¹

RESUMO

O cálcio é essencial na vida dos moluscos, pois está relacionado com a formação da concha e com vários processos metabólicos fundamentais para manter a sua homeostase. O objetivo deste trabalho foi verificar a mobilização do cálcio na hemolinfa e na concha de *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes soluções de carbonato de cálcio. Para este estudo, foram utilizados caramujos com 60 dias de vida, distribuídos em cinco grupos, quatro expostos a diferentes soluções (20, 40, 60 e 80mg/L) de carbonato de cálcio e um controle. O tempo total de exposição foi de 45 dias. Quinzenalmente, os caramujos eram sacrificados por meio de punção cardíaca para extração da hemolinfa. A concentração de cálcio na hemolinfa foi determinada usando-se kits de diagnóstico (Doles Reagentes[®]) e o conteúdo de cálcio nas conchas, pelo método de volumetria de complexação modificada. Os resultados demonstraram que houve aumento de cálcio na hemolinfa e diminuição de cálcio na concha aos 15 dias de exposição a 20mg/L de carbonato de cálcio. Nos demais grupos expostos, verificou-se que a concentração de cálcio na hemolinfa é inversamente proporcional à quantidade de cálcio na concha. Concluiu-se que, em moluscos expostos a diferentes quantidades de cálcio, ocorre uma mobilização frequente do cálcio na hemolinfa e na concha de acordo com a quantidade de cálcio disponível.

DESCRITORES: Esquistossomose. *Biomphalaria glabrata*. Cálcio.

INTRODUÇÃO

O cálcio no ciclo de vida dos moluscos é essencial, pois promove a formação da concha (Marxen et al., 2003), funciona como solução tampão em processos metabólicos e participa da produção de células de defesa dos moluscos – os hemócitos –, além de influenciar na sua capacidade fagocítica (Zelck et al., 1995).

1 Laboratório de Esquistossomose Experimental do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ.

2 Departamento de Ciências Fisiológicas/Instituto de Biofísica/Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Endereço para correspondência: E-mail: clelia@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 13/9/2010. Revisto em: 11/3/2011. Aceito em: 24/3/2011.

Foram realizados estudos sobre a influência do cálcio no crescimento da concha, na fecundidade, oviposição, mortalidade e infecção por *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeira intermediária deste parasito no Brasil (Dawies & Erasmus, 1984; Mazuran et al., 1999; Mostafa et al., 2001). Tanto o crescimento como a taxa de postura são influenciados pela concentração de cálcio que os moluscos absorvem por meio de sua dieta no ambiente em que vivem.

Na hemolinfa de *B. glabrata*, o cálcio é destinado a várias partes do organismo deste molusco como: tecidos, hemolinfa, manto e concha, nesta última sob a forma de cálcio sólido. Este íon atua em diversos sítios, sendo primordial na regulação eletroquímica do molusco e contribui para a sua homeostase. O equilíbrio de cálcio na hemolinfa e na concha é regulado por uma taxa de excreção e circulação (Florkin & Scheer, 1972).

Paschoal & Amato (1996) observaram os níveis de cálcio em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, verificando uma deposição de cálcio na concha e na glândula digestiva do molusco infectado. Isso em decorrência da aceleração da via glicolítica a fim de suprir a demanda de energia gasta pelo molusco durante a infecção.

Em outras condições de estresse fisiológico, como infecção, jejum, estivação e tratamento com moluscicidas, os moluscos também alteram o metabolismo de carboidratos e de proteínas. Promovem, então, a liberação de ácidos orgânicos altamente tóxicos que serão neutralizados pela mobilização de carbonato de cálcio, excretados ou metabolizados em outros tecidos (Becker, 1980; Liebsch & Becker, 1990; Mello-Silva et al., 2006).

Em decorrência do processo de infecção, alguns autores sugerem a ocorrência de hipercaleificação por causa das alterações no balanço iônico de moluscos infectados (Pinheiro & Amato, 1995; Zbikowska, 2003). Neste contexto, Mostafa (2007) relata que a mobilização de cálcio da concha para a parte mole de *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus* infectados por *S. mansoni* e *Schistosoma haematobium*, respectivamente, promove o processo de hipercaleificação.

O objetivo deste trabalho foi verificar a mobilização de cálcio na hemolinfa e na concha de *B. glabrata* expostos a diferentes quantidades de carbonato de cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Moluscário do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE), Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 200 exemplares de *B. glabrata* (linhagem procedente de Belo Horizonte-MG) com 60 dias de vida. Estes exemplares foram divididos em cinco grupos, quatro deles com 40 caramujos expostos a diferentes quantidades de carbonato de cálcio (20, 40, 60 e 80mg/L) e um

grupo controle, acondicionados em caixas de polipropileno com capacidade para 3L de água desclorada. O carbonato de cálcio foi diluído na água desclorada conforme proporção mencionada anteriormente. Os moluscos foram expostos a diferentes quantidades de carbonato de cálcio por 45 dias. De cada grupo, dez caramujos escolhidos de forma aleatória foram sacrificados quinzenalmente (15, 30 e 45 dias) após a exposição ao carbonato de cálcio. Neste mesmo período, as concentrações de carbonato foram renovadas; as caixas foram lavadas e os caramujos, expostos novamente às mesmas quantidades de carbonato de cálcio. Duas vezes na semana foram alimentados com 30g de alface (*Lactuca sativa L.*).

A hemolinfa dos moluscos foi extraída por meio de punção na cavidade pericárdia e acondicionada em microtubos do tipo Eppendorf. Todos os materiais biológicos foram mantidos em banho de gelo durante a coleta e armazenados a -18°C para processamento e análise com o emprego de *kit* de diagnóstico da Doles reagentes®. Antes da determinação do cálcio na hemolinfa, os tubos contendo hemolinfa foram centrifugados, sendo o sobrenadante utilizado para a dosagem. O cálcio foi determinado colorimetricamente por meio de um complexo corado com cresolfaleína em meio alcalino. Utilizou-se o reagente de cor (concentrado) composto por: Dietanolamina 5,7 M, dietilamina 4,3M, 8-Hidroxiquinolina 0,019M, 0-cresolfaleína complexona 0,00025M e estabilizantes por litro e a solução padrão (10mg/dL de cálcio). Tanto o reagente de cor como a solução padrão foram armazenados à temperatura de 2°C a -8°C.

Por não ser estável, o reagente de cor foi preparado no momento de sua utilização e apenas em quantidades necessárias para os testes, conforme as orientações do *kit*, na proporção de 7,0mL de água deionizada e 1,0mL do reagente de cor (concentrado). Esta solução funciona como o branco da leitura. Para a leitura das amostras de hemolinfa, foram utilizados 2,5 mL do reagente de cor e 20µL da hemolinfa oriunda dos caramujos em diferentes concentrações e do grupo controle. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 570nm.

As conchas dos moluscos analisados foram coletadas utilizando-se pinças de relojoeiro. As conchas foram quebradas em pequenos pedaços e separadas por grupos. Depois de separadas, foram submetidas ao processo de secagem em placas de Petri em temperatura ambiente por quatro dias e, em seguida, foram pesadas em balança analítica de precisão e armazenadas em potes plásticos devidamente identificados. Os caramujos foram dissecados para observação de possíveis alterações morfológicas. A concha de todos os exemplares foi lavada e separada para análise de cálcio. A determinação do conteúdo de cálcio nas conchas foi realizada segundo o método de volumetria de complexação modificada (Soido et al., 2009).

As conchas foram transferidas para um cadinho de porcelana não porosa e levadas à mufla elétrica a uma temperatura de 450°C, por 48 horas, para que ocorresse o processo de calcinação a fim de eliminar a matéria orgânica existente na concha, deixando apenas os minerais. Após 48 horas, as cinzas foram pesadas e, em

seguida, acondicionadas em provetas de 500mL, nas quais foram acrescentados, a cada material, 50mL de HNO₃ (ácido nítrico), permanecendo nesta solução por 24 horas. As amostras foram diluídas na concentração de 1/100 e destas foram retirados 25ml para cada titulação de EDTA.

Foram utilizados 30mL de uma solução de hidróxido de potássio a 10%. A partir do volume de EDTA gasto na titulação, a massa de carbonato de cálcio foi calculada e expressa em mg/ CaCO₃ por grama de concha.

Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão. Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) para avaliação da diferença entre os grupos de caramujos expostos a diferentes concentrações no mesmo intervalo de tempo e da diferença do grupo exposto nos diferentes intervalos de tempo. A regressão polinomial de primeira ordem foi empregada para verificar a significância da relação entre as alterações bioquímicas observadas em função do tempo e o teste de correlação de Pearson, para verificar a relação entre a concentração de CaCO₃ na hemolinfa e na concha.

RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram a quantidade de cálcio na hemolinfa (mg/dL) nos moluscos submetidos a diferentes quantidades de CaCO₃. Observou-se diferença significativa nos moluscos expostos a 20 mg/L durante 15 dias em relação ao controle com 15 dias ($q= 5,642$; $p<0,05$). Entre o mesmo grupo de expostos, observou-se diferença significativa apenas entre 20 mg/L com 15 dias e 30 dias ($q= 6,519$; $p<0,01$).

Tabela 1. Concentração de cálcio (mg/dl) na hemolinfa de moluscos submetidos a diferentes concentrações de CaCO₃ - Média e desvio padrão (\pm)

	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	37,077 \pm 5,404 ^{a,A}	30,470 \pm 1,259 ^{a,A}	35,915 \pm 6,781 ^{a,A}
20mg CaCO ₃	48,815 \pm 0,587 ^{b,A}	33,960 \pm 0,3394 ^{a,B}	38,220 \pm 0,240 ^{a,A,B}
40mg CaCO ₃	40,350 \pm 1,022 ^{a,b,A}	32,940 \pm 2,927 ^{a,A}	38,063 \pm 2,353 ^{a,A}
60mg CaCO ₃	42,090 \pm 1,131 ^{a,b,A}	38,850 \pm 2,743 ^{a,A}	43,783 \pm 3,559 ^{a,A}
80mg CaCO ₃	38,813 \pm 5,601 ^{a,b,A}	37,330 \pm 0,254 ^{a,A}	38,763 \pm 2,762 ^{a,A}

Letras minúsculas diferentes – diferença significativa entre os grupos expostos no mesmo intervalo de tempo.

Letras maiúsculas diferentes – diferença significativa entre o grupo exposto nos diferentes intervalos de tempo.

Por meio da análise de regressão polinomial de primeira ordem, observou-se apenas uma correlação positiva nas soluções de cálcio em função do tempo em 60mg/L. Ressalta-se que o maior decréscimo foi observado em 20 mg/L (figuras 1, 2, 3, e 4).

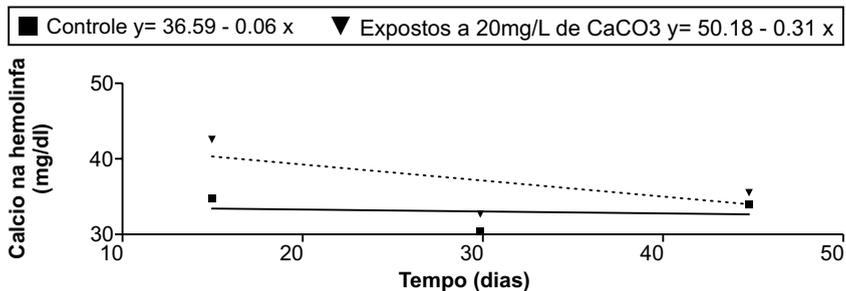


Figura 1. Concentração de cálcio na hemolinfa (mg/dl) em moluscos submetidos a 20 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

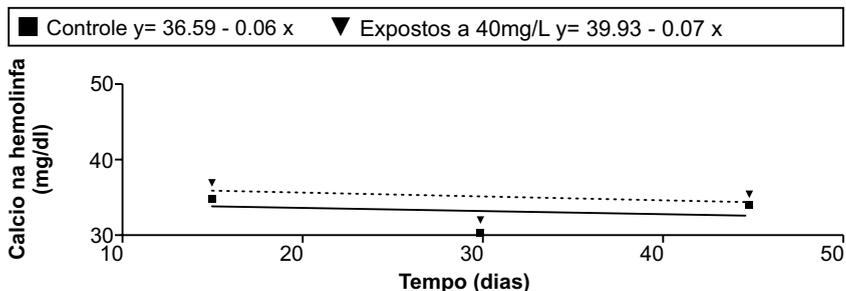


Figura 2. Concentração de cálcio na hemolinfa (mg/dl) em moluscos submetidos a 40 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

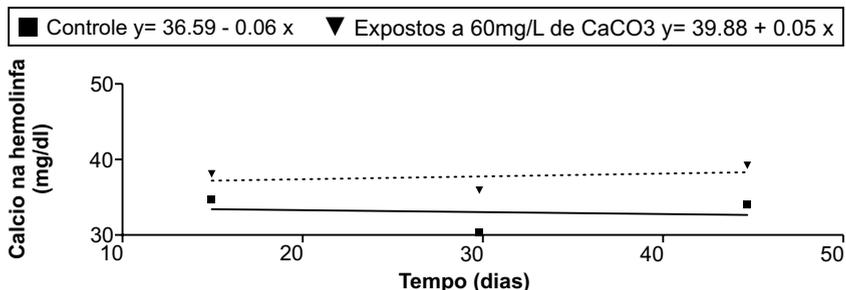


Figura 3. Concentração de cálcio na hemolinfa (mg/dl) em moluscos submetidos a 60 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

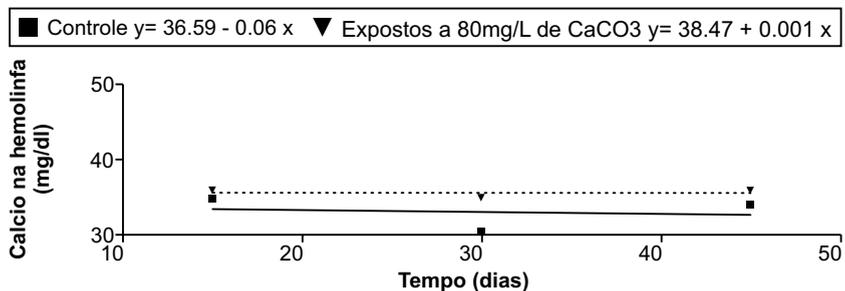


Figura 4. Concentração de cálcio na hemolinfa (mg/dl) em moluscos submetidos a 80 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

Pode-se observar na Tabela 2, que houve diferença significativa na concentração de carbonato de cálcio na concha, nos primeiros 15 dias, entre o grupo controle e todas as concentrações: 20mg/L ($q = 8,036$; $p < 0,001$), 40 mg/L ($q = 15,286$; $p < 0,001$), 60 mg/L ($q = 12,866$; $p < 0,001$) e 80 mg/L ($q = 13,360$; $p < 0,001$); entre 20mg/L e 40 mg/L ($q = 7,250$; $p < 0,01$) e entre 20 mg/L e 80mg/L ($q = 5,325$; $p < 0,05$). Com 30 dias houve diferença significativa entre o grupo exposto a 80 mg/L e os grupos controle ($q = 5,599$; $p < 0,05$) e 40 mg/L ($q = 5,599$; $p < 0,05$). Aos 45 dias de exposição, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Concentração de cálcio (mg / CaCO_3 /g de cinzas) na concha de moluscos submetidos a diferentes concentrações de CaCO_3 - Média e desvio padrão (\pm)

	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	6,523 \pm 1,189 ^{a,A}	3,101 \pm 0,383 ^{a,B}	2,912 \pm 0,3603 ^{a,B}
20mg CaCO_3	3,190 \pm 1,047 ^{b,A}	2,383 \pm 0,825 ^{a,b,B}	1,499 \pm 0,761 ^{a,B}
40mg CaCO_3	0,182 \pm 0,048 ^{c,A}	3,001 \pm 0,586 ^{a,B}	2,590 \pm 1,089 ^{a,B}
60mg CaCO_3	1,186 \pm 0,043 ^{b,c,A}	1,113 \pm 0,00 ^{a,b,A}	1,897 \pm 0,657 ^{a,A}
80mg CaCO_3	0,981 \pm 0,799 ^{c,A}	0,6783 \pm 0,196 ^{b,A}	1,396 \pm 0,931 ^{a,A}

Letras minúsculas diferentes – diferença significativa entre os grupos expostos no mesmo intervalo de tempo.

Letras maiúsculas diferentes – diferença significativa entre o grupo exposto nos diferentes intervalos de tempo.

Os resultados da análise de regressão polinomial de primeira ordem demonstraram relação negativa entre a quantidade de cálcio na concha e o tempo de exposição nos grupos controle e exposto a 20 mg/L de CaCO_3 (Figura 5) e relação positiva entre os grupos expostos a 40, 60 e 80 mg/L de CaCO_3 (figuras 6, 7 e 8).

■ Controle $y = 7.790 - 0.12 x$ ▼ Expostos a 20mg/L de CaCO_3 $y = 4.048 + 0.05 x$

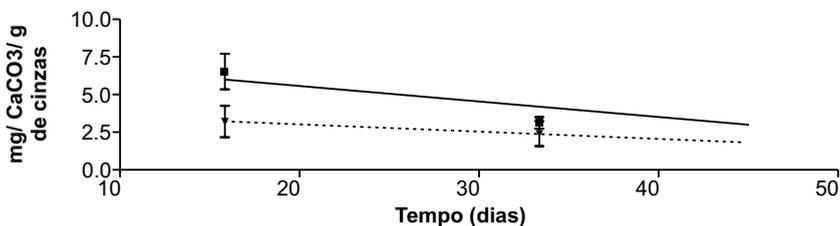


Figura 5. Concentração de cálcio na concha (mg / CaCO_3 /g de cinzas) em moluscos submetidos a 20 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

■ Controle $y = 7.790 - 0.12 x$ ▼ Expostos a 40mg/L de CaCO_3 $y = 0.484 + 0.08 x$

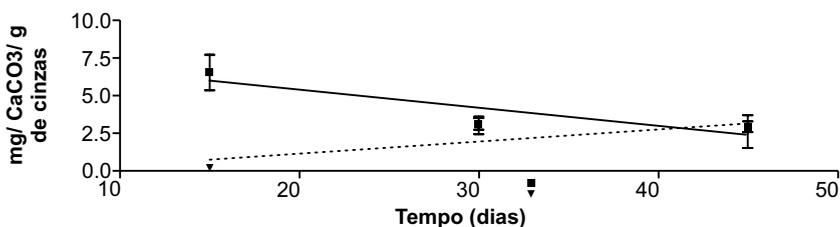


Figura 6. Concentração de cálcio na concha (mg / CaCO_3 /g de cinzas) em moluscos submetidos a 40 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

■ Controle $y = 7.790 - 0.12 x$ ▼ Expostos a 60mg/L de CaCO_3 $y = 0.6877 + 0.02 x$

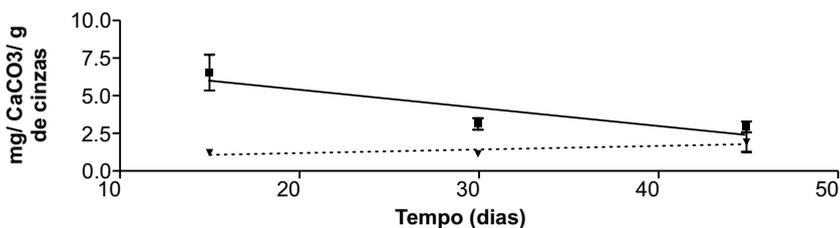


Figura 7. Concentração de cálcio na concha (mg / CaCO_3 /g de cinzas) em moluscos submetidos a 60 mg/L de CaCO_3 em função do tempo de exposição.

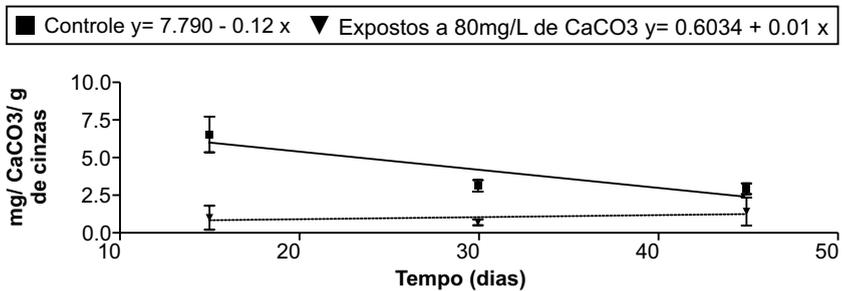


Figura 8. Concentração de cálcio na concha (mg /CaCO₃/g de cinzas) em moluscos submetidos a 80 mg/L de CaCO₃ em função do tempo de exposição.

O teste de correlação de Pearson entre a quantidade de cálcio na hemolinfa e a quantidade de cálcio na concha não apresentou correlação nas concentrações em função do tempo. Ressalta-se que com 15 dias houve um decréscimo de cálcio tanto na hemolinfa quanto na concha, no entanto com 20mg/L verificou-se um aumento de cálcio na hemolinfa e um decréscimo na concha. Com 30 dias e 45 dias, pode-se observar que a quantidade de cálcio na hemolinfa é inversamente proporcional à quantidade de cálcio na concha.

DISCUSSÃO

O cálcio é incorporado no ciclo metabólico e seu excesso é depositado na concha e nas células do corpo (Dewith & Sminia, 1980). Em caramujos, a concentração de cálcio na hemolinfa permanece elevada, mesmo se a disposição no ambiente for baixa, segundo Greenaway (1971) e Grospietsch et al. (2000). Neste trabalho, verificou-se que quanto maior era a quantidade de carbonato de cálcio, maior era também sua mobilização para a hemolinfa, aumentando a disponibilidade de cálcio. Este excesso de cálcio provavelmente ficou armazenado em células dispostas nos espaços intercelulares no epitélio, em células de produção de muco no manto e em células musculares descritas como sítio de deposição em *B. glabrata* por Bielefeld et al. (1992). Segundo Magalhães (2009) e Magalhães et al. (2009), a disponibilidade de cálcio pode desencadear a formação de pérolas em *B.glabrata* submetida a diferentes quantidades de cálcio, sendo considerada um outro sítio de armazenamento deste íon no molusco.

Observou-se que, com 15 dias de exposição a 20mg/L de carbonato de cálcio, houve aumento de cálcio na hemolinfa e diminuição de cálcio na concha. Em relação às outras concentrações ao longo do tempo, verificou-se que a quantidade de cálcio na hemolinfa é inversamente proporcional à quantidade de cálcio na concha. Este resultado é compatível com Dewith & Sminia (1980), para os quais a alta concentração

de cálcio na hemolinfa faz com que este produto seja distribuído para a concha e o manto, acontecendo o inverso se a maior concentração de cálcio estiver na concha. Este equilíbrio na distribuição de cálcio na hemolinfa e na concha é pH dependente (Marxen & Becker, 2000) e está relacionado à disponibilidade de cálcio no meio.

Apesar do balanço iônico do cálcio entre a concha e a hemolinfa, não ocorreu o processo de hiper calcificação observado em moluscos infectados (Pinheiro & Amato, 1995).

Dessas considerações, conclui-se que, em moluscos não infectados, ocorre uma mobilização frequente de cálcio nestes sítios de acordo com a quantidade de cálcio disponível no ambiente.

ABSTRACT

Calcium mobilization in *Biomphalaria glabrata* exposed to different quantities of calcium carbonate

Calcium is essential to mollusk's life, because is associated with shell formation and metabolic processes that are essential to maintain their homeostasis. The aim of this work was to verify the mobilization of calcium in the haemolymph and shell of *Biomphalaria glabrata* (strain BH) exposed to different calcium carbonate concentrations. Sixty days old snails were used for this study, distributed in five groups: four groups exposed to different concentrations (20, 40, 60, 80 mg/L) of calcium carbonate and one control group. The exposition time was forty-five days. Fortnightly, the snails were sacrificed by cardiac puncture for haemolymph extraction. The concentration of calcium was determined in the haemolymph, using diagnosis kits (Dole's Reagentes[®]) and for the calcium content in the shell, a modified volumetric method of complexing was employed. The results showed an increase of the calcium content in haemolymph and a decrease in shell of snails exposed to 15 days of 20mg/L of calcium carbonate. In the other exposed groups, the calcium concentration in the haemolymph was inversely proportional to the amount of calcium in the shell. We conclude that in snails exposed to different amounts of calcium, mobilization in the hemolymph and in the shell occurs according to the amount of calcium available.

KEY WORDS: Schistosomiasis. *Biomphalaria glabrata*. Calcium.

REFERÊNCIAS

1. Becker W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and mollusks, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Z. Parasitenkd* 63: 101-111, 1980.
2. Bielefeld U, Zierold- Kortje KH, Becker W. Calcium localization in the shell-forming tissue of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: a comparative study of various methods for localizing calcium. *Histochemical J* 24: 927-938, 1992.

3. Dawies TW, Erasmus ED. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tissue Res* 236: 643-649, 1984.
4. Dewith ND, Sminia T. The effects of nutritional state and yeh external concentrations of the ionic composition of the haemolymph and on the calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Proc Konin N Akademy Wetenschappen* 83: 213-227, 1980.
5. Florkin M & Scheer BT. *Chemical Zoology*. Vol. 2. Academic Press, New York, 1972.
6. Greenaway P. Calcium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L) (Gastropoda; Pulmonata). I. The effect of internal and external calcium concentrations. *J Exp Biol* 54: 199-214, 1971a.
7. Greenaway P. Calcium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L) (Gastropoda; Pulmonata). II. Calcium movements between internal calcium compartments. *J Exp Biol* 54: 609-620, 1971b.
8. Grospietsch T, Sitnikova TY, Zerbst-Boroffka I. Comparison of calcium storage between a Baikalian gastropod and holarctic relatives. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125: 273-283, 2000.
9. Liebsch M, Becker W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. *J Comp Physiol [B]* 166: 41-50, 1990.
10. Magalhaes ACS. A influência de diferentes concentrações de carbonato de cálcio no manejo da população de *Biomphalaria glabrata* em condições laboratoriais. Monografia, Faculdades São José, Rio de Janeiro, 2009.
11. Magalhaes ACS, Nascimento AC, Mello-Silva CC. Formação de pérolas em *Biomphalaria glabrata* submetida a diferentes concentrações de carbonato de cálcio. Anais do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia. Rio de Janeiro, 2009.
12. Marxen JC, Becker W. Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol Part B* 127: 235-242, 2000.
13. Marxen JC, Becker W, Finke D, Hasse B, Epple M. Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. *J Moll Stud* 69: 113-121, 2003.
14. Mazuran N, Hrsak M, Tomic PD. Effects of CaCl₂ and CaBr₂ on the fecundity of *Planorbarius corneus* L. *Chemosphere* 38: 2345-2355, 1999.
15. Mostafa OMS, Bakry FA, Sleem Sh, El-Dafrawy SM. The influence of *Schistosoma mansoni* and/ or *Echinostoma liei* infection on the tissue soluble proteins of *Biomphalaria alexandrina*. *Egypt J Zoology* 37: 33-43, 2001.
16. Mostafa OMS. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. *Parasitol Res* 101: 963-966, 2007.
17. Mello-Silva CC, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae). *Mem Inst O Cruz* 101: 3-8, 2006.
18. Soido C, Vasconcellos MC, Diniz AG, Pinheiro J. An Improvement of calcium determination technique in the Shell of molluscs. *Brz Arch Biol Tecnol* 52: 93-98, 2009.
19. Paschoal SV, Amato SB. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) em *Bradybaena Similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): Alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. *Rev Bras Zool* 13: 411-418, 1996.
20. Pinheiro J, Amato S. Calcium determination in the shell of *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda) infected with *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea). *Arq Biol Tecnol* 38: 761-767, 1995.
21. Zbikowska E. The effect of Digenea Larvae on calcium content in the shells of *Lymnaea stagnalis* (L) individuals. *J Parasitol* 89: 76-79, 2003.
22. Zelck UE, Becker W, Bayne CJ. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Dev Comp Immunol* 19: 181-194, 1995.