



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPONENTES CELULARES E NÃO
CELULARES DA HEMOLINFA DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*
MELÂNICA NA INFECÇÃO POR *SCHISTOSOMA MANSONI*.

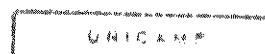
SILMARA MARQUES ALLEGRETTI

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE BIOLOGIA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS, NA ÁREA DE
PARASITOLOGIA

ORIENTADORA: PROFA.DRA. ELIANA MARIA ZANOTTI-MAGALHÃES

DEZEMBRO DE 1994

Este exemplar corresponde à redação final	
da tese defendida pelo(a) candidato a)	
<i>Silmara Marques</i>	
<i>Allegretti</i>	<i>27</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora	
	<i>102</i>
	<i>071</i>



UNIDADE	PC
Nº CHAMADA:	T/unicamp
V.	AR 582
FORMA DO	23715
PROC.	433/95
C	☒
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/02/95

CM-00065499-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

AL526	Allegretti, Silmara Marques Estudo da ação dos componentes celulares e não celulares da hemofilia de <i>Biomphalaria glabrata</i> na infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> / Silmara Marques Allegretti. -- Campinas, SP : [s.n.], 1994. Orientador: Eliana Maria Zanotti-Magalhaes. Tese (doutorado) -- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Schistosoma mansoni</i>. 2. <i>Biomphalaria glabrata</i>. 3. Hemofilia. 4. Celulas. I. Zanotti-Magalhaes, Eliana Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	--

Este trabalho foi realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

A execução deste trabalho contou com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP e FAEP.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães, pela orientação, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães pela co-orientação deste trabalho pela amizade e infinita paciência.

A Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta pela leitura minuciosa, sugestões e pelos docinhos.

Ao Prof. Dr. Luiz Candido de Souza Dias pela leitura atenta e comentários.

A Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo pela ajuda na parte histológica.

Ao Prof. Dr. José Ferreira de Caralho, pelo acompanhamento estatístico e sugestões.

A Profa. Dra. Verónica Sierpe Jeraldo, pela leitura, sugestões e pela amizade.

À Carla Almeida Vivaqua e André Luís Santos de Pinho, pelo processamento do anexo estatístico.

Aos professores do curso de pós-graduação em Parasitologia, de quem minha formação recebeu valiosa ajuda.

Ao carinho e ajuda de todos os funcionários do Departamento de Parasitologia.

A Mara e Heloisa, pela colaboração, amizade e participação em todos os momentos.

A Ana Paula e José Eduardo pelo suporte técnico e afetivo.

A Fábria e Sérgio, pelos anos.

Aos meus pais por TUDO.

Ao Lau pelo incentivo e carinho nos momentos difíceis.

Aos amigos, que seguem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me incentivando.

Ao João, pela paciência, compreensão, amor e presença em todos os momentos.

Índice

Lista de tabelas e figuras.....	i
1) Introdução.....	1
2) Objetivo.....	11
3) Material e Métodos.....	12
3.1) Planejamento experimental.....	12
3.2) Constituição dos grupos experimentais.....	13
3.3) Manutenção dos moluscos.....	16
3.4) Infecção de moluscos.....	16
3.5) Obtenção da hemolinfa para inoculação.....	17
3.6) Processo de inoculação da hemolinfa.....	18
3.7) Determinação da taxa de infecção e mortalidade.....	18
3.8) Obtenção de hemolinfa e contagem dos amebócitos.....	19
3.9) Preparação de eritrócitos de carneiro.....	19
3.10) Verificação da taxa de fagocitose.....	20
3.11) Avaliação do índice de fagocitose.....	21
3.12) Obtenção de cortes histológicos.....	21
2.13) Análise estatística.....	22
4) Resultados.....	24
4.1) Resultados relativos a mortalidade e susceptibilidade.....	24
4.2) Período pré-patente.....	26
4.3) Resultados relativos a mortalidade.....	28
4.4) Mortalidade ao longo do tempo.....	30
4.5) Reação tecidual	37
4.6) Avaliação da atividade fagocitária.....	44

4.7) Avaliação do número de amebócitos na hemolinfa.....	53
5) Discussão.....	71
6) Conclusões.....	86
7) Referências Bibliograficas.....	88
Anexo I Tabelas.....	I
Anexo II Estatístico.....	XXVII

Lista de Figura e Tabelas

Tabela 1.....	31
Taxa de infecção de <i>B. glabrata</i> melânica inoculada com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células.	
Figura 1.....	32
Taxa de infecção cumulativa de <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3).	
Figura 2.....	33
Taxa de infecção de semanal de <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2), suspensão de células (G3) e controle infectado (G4).	
Figura 3.....	34
Taxa de mortalidade de <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total (G1) e apenas infectada (G4).	
Figura 4.....	35
Taxa de mortalidade de <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa livre de células (G2) e apenas infectada (G4).	
Figura 5.....	36
Taxa de mortalidade de <i>B. glabrata</i> inoculadas com suspensão de células (G3) e apenas infectada (G4).	
Figura 6.....	39
Número médio de larvas íntegras de <i>S. mansoni</i> observadas em <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3).	
Figura 7.....	40
Número médio de larvas degeneradas de <i>S. mansoni</i> observadas em <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3).	
Figura 8.....	41
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de células oriundas de molusco infectado após 12 horas de infecção por <i>S. mansoni</i> .	
Figura 9.....	41
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de células oriundas de molusco infectado após 24 horas de infecção por <i>S. mansoni</i> .	

Figura 10.....	42
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células oriundas de molusco infectado após 30 minutos de infecção por <i>S. mansoni</i> .	
Figura 11.....	42
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células oriundas de molusco infectado após 12 horas de infecção por <i>S. mansoni</i> .	
Figura 12.....	43
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células oriundas de molusco infectado após 24 horas de infecção por <i>S. mansoni</i> .	
Figura 13.....	43
Corte histológico da região céfalo-podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total oriundas de molusco infectado após 12 horas de infecção por <i>S. mansoni</i> .	
Figura 14.....	47
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total, frente a eritrócitos de carneiro.	
Figura 15.....	48
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa livre de células, frente a eritrócitos de carneiro.	
Figura 16.....	49
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculadas com suspensão de células, frente a eritrócitos de carneiro.	
Figura 17.....	50
Fotomicrografia de monocamada de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total e infectada por <i>S. mansoni</i> posteriormente fagocitando eritrócitos de carneiro.	
Figura 18.....	50
Fotomicrografia de monocamada de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células e infectada por <i>S. mansoni</i> posteriormente fagocitando eritrócitos de carneiro.	
Figura 19.....	51
Fotomicrografia de monocamada de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células e infectada por <i>S. mansoni</i> posteriormente fagocitando eritrócitos de carneiro.	
Figura 20.....	51
Fotomicrografia de monocamada de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de células e infectada por <i>S. mansoni</i> posteriormente fagocitando eritrócitos de carneiro.	

Figura 21.....	52
Fotomicrografia de monocamada de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de células e infectada por <i>S. mansoni</i> posteriormente fagocitando eritrócitos de carneiro.	
Figura 22.....	58
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de molusco infectado e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G1 s1).	
Figura 23.....	59
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de molusco sadio e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G1 s2).	
Figura 24.....	60
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de molusco infectado (G1 s3).	
Figura 25.....	61
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de molusco sadio (G1 s4).	
Figura 26.....	62
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células de molusco infectado e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G2 s1).	
Figura 27.....	63
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células de molusco sadio e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G2 s2).	
Figura 28.....	64
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células de molusco infectado (G2 s3).	
Figura 29.....	65
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa livre de células de molusco sadio (G2 s4).	
Figura 30.....	66
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de amebócitos de molusco infectado e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G3 s1).	
Figura 31.....	67
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de amebócitos de molusco sadio e posteriormente infectado por <i>S. mansoni</i> (G3 s2).	
Figura 32.....	68
Número médio de amebócitos de <i>B. glabrata</i> inoculada com suspensão de amebócitos de molusco infectado (G3 s3).	

Figura 33.....69
 Número médio de amebócitos de *B. glabrata* inoculada com
 suspensão de amebócitos de molusco sadio (G3 s4).

Figura 34.....70
 Número médio de amebócitos de *B. glabrata* infectada
 (controle G4 s1).

Anexo I

Tabelas de 2 a 37I
 Dados semanais da taxa de infecção e mortalidade de *B.*
glabrata inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados ou
 não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao
 trematódeo.

Tabelas 38 a 40.....XIX
 Número médio de larvas de *S. mansoni* observadas em *B.*
glabrata inoculadas.

Tabelas 41 a 44.....XX
 Índice de fagocitose de granulócitos de *B. glabrata*
 inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectado ou
 sadio e posteriormente infectado, frente a eritrócitos de
 carneiro.

Tabelas 45 a 48.....XXI
 Índice de fagocitose de granulócitos de *B. glabrata*
 inoculadas com hemolinfa livre de células moluscos infectado
 ou sadio e posteriormente infectado, frente a eritrócitos de
 carneiro.

Tabelas 49 a 52.....XXII
 Índice de fagocitose de granulócitos *B. glabrata* inoculadas
 com suspensão de células de moluscos infectado ou sadio e
 posteriormente infectado, frente a eritrócitos de carneiro.

Tabela 53.....XXIII
 Índice de fagocitose de granulócitos de *B. glabrata*
 infectados, frente a eritrócitos de carneiro

Tabela 54.....XXIV
 Número médio de amebócitos não estrelados em *B. glabrata*
 inoculada com hemolinfa total.

Tabela 55.....XXIV
 Número médio de amebócitos estrelados em *B. glabrata*
 inoculada com hemolinfa total.

Tabela 56.....XXIV
 Número médio de amebócitos não estrelados em *B. glabrata*
 inoculada com hemolinfa livre de células.

Tabela 57.....XXIV
Número médio de amebócitos estrelados em *B. glabrata*
inoculada com hemolinfa livre de células.

Tabela 58.....XXVI
Número médio de amebócitos não estrelados em *B. glabrata*
inoculada com hemolinfa suspensão de células.

Tabela 59.....XXVI
Número médio de amebócitos estrelados em *B. glabrata*
inoculada com suspensão de células.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo verificar a ação da inoculação de hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de amebócitos no desenvolvimento do *S. mansoni* da linhagem BH em *B. glabrata* melânica. Os parâmetros avaliados foram: taxa de infecção, taxa de mortalidade, período pré-patente, reação tecidual em torno das larvas de *S. mansoni*, atividade fagocitária dos amebócitos e número de amebócitos na hemolinfa. Para a determinação da taxa de infecção, taxa de mortalidade, período pré-patente, atividade fagocitária e número de amebócitos circulantes os moluscos foram infectados com 10 miracídios do trematódeo. A reação tecidual foi observada em moluscos expostos a 100 miracídios.

Os resultados indicaram que, a inoculação de hemolinfa total provocou a facilitação da infecção observando-se diminuição do período pré-patente, aumento da taxa de mortalidade, pequena atividade fagocitária dos amebócitos e discreta reação amebocitária em torno do esporocisto de *S. mansoni*. A inoculação de hemolinfa livre de células provocou um retardamento do desenvolvimento do parasita com o aumento do período pré-patente, e reação tecidual mais intensa em torno do esporocisto de *S. mansoni*.

A inoculação de suspensão de amebócitos produziu uma reação mais efetiva contra o parasita com aumento do período pré-patente, diminuição da mortalidade dos moluscos, aumento da atividade fagocitária, aumento das células estreladas na hemolinfa circulante e aumento das reações amebocitárias no tecido em torno dos esporocistos.

A inoculação de suspensão de células produziu maior resistência ao desenvolvimento do *S. mansoni*.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to verify the effects from the inoculation of different kinds of hemolymph on the development of *Schistosoma mansoni* in pigmented *Biomphalaria glabrata*. The *S. mansoni* belongs to the BH strain. The types of hemolymph were: complete hemolymph, cells-free hemolymph and amoebocyte suspension.

In order to achieve our purpose the following variables were considered: infection rate, death rate, pre-patent period, tissue reactions around *S. mansoni* larval, phagocytosis activity and number of amoebocytes in the circulation hemolymph. *B. glabrata* snail were infected with 10 miracidia from the trematodes. The tissue reaction was observed on the snails that were exposed to 100 miracidia.

The results have indicated that the inoculation of the complete hemolymph facilitated the infection with decrease on the pre-patent period as well as the increase on the death rate little phagocytosis activity on the amoebocytes and slight reaction around sporocyst of the *S. mansoni*. The inoculation of cells-free hemolymph postponed the parasite development with the increase of the pre-patent period and more intense tissue reaction around sporocyst of *S. mansoni*.

The inoculation of the amoebocytes suspension caused a more effective reaction against the parasite with the increase the pre-patent period, the decrease snails mortality, the increase phagocytosis activity the increase of granulocytes in the circulating hemolymph and the increase of amoebocytes reactions around sporocysts of *S. mansoni*.

The inoculation of the amoebocytes suspension produced greater resistance to the *S. mansoni* development.

1) INTRODUÇÃO

Há alguns anos não se acreditava que os invertebrados possuísem um sistema imune. Com mais forte razão, não se admitia que este sistema tivesse características semelhantes àquelas verificadas nos vertebrados. Hoje sabe-se que o sistema imune dos invertebrados, tal como ocorre nos vertebrados, desempenha diversas funções: apresenta células de defesa, reconhece corpos estranhos, possui resposta encapsuladora, toma parte no reparo tecidual, fagocita, possui reações citotóxicas, assim como também possui fatores humorais (Wagge, 1955; Cheng, 1975; Babior, 1978 e Ratcliffe, 1985).

Entre as diferenças observadas está a ausência das imunoglobulinas, que têm um importante papel no sistema imune dos vertebrados e que não foram encontradas nos invertebrados. Entretanto, mesmo sem a presença de imunoglobulinas, o sistema imune dos invertebrados é muito eficiente. Isto porque existem substâncias que atuam semelhantemente a imunoglobulinas. Há na literatura observações de transferência de resistência através da hemolinfa ou fatores humorais que ampliam a resposta celular (Mc Kay & Jenkin, 1969; Loker & Bayne, 1982; Granath & Yoshino, 1984).

Entre os tipos de defesa registrados em invertebrados, o que é patrocinado por células é considerado como sendo a

principal linha de defesa dos moluscos. Estas células estão presentes na hemolinfa e fluídos do corpo dos moluscos e atuam como defensoras, fagocitando e encapsulando materiais estranhos que entram no organismo do molusco. A fagocitose de materiais estranhos é facilitada pela movimentação destas células, que exercem importante papel na relação parasita-hospedeiro (Abdul Salam & Michelson, 1980ab).

Os amebócitos, como são conhecidas estas células, originam-se do "Órgão Produtor de Amebócitos" (APO), localizado na região reno-pericárdica do molusco. O APO apresenta diferentes reações dependendo do estímulo a que é submetido. Quando o estímulo é produzido por substância particulada ou solúvel, o APO não apresenta alterações; quando o molusco é submetido a infecção por parasitas há um aumento deste órgão devido à maior produção dos amebócitos (Sullivan et al., 1984; Joky et al., 1985).

Os amebócitos são divididos em duas categorias: hialinócitos e granulócitos (Cheng, 1975). A primeira categoria possui um contorno circular ou ovalado, tem grande núcleo em relação ao raio citoplasmático e poucas estruturas lisossomais, não emite pseudópodes e nem é considerada portadora de função fagocitária, sendo o seu papel de defesa desconhecido. A segunda categoria apresenta grânulos no seu interior, tem relativamente mais citoplasma, mais lisossomos, emite pseudópodes e fagocita corpos estranhos. Os granulócitos são muito parecidos com os macrófagos humanos (Cheng, 1975).

Neste trabalho os amebócitos foram classificados em estrelados (granulócitos) e não estrelados (hialinócitos). Esta denominação foi adotada devido à grande controvérsia que existe na literatura sobre a classificação destas células. George, em 1941 (apud Wagge, 1955), classificou os amebócitos em 3 tipos. A denominação dada por este pesquisador foi: tipo 1 - células não diferenciadas que têm a capacidade de se diferenciar em outros tipos de células. Tipo 2 - células que possuem a capacidade de fagocitar. Tipo 3 - células que possuem grânulos, vacúolos e parecem fazer transporte de material nutritivo. Pan, em 1958, classificou-os em um só tipo de célula, denominando-os de amebócitos. Sminia, em 1972, também admitiu tratar-se de um único tipo de célula com diferentes funções. Cheng, em 1975, classificou-as em duas categorias, como já mencionado, e Noda & Loker, em 1989, classificaram-nas em 4 categorias de células: granulócitos com grande espraçamento, granulócitos com pouco espraçamento, células redondas e hialinócitos. A classificação destas células, portanto, não está definida até os dias de hoje. Existe a possibilidade de tratar-se de um único tipo de célula que, dependendo do estímulo, se transforme em outro tipo. Cheng & Garrabrant (1977) observaram que os hialinócitos podem representar um tipo primário de célula que reage contra antígenos solúveis. Os hialinócitos de *Mercenaria mercenaria* (Mollusca, Pelecypoda, Bivalvia) têm a capacidade de fagocitar bactérias (Foley & Cheng, 1974 e 1975). Entretanto, isto não acontece em

Biomphalaria glabrata infectada por *Schistosoma mansoni* (Foley & Cheng, 1975). Ottaviani (1983) demonstrou que em *Planorbarius corneus* há um único tipo de célula, mas com estágios de maturação diferentes e que dependendo do estágio de maturação a célula poderia exercer uma determinada função. Ottaviani & Franchini (1988) sugerem que há dois tipos de células em *P. corneus*, porque existem marcadores de superfície específicos para cada tipo de célula. van der Knaap & Loker, 1990, verificaram que existem 4 tipos de células, que atuam no sistema de defesa interno do molusco. Entre estes 4 tipos de células 3 são consideradas fixas, que não circulam, nos tecidos. As células consideradas fixas foram classificadas em células endoteliais, células reticulares e células porosas.

Os amebócitos, além da função fagocitária, fazem transporte de cálcio quando há necessidade de reparar a concha. Desempenham papel semelhante ao fibrinogênio, quando atuam como "tampão" em casos de ferimentos dos moluscos impedindo, assim, extravasamento de hemolinfa (Wagge, 1955; Ratcliffe, 1985).

A resistência dos moluscos planorbídeos a infecção é determinada por fatores genéticos. Segundo Richards (1973), Richards & Merritt (1975) e Richards (1984) a susceptibilidade dos moluscos à infecção por *Schistosoma mansoni* é determinada geneticamente e constitui caráter hereditário. As variações da infectividade são devidas a um único gene dominante, podendo estar presente o caráter da

susceptibilidade em moluscos refratários.

A fisiologia, a dieta e a idade dos moluscos influenciam e caracterizam o comportamento e o grau de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Existe a necessidade da interação fisiológica do molusco com o trematódeo. A dieta do molusco é importante para o estabelecimento da infecção, porque o parasita consome boa parte dos nutrientes existentes em seu organismo, principalmente o glicogênio (Liebsch & Becker, 1990). A idade é importante porque os moluscos jovens são mais susceptíveis a infecção em relação aos mais velhos (Richards, 1973 e 1984; Richards & Merritt, 1975; Niemann & Lewis, 1990).

A natureza do parasitismo é influenciada por aspectos fisiológicos, imunológicos e de adaptação do molusco em relação ao parasita (Jourdane & Théron, 1987). Os moluscos que servem de hospedeiro ao *Schistosoma mansoni* são mais susceptíveis às linhagens simpátricas do parasita, ou seja, moluscos de uma determinada região são mais susceptíveis a parasitas da mesma região geográfica. Esta observação foi confirmada por diversos autores (Newton, 1953; Paraense & Côrrea, 1963; Magalhães, 1966; Paraense & Côrrea, 1978; Santana et al., 1978 e van der Knaap & Loker, 1990). As infecções alopátricas são possíveis quando o molusco é geneticamente selecionado ou quando o molusco é submetido a uma grande carga parasitária (Paraense, 1963, Santana et al., 1978; Dias et al., 1987).

A presença de infecções concomitantes, ou seja, aquelas

que ocorrem quando um molusco é parasitado por uma ou mais espécies de trematódeos digenéticos, também altera a relação parasita-hospedeiro pela competição de nutrientes, luta por espaço no corpo do hospedeiro, alterações fisiológicas e imunológicas (Lie et al., 1977ab; 1981; Loker & Hertel, 1987; Noda & Loker, 1989). As alterações poderiam aumentar ou diminuir a susceptibilidade do molusco quando uma segunda espécie de trematódeo entra em contato com o caramujo (Lie et al., 1977b). Foi verificado por Machado (1990) que *B. tenagophila* submetida a inoculação de hemolinfa total de moluscos infectados por *S. mansoni* apresentou resistência a infecção quando exposto posteriormente ao *S. mansoni*.

A fagocitose nos invertebrados inferiores teria apenas como função a alimentação através da ingestão de partículas estranhas que são digeridas no seu interior. Hoje em dia reconhece-se que ela tem como função principal a defesa dos moluscos e dos vertebrados. A fagocitose, juntamente com fatores humorais, é responsável pela eficiência do sistema de defesa dos moluscos, junto com a concha e o muco, evitando a entrada de corpos estranhos (Ratcliffe, 1985; Bayne, 1990). O processo fagocitário, tanto nos vertebrados como nos invertebrados, reconhece primeiramente o material estranho que penetrou no organismo e somente depois há o englobamento da partícula que foi reconhecida como estranha (LoVerde et al., 1982). Este processo acontece também nos enxertos feitos em moluscos, onde há reconhecimento e aceitação de tecidos do seu próprio corpo e reconhecimento e

rejeição daquele que foi implantado (Tripp, 1961; Chernin, 1966; Cheng & Jourdane, 1987; Jourdane & Cheng, 1987; Ottavianni & Vergine, 1990). As células fagocitárias produzem peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e radicais hidroxila, formando um sistema que se chama "*burst respiratório*". Este sistema é altamente tóxico e atua na destruição dos microorganismos (Babior, 1978; Dikkeboom et al., 1987 e 1988; Sminia & van der Knaap, 1987).

Um outro aspecto que vem sendo paulatinamente desenvolvido e relatado na literatura diz respeito ao mecanismo da imunidade. Falava-se que a imunidade dos moluscos era efetuada por interações não específicas das células fagocitárias com os parasitas invasores, juntamente com um número de fatores humorais não relatados. Hoje sabe-se que os moluscos têm reações celulares imunes específicas com um curto período de memória (Ratcliffe, 1985; Tripp, 1970).

Há ainda trabalhos que relatam a existência em moluscos de vários fatores humorais que estão presentes no soro como lectinas, aglutininas, linfoquinas (Bird, 1974; Renwrantz, 1977; Sminia, et al., 1979; Lie et al., 1980; Vasta, et al., 1982; Vasta, et al., 1984; Boswell & Bayne, 1984; Mullainadhan & Renwrantz, 1986 e Renwrantz & Stahmer, 1983; van der Knaap & Loker, 1990; Hertel et al., 1994).

As lectinas são proteínas com habilidade a unir-se a carboidratos especificamente e são sintetizadas pelos amebócitos e são liberadas no soro, onde atuam como

opsoninas ligando-se ao material estranho (van der Knaap et al., 1981; Ottaviani & Franchini, 1988; Zelck & Becker, 1990; Richards & Renwrandtz, 1991; Monroy & Loker, 1993).

Nos trabalhos de Lodes & Yoshino (1993); Coustau & Yoshino, (1994ab) foi verificado que amebócitos de cepas de *B. glabrata*, resistentes e susceptíveis, embora possuam polipeptídeos semelhantes que se ligam ao esporocisto de *S. mansoni* estão em quantidades diferentes. Aglutininas também são encontradas em maior quantidade na hemolinfa de moluscos resistentes após a exposição ao trematódeo (Couch et al. 1990).

Fryer & Bayne (1990) verificaram que amebócitos de moluscos susceptíveis tinham uma capacidade menor em fagocitar em relação aos resistentes.

No trabalho de Balan et al. (1993) foi observado que moluscos superinfectados por *S. mansoni* não possuíam reação amebocitária em torno da larva degenerada, sugerindo que não houve participação direta das células da hemolinfa do molusco na destruição da larva de *Schistosoma mansoni* e que, possivelmente, fatores da hemolinfa atuariam na destruição do parasita.

Foram feitos trabalhos com a inoculação de várias partículas estranhas (grãos de pólen, esferas de poliésteres, bactérias, tecidos heterólogos transplantados, tecidos homólogos fixados em formalina, miracídios, esporocistos e cercárias que não conseguiram sair dos tecidos dos moluscos) e notou-se que existe reconhecimento por parte de moléculas

receptoras que podem estar presentes no soro ou na superfície das células da hemolinfa (Feng, 1966; Bayne, 1982; van der Knaap et al., 1981). Esta especificidade pode não estar presente na fagocitose na ausência do soro ou fatores do soro (Prowse & Tait, 1969). A destruição de organismos estranhos pode ocorrer com ou sem a presença de amebócitos, sugerindo a participação de componentes humorais com liberação de substâncias citotóxicas (Cheng & Yoshino, 1976; Foley & Cheng, 1977).

Seta (1990) verificou que os moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentaram comportamento amebocitário diferente frente a diversos estímulos. Parece ainda, ter havido mobilização dos amebócitos estrelados (granulócitos) quando o estímulo era a infecção por *S. mansoni*, sugerindo uma resposta específica ao parasita.

Existe ainda a constatação do fenômeno de resistência adquirida, quando se transfere soro de um molusco refratário a infecção por *S. mansoni* a um molusco susceptível, observando-se, neste caso, transferência de resistência (Granath & Yoshino, 1984).

No trabalho anterior (Allegretti, 1991) constatamos diferenças de comportamento entre as variantes albina e melânica de *B. glabrata* em relação ao *S. mansoni*, linhagem BH. Observamos um maior número de moluscos melânicos eliminando cercárias e por um período mais longo do que nos moluscos albinos. Foi observado que houve interrupção precoce da eliminação de cercárias, com cura da infecção em

alguns moluscos albinos. A taxa de mortalidade também foi maior nos moluscos melânicos, por terem se infectado mais. A contagem das células da hemolinfa nos mostrou um maior número de células estreladas para a variante albina. Foi também verificado que existem picos do número de células em diferentes horários para as duas variantes, sendo de 12 horas para a variante albina e de 24 horas para a variante melânica. O estudo histológico mostrou um maior número de esporocistos íntegros para a variante melânica e um maior número de esporocistos degenerados para a variante albina.

Estes resultados, que indicaram maior susceptibilidade para a variante melânica, estimularam a continuidade do estudo com a variante que se mostrou mais susceptível e está presente em maior densidade na natureza.

2.) OBJETIVOS

Com a intenção de estudarmos alguns aspectos dos mecanismos de defesa dos moluscos expostos ao *S. mansoni* formulamos algumas questões:

1. Quais seriam as reações produzidas com a inoculação de hemolinfa total, hemolinfa sem células e com apenas suspensão de células, em relação à taxa de infecção dos moluscos, na variação do número de amebócitos circulantes, na capacidade fagocitária das células estreladas e na reação tecidual nos moluscos infectados por *S. mansoni*?
2. Será que poderíamos atribuir apenas às células a responsabilidade no processo de morte das larvas de *S. mansoni* ou fatores humorais também estariam envolvidos?
3. Qual seria a reação do molusco frente a infecção por *S. mansoni* quando inoculado com suspensão de amebócitos colhidos no período em que estas células foram observadas em maior número na hemolinfa dos moluscos melânicos?

3.) MATERIAL E MÉTODOS

3.1.) Planejamento experimental

Os moluscos utilizados foram da espécie *Biomphalaria glabrata* melânica, nascidos e criados no Laboratório do Departamento de Parasitologia da Unicamp e descendentes de exemplares coletados em Belo Horizonte MG, cedidos pelo professor Wladimir Lobato Paraense. A linhagem do *S. mansoni* utilizada foi a BH (Paraense & Corrêa, 1963).

A avaliação do comportamento dos moluscos frente a inoculação dos 3 tipos de inóculo (hemolinfa total, hemolinfa sem células e suspensão de células) foi feito através das seguintes observações:

1. Taxa de infecção (n=100 moluscos para cada subgrupo) e mortalidade (n=50 moluscos para cada subgrupo)
2. Identificação e contagem de amebócitos na hemolinfa circulante (n=10 moluscos para cada horário para cada subgrupo)
3. Avaliação da capacidade fagocitária (n=10 moluscos para cada horário para cada subgrupo).
4. Reação tecidual ao *S. mansoni* (n=3 moluscos para cada horário para cada subgrupo).

3.2.) Foram constituídos os seguintes grupos:

Grupo 1 - Inoculação de hemolinfa total

subgrupo 1 (s1) - Moluscos inoculados com hemolinfa total de moluscos infectados por *Schistosoma mansoni* e posteriormente infectados por *S. mansoni*.

subgrupo 2 (s2) - Moluscos inoculados com hemolinfa total de moluscos sadios e posteriormente infectados por *S. mansoni*.

subgrupo 3 (s3) - Moluscos inoculados com hemolinfa total de moluscos infectados por *S. mansoni*.

subgrupo 4 (s4) - Moluscos inoculados com hemolinfa de moluscos sadios.

Grupo 2 - Inoculação de hemolinfa livre de células

subgrupo 1 (s1) - Moluscos inoculados com hemolinfa livre de células de moluscos infectados e posteriormente infectado por *S. mansoni*.

subgrupo 2 (s2) - Moluscos inoculados com hemolinfa livre de células de moluscos sadios e posteriormente infectado por *S. mansoni*.

subgrupo 3 (s3) - Moluscos inoculados com hemolinfa livre de células de moluscos infectado por *S. mansoni*.

subgrupo 4 (s4) - Moluscos inoculados com hemolinfa livre de células de moluscos sadios.

Grupo 3 - Inoculação de suspensão de amebócitos

subgrupo 1 (s1) - Moluscos inoculados com suspensão de amebócitos de moluscos infectados e posteriormente infectado por *S. mansoni*.

subgrupo 2 (s2) - Moluscos inoculados com suspensão de amebócitos de moluscos sadios e posteriormente infectado por *S. mansoni*.

Subgrupo 3 (s3) - Moluscos inoculados com suspensão de amebócitos de moluscos infectados por *S. mansoni*.

subgrupo 4 (s4) - Moluscos inoculados com suspensão de amebócitos de moluscos sadios.

Grupo 4 - Controles

subgrupo 1 (s1) - Moluscos infectados por *S. mansoni*.

subgrupo 2 (s2) - Moluscos não infectados por *S. mansoni*.

Tabela-resumo dos grupos experimentais

grupos	Tipo de inóculo	Inoculação				Infecção posterior
		Origem da hemolinfa		Não inoculado		
		Molusco infectado	Molusco sadio			
grupo 1	Hemolinfa total	S1	S2		Sim	
		S3	S4		Não	
grupo 2	Hemolinfa sem células	S1	S2		Sim	
		S3	S4		Não	
grupo 3	Suspensão de células	S1	S2		Sim	
		S3	S4		Não	
grupo 4	Nenhum	-	-	S1	Sim	
		-	-	S2	Não	

3.3.) Manutenção dos moluscos:

Os moluscos foram criados a uma temperatura média de 22° a 25° C em tanques com água decolorada e alimentados diariamente com folhas de alface fresca. Uma vez por semana foi adicionado carbonato de cálcio à água.

3.4.) Infecção de moluscos:

A linhagem de *S. mansoni* utilizada para a infecção foi a de Belo Horizonte, MG, (BH) mantida em *B. glabrata* simpátrica e em camundongos fêmeos, Swiss, SPF.

Os miracídios foram obtidos das fezes de camundongos 60 dias após a infecção por *S. mansoni*.

As fezes foram homogeneizadas em água decolorada e colocadas em cálice de sedimentação. O sedimento foi lavado e depois de limpo foi exposto à luz para eclosão dos miracídios (Standen, 1951). Os moluscos foram expostos individualmente em frascos de vidro, com 3 ml de água, onde foram colocados 10 miracídios. Os moluscos ficaram expostos por 2 horas à luz para propiciar a entrada dos miracídios ativados pelo calor e pela luz (Standen, 1951). Os caramujos utilizados tinham de 7 a 9 mm de diâmetro. O grupo controle sem infecção deste experimento teve o mesmo tipo de tratamento dos infectados.

3.5.) Obtenção da hemolinfa para inoculação

3.5.1.) Obtenção da hemolinfa total para inoculação

A hemolinfa foi obtida da região céfalo-podal de moluscos de 7 a 9mm de diâmetro através da punção da região céfalo-podal com uma pipeta Pasteur (Michelson, 1966). Após a coleta a hemolinfa foi mantida em tubo plástico e logo em seguida inoculada.

3.5.2.) Obtenção da suspensão de amebócitos e hemolinfa livre de células para inoculação.

Para obtermos a suspensão de células colhemos hemolinfa de 10 moluscos e centrifugamos durante 10 minutos a 1173g a 4° C com 3 repetições. A primeira centrifugação foi feita com hemolinfa total e nas duas seguintes adicionamos ao sedimento MME (meio mínimo essencial pH 7.4). A suspensão de células obtida e inoculada nos moluscos possuía aproximadamente 24 células por 0,5 ul (mesma quantidade de células da hemolinfa total). A cada inoculação foi verificado a quantidade de células existentes na hemolinfa com o auxílio da câmara de Neubauer.

Para obtermos hemolinfa livre de células colhemos hemolinfa de 10 moluscos e centrifugamos durante 10 minutos a 1173g a 4° C com 3 repetições. Após a primeira centrifugação as células foram encontradas depositadas no fundo do tubo e na camada superficial. Após a retirada das

células da parte superficial e do fundo por pipeta, a hemolinfa foi novamente centrifugada na mesma rotação e temperatura.

3.6) Processo de inoculação:

Os moluscos foram previamente anestesiados com mentol 0,025% por 3 horas. A inoculação, de 0,5 ml de hemolinfa em cada exemplar foi feita na região céfalo-podal com auxílio de uma seringa odontológica (com tubo de plástico). Para se evitar contaminação do inóculo, o manuseio foi realizado perto da chama.

A inoculação da suspensão de amebócitos em MME foi feita da mesma maneira.

3.7.) Determinação da taxa de infecção e mortalidade:

Cinquenta caramujos submetidos à infecção por *S. mansoni* foram expostos a luz e calor durante 2 horas para estimular a eliminação de cercárias. Esta observação começou a ser feita após 20 dias da exposição do molusco ao *S. mansoni* e após este período foi feita semanalmente. A taxa de mortalidade dos moluscos foi observada diariamente até o final do experimento em todos os subgrupos.

No caso da determinação da taxa de infecção utilizamos 100 moluscos (réplica) para a análise estatística.

3.8) Obtenção de hemolinfa e contagem dos amebócitos:

A hemolinfa coletada foi depositada em câmara de Neubauer e a contagem de amebócitos foi feita individualmente para cada molusco em microscópio de contraste e fase, com aumento de 400 vezes. As coletas foram feitas nos períodos de 30 minutos de infecção, às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas. Com isto foram formados 10 grupos de observação com 10 caramujos cada, totalizando 100 caramujos para este experimento para cada subgrupo.

3.9.) Preparação de eritrócitos de carneiro para o estudo da fagocitose:

Os eritrócitos de carneiro foram colhidos em solução de Alsever. Os eritrócitos foram lavados 5 vezes em tampão salino fosfatado (PBS), pH 7.4. Em seguida foi adicionado a 1 volume de "papa" de eritrócitos, 10 volumes de formol a 3% em PBS, pH 7,4. A mistura foi levemente agitada e deixada por 24 horas em geladeira, acrescentando-se 2 volumes de formol neutro. Incubou-se por 24 horas em geladeira com agitação leve, seguindo-se 8 lavagens com PBS, pH 7,4.

A suspensão de eritrócitos de carneiro foi ajustada para a concentração final de 3×10^6 células/mm³ com auxílio da câmara de Neubauer.

3.10.) Verificação da taxa de fagocitose através de preparação de monocamadas de amebócitos.

A hemolinfa na preparação de monocamadas de amebócitos foi proveniente de moluscos com 7 a 9 mm de diâmetro infectados ou não com 10 miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH.

Antes da retirada da hemolinfa, estes moluscos foram lavados em água destilada e ligeiramente secos em papel absorvente. A hemolinfa foi retirada pela punção da região céfalo-podal, com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico (Michelson, 1966).

Retiramos hemolinfa de 10 moluscos, para cada período de infecção, obtendo-se um "pool". Duas gotas de 25 μ l de hemolinfa foram colocados sobre lâmina lavada com Extran (Ma 02). Duas lâminas assim preparadas para cada horário de coleta de hemolinfa foram incubadas por 60 minutos a 25° C em estufa BOD. Ao final do período de incubação, o excesso de hemolinfa foi dispensado, ficando uma camada de amebócitos firmemente aderida às lâminas. A monocamada de células foi coberta com 50 μ l de eritrócitos de carneiro formolizados na concentração de 3×10^6 células/mm³. As preparações foram novamente incubadas em iguais condições. No final do período de incubação a monocamada foi lavada com MME pH 7,4 para remoção do excesso de eritrócitos e depois foi fixada em metanol e corada com May-Grünwald (diluído a 1/2 em PBS a 2% por 5 minutos) e posteriormente com Giemsa

(diluído a 1/2 em PBS a 2% por 20 minutos), sendo montada em bálsamo do Canadá (Abdul-Salam & Michelson, 1980; Santana, 1990).

3.11.) Avaliação do índice de fagocitose

Para avaliação do índice de fagocitose, contamos (com auxílio de microscopia óptica) até 200 células em 2 preparações para cada experimento, sendo o valor final determinado pela média aritmética conforme Abdul-Salam & Michelson (1980).

$$\frac{\text{número de células fagocitando pelo menos 1 eritrócito}}{\text{número total de células contadas (200)}} \times 100$$

O índice de fagocitose foi analisado nos intervalos de tempo correspondentes a 30', 12, 24, 48 e 72 horas para cada subgrupo.

3.12.) Obtenção de cortes histológicos:

Utilizamos 3 moluscos para cada horário para cada subgrupo.

Cada molusco foi exposto a 100 miracídios Os moluscos foram sacrificados após 30', 12, 24, 48 e 72 horas depois da

infecção.

Os moluscos foram fixados em Bouin aquoso por 48 horas e após este período a concha do molusco foi removida.

Após a fixação, os moluscos foram desidratados, diafanizados incluídos em parafina e cortados em micrótomo. Os cortes da região céfalo-podal foram feitos com a espessura de 5 *micra* foram corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Gomori.

3.13.) Análise estatística

A análise estatística foi feita no Laboratório de Estatística da Unicamp. Os cálculos estatísticos foram feitos com o SAS^R (Statistical Analysis System) e todo o procedimento está apresentado no anexo-II deste trabalho. Na análise avaliamos o comportamento dos moluscos que receberam hemolinfa total (T), hemolinfa livre de células (S) e suspensão de células (C). Em toda a análise considerou-se a procedência do inóculo, (molusco infectado (I) ou sadio (I*)).

Para a análise de sobrevivência ajustou-se um modelo paramétrico, por máxima-verossimilhança (Cox, D.R. e Oakes, D. (1984). O modelo ajustado é do tipo linear, com erros distribuídos segundo uma Weibul.

As taxas de infecção foram estudadas através de modelos logísticos, apropriados para respostas binárias.

A análise estatística do número de amebócitos na hemolinfa circulante foi feita através da MANOVA, análise de variância multivariada. Devido à grande variabilidade dentro dos conjuntos de 10 replicações, a análise foi dividida em duas fases. A primeira tem o objetivo de identificar que combinação dos 4 fatores proporciona um maior número de amebócitos. A segunda verifica se os fatores estudados interferem na variabilidade citada e, caso isso ocorra, procura as combinações dos níveis desses fatores que forneçam a menor variabilidade entre as replicações. Para isso, usa-se o desvio padrão amostral de cada conjunto de 10 replicações como resposta.

Para analisar o índice fagocítico dos amebócitos foi utilizado o teste Tukey para comparar as proporções dos grupos de hemolinfa, origem e infecção.

A análise dos cortes histológicos foram feitas através da análise de variância (ANOVA).

4.) RESULTADOS

4.1) - Susceptibilidade e mortalidade de moluscos *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células e posteriormente infectadas ou não com *S. mansoni*

4.1.1.) Infecção

Os dados referentes à taxa de infectividade dos moluscos estão nas tabelas de 1 a 37 e figuras 1 e 2. As tabelas de 2 a 37 estão no anexo I.

As taxas de infecção acumulativas mais elevadas foram as dos grupos inoculados com hemolinfa livre de células e suspensão de células (Tabela 1 e figura 1).

Os moluscos que receberam hemolinfa total de molusco infectado (G1, s1) tiveram uma baixa taxa de infectividade, com 28% dos moluscos infectados (tabela 1 e figura 1).

Os moluscos inoculados com hemolinfa total de molusco sadio (G1, s2) apresentaram uma taxa de infecção maior, com 54% dos moluscos infectados (tabela 1 e figura 1).

A maior taxa de infectividade no grupo inoculado com hemolinfa livre de células foi vista no subgrupo inoculado com hemolinfa de molusco infectado (G2, s1), com 64% dos moluscos infectados (tabela 1 e figura 1).

Os moluscos que receberam hemolinfa livre de células de molusco sadio (G2, s2) tiveram um percentual menor de

infecção, com 53% dos moluscos infectados, tendo sido verificado que alguns moluscos que eliminavam cercárias deixaram de fazê-lo, assim permanecendo até o final do experimento (Tabela 1 e figura 1).

No grupo inoculado com suspensão de células a maior taxa de infectividade foi para o subgrupo que recebeu hemolinfa de molusco infectado (G3, s1), com 51% dos moluscos parasitados. Os moluscos que receberam suspensão de células de moluscos sadios (G3, s2) tiveram 43% de taxa de infecção (tabela 1 e figura 1).

O grupo controle (moluscos apenas infectados G4, s1) teve uma alta taxa de infectividade (63%) quando comparada com os grupos inoculados com hemolinfa total e suspensão de amebócitos (tabela 1 e figura 1). O grupo controle (infectado apenas) teve uma menor taxa de infecção, apenas quando comparado com o subgrupo 1 do grupo 2 (inoculado com hemolinfa livre de células de molusco infectado e infectado posteriormente), com 64% de moluscos infectados (tabela 1 e figura 1).

A análise estatística da taxa de infecção verificou que o tipo de inóculo (hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células) foi fator significativo ($p < 0.0015$). A mesma análise considerou significativa a interação tipo de inóculo e origem do inóculo; $p < 0.0002$ (moluscos infectados, moluscos sadios; os dados estão no anexo II).

4.2.) Período pré-patente

O início da eliminação de cercárias (período pré-patente) variou nos diferentes grupos (tabelas 2 a 37, anexo I, e figura 2).

A análise semanal das taxas de infecção no período pré-patente considerou a mortalidade dos moluscos para efeito de cálculo da taxa de infecção (tabelas 2 a 37, anexo I, e figura 2).

O período pré-patente foi menor para o grupo inoculado com hemolinfa total de molusco infectado (3 semanas) em relação aos grupos inoculados com hemolinfa livre de células de molusco infectado (6 semanas) e suspensão de células de molusco infectado (8 semanas) (tabelas 4, 19 e 33, anexo I, e figura 2).

O grupo controle (moluscos apenas infectados-G4, s1) teve um período pré-patente maior (4 semanas) do que o grupo inoculado com hemolinfa total e menor do que os grupos inoculados com hemolinfa livre de células e suspensão de células (tabela 5, anexo I e figura 2).

A taxa de infecção mais elevada, considerando a mortalidade dos moluscos, foi a do grupo inoculado com hemolinfa total proveniente de molusco sadio e infectado posteriormente (G1, s2), com 90% dos moluscos infectados (tabela 6, anexo I e figura 2).

Os moluscos que receberam hemolinfa total de molusco infectado e que foram infectados posteriormente (G1, s1)

também tiveram uma alta taxa de infectividade, com 87,5% dos moluscos infectados (tabela 6, anexo I e figura 2).

A maior taxa de infectividade no grupo inoculado com hemolinfa livre de células foi vista no subgrupo inoculado com hemolinfa de molusco infectado e infectado posteriormente (G2, s1), com 88,2% dos moluscos infectados (tabela 20, anexo I e figura 2). Os moluscos que receberam hemolinfa livre de células de molusco sadio e que foram infectados posteriormente (G2, s2) tiveram um percentual menor de infecção (70,2%), tendo sido verificado que alguns moluscos que eliminavam cercárias deixaram posteriormente de fazê-lo, como já foi relatado, assim permanecendo até o final do experimento (tabela 21, anexo I e figura 2).

No grupo inoculado com suspensão de células a maior taxa de infectividade foi para o subgrupo que recebeu inóculo de molusco infectado e foi infectado posteriormente (G3, s1) com 84,6% dos moluscos infectados (tabela 33, anexo I e figura 2). Os moluscos que receberam suspensão de células de moluscos sadios e que foram infectados posteriormente (G3, s2) tiveram 66,6% de taxa de infecção (tabela 35, anexo I e figura 2).

O grupo controle (moluscos infectados apenas) teve uma taxa de infectividade maior (78,5%) quando comparado com o grupo inoculado com suspensão de células.

4.3.) Mortalidade

Os resultados da mortalidade dos moluscos durante 12 semanas de observação estão expressos nas tabelas de 2 a 37, anexo I, e figuras de 3 a 5. Os resultados da análise estatística encontram-se no anexo II.

A mortalidade foi mais alta no grupo inoculado com hemolinfa total, (em relação aos grupos inoculados com hemolinfa livre de células e com suspensão de células). Entre os grupos existe uma característica comum que é a maior mortalidade nos subgrupos 1 e 2 (que receberam inóculo e foram infectados) e menor mortalidade nos subgrupos 3 e 4 (que receberam inóculo e não foram expostos ao *S. mansoni*).

No grupo inoculado com hemolinfa total (G1) a mortalidade foi alta para os subgrupos 1 e 2 (inoculados com hemolinfa de molusco infectado e sadio e que foram infectados posteriormente), onde observamos as maiores taxas de mortalidade de todos os subgrupos: 100% dos moluscos mortos na 10^a e 11^a semanas, respectivamente (tabelas 11 e 12, anexo I, e figura 3). Neste grupo, as taxas de mortalidade dos demais subgrupos (3 e 4) foram muito mais baixas, apenas 20% e 28% dos moluscos morreram até o final do período de observação (tabelas 12 e 13, anexo I, e figura 3).

A mortalidade no grupo inoculado com hemolinfa livre de células (G2) foi grande para os subgrupos 1 e 2 (inoculados com hemolinfa proveniente de moluscos infectados e sadios e

que foram infectados posteriormente), sendo, respectivamente, de 88% e 86% até o final do período de observação (tabelas 24 e 25, anexo I, e figura 4). As mortalidades mais baixas foram as dos subgrupos 3 e 4 (inoculados com hemolinfa infectada ou sadia, porém não expostos posteriormente ao *S. mansoni*), com taxas de 12% e 22% até o final do período de observação (tabelas 24 e 25, anexo I, e figura 4).

No grupo inoculado com suspensão de células a mortalidade foi mais alta para os subgrupos 1 e 2, com 50% e 36% de moluscos mortos respectivamente até o final do período de observação (tabela 36 e 37, anexo I, e figura 5). As mortalidades mais baixas foram verificadas nos subgrupos 3 e 4, com 16% e 2% de moluscos mortos respectivamente até o final do experimento (tabela 36 e 37, anexo I, e figura 5).

Como já mencionado, a mortalidade foi mais alta para o grupo inoculado com hemolinfa total em relação aos grupos inoculados com hemolinfa livre de células e com suspensão de células. Os subgrupos 3 e 4 de todos os grupos apresentaram a característica comum de baixa mortalidade.

Os subgrupos 3 (que receberam inóculos de moluscos infectados) tiveram as menores taxas de mortalidade (em relação aos demais subgrupos) tanto para o grupo inoculado com hemolinfa total como para o grupo inoculado com hemolinfa livre de células. Já para o grupo inoculado com suspensão de células a taxa de mortalidade foi menor para o subgrupo 4 (inoculado com hemolinfa de molusco sadio).

Estas observações foram confirmadas pela análise estatística, que nos mostrou que o tipo do inóculo foi um fator importante na morte dos moluscos e revelou 3 grupos distintos significativamente ($p < 0.0001$): grande mortalidade em moluscos inoculados com hemolinfa total, independente de sua origem; mortalidade média em moluscos inoculados com hemolinfa sem células, também independentemente de sua origem; e baixa mortalidade para o grupo inoculado com suspensão de células.

4.4.) Mortalidade ao longo do tempo

Em moluscos inoculados com hemolinfa total a mortalidade foi alta desde a 2^a semana de observação para todos os subgrupos, exceto para o subgrupo 3 que, como já mencionado, teve uma taxa de mortalidade baixa (figura 3). Para os moluscos inoculados com hemolinfa livre de células a taxa de mortalidade foi alta (porém mais baixa do que a do grupo 1), e começou a se acentuar na 7^a semana (figura 4). A inoculação de suspensão de células resultou como já citado, na menor taxa de mortalidade entre os grupos e num retardamento da mortalidade, como no grupo 2 (figura 5).

Tabela 1 - Taxa de infecção de *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Grupos experimentais	Número total de moluscos infectados	Taxa de infecção
G1, s1	100	28
G1, s2	100	54
G2, s1	100	64
G2, s2	100	53
G3, s1	100	51
G3, s2	100	43
G4, s1	100	63

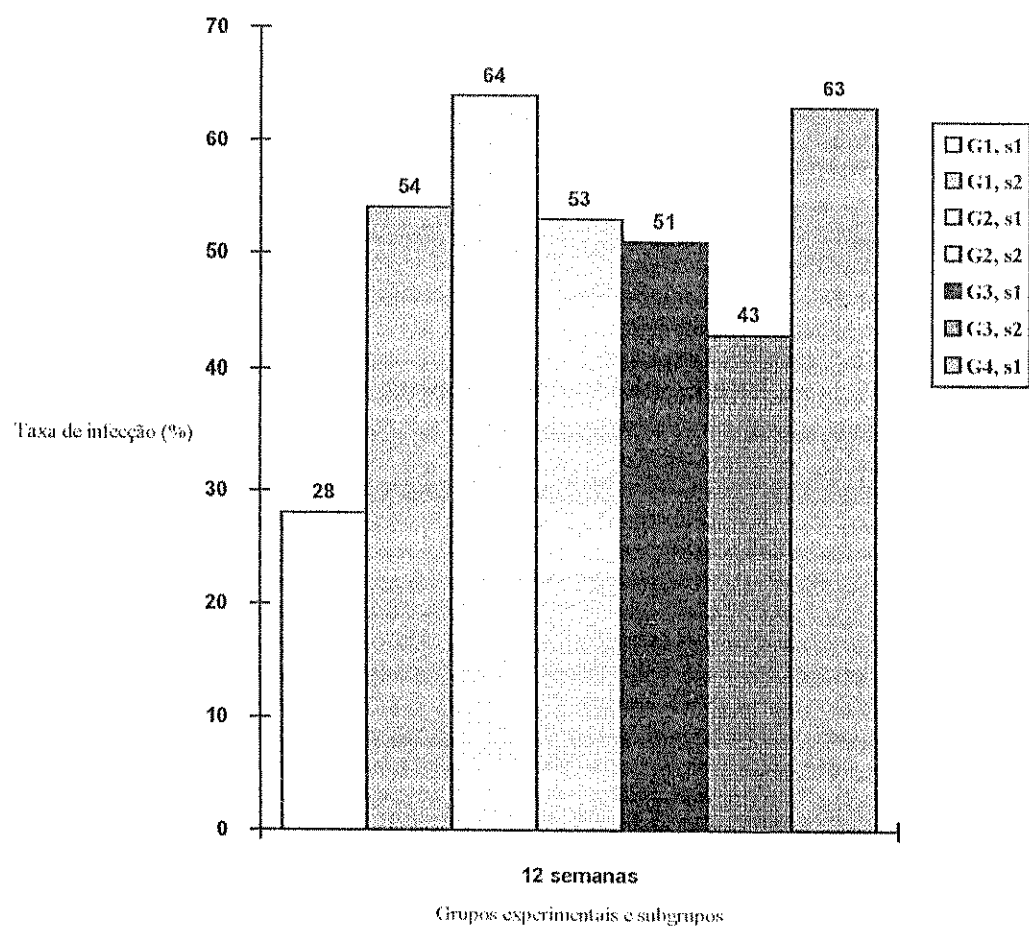


Figura 1 - Taxa de infecção cumulativa de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostos ao trematódeo. G4 s1 corresponde ao grupo controle infectado, que não recebeu inóculo (n=100).

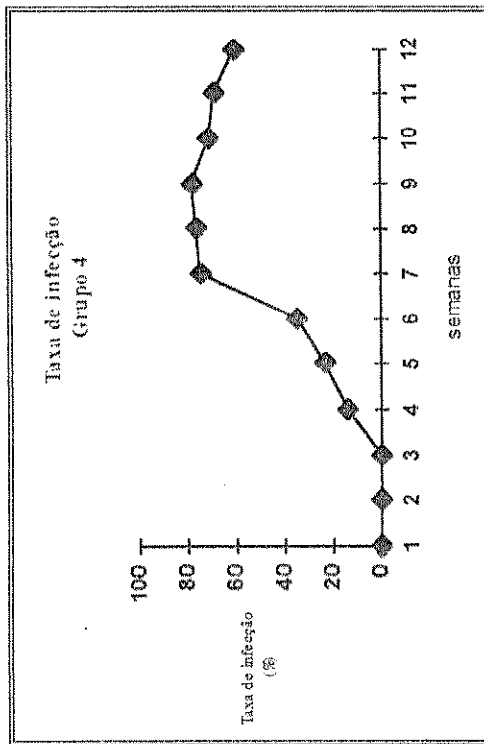
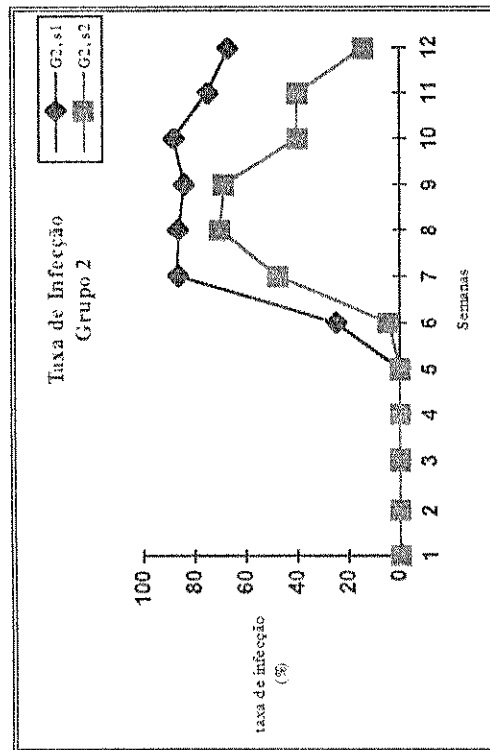
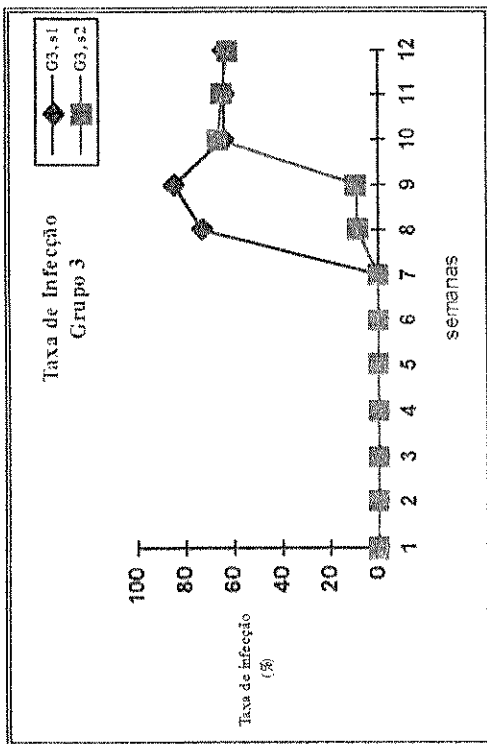
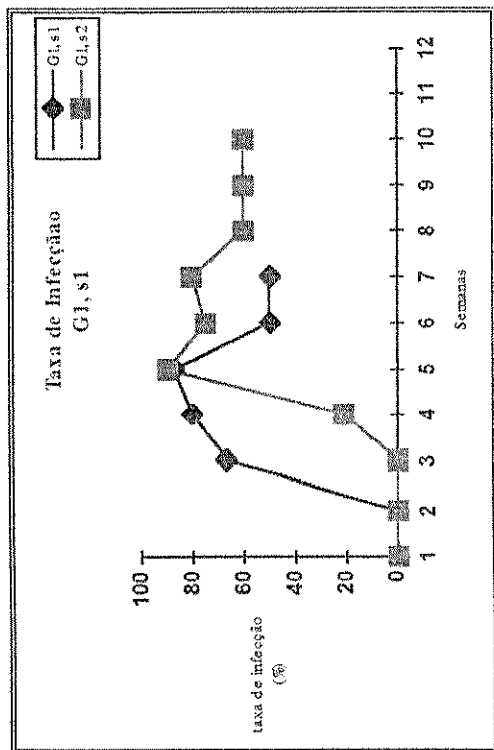


Figura 2 - Taxa de Infecção semanal de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de amebócitos (G3) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente infectados pelo trematódeo. G4 s1 corresponde ao grupo controle infectado, que não recebeu inóculo.

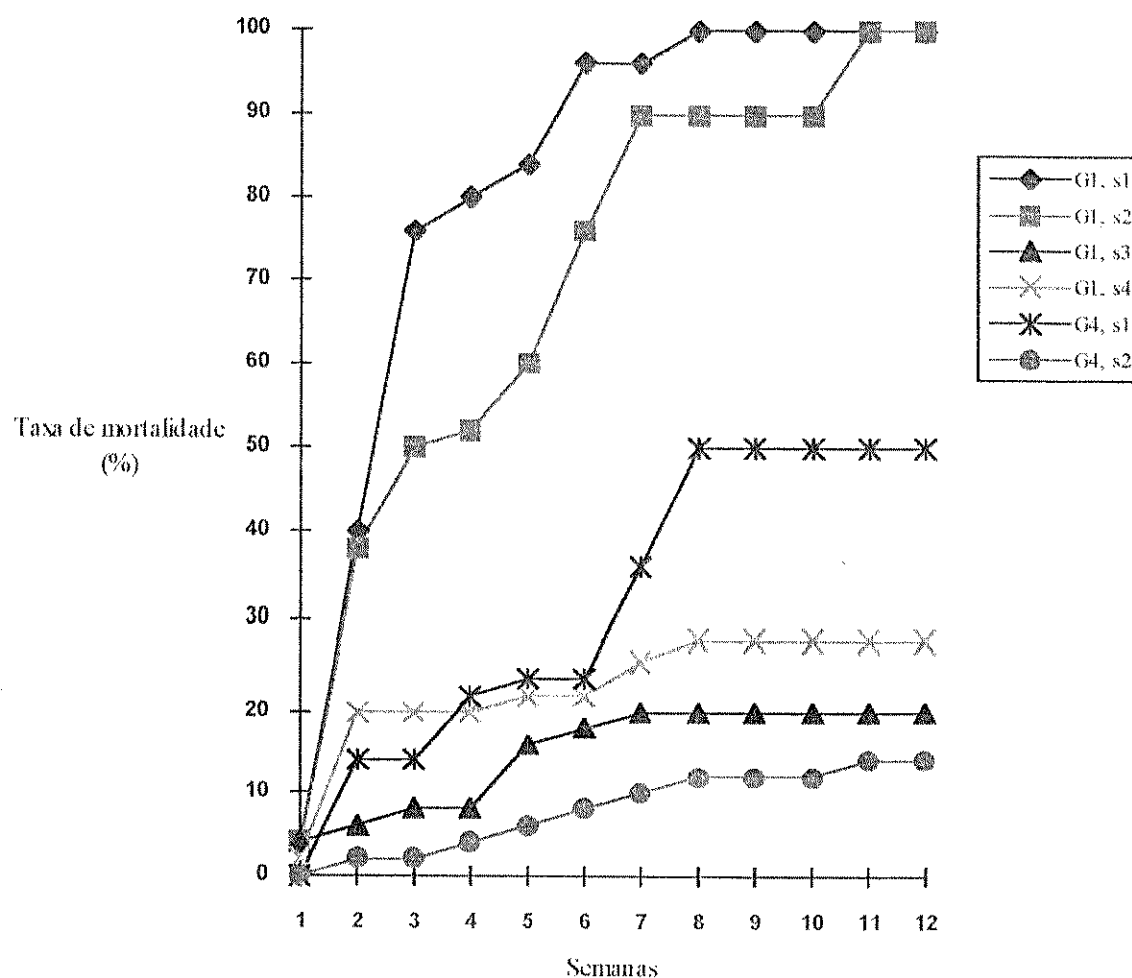


Figura 3 - Taxa de Mortalidade de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total (G1) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostos ou não ao trematódeo. G4 s1 corresponde ao grupo controle infectado e o G4 s2 ao grupo sadio (n=50).

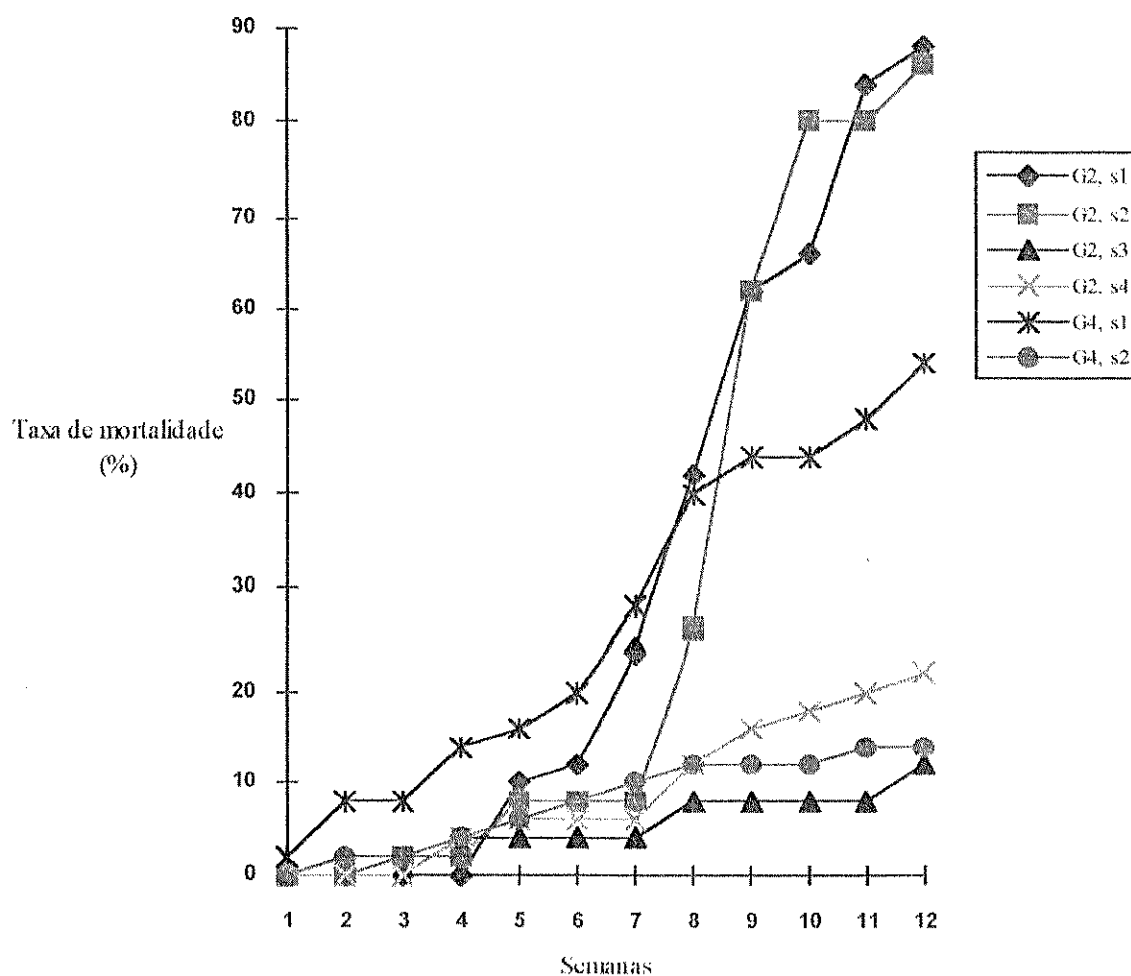


Figura 4 - Taxa de Mortalidade de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa livre de células (G2) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostos ou não ao trematódeo. G4 s1 corresponde ao grupo controle infectado e o G4 s2 ao grupo sadio (n=50).

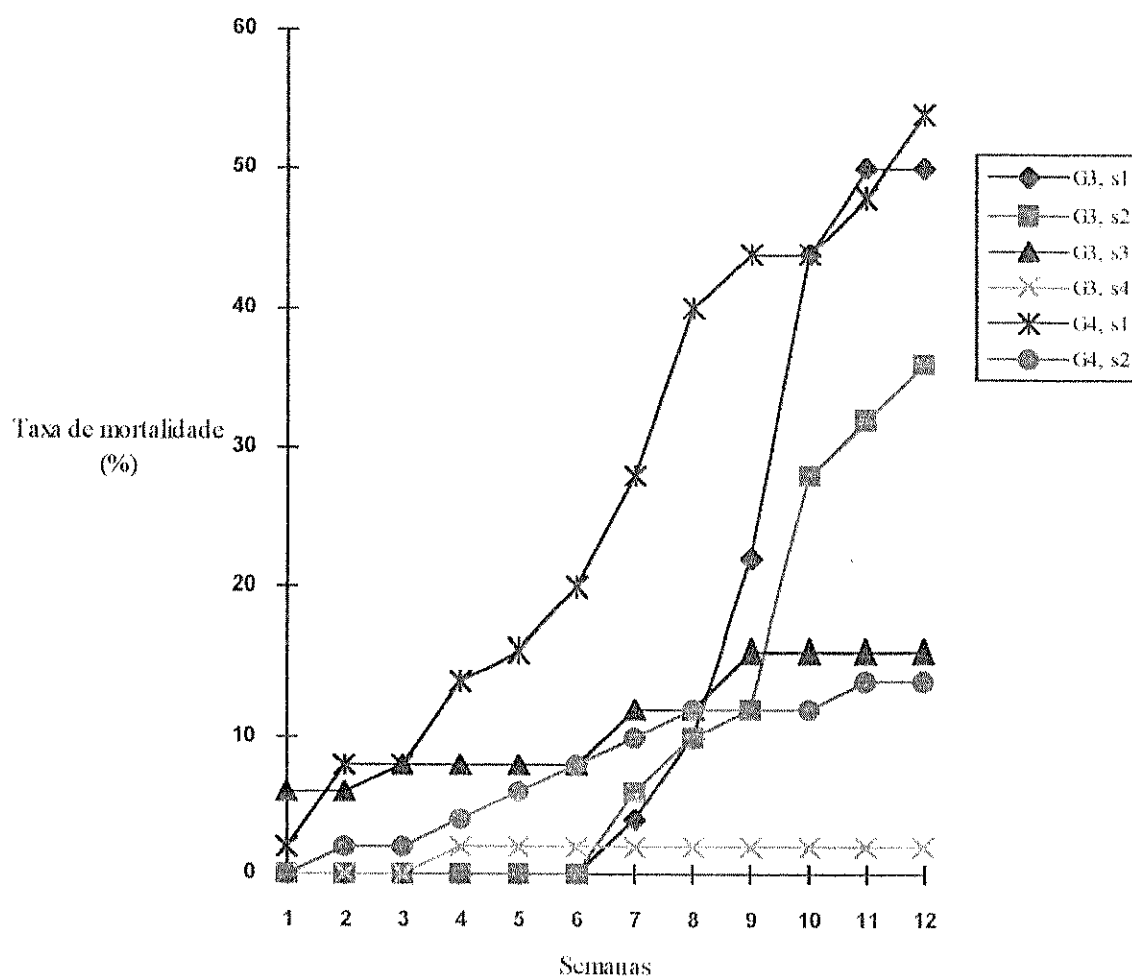


Figura 5 - Taxa de Mortalidade de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de amebócitos (G3) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente infectados ou não pelo trematódeo. G4 s1 corresponde ao grupo controle infectado e o G4 s2 ao grupo controle sadio (n=50).

4.5.) - Reação Tecidual nos moluscos *B. glabrata* inoculados com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células.

Os resultados referentes a viabilidade das larvas de *S.mansoni* nos tecidos de *B. glabrata* estão nas tabelas 38 a 40, anexo I e figuras 6 a 13

A análise estatística revelou que não houve nenhuma interação ou fator principal significativo, com exceção do período de observação. Não foi considerado significativo o número de esporocistos degenerados às 72 horas (figura 7).

Os grupos que apresentaram diferença significativa no número de esporocistos íntegros foram os inoculados com suspensão de células e o grupo controle (moluscos apenas infectados). O grupo inoculado com suspensão de células de molusco infectado (G3 s1) teve uma maior quantidade de esporocistos íntegros às 12 horas em relação aos demais horários de observação (tabela 40, anexo I e figura 6), enquanto o subgrupo 2 (inoculado com suspensão de células de molusco sadio) do mesmo grupo (G3 s2) teve dois horários em que as quantidades de esporocitos eram significativamente diferentes dos outros horários (12 e 24 horas; figura 6). O grupo controle (G4, s1) apresentou uma quantidade significativamente maior de larvas íntegras aos 30 minutos de infecção (tabela 38, anexo I, e figura 6).

Em moluscos inoculados com suspensão de células (figuras 8 e 9) e com hemolinfa livre de células (figuras 10

e 11) verificamos maior reação amebocitária em torno das larvas de *S. mansoni*, enquanto em moluscos inoculados com hemolinfa total (figuras 12 e 13) as reações em torno das larvas foram discretas.

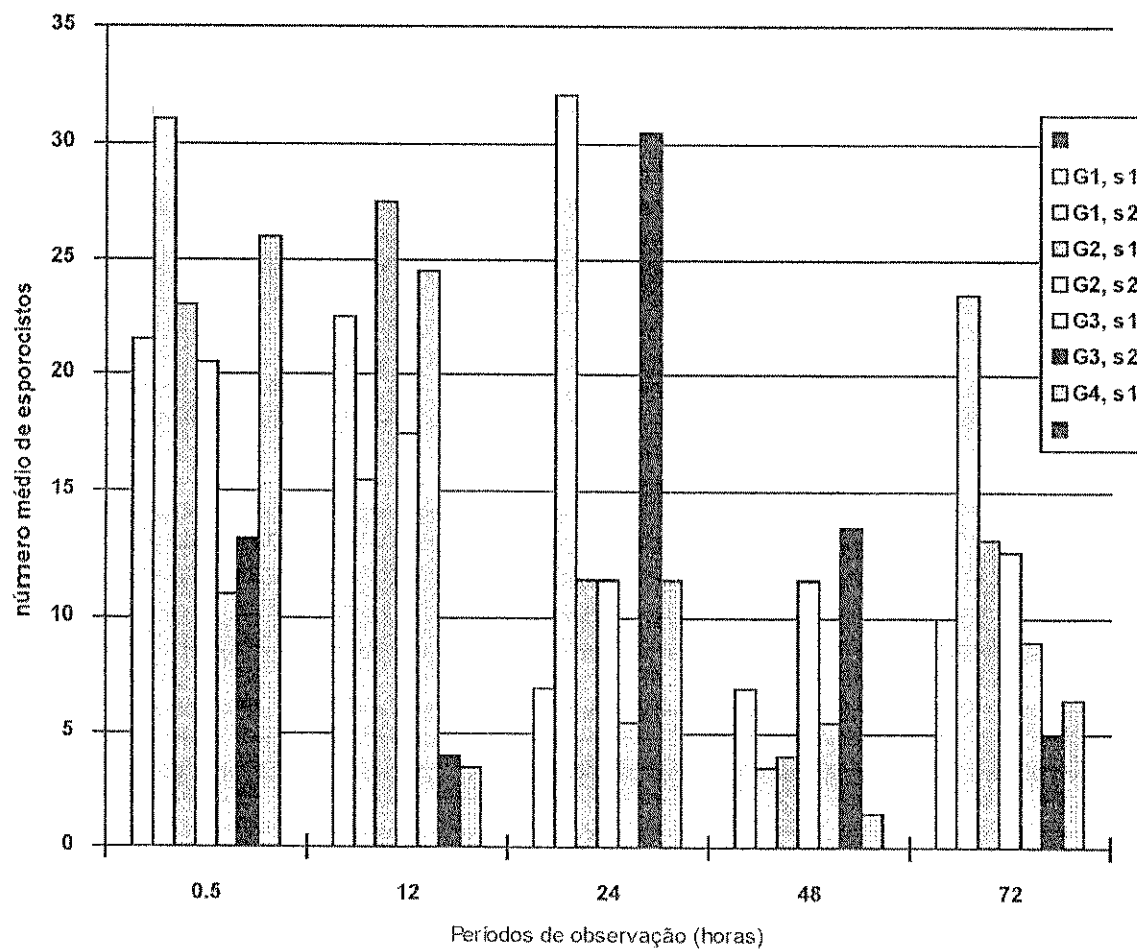


Figura 6 - Número médio de larvas integras de *S. mansoni* observadas em *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente infectadas com 100 miracídios.

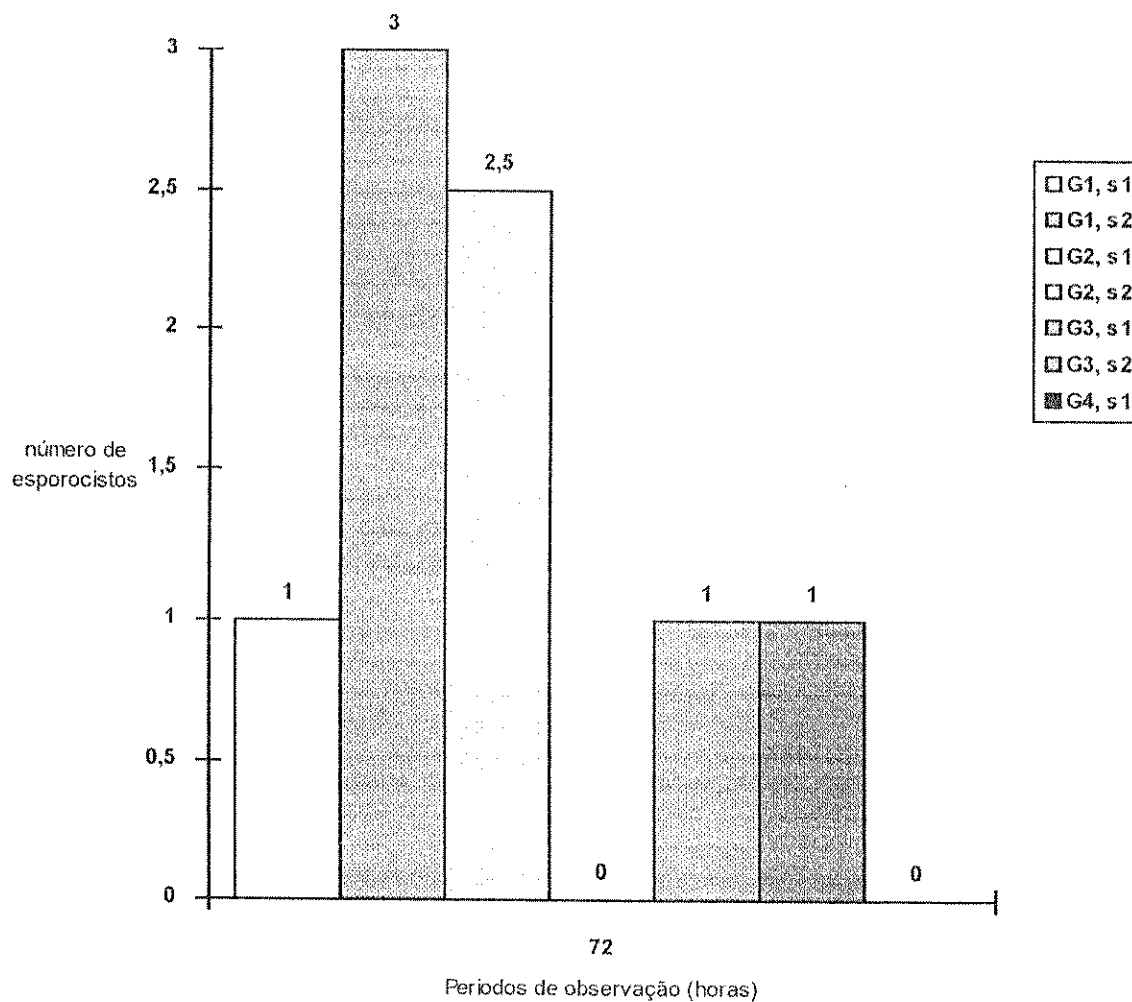


Figura 7 - Número médio de larvas degeneradas de *S. mansoni* observadas em *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total (G1), hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e infectados por 100 miracídeos.

Figura 8. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com suspensão de células oriundas de molusco infectado após 12 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se 3 larvas íntegras do parasita.
(X 370)

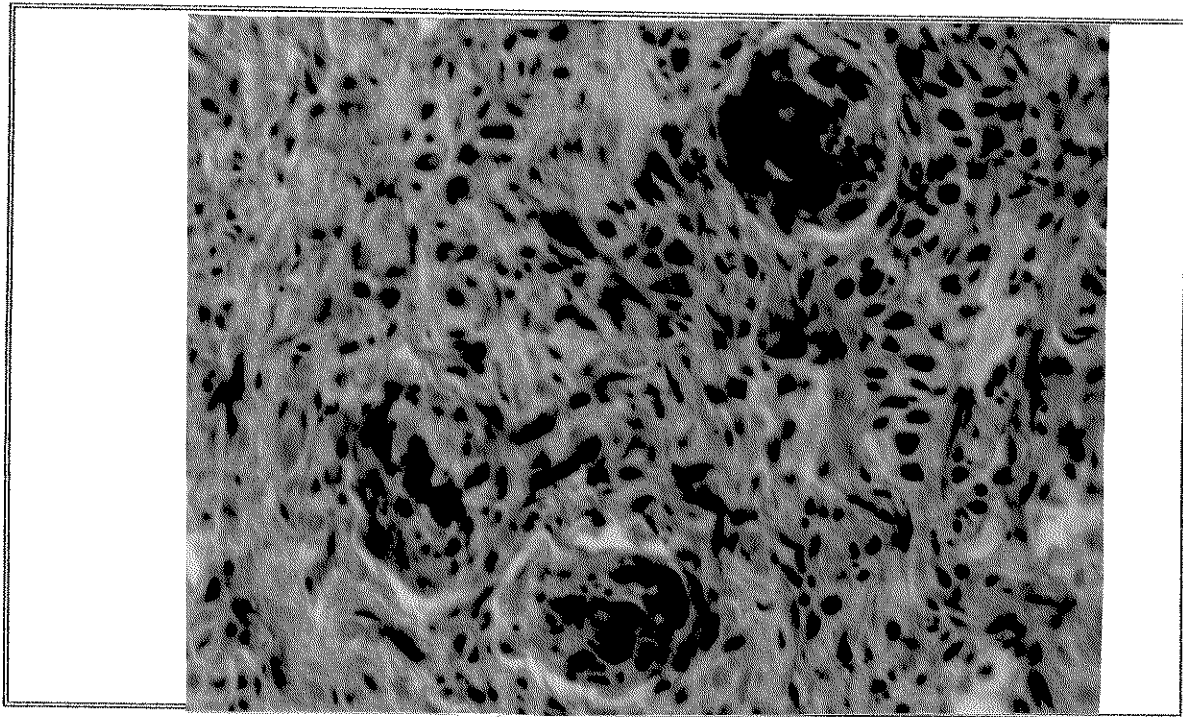


Figura 9. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com suspensão de células oriundas de molusco sadio após 24 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se a presença de 1 esporocisto em degeneração.
(X 370)

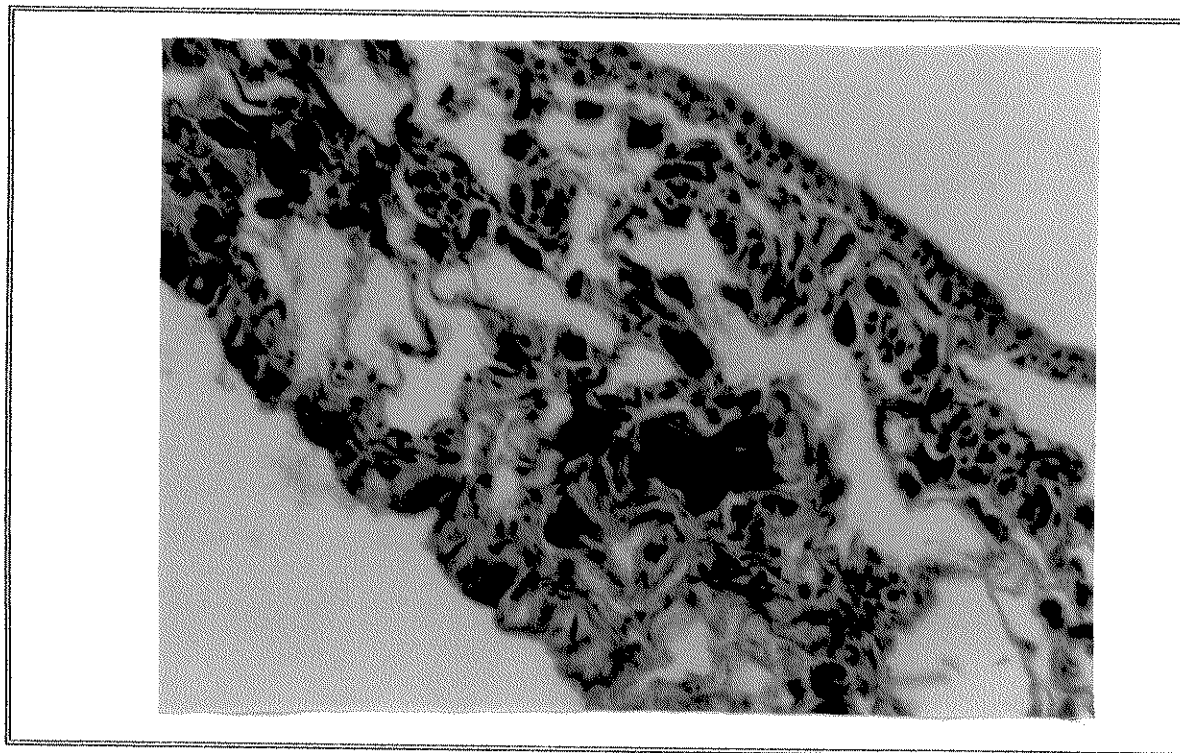


Figura 10. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com hemolinfa livre de células oriundas de molusco sadio após 30 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se reação em torno da larva.
(X 370)

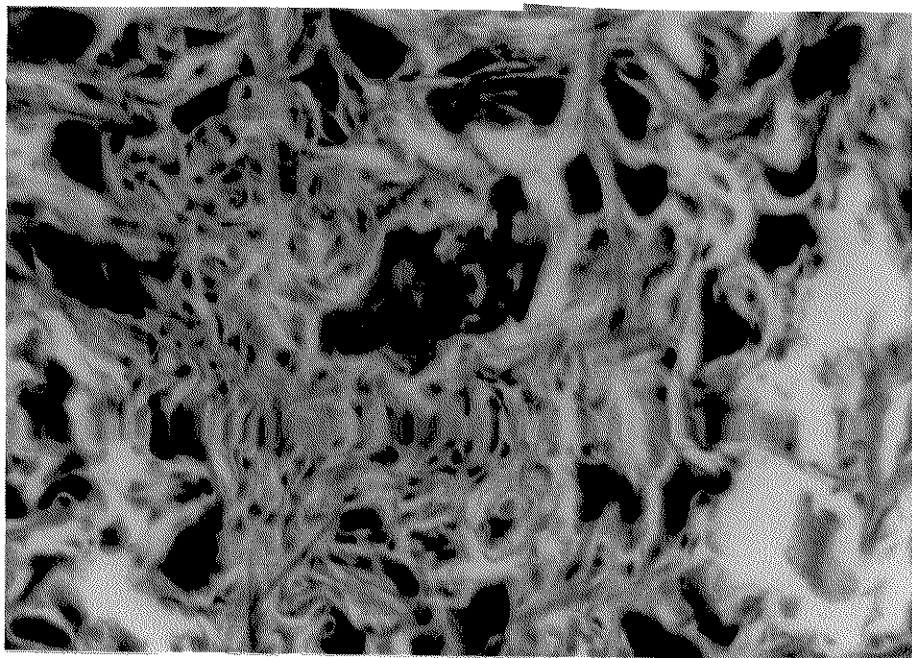


Figura 11. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com hemolinfa livre de células oriundas de molusco sadio após 12 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se reação em torno da larva.
(X 340)

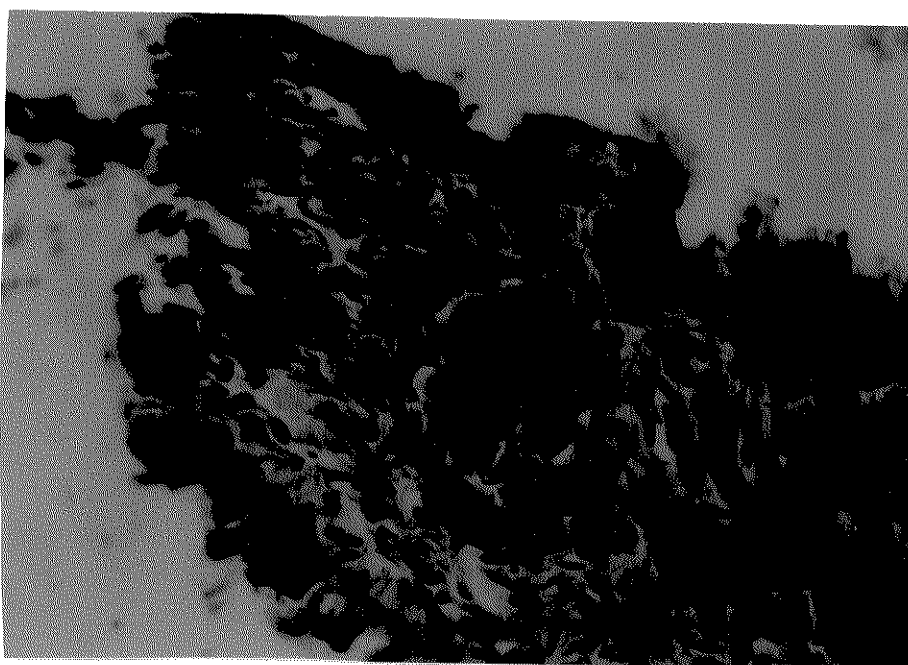


Figura 12. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com hemolinfa total oriundas de molusco infectado após 24 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se reação discreta torno da larva.
(X 340)

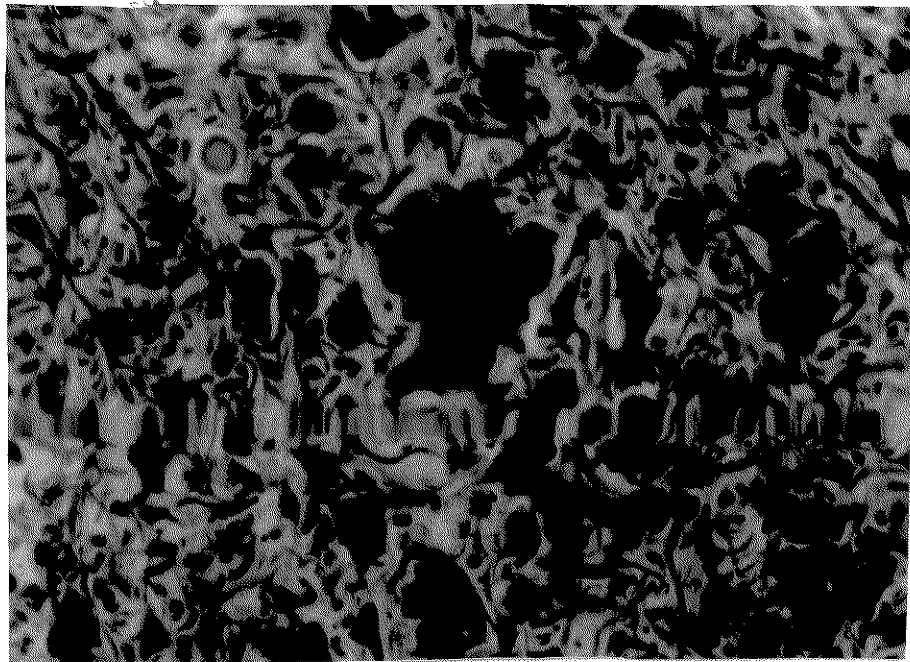
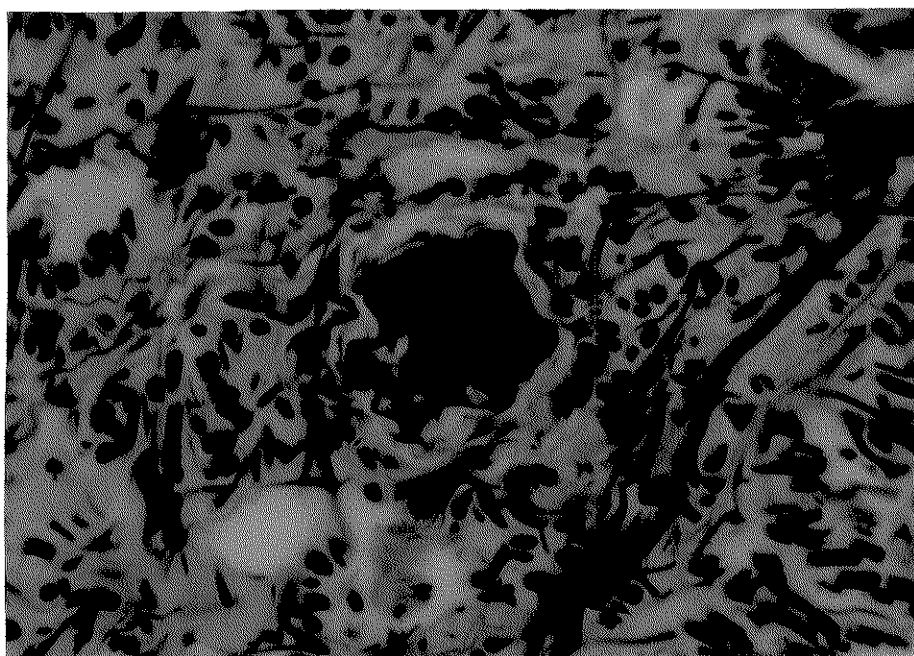


Figura 13. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* inoculada com hemolinfa total oriundas de molusco sadio após 12 horas de infecção por *S. mansoni*. Observa-se discreta reação em torno da larva.
(X 340)



4.6.) - Avaliação da atividade de fagocitose em moluscos *Biomphalaria glabrata* melânica inoculados com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células

Os resultados referentes à atividade fagocitária dos amebócitos frente a hemáceas de carneiro estão apresentados nas tabelas 41 a 53, anexo I e figuras 14 a 21.

A análise estatística dos dados apontou o fator tipo de inóculo (hemolinfa) como significativo ($p = 0,08\%$). Os outros fatores (origem da hemolinfa e infecção) e todas as interações não foram significativas ($p = 19.5\%$). No grupo inoculado com suspensão de células, o índice fagocitário foi significativamente maior que nos demais grupos.

Em moluscos inoculados com hemolinfa total de moluscos infectados e não expostos ao *S. mansoni* (G1 s3) observamos um alto índice de fagocitose em relação aos demais subgrupos aos 30 minutos e 12 horas (tabela 43 anexo I e figura 14). Após este período diminuiu progressivamente a atividade fagocitária. Os grupos inoculados com hemolinfa total (proveniente de moluscos infectados e sadios) e expostos ao *S. mansoni* (G1, s1 e G1, s2) apresentaram índices menores aos 30 minutos e 12 horas, porém em relação ao grupo controle (moluscos infectados) o índice foi mais elevado (tabela 41 e 42, anexo I e figura 14).

Nos moluscos inoculados com hemolinfa sem células procedente de moluscos sadios (G2 s1) o índice de fagocitose aos 30 minutos foi alto, caindo às 12 horas e voltando a

crescer até 72 horas (tabela 45, anexo I e figura 15). O grupo inoculado com hemolinfa proveniente de molusco sadio e infectado posteriormente (G2 s2) apresentou um alto índice de fagocitose aos 30 minutos e 48 horas (tabela 46, anexo I e figura 15).

No grupo G2,s4 (inoculado com hemolinfa sem células de molusco sadio) observou-se uma alta taxa de fagocitose aos 30 minutos, comparativamente aos demais subgrupos (tabela 46, anexo I e figura 15).

A atividade fagocitária no grupo inoculado com suspensão de amebócitos foi alta em todos os horários estudados (tabelas 49 a 52, anexo I e figura 16). Quando comparamos o grupo controle (G4 s1), onde os moluscos foram apenas infectados, com o grupo que foi inoculado com suspensão de células, verificamos que a atividade fagocitária foi mais baixa para o grupo controle em todos os horários observados (tabela 53, anexo, I). Os moluscos que foram inoculados com suspensão de células provenientes de moluscos infectados e que foram infectados posteriormente (G3 s1) tiveram dois horários de pico da atividade fagocitária, aos 30 minutos e às 24 horas (tabela 49, anexo I e figura 16). Este subgrupo teve índice significativamente maior de fagocitose, tanto em relação aos demais subgrupos deste grupo como em relação aos outros dois grupos. Os subgrupos que foram somente inoculados com suspensão de amebócitos (G3 s3 e G3 s4) e o grupo controle (G4 s1 apenas infectado) tiveram em todos os períodos observados uma taxa

de fagocitose menor em relação aos subgrupos 1 e 2 do grupo 3 (tabelas 51 e 52, anexo I e figura 16).

Foi feita a análise estatística para verificar as diferenças dos índices de fagocitose entre os horários estudados resultando em uma função linear com uma tendência crescente para o grupo inoculado com suspensão de células de molusco sadio (G3, s4); uma tendência decrescente para o grupo inoculado com hemolinfa total de molusco infectado (G1, s3) e uma parábola para o grupo inoculado com hemolinfa total de molusco sadio e infectado posteriormente (G1, s2). Os níveis de significância para o teste foram de 5%. Para os demais grupos não houve evidência estatística do "efeito hora" (anexo II).

As microfotografias (figuras 17 a 23) da atividade fagocitária dos amebócitos mostram aspectos que merecem registro. A fagocitose dos eritrócitos pode ocorrer pela expansão múltipla de pseudópodes em várias direções (figura 17). Em outras ocasiões a atividade fagocitária se processa com os amebócitos formando uma rede (figura 18 a 20). Amebócitos multinucleados foram frequentes e em alguns outros aspectos lembravam células gigantes (figura 21).

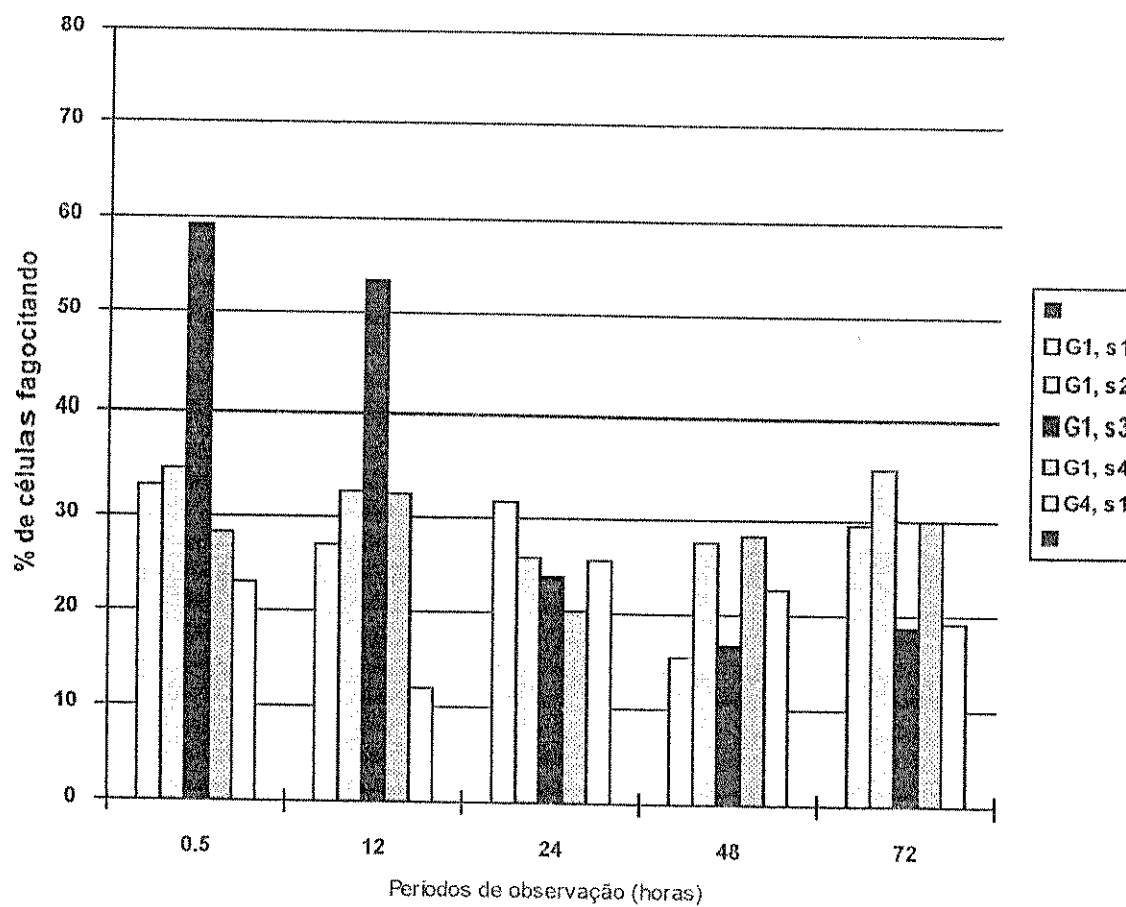


Figura 14 - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de moluscos infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

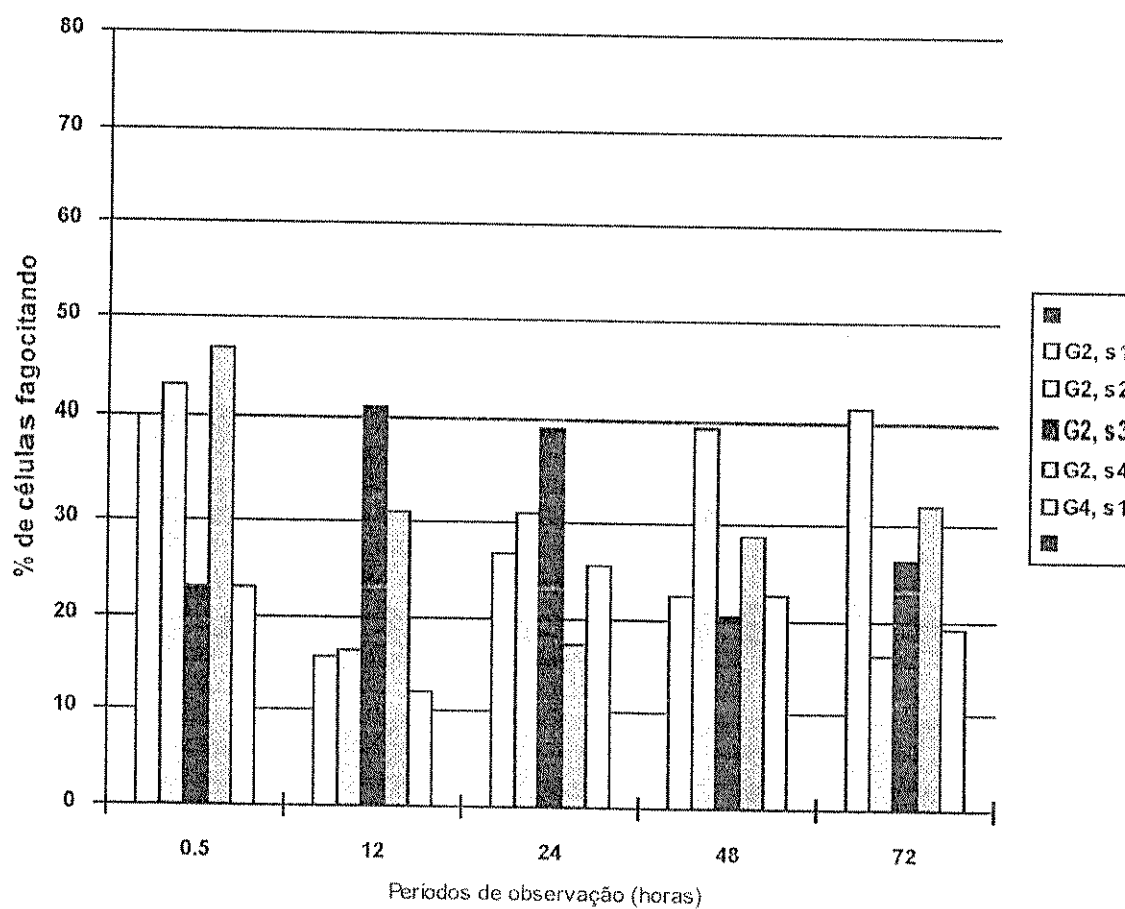


Figura 15 - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de moluscos infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

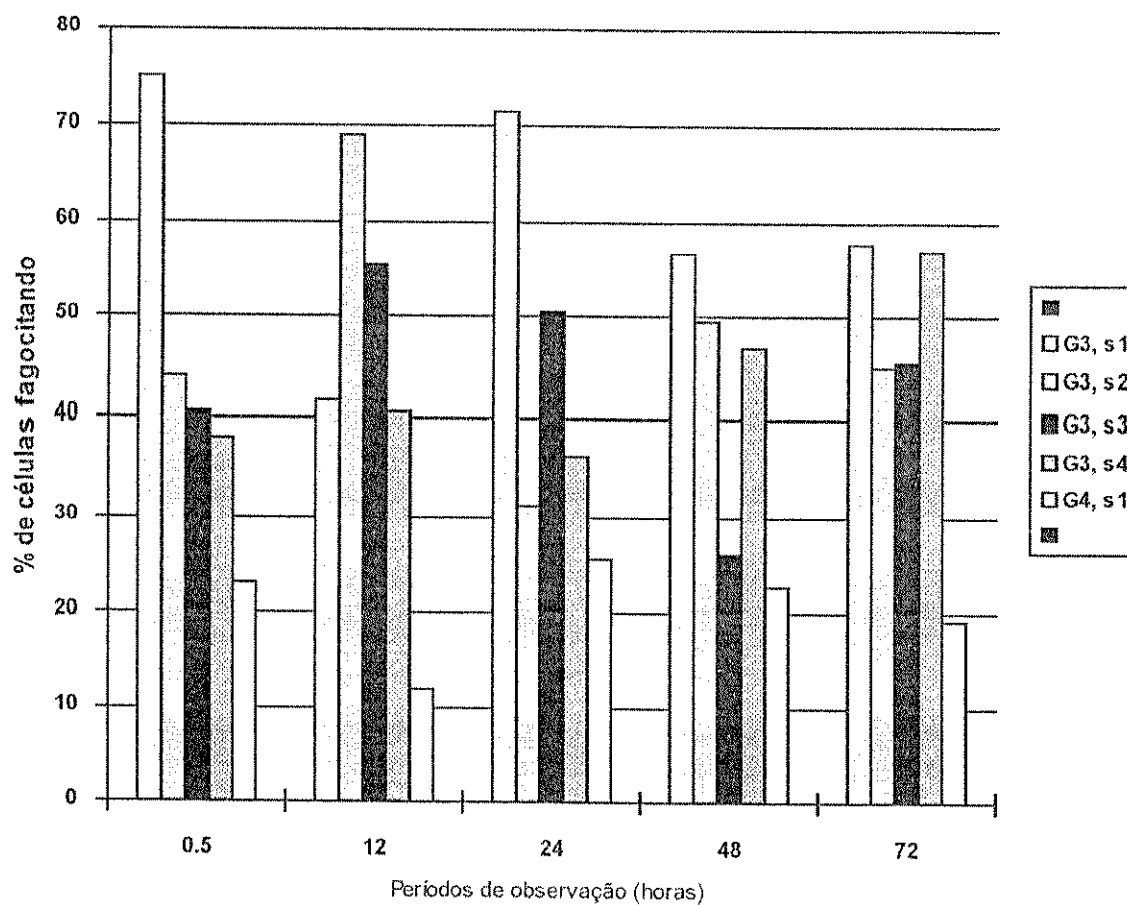


Figura 16 - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de amebócitos de moluscos infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

Figura 17. Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de *Biomphalaria glabrata* do grupo G1 (inoculados com hemolinfa total e infectado por *S. mansoni* posteriormente) fagocitando eritrócitos de carneiro (X 340).

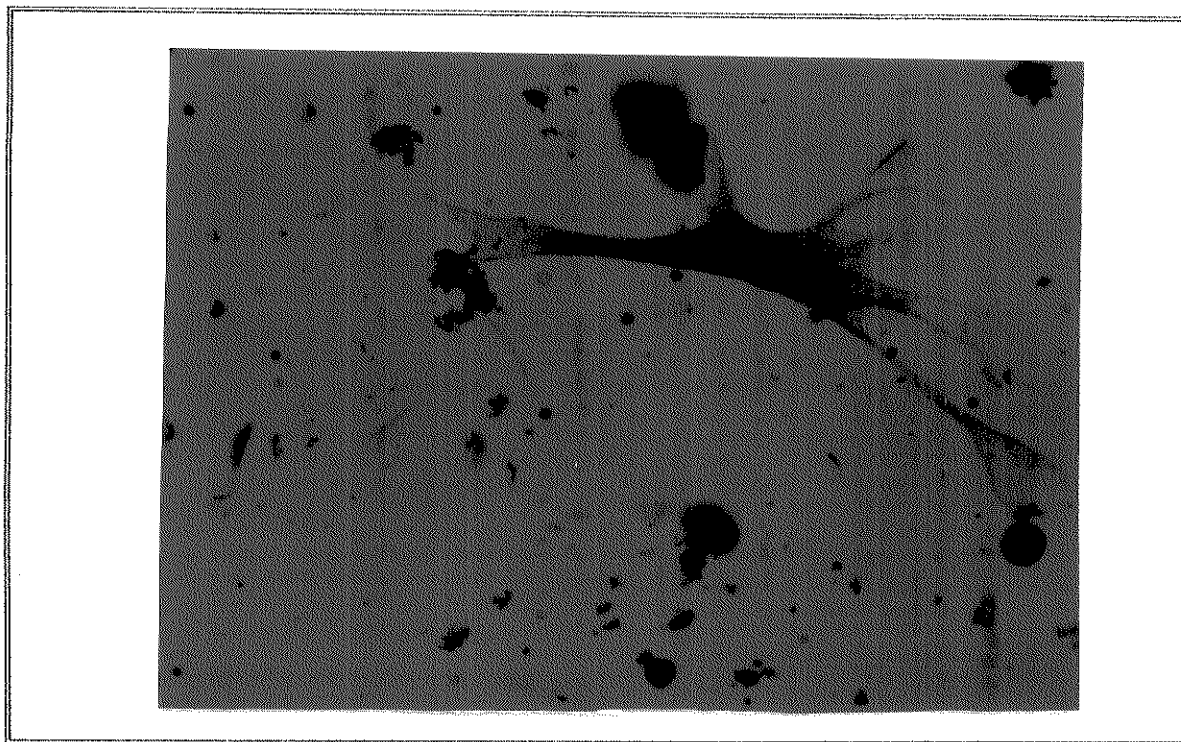


Figura 18. Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de *Biomphalaria glabrata* do grupo G2 (inoculados com hemolinfa sem células e infectado por *S. mansoni* posteriormente) fagocitando eritrócitos de carneiro (X 340).

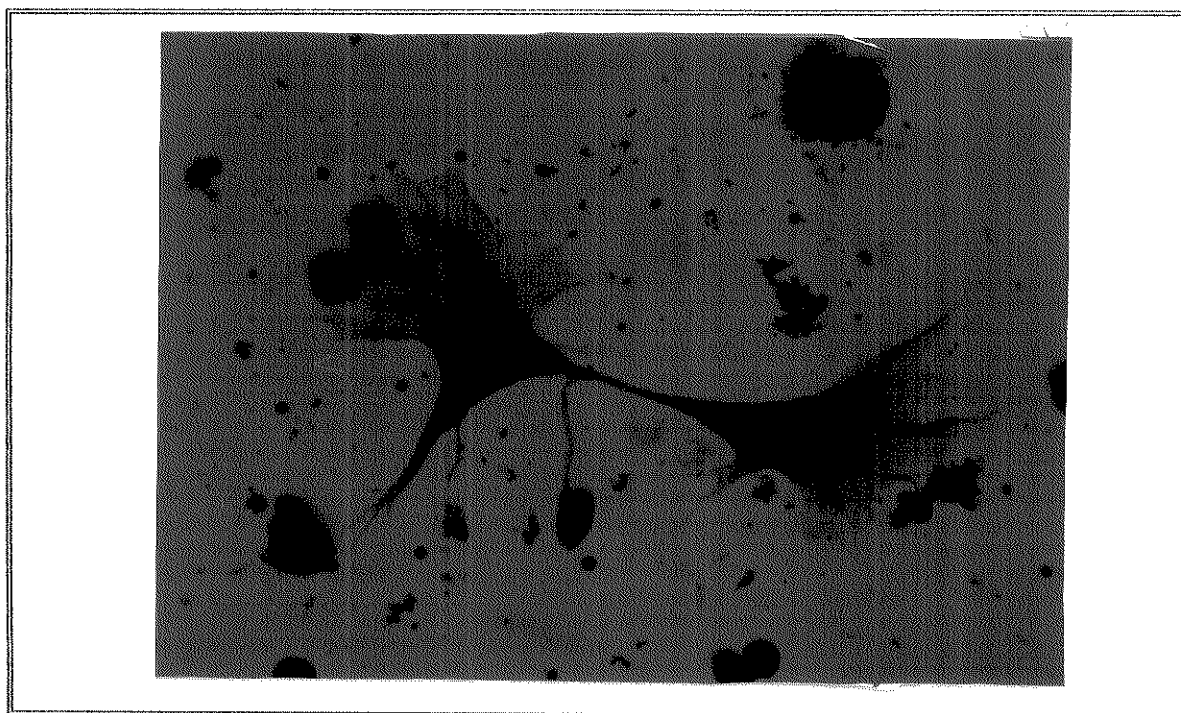


Figura 19. Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de *Biomphalaria glabrata* do grupo G2 (inoculados com hemolinfa sem células e infectado por *S. mansoni* posteriormente) fagocitando eritrócitos de carneiro (X 340).

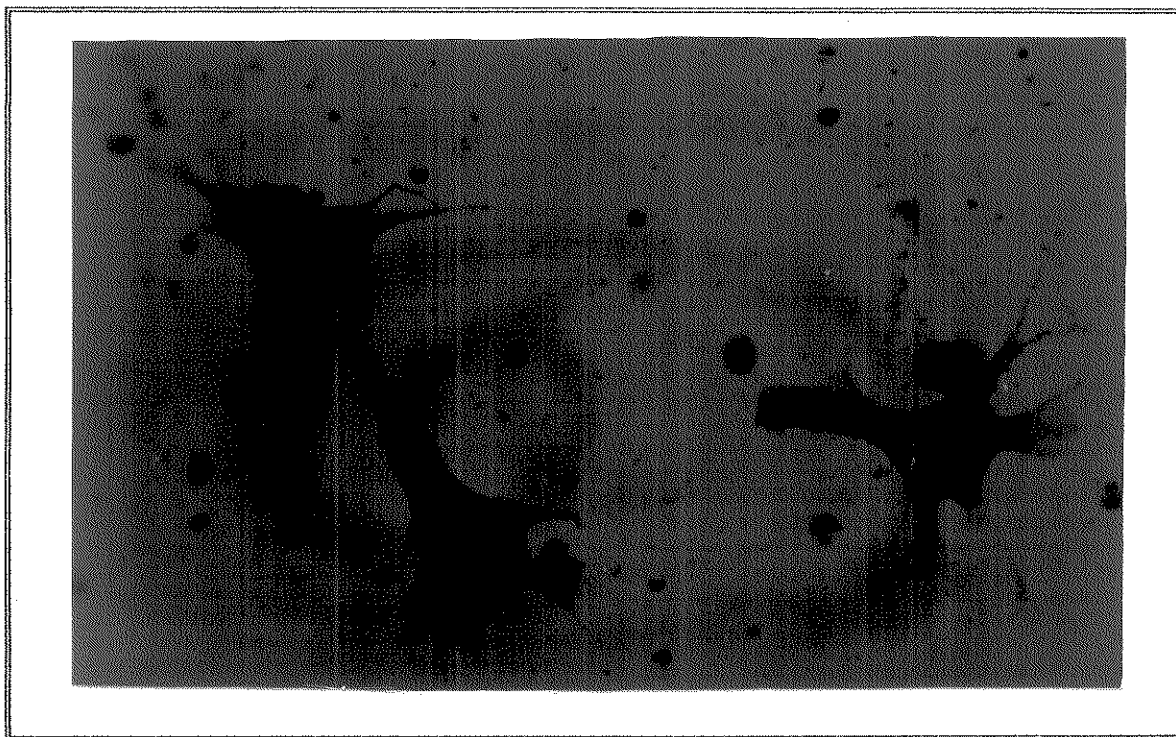


Figura 20. Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de *Biomphalaria glabrata* do grupo G3 (inoculados com suspensão de células e infectado por *S. mansoni* posteriormente) fagocitando eritrócitos de carneiro (X 340).

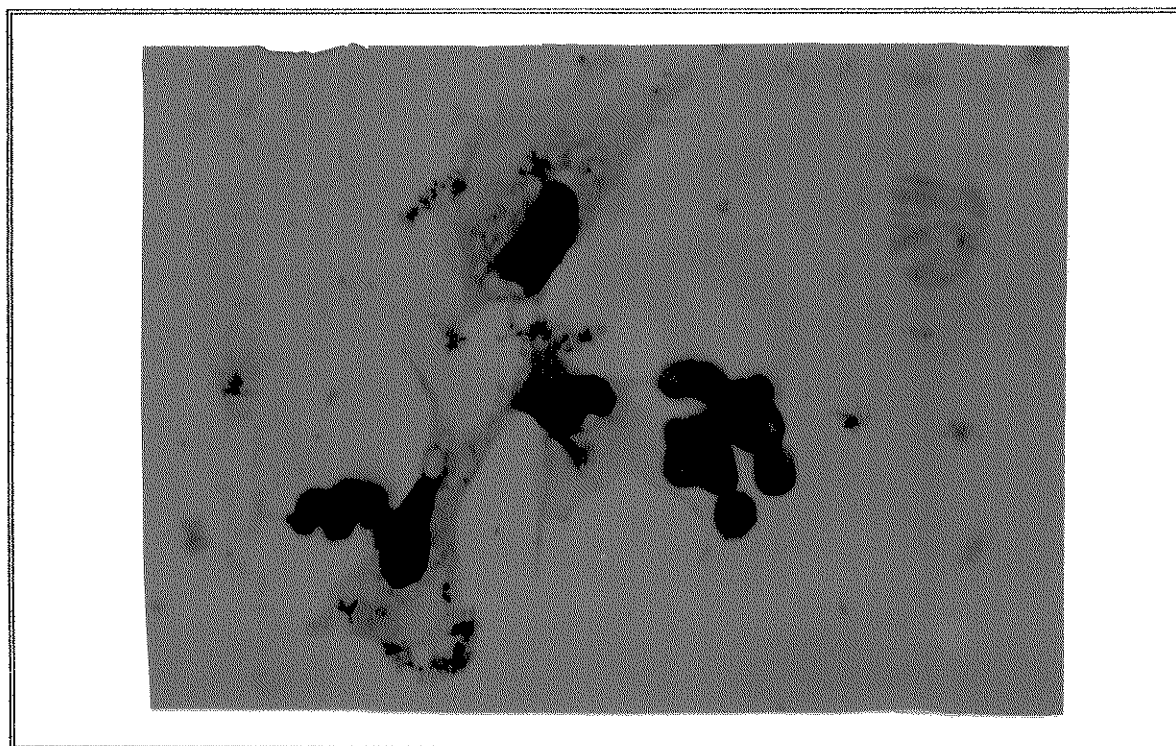
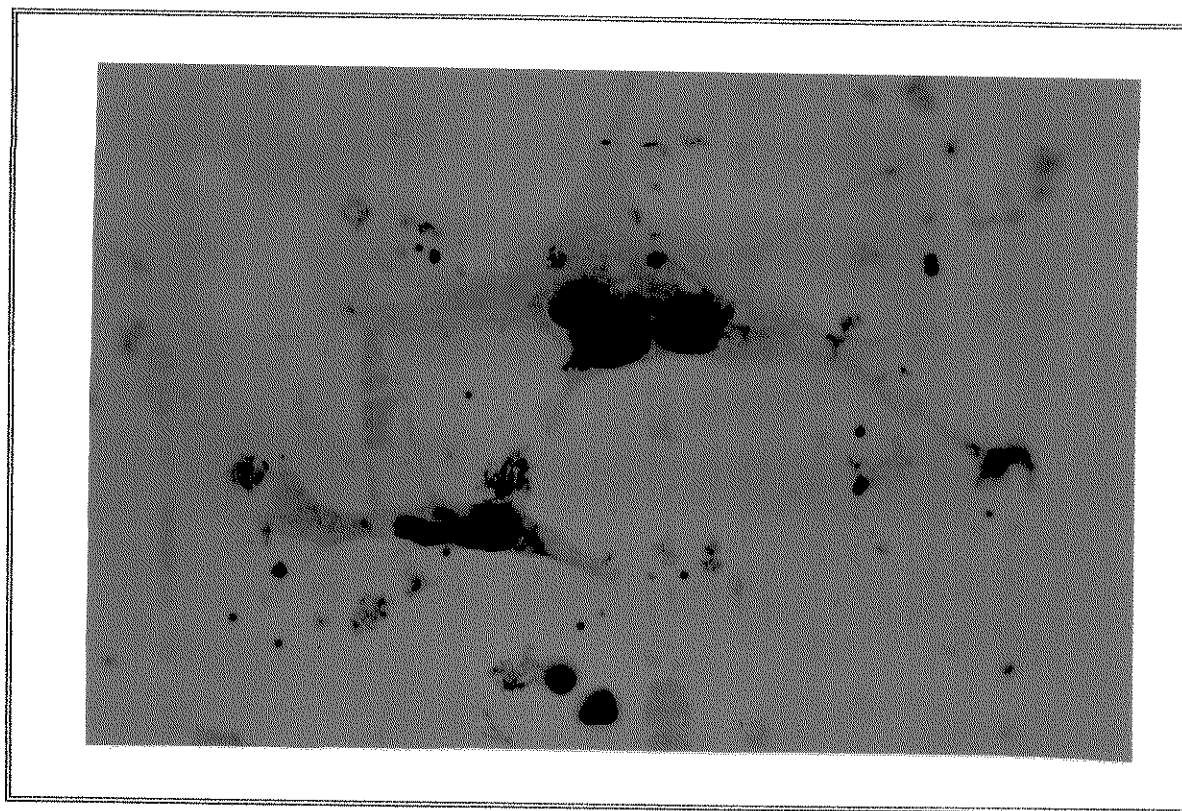


Figura 21. Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de *Biomphalaria glabrata* do grupo G3 (inoculados com suspensão de células e infectado por *S. mansoni* posteriormente) apresentando 3 núcleos (X 340)



4.7.) - Avaliação do número de amebócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*.

Nas tabelas 54 a 59, anexo I e figuras 22 a 34 estão apresentados os dados do número de amebócitos na hemolinfa dos moluscos.

A quantidade de amebócitos estrelados (granulócitos) foi significativamente superior em relação aos não estrelados (hialinócitos) em todos os grupos estudados, exceto em alguns poucos períodos. Nestes, a diferença não foi considerada significativa pela análise estatística (anexo II).

O grupo inoculado com hemolinfa total apresentou uma quantidade de células estreladas menor do que os outros dois grupos inoculados (tabela 54 a 55, anexo I e figuras 22 a 25).

No grupo inoculado com hemolinfa total de molusco infectado e exposto posteriormente ao *S. mansoni* (G1, s1), observamos um grande número de células estreladas às 24 horas (tabela 55, anexo I e figura 22).

No subgrupo 2, os dois tipos de células apresentaram-se em grande número às 2 horas depois da exposição ao *S. mansoni*. Às 24 horas as células estreladas elevaram-se em um pico ainda maior, (mas não foi considerada significativa a diferença dos 2 picos), enquanto as não estreladas permaneceram sem grandes alterações até o final do período

de observação (tabela 55, anexo I e figura 23).

No subgrupo 3 observou-se elevação acentuada no número de amebócitos estrelados aos 30 minutos, 10 horas e 24 horas após exposição ao parasita. Estes picos foram significativamente diferentes dos demais horários observados neste subgrupo, mas não são significativamente diferentes entre si. As células não estreladas estiveram em menor número em todo o período observado (tabela 55, anexo I e figura 24). No subgrupo 4 o número de células estreladas foi grande no início do período de observação de 30 minutos, 2 e 4 horas. O pico máximo foi às 4 horas, mas não diferiu significativamente em relação aos dados de 30 minutos e 2 horas, mas foi significativamente diferente dos demais horários deste subgrupo (tabela 55, anexo I e figura 25).

As células estreladas no subgrupo 4 apresentaram-se em pequeno número. Dentre todos os subgrupos do grupo 1 apenas no subgrupo 4 não houve uma elevação no número de células estreladas às 24 horas (figura 25).

A quantidade de amebócitos na hemolinfa circulante de moluscos inoculados com hemolinfa livre de células foi significativamente maior em relação ao grupo inoculado com hemolinfa total (tabelas 56 a 57, anexo I e figuras 26 a 29).

No subgrupo 1 do grupo 2 foi verificada a ocorrência de 2 elevações no número de células estreladas, às 4 horas e às 6 horas, mas não foi considerada significativa a diferença

entre as elevações. Após este período houve uma queda na quantidade das células circulantes, que voltou a subir às 12 horas. A elevação do número de células às 12 horas foi significativamente inferior em relação ao pico que ocorreu entre 4 e 6 horas (tabela 57, anexo I e figura 26). O subgrupo 2 do grupo 2 apresentou várias oscilações na quantidade de células estreladas, mas elas não foram consideradas significativas (tabela 57, anexo I e figura 27).

No subgrupo 3 do mesmo grupo 2, os amebócitos estrelados apresentaram 2 picos, aos 30 minutos e 6 horas. Estas elevações não foram consideradas diferentes entre si, mas foram significativamente diferentes dos demais horários (tabela 57, anexo, I e figura 28). O número de células no subgrupo 4 do grupo 2 foi elevado para as células estreladas no início do período de contagem, aos 30 minutos, mas o pico máximo foi verificado às 12 horas pós infecção ao *S.mansoni*. As elevações do número de células, que aconteceram aos 30 minutos e às 12 horas, não foram significativamente diferentes entre si, mas foram diferentes dos demais horários observados (tabela 57, anexo I e figura 29).

A quantidade de amebócitos estrelados na hemolinfa circulante de moluscos inoculados com suspensão de células foi maior em relação aos outros 2 grupos, mas diferiu significativamente apenas do grupo inoculado com hemolinfa total.

As células do tipo estrelado estiveram presentes na

hemolinfa circulante em maior número em relação ao tipo não estrelado em todos os subgrupos do grupo 3 (tabelas 58 a 59, anexo I e figuras 30 a 33).

Os moluscos que foram inoculados com suspensão de amebócitos de molusco infectado e posteriormente infectados (G3, s1) apresentaram um pico no número de células às 4 e 12 horas. Os valores observados não diferiram significativamente entre si. As células estreladas permaneceram sem grandes oscilações em todo o período observado neste subgrupo (tabela 59, anexo I e figura 30). O subgrupo 2 do grupo 3 (inoculado com suspensão de células de molusco sadio e infectado posteriormente) teve um grande aumento de células às 6 horas e um aumento um pouco menor às 48 horas de observação. Estes dois picos não foram considerados significativamente diferentes entre si, mas foram diferentes dos demais horários de contagem (tabela 59, anexo I e figura 31). No subgrupo 3 do grupo inoculado com suspensão de células (de molusco infectado) observou-se um aumento no número de células no período de 30 minutos a 4 horas e depois verificou-se uma queda no número de células que voltou a elevar-se um pouco às 24 horas. A quantidade de células presentes na hemolinfa entre 30 minutos e 4 horas foi significativamente diferente dos demais horários neste subgrupo (tabela 59, anexo e figura 32). O subgrupo 4 do grupo 3 apresentou um maior número médio de células estreladas às 12 horas entre todos os subgrupos dos demais grupos (tabela 59, anexo I e figura 33).

O grupo controle (moluscos apenas infectados) G4, s1 apresentou uma quantidade de células estreladas menor em comparação com o grupo inoculado com suspensão de células, mas mostrou uma quantidade maior de células estreladas em comparação com o grupo inoculado com hemolinfa livre de células e hemolinfa total (figura 34).

A análise estatística mostrou que o tipo de inóculo foi o fator significativo. O nível de significância do teste foi inferior a 1%. Com relação aos horários de pico não existiu um único valor que se destacasse, mas sim um conjunto de tempos que podem representar estes picos (anexo II).

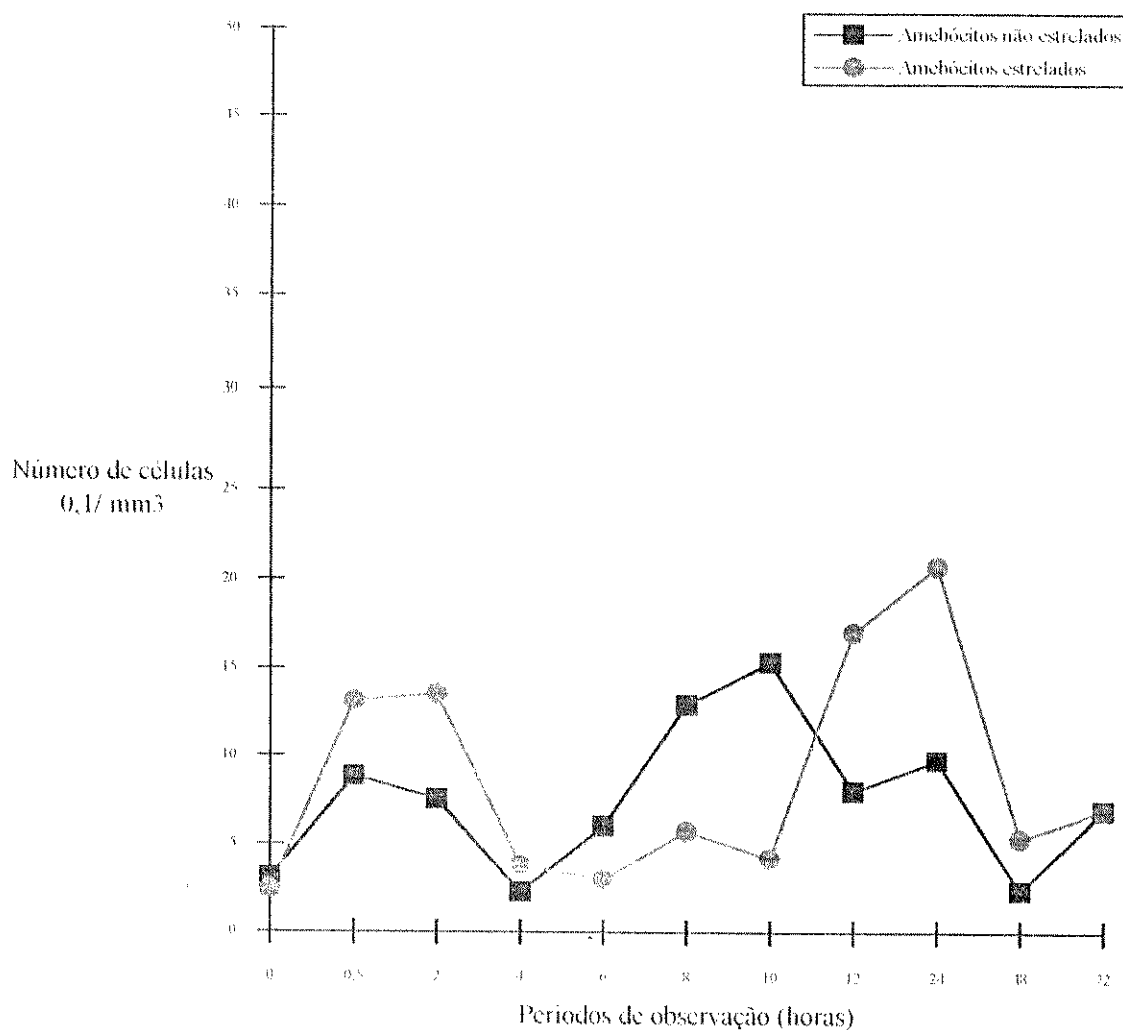


Figura 22 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de molusco infectado e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G1 s1).

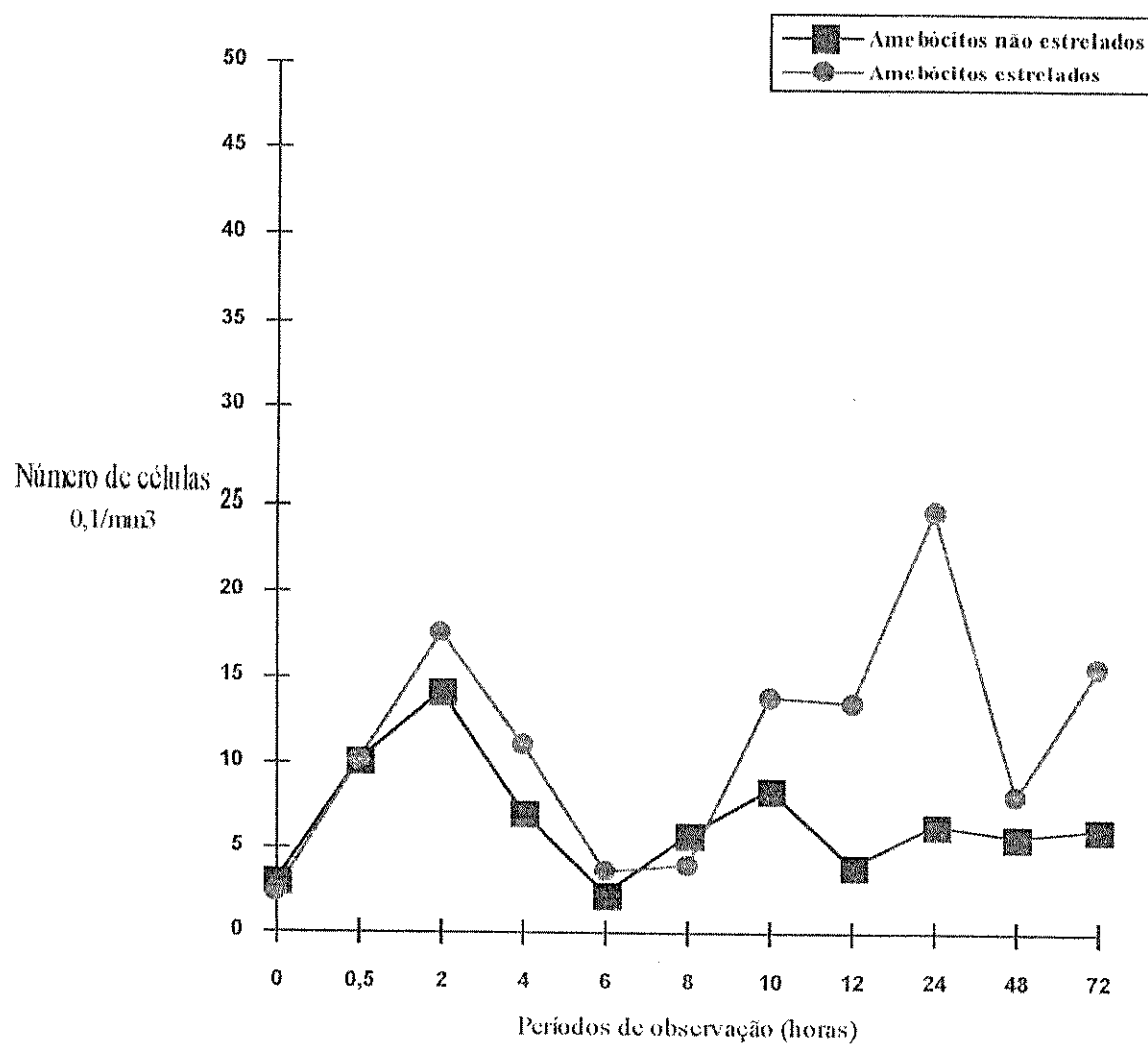


Figura 23 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de molusco sadio e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G1 s2).

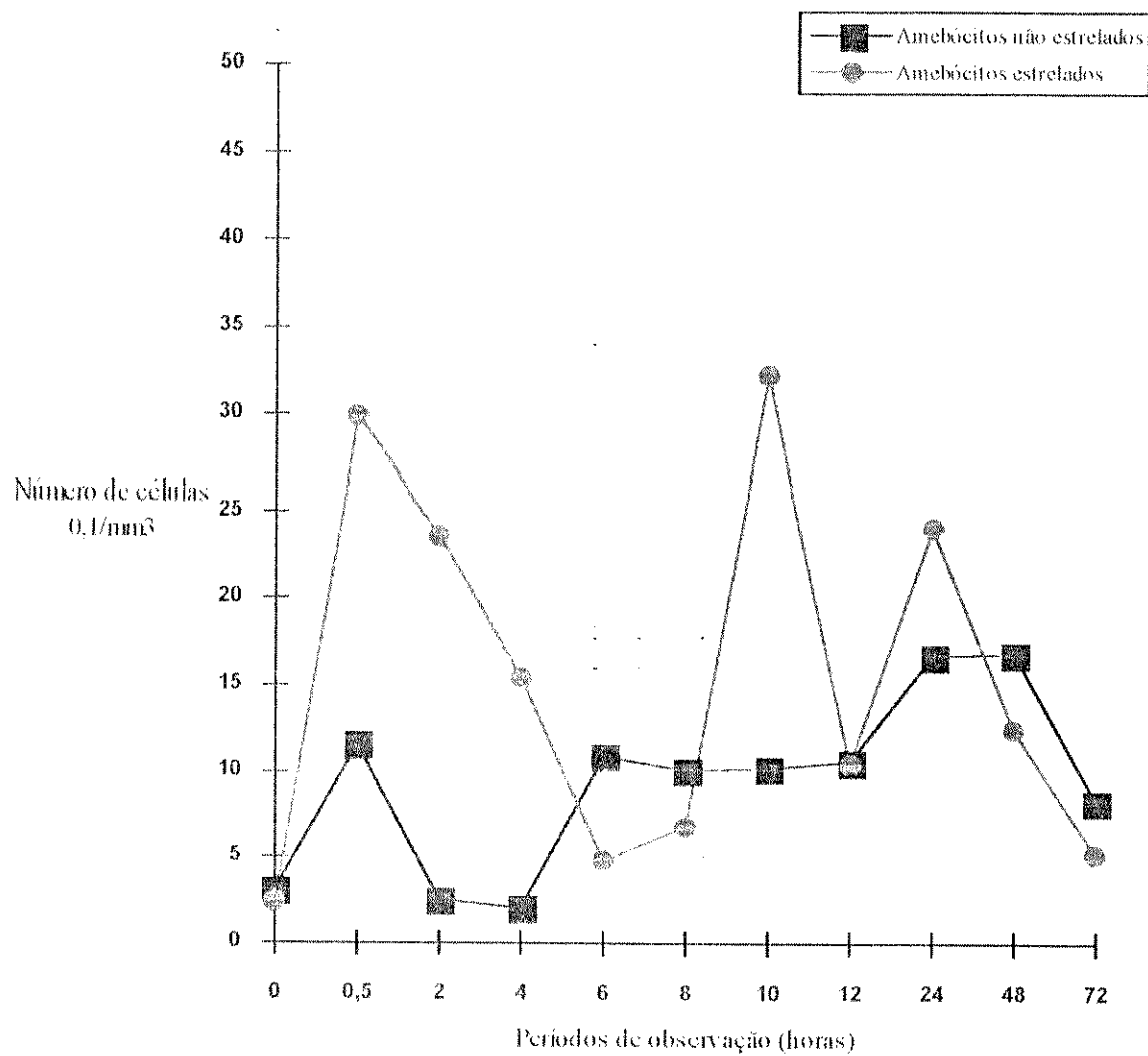


Figura 24 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de molusco infectado (G1 s3).

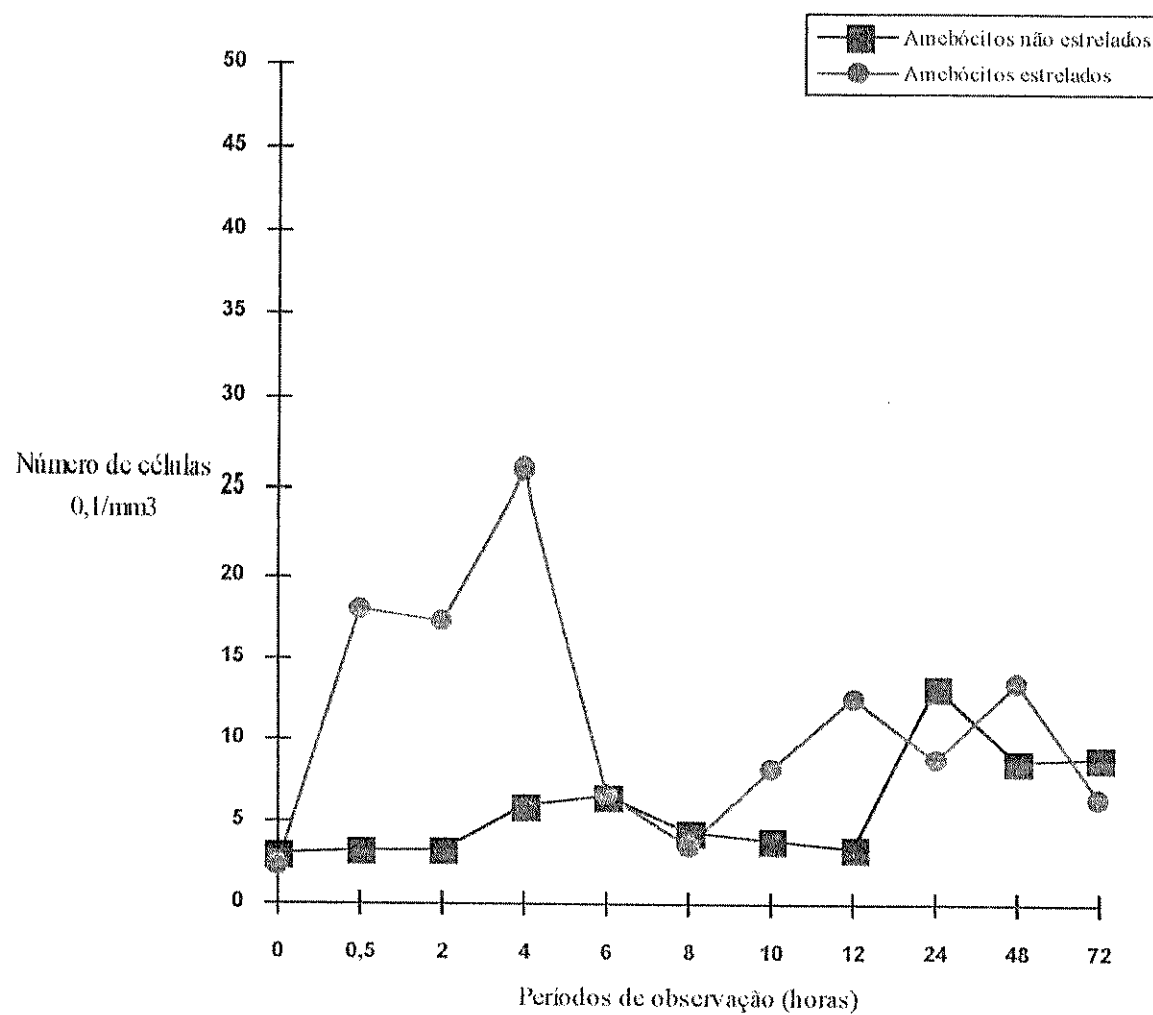


Figura 25 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de molusco sadio (G1 s4).

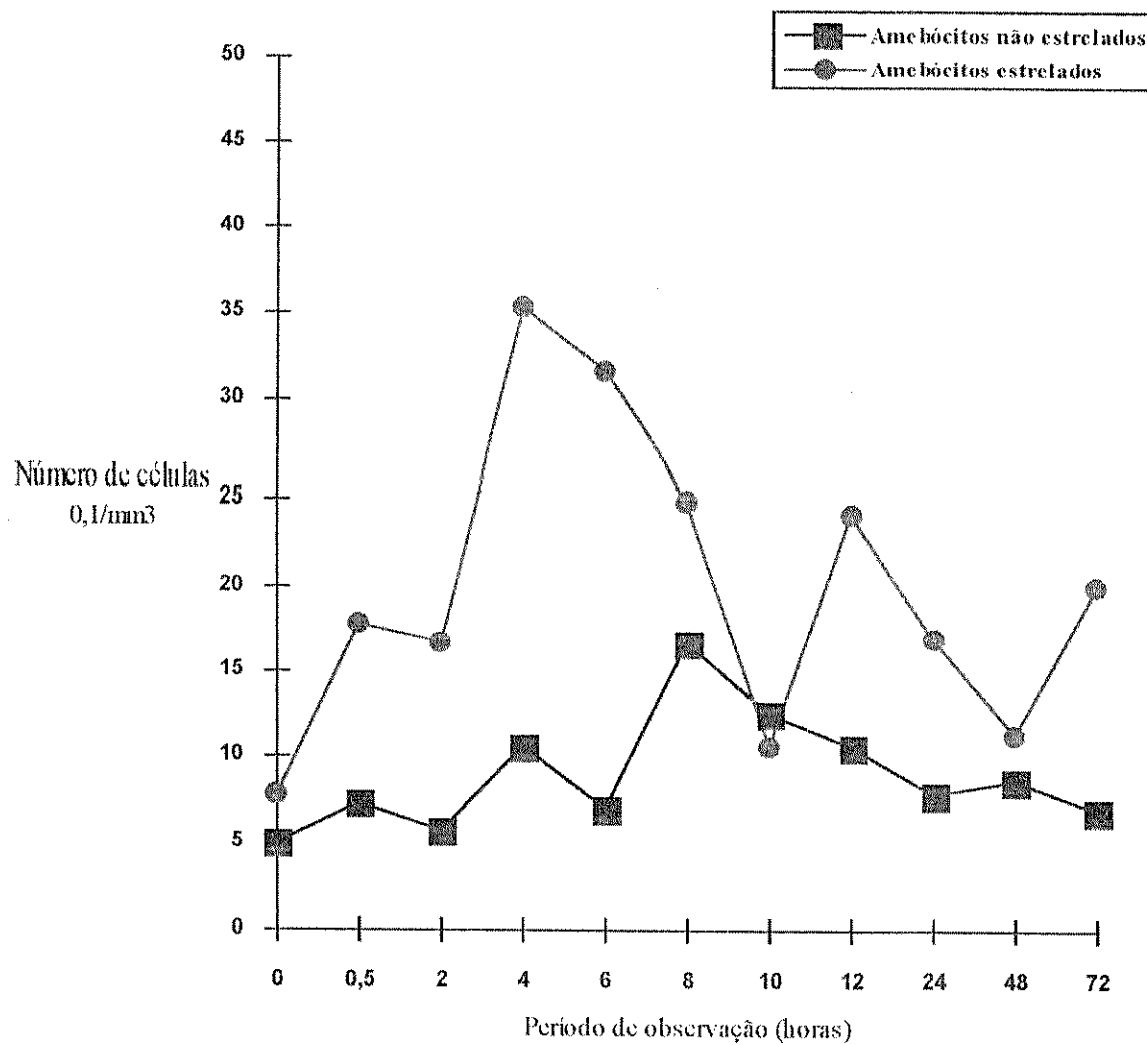


Figura 26 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de molusco infectado e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G2 s1).

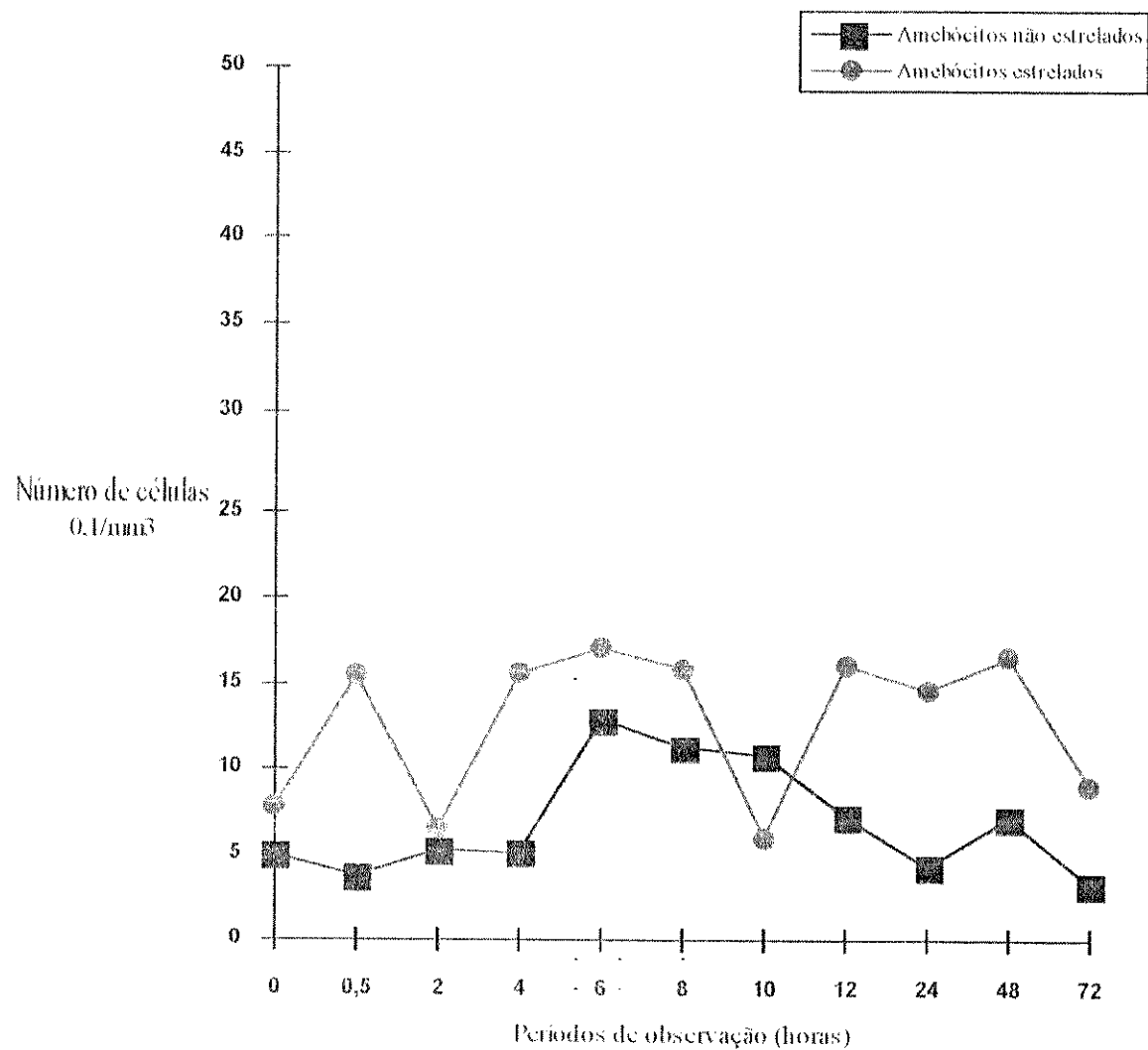


Figura 27 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de molusco sadio e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G2 s2).

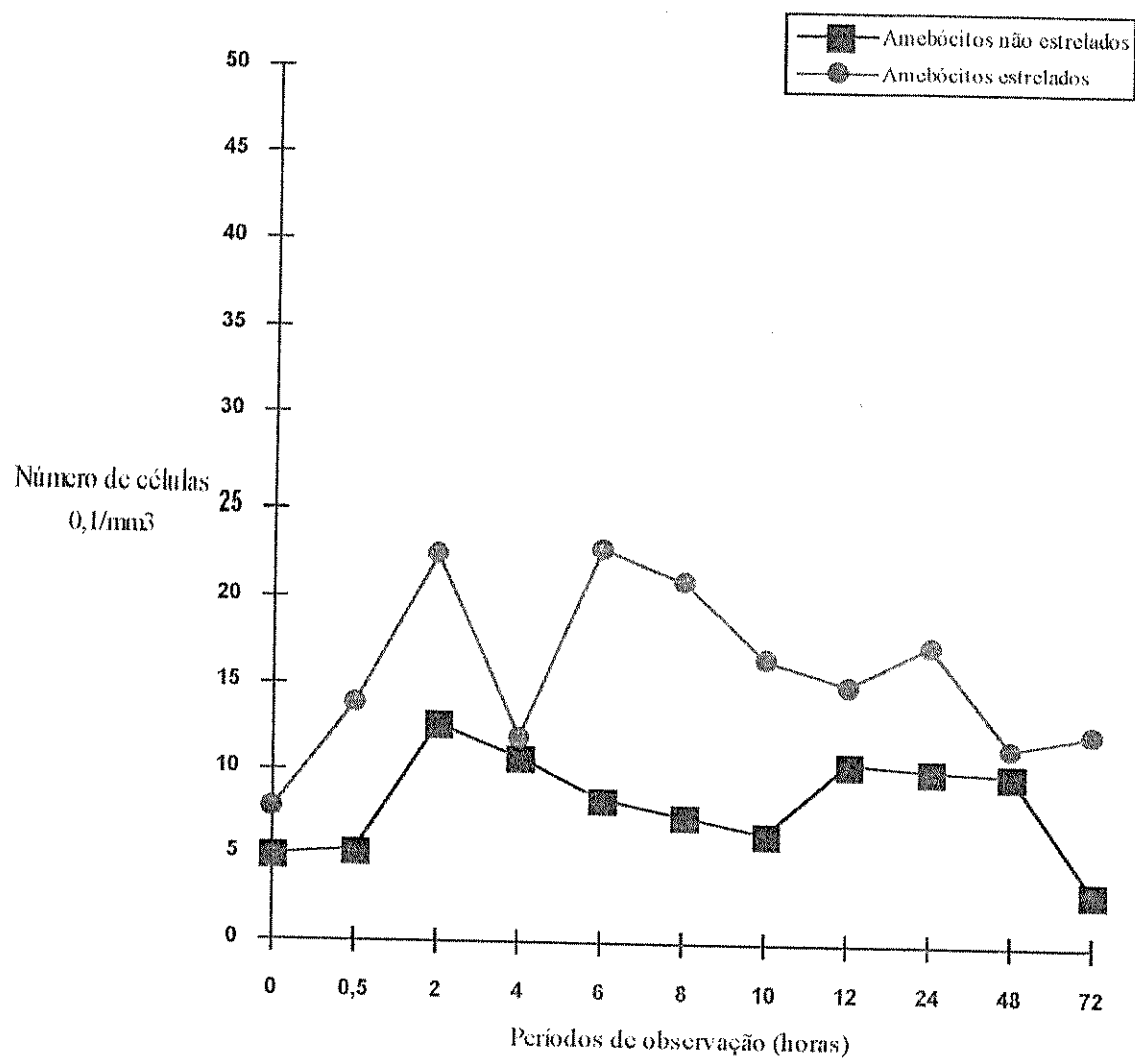


Figura 28 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de molusco infectado (G2 s3).

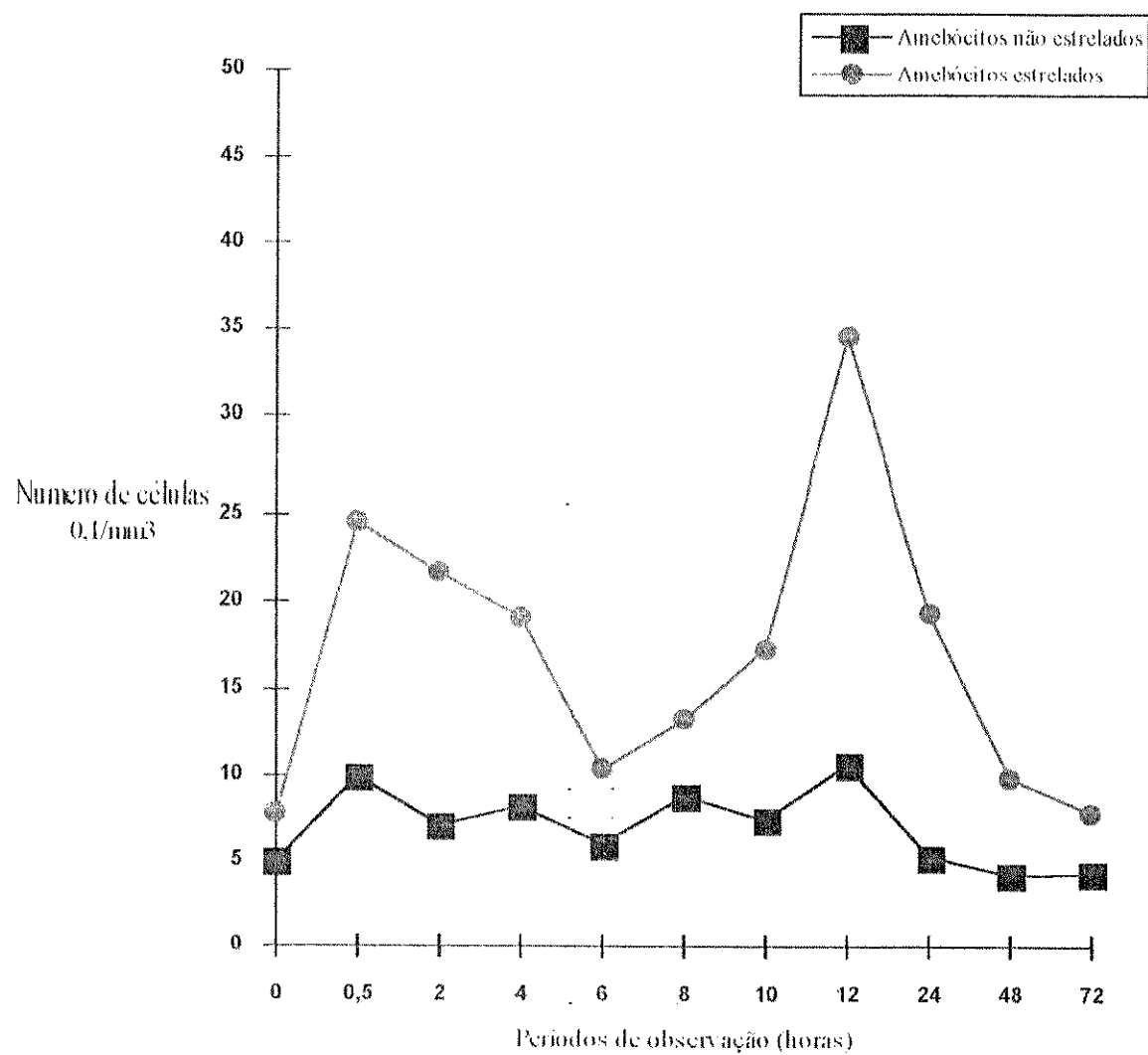


Figura 29 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de molusco sadio (G2 s4).

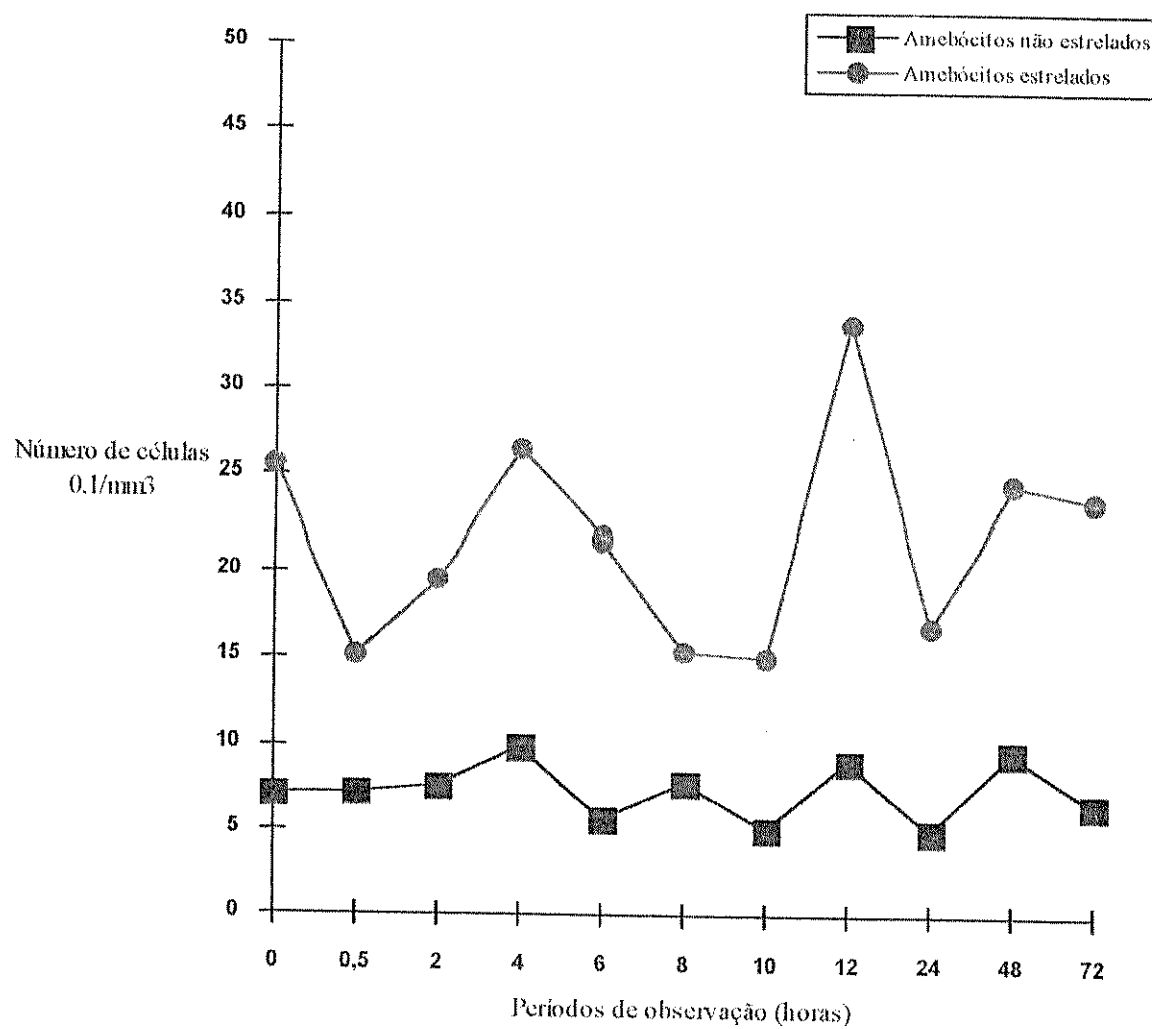


Figura 30 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células de molusco infectado e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G3 s1).

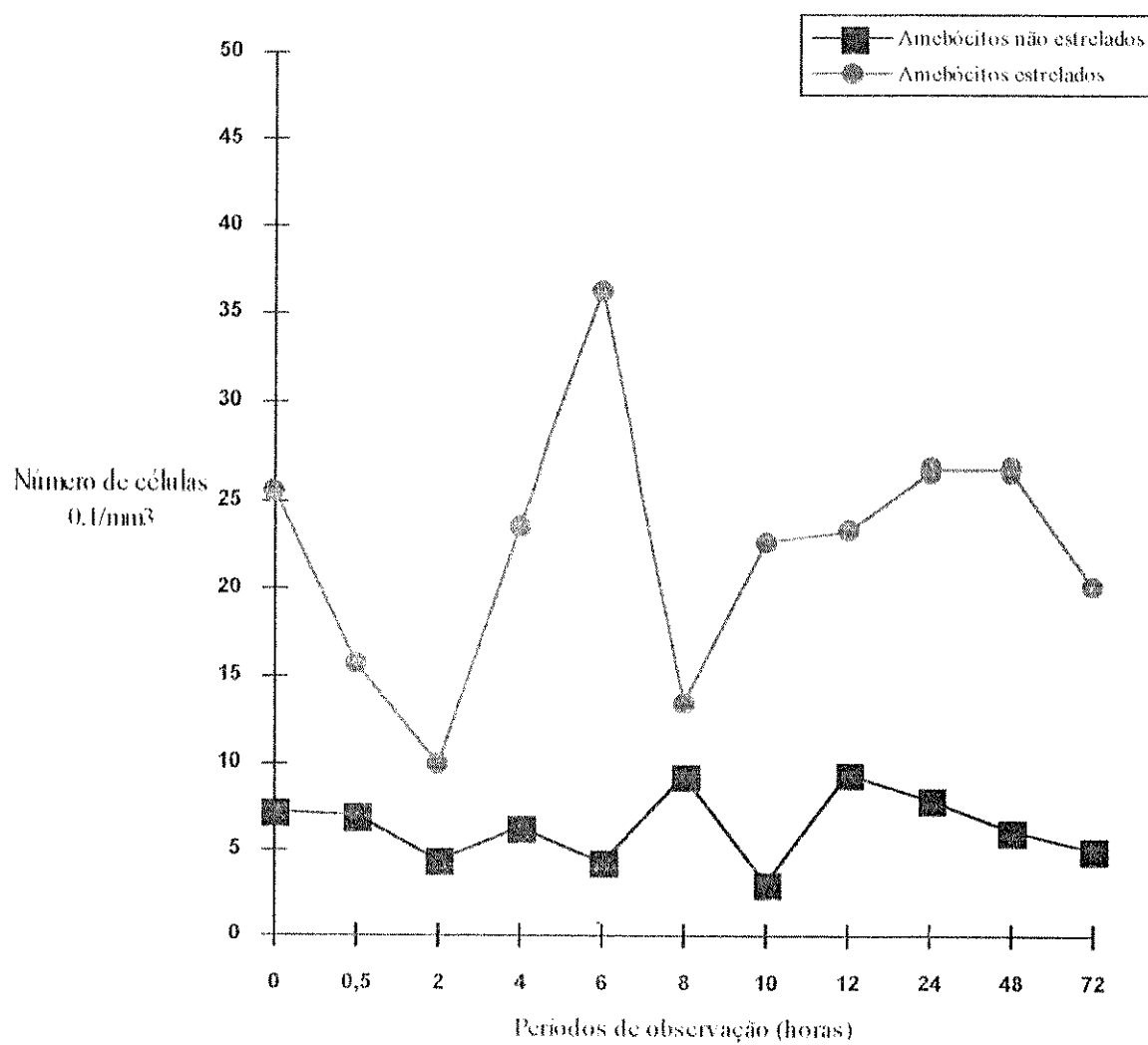


Figura 31 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células de molusco sadio e infectado posteriormente por *S. mansoni* (G3 s2).

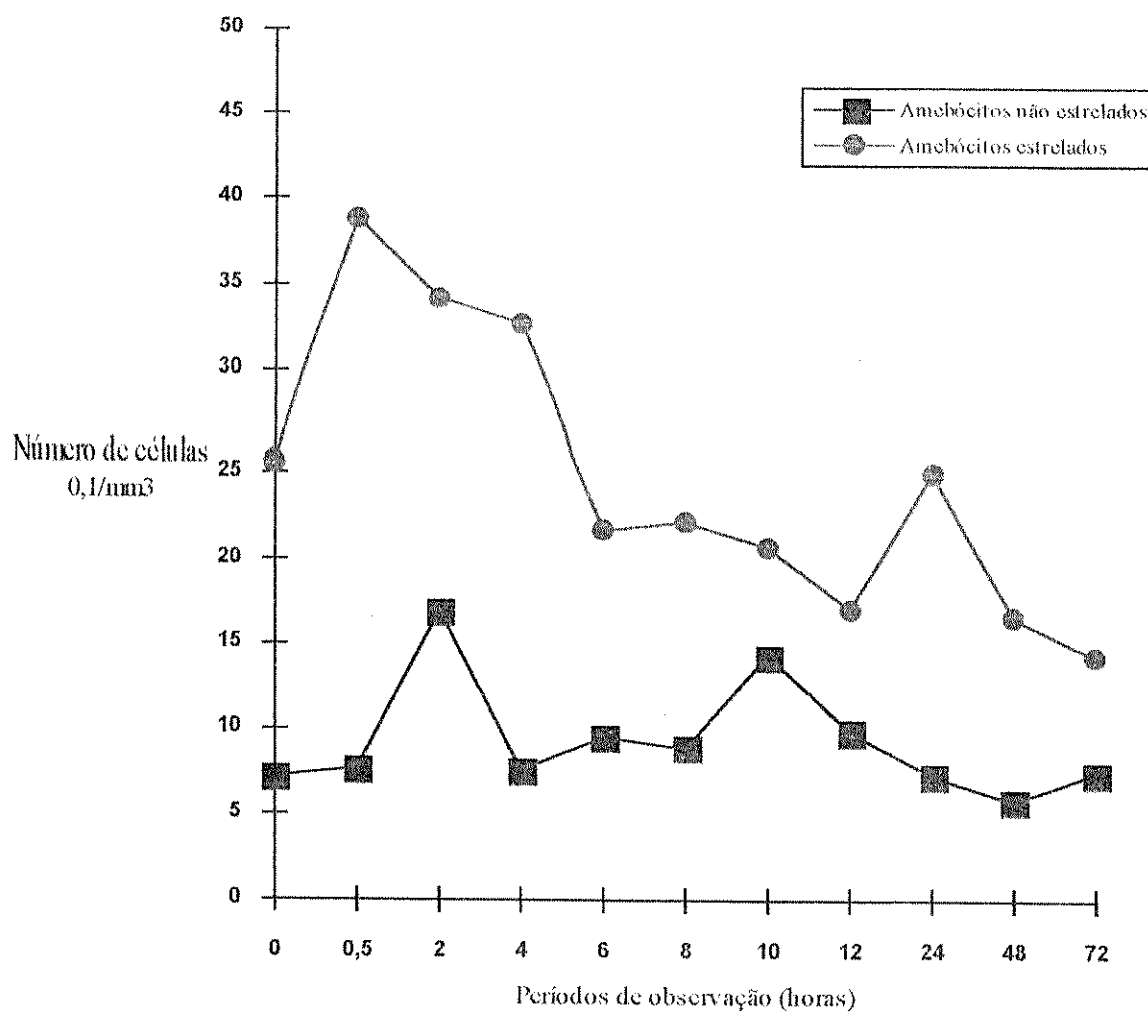


Figura 32 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células de molusco infectado (G3 s3).

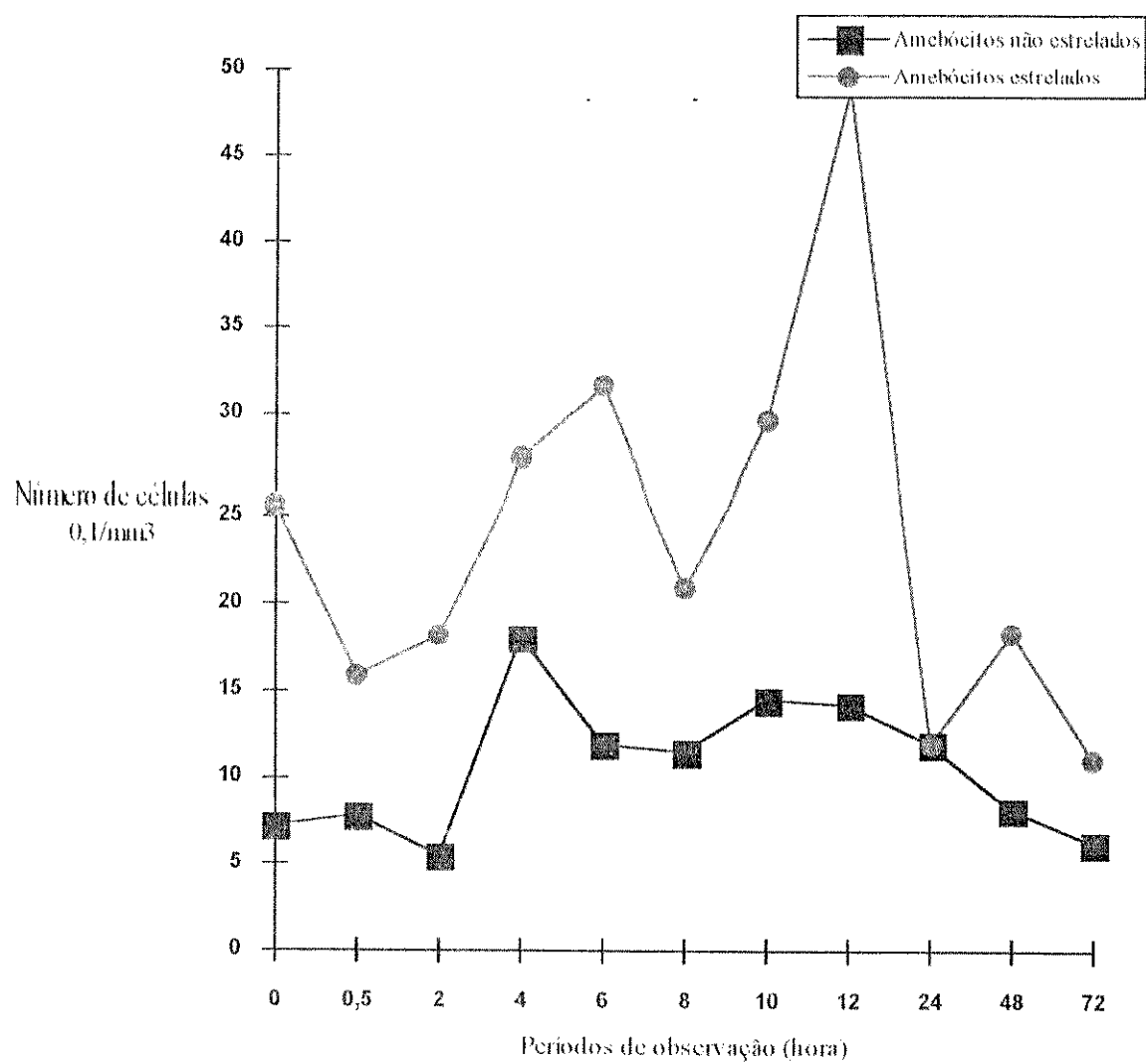


Figura 33 - Número médio de amebócitos em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células de molusco sadio (G3 s4).

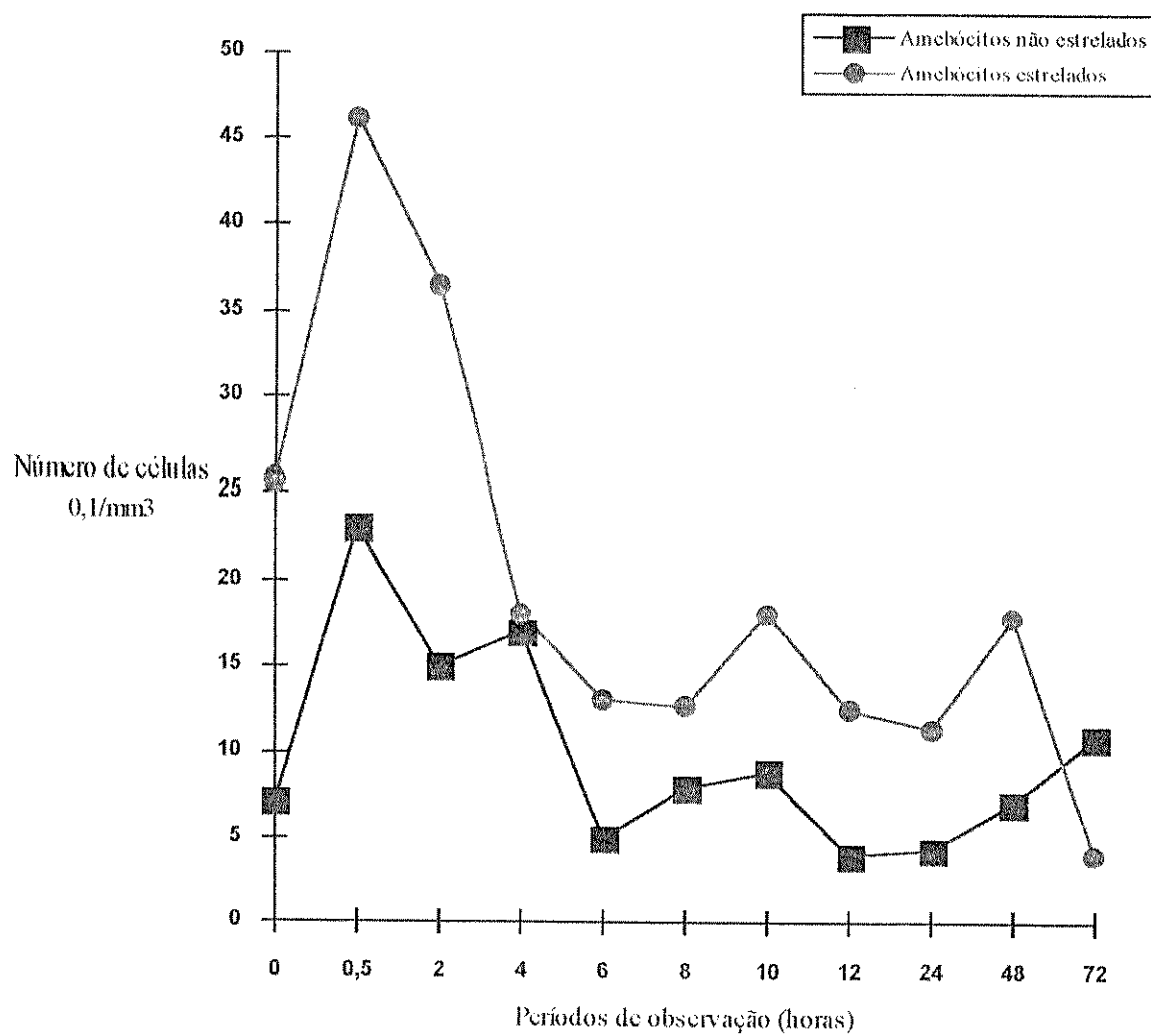


Figura 34 - Número médio de Amebócitos em *B. glabrata* melânica infectada por *S. mansoni* (G4 s1 controle).

5.) DISCUSSÃO

Neste trabalho analisamos a ação dos componentes celulares e não celulares da hemolinfa dos moluscos planorbídeos *B. glabrata* frente ao *S. mansoni*.

O trabalho foi subdividido em 4 partes.

1 - Verificar a taxa de infecção e mortalidade dos moluscos após terem sido inoculados com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células, podendo terem sido infectados ou não após a inoculação.

2 - Avaliar a evolução da infecção pelo *S. mansoni* nos tecidos dos moluscos *B. glabrata* até 72 horas após infecção.

3 - Avaliar quantitativamente a atividade fagocitária das células estreladas frente a hemáceas de carneiro.

4 - Quantificar os amebócitos na hemolinfa circulante.

A resistência ou a susceptibilidade dos moluscos é determinada por diversos fatores. Os fatores genéticos (Richards 1973 e Richards & Merritt, 1975), os ajustes fisiológicos, a idade (Richards, 1973 e Nieman & Lewis, 1990), a linhagem, a carga parasitária, a temperatura e as condições alimentares são fatores importantes para o estabelecimento da infecção. A alteração de algum destes fatores poderia aumentar ou diminuir a susceptibilidade do molusco. No presente trabalho utilizamos moluscos da mesma espécie, linhagem do parasita compatível, moluscos do mesmo tamanho, a mesma carga parasitária, a mesma temperatura e

condições alimentares semelhantes.

O fator que variou foi a inoculação dos moluscos com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de amebócitos.

Inicialmente, verificamos que as taxas de infecção cumulativas (sem considerar a mortalidade) em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total (G1) de molusco infectado ou sadio foram baixas quando comparadas àquelas verificadas em moluscos inoculados com hemolinfa livre de células (G2) e suspensão de células (G3). Considerando a taxa de mortalidade verificamos uma grande mortalidade de moluscos inoculados com hemolinfa total, uma mortalidade média nos moluscos inoculados com hemolinfa livre de células e uma baixa mortalidade em moluscos inoculados com suspensão de amebócitos (G3). Verificamos que o período pré-patente foi menor no grupo inoculado com hemolinfa total e maior para os grupos inoculados com hemolinfa livre de células e suspensão de amebócitos.

Se aliarmos à taxa de infecção a taxa de mortalidade e o período pré-patente, verificamos que, embora a transferência de hemolinfa total de molusco infectado tenha provocado menor número de moluscos que apresentaram eliminação de cercárias (o que faz crer num mecanismo de resistência), a alta taxa de mortalidade e o curto período pré-patente denotam um mecanismo de favorecimento do parasita no molusco. Neste caso, o "ajuste" do parasita ao molusco não pode ser considerado bom, pois determinou grande

mortalidade dos caramujos inoculados.

A grande mortalidade dos moluscos inoculados com hemolinfa total de molusco infectado provavelmente foi devido à infecção por *S. mansoni*. No caso dos moluscos inoculados com suspensão de células a taxa de infecção foi alta, mas a taxa de mortalidade foi inferior à dos moluscos inoculados com hemolinfa total portanto houve uma relação mais equilibrada entre parasita e hospedeiro intermediário.

Os subgrupos 1 e 2 (infectados após a inoculação), independentemente do tipo de inóculo, apresentaram maior taxa de mortalidade em relação aos subgrupos de moluscos apenas inoculados (s3 e s4).

A inoculação de suspensão de células provocou o aumento do período pré-patente e a diminuição da mortalidade dos moluscos, mas não conferiu resistência completa ao parasita.

Loker et al. (1986), utilizando hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *Echinostoma paraensei*, verificaram *in vitro* destruição de esporocistos de *S. mansoni*.

Bayne et al. (1980), também num modelo *in vitro*, mostraram que a morte da larva está associada com o mecanismo citotóxico mediado por células, ao observarem que esporocistos em cultura foram encapsulados e destruídos quando incubados com hemolinfa total ou apenas amebócitos.

No presente trabalho usamos apenas moluscos de linhagem susceptível. Embora tenhamos inoculado hemolinfa total de origem infectada, não conseguimos transferir resistência à

infecção. Ao contrário, parece que a hemolinfa total facilitou o desenvolvimento do *S. mansoni*.

Machado (1990), empregando *B. tenagophila* submetidas à inoculação de hemolinfa de molusco infectado por *S. mansoni*, observou elevada resistência à infecção posterior por *S. mansoni*. Não observamos este fato em *B. glabrata* quando inoculamos hemolinfa total originada de moluscos infectados.

A inoculação de hemolinfa total resultou em grande mortalidade para os moluscos, porque esta não conseguiu proteger os moluscos dos danos causados pelo parasita.

Os moluscos *B. glabrata* de Belo Horizonte são considerados muito susceptíveis ao *S. mansoni*, portanto não se observam grandes reações teciduais em volta da larva (Pan, 1965; Guaraldo et al, 1981). As reações amebocitárias em torno dos esporocistos nos moluscos inoculados com hemolinfa total apresentaram-se discretas. Foi observada uma reação igualmente discreta em torno da larva de *S. mansoni* no grupo controle G4, s1 (moluscos apenas infectados).

As reações amebocitárias foram mais intensas em torno da larva de *S. mansoni* no grupo inoculado com hemolinfa sem células (G2) e no grupo inoculado com suspensão de células (G3). Embora não tenha havido diferença significativa entre a quantidade de esporocistos íntegros e degenerados entre os grupos, o grupo inoculado com suspensão de células apresentou uma reação mais intensa em torno da larva de *S. mansoni* quando comparado com os 2 grupos que sofreram

inoculação e com o grupo controle. A inoculação de suspensão de amebócitos e de hemolinfa livre de células, mesmo sendo proveniente de *B. glabrata* melânica, que é um molusco altamente susceptível ao *S. mansoni*, gerou uma resposta imune-celular, mobilizando os amebócitos para os tecidos em torno da larva de *S. mansoni*, enquanto que em moluscos inoculados com hemolinfa total não observamos uma resposta celular em torno do parasita, parecendo indicar que o trematódeo não foi reconhecido como um corpo estranho dentro do molusco. Apesar da intensa reação amebocitária em torno das larvas em moluscos inoculados com hemolinfa livre de células, esta reação não foi suficiente para impedir o desenvolvimento do trematódeo, conforme a alta taxa de infecção observada nestes moluscos.

Balan et al. (1993) sugeriram que fatores do soro fossem responsáveis pela destruição dos esporocistos, por não se observarem reações celulares em volta dos esporocistos de *S. mansoni*. Células fixas presentes nos tecidos poderiam também estarem envolvidas no processo de morte do esporocisto (van der Knaap & Loker, 1990). As reações teciduais em torno do esporocisto, mesmo que discretas, sempre foram observadas em nosso trabalho.

A fagocitose de materiais estranhos pelas células da hemolinfa é um importante aspecto do mecanismo de defesa de moluscos. Isto tem sido demonstrado através da introdução de partículas estranhas, microorganismos e parasitas (Stauber,

1950; Tripp, 1958; 1960; 1961; Feng, 1966; Feng & Stauber, 1968; Feng & Feng, 1974; Cheng & Cali, 1974; Cheng & Rifkin, 1970; Tripp, 1970; Michelson, 1975 e Abdul-Salam & Michelson, 1980).

A atividade de fagocitose dos amebócitos pode ser influenciada pela temperatura e pH (Foley & Cheng, 1975), mas em nossos experimentos estas condições não foram variáveis.

No presente trabalho, com a inoculação de hemolinfa total, hemolinfa sem células e suspensão de células obtivemos respostas substancialmente diferentes em relação à taxa de fagocitose. O índice de fagocitose das células estreladas foi pequeno em moluscos inoculados com hemolinfa total em comparação aos outros dois grupos estudados (G2 e G3).

A atividade fagocitária dos amebócitos foi maior para o grupo inoculado com hemolinfa sem células, mas a diferença não foi significativa em relação ao grupo inoculado com hemolinfa total.

O índice de fagocitose dos granulócitos foi significativamente superior para o grupo inoculado com suspensão de células em relação aos outros 2 grupos (G1 e G2).

A inoculação de suspensão de células, independentemente da sua origem infectada ou sadia, provocou um alto índice de fagocitose.

O maior índice de fagocitose em moluscos inoculados com

suspensão de células pode ter sido provocado por: 1 - aumento da habilidade de espraçamento dos amebócitos, 2 - aumento da atividade aglutinante na hemolinfa, 3 - aumento do número de amebócitos que podem estar vindo dos tecidos ou sendo produzidos pelo APO.

Os resultados obtidos referentes a atividade de fagocitose e ao número de amebócitos circulantes poderiam ser decorrentes do tipo de inóculo naqueles grupos inoculados com hemolinfa total e suspensão de células. Tal fato parece não ter ocorrido, uma vez que em moluscos que receberam hemolinfa total, o número de amebócitos e o índice de fagocitose foram menores. A concentração de células inoculadas foi a mesma tanto para moluscos inoculados com hemolinfa total como para os inoculados com suspensão de células. Portanto, a inoculação de células sem componentes do soro fez com que houvesse um combate mais efetivo à infecção. O combate mais efetivo à infecção, no caso da inoculação de suspensão de células pode ter sido ampliado pelas lectinas. As lectinas produzidas pelos amebócitos podem aderir a carboidratos tanto do parasita como da superfície dos amebócitos funcionando como moléculas ponte entre o parasita e amebócito (Boswell & Bayne, 1986). A ausência de componentes do soro, ao inocularmos suspensão de células, não impediu a ação dos amebócitos contra o trematódeo.

A presença de substâncias solúveis (lectinas e polipeptídeos livres) na hemolinfa total e hemolinfa livre

de células pode ter bloqueado o processo de opsonização feito pelas lectinas (amebócitos - parasita) através da ocupação destes sítios de ligação no parasita ou nos amebócitos.

No trabalho de Loker & Bayne, (1982) verificou-se que a incubação de esporocisto *in vitro* com hemolinfa de molusco susceptível ou resistente falhou em proteger os esporocistos do ataque de amebócitos de molusco resistente. Este resultado sugere que a diferença entre molusco susceptível e resistente não está nos fatores do soro, mas sim na capacidade dos amebócitos em destruir os esporocistos de *S. mansoni*. Nos moluscos que foram inoculados com suspensão de células não foi observada transferência completa de resistência, mas houve uma diminuição na susceptibilidade ou observou-se algum grau de resistência, tendo em vista que o período pré-patente foi maior. Além disso, observamos uma reação tecidual mais intensa e uma maior atividade de fagocitose dos amebócitos.

Bayne (1990) demonstrou haver diferença na atividade de fagocitose quando os esporocistos foram incubados com amebócitos de cepa resistente e de cepa susceptível. Quando a cepa foi de molusco susceptível, a atividade de fagocitose diminuía; e quando foi de cepa resistente a atividade de fagocitose aumentava. Quando se colocava hemolinfa livre de células (independentemente de ser de molusco resistente ou susceptível) para ser incubada com

amebócitos, nenhuma alteração acontecia na atividade fagocitária em *B. glabrata*.

Lodes & Yoshino (1990) verificaram que esporocistos de *S. mansoni* na presença de hemolinfa sem células e amebócitos de moluscos susceptíveis (M-line) os amebócitos tinham a mobilidade reduzida *in vitro*. A mobilidade dos amebócitos aumentava quando foram incubados com hemolinfa sem células de moluscos resistentes (10-R2).

A inoculação de hemolinfa sem células de molusco susceptível, independentemente de a origem ser de molusco infectado ou sadio, não promoveu uma intensa ativação dos amebócitos dos moluscos que foram inoculados e em consequência não foi capaz de transferir resistência completa ao molusco inoculado.

A variação do comportamento cinético dos amebócitos em moluscos pode ser influenciada por parasitas e materiais estranhos (Cheng, 1987 e van der Knaap et al., 1987; Sminia & Knaap, 1987; Moukassa & Jourdane, 1990).

A variação do comportamento cinético dos amebócitos circulantes também pode ser afetada pela idade dos moluscos. Os moluscos mais jovens apresentam maior quantidade de células em relação aos adultos (Stumpf & Gilbertson, 1978 e Dikkeboom et al. 1984)

No presente trabalho utilizamos moluscos jovens (7 a 9 mm de diâmetro) e não utilizamos moluscos cujas conchas

apresentassem "cáries", porque estes poderiam ter um número maior de amebócitos circulantes envolvidos no transporte de cálcio para as áreas danificadas.

A inoculação de hemolinfa provocou alterações substanciais no comportamento cinético dos amebócitos.

Pudemos observar 4 tipos de comportamento cinético dos amebócitos estrelados em moluscos *B. glabrata* inoculados com hemolinfa total, hemolinfa livre de células e suspensão de células:

Padrão 1 - Os amebócitos apresentaram 2 picos de células estreladas, sendo que o primeiro pico foi pequeno e o segundo pico foi maior (G1 s1 e G3 s4).

Padrão 2 - Os amebócitos estrelados apresentaram 2 picos, mas que em intensidade não diferiram significativamente (G1 s2, G1 s3, G2 s4 e G3 s2).

Padrão 3 - Os amebócitos estrelados apresentaram 2 picos sendo que o primeiro foi significativamente maior (G1 s4, G2 s1, G3 s3)..

Padrão 4 - Os amebócitos estrelados apresentaram oscilações não significativas (G2 s2 e G3 s1).

As alterações ocorridas no comportamento cinético dos amebócitos estrelados dos moluscos inoculados podem ser influenciadas por 2 fatores: 1 - A migração dos amebócitos dos tecidos para circulação e vice-versa. 2 - A estimulação da atividade do APO.

Os grupos de moluscos inoculados que foram enquadrados no padrão 1 mostraram uma pequena elevação no número de

células estreladas após a inoculação e um segundo pico mais intenso e tardio entre 12 e 24 horas.

A inoculação de hemolinfa total de molusco infectado acrescida da infecção por *S. mansoni*, provocou um aumento discreto no número de amebócitos estrelados no início do período de observação e entre 12 e 24 horas houve uma segunda elevação, de uma forma mais intensa. Este comportamento foi semelhante àquele observado em moluscos inoculados com suspensão de amebócitos de moluscos sadios.

Os grupos que foram considerados como sendo do padrão 1 foram: G1 s1, G3 s4. Verificamos que entre estes dois grupos um deles foi apenas inoculado (G3 s4), não tendo sido infectado; portanto o 2^o pico pode demonstrar que esta elevação deveu-se a inoculação e não à infecção pelo *S. mansoni*.

Os grupos de moluscos enquadrados no padrão 2 foram G1 s2, G1 s3, G2 s3, G2 s4 e G3 s2, que apresentaram 2 picos distintos, mas que não diferiram significativamente entre si quanto a intensidade. À exceção do grupo G2 s4, os grupos incluídos no padrão 2 têm em comum a presença de células no inóculo ou então o parasitismo (o molusco sofreu infecção ou recebeu um inóculo de um molusco parasitado).

No padrão 3 foram enquadrados os grupos G1 s4, G2 s1 e G3 s3. Neste caso ocorreu um pico de células inicial semelhante ao que ocorreu nos moluscos do grupo controle (G4, s1) apenas infectados, mas podendo ter um 2^o pico de células menor e tardio. O pico inicial que ocorreu no G1 s4

pode ser devido a inoculação de células que teriam agido semelhantemente a elementos estranhos. O mesmo ocorreu com o G3 s3 e G2 s1. O G2 s1 embora não tenha células, a hemolinfa provinha de molusco infectado.

Os grupos pertencentes ao padrão 4, considerado como oscilatório, foram G2 s2 e G3 s1 . Nestes grupos houve um aumento precoce no número de amebócitos que se manteve com oscilações no decorrer do experimento.

O 1^o pico foi uma característica dos grupos infectados (como no grupo controle infectado) sendo que os demais picos podem ser atribuídos a inoculação de hemolinfa.

Nos 3 tipos de inóculo a que foram submetidos os moluscos observamos que as células estreladas (granulócitos) estiveram em maior número do que os hialinócitos. Estes dados estão de acordo com Cheng & Auld (1977) e Jeong & Heyneman (1976), que submeteram moluscos a diferentes estímulos e verificaram que as alterações substanciais ocorreram com as células estreladas.

Os amebócitos estrelados na hemolinfa circulante dos moluscos inoculados com hemolinfa total apresentaram-se em níveis baixos em relação aos 2 grupos estudados (hemolinfa livre de células e suspensão de células). Nos moluscos inoculados com hemolinfa livre de células verificamos um número médio maior de amebócitos na hemolinfa circulante em relação ao grupo inoculado com hemolinfa total, mas significativamente menor em relação ao grupo inoculado com suspensão de células. O fato de haver uma grande quantidade

de células estreladas na hemolinfa circulante pode explicar o período pré-patente maior neste último grupo, assim como as menores taxas de infecção e mortalidade.

Conforme os resultados já descritos, embora não tenha havido diferença significativa entre a quantidade de esporocistos íntegros e degenerados entre os grupos, o grupo inoculado com suspensão de células apresentou uma reação mais intensa em torno da larva de *S. mansoni*. O índice de fagocitose dos granulócitos foi significativamente superior para o grupo inoculado com suspensão de células (G3) em relação aos outros dois grupos (G1 e G2).

Estes resultados parecem nos mostrar que a inoculação de suspensão de células não conseguiu impedir totalmente que os moluscos se infectassem, mas conseguiu diminuir significativamente a mortalidade dos animais e diminuiu também a susceptibilidade dos moluscos. Pensamos que a inoculação de células pode ter ativado os amebócitos que estavam na hemolinfa do molusco inoculado, porque verificamos uma quantidade maior destas células na hemolinfa circulante e maior atividade de fagocitose.

A inoculação de suspensão de células não impediu que os moluscos se infectassem, mas retardou o desenvolvimento do *S. mansoni*.

Granath & Yoshino (1984) inocularam hemolinfa de molusco resistente em molusco susceptível e vice-versa. Eles conseguiram 60% de resistência em moluscos que foram

inoculados com hemolinfa de molusco resistente, sendo que quase todos os moluscos que receberam hemolinfa de molusco susceptível se infectaram. Em nosso trabalho não conseguimos uma taxa de resistência tão elevada, talvez porque transferimos hemolinfa de molusco susceptível para molusco susceptível.

Verificamos em moluscos inoculados com suspensão de células que além do índice fagocitário ser maior, também os amebócitos ficavam mais aglutinados em torno das hemáceas de carneiro. No trabalho de van der Knaap et al. (1981) foi demonstrado que os amebócitos sintetizam aglutininas/opsoninas. Sminia et al. (1979) demonstram que na hemolinfa de *Lymnaea stagnalis* há opsoninas. Van der Knaap et al. (1981), em estudo imunocitoquímico dos amebócitos, verificaram que há opsoninas/aglutininas e que elas estão localizadas dentro do citoplasma dos amebócitos.

A maior atividade de fagocitose por nós observada em moluscos inoculados com suspensão de células pode acontecer porque os amebócitos possuem opsoninas e aglutininas que têm função de receptores citofílicos no reconhecimento de material estranho (van der Knaap et al., 1981). Confirmando esta observação, quando inoculamos suspensão de células em moluscos *B. glabrata* houve um aumento na atividade de fagocitose na ausência de fatores do soro comparando com os outros tipos de inoculação (hemolinfa total e hemolinfa sem células). Neste caso poderíamos pensar que quando inoculamos hemolinfa total e hemolinfa sem células, os fatores solúveis

deixaram de agir como opsoninas, inibindo a ação dos amebócitos e promovendo o desenvolvimento do *S. mansoni*.

Verificamos que os diferentes inóculos usados (hemolinfa total, hemolinfa sem células e suspensão de células) conferiram graus de resistência diferentes para os moluscos, sendo que os moluscos inoculados com hemolinfa total não apresentaram resistência à infecção; os moluscos inoculados com hemolinfa livre de células apresentaram um grau de resistência médio e os moluscos inoculados com suspensão de células apresentaram maior resistência. A resistência ao *S. mansoni* não foi total, mas foi gradativa entre os inóculos.

Pudemos verificar neste trabalho que as células são a principal linha de defesa dos moluscos e que fatores do soro sozinhos são incapazes de combater o parasita. Estes dados estão de acordo com Bayne et al., 1980; Dikkeboom, 1988 e van der Knaap & Loker, 1990.

6.) CONCLUSÕES

- Com relação a taxas de infecção cumulativas em *B. glabrata* 3 grupos significativamente diferentes se destacaram: o grupo G1 s1 (28%), o grupo G3 s2 (43%) os demais grupos (53% a 60%).
- As taxas de mortalidade em moluscos *B. glabrata* demonstraram 3 grupos distintos que foram: grupo inoculado com hemolinfa total que apresentou alta mortalidade, grupo inoculado com hemolinfa livre de células que apresentou média mortalidade e grupo inoculado com suspensão de amebócitos que apresentou baixa mortalidade.
- Os subgrupos 1 e 2 (infectados após a inoculação) independentemente do tipo de inóculo apresentaram maior taxa de mortalidade em relação aos subgrupos de moluscos apenas inoculados (s3 e s4).
- A inoculação de hemolinfa total provocou diminuição do período pré-patente e o aumento da taxa de mortalidade.
- Nos grupos de moluscos inoculados com hemolinfa livre de células e suspensão de células independentemente da origem (infectada ou sadia) houve um retardamento do desenvolvimento do parasita com o aumento do período pré-patente (6 e 8 semanas, respectivamente).

- A inoculação de hemolinfa total não estimulou a atividade fagocitária e determinou uma discreta reação em torno da larva de *S. mansoni*.
- A inoculação de hemolinfa livre de células e a suspensão de amebócitos provocaram reação tecidual mais intensa em torno da larva de *S. mansoni*.
- A inoculação de suspensão de células em moluscos *B. glabrata* provocou o aumento do período pré-patente, a diminuição da mortalidade dos moluscos, o aumento da atividade fagocitária, o aumento das células estreladas na hemolinfa circulante e o aumento das reações no tecido em torno da larva de *S. mansoni*.

Referências Bibliografias

- Abdul-Salam, J.M. and Michelson, E.H. *B. glabrata* amoebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 36:52-9, 1980a.
- Abdul-Salam, J.M. and Michelson, E.H. *B. glabrata* amoebocytes: Effect of *S. mansoni* infection on in vitro phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 35:241-47, 1980b.
- Allegretti, S.M. Comportamento de *Biomphalaria glabrata* variantes albina e melânica frente à infecção por *Schistosoma mansoni*. Campinas Tese (Mestrado) Unicamp - Instituto de Biologia, 1991.
- Babior, B.M. Oxygen-dependent killing by phagocytes. *New England J. Med.* 298(12):659-68, 1978.
- Balan, D.S.L. Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) infectadas por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde Publica São Paulo.* 27(6) p:421-29, 1993.
- Bayne, C.J. Molluscan immunobiology: Isolation of an *Aeromonas formicans* which escapes the internal defense systems of *Helix pomatia*. *Dev. Comp. Immunol.* 6:675-82, 1982.
- Bayne, C.J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience* 40(10):723-31, 1990.
- Bayne, C.J.; Buckley, P.M. and DeWan, P.C. *S. mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail for sporocysts in plasma from resistant *B. glabrata*. *Exp. Parasitol.* 50:409-16 1980.
- Bird, G.W.G. Invertebrate agglutinins in general. *Ann. NY Acad. Sci.* 234(19):51-54, 1974.
- Boswell, C.A. & Bayne, C.J. Isolation, characterization and functional assessment of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata* intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.* 8:559-68, 1984
- Boswell, C.A. & Bayne, C.J. Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge. *Immunology* 57:261-64, 1986.
- Cheng, T. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* 266:343-79, 1975.

- Cheng, T.C. Some cellular mechanism governing self and nonself recognition and pathogenicity in vertebrates and invertebrates relative to protistan parasites. *Aquaculture* 67:1-14, 1987.
- Cheng, T. & Auld, K.R. Hemocytes on the pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 30:119-22, 1977.
- Cheng, T. & Cali, A. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytized by granulocytes of *Crassostrea virginica*. *Comtemp. Top. Immunobiol.* 4:25-35, 1974.
- Cheng, T.C. & Garrabrant, T.A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 77:467-72, 1977
- Cheng, T.C. and Jourdane, J. Transient cellular reactin in *B. glabrata* (mollusca) to heterotopic isografts. *J. Invertebr. Pathol.* 49:273-78, 1987.
- Cheng, T. & Rifkin, E. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. *Amer. Fish Soc. Spec. Publ.* 443-96, 1970
- Cheng, T. & Yoshino, T.P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (mollusca) challenged with bacterial lipids. *J. Invertebr. Pathol.* 28:143-46, 1976.
- Chernin, E. Transplatation of larval *S.mansoni* from infected to uninfected snails. *J. Parasitol* 52(3): 473-81, 1966.
- Couch, L; Hertel, L.A. and Loker, E.S. Humoral responses of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: Observation on a circulating hemagglutinin. *J. of Exp. Zoo.* 255:340-49, 1990
- Coustau, C. & Yoshino, T.P. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*-susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *J. Invertebr. Pathol.* 63:82-9, 1994a
- Coustau, C. & Yoshino, T.P. *Schistosoma mansoni*: Modulation of hemocytes surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. *Exp. Parasitol.* 79:1-10, 1994b
- Cox, D.R., Oakes, D.O. Analysis of survival data. London: Chapman Hail, 1984

- Dias, L.C.S.; Ueta, M.T. and Guaraldo, A.M.A. Susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. stramine* e *B. tenagophila* de diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 29(4):205-12, 1987.
- Dikkeboom, R.; van der Knaap, W.P.W.; Meuleman, E. & Sminia, T. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Cell. Tissue Res. 238:43-47, 1984.
- Dikkeboom, R.; Tijnnagel, J.M.G.H.; Mulder, E.C. & van der Knaap, W.P.W. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. J. Invertebr. Pathol. 49:321-31, 1987.
- Dikkeboom, R.; Bayne, C.J.; van der Knaap, W.P.W. & Tijnnagel, J.M.G.H. Possible role of reactive forms of oxygen *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. Parasitol. Res. 75:148-54, 1988.
- Feng, J.S. The fate of a virus, *Staphylococcus aureus* Phage80, injected into the oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. 8:496-504, 1966.
- Feng, S.Y & Feng, J.S. The effect of temperature on cellular reactions of *Crassostrea virginica* to the injection of avian erythrocytes. J. Invertebr. Pathol. 23:22-37, 1974.
- Feng, J.S. & Stauber, L.A. Experimental hexamitiasis in the oyster *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. 10:94-110, 1968.
- Foley D.A & Cheng, T.C. Morphology hematological parameters and behavior of hemolymph cells of quahog clam, *Mercenaria mercenaria*. Biol. Bull. 146:343-56, 1974
- Foley, D.A. & Cheng, T.C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the Pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. 25, 189-97, 1975.
- Foley, D.A. & Cheng, T. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. J. Invertebr. Pathol. 29:321-25, 1977.
- Fryer, S.E. and Bayne, C.J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 76:45-52, 1990.
- Granath, W.O. and Yoshino, T. *S. mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *B. glabrata*. Exp. Parasitol. 58:188-193, 1984

- Guaraldo, A.M.A.; Magalhães, L.A.; Rangel, H.A. e Pareja, G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Pública.*, São. Paulo 15:436-48, 1981.
- Hertel, L.A.; Stricker, S.A.; Monroy, F.P.; Wilson, W.D. & Loker, E.S. *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria mammalian erythrocytes, and sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*. *J. Invertebr. Pathol.* 64:52-61, 1994.
- Jeong, K.H. & Heyneman, D. Leucocytes of *Biomphalaria glabrata*: Morphology and behavior of granulocytes cells *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* 28:357-62, 1976.
- Joky, A.; Matricon-Gondran, M. and Benex, J. Response to the amoebocyte-production organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia. *J. Invertebr. Pathol.* 45:28-33, 1985.
- Jourdane, J. & Cheng, T.C. The two-phase recognition process of allografts in a brasilian strain of *B. glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 49:145-58, 1987.
- Jourdane, J. & Théron, T.C. *Schistosoma mansoni*: Cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exp. Parasitol.* 50:349-57, 1987.
- Liebsch, M.G. & Becker, W. Comparatie glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* influence of starvation and infection with trematode *Schistosoma mansoni*. *J. Comp. Physiol.* 166:41-50, 1990.
- Lie, K.J.; Heyneman, D. and Richards, C.S. *Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural miracidia of *Echinostoma paraense*. *Exp. Parasitol.* 43:54-62, 1977a.
- Lie, K.J.; Heyneman, D. and Richards, C.S. Studies on resistance in snail: Interference by nonirradiated *Echinostoma* larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 29:118-25, 1977b.
- Lie, K.J., Jeong, K.J. and Heyneman, D. Tissue resctions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 74(2):157-66, 1980.
- Lie, K.J.; Heyneman, D. and Jeong, K.H. Selective interference with granulocyte function induced by *Echinostoma paraense* (Trematoda) larvae in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Parasitol.* 67(6):790-96, 1981.

- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. The effect of Schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *J. Invertebr. Pathol.* 56:75-85, 1990.
- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. Polypeptides synthesized *in vitro* by *Biomphalaria glabrata* hemocytes bind *Schistosoma mansoni* primary sporocysts *J. Invertebr. Pathol.* 61:117-22, 1993.
- Loker, E.S. and Bayne, C.J. *In vitro* encounters between *S. mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *B. glabrata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(5) 1982
- Loker, E.S.; Bayne, C.J. Yui, M.A. *Echinostoma paraensei*: Hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 62:149-154, 1986.
- Loker, E.S. and Hertel, L.A. Alterations in *B. glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. *J. Parasitol* 73(3), 503-13, 1987.
- LoVerde, P.T.; Gherson, J. and Richards, C.S. Reaction against self in an invertebrate? *J. Invertebr. Pathol.* 39:247-49, 1982.
- Machado, S.M.P.R. Estudo da ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). Campinas Tese (Mestrado) Unicamp - Instituto de Biologia, 1990.
- Magalhães, L.A. Moluscos planorbídeos do Distrito Federal, Brasília. Tese (Doutoramento) - Unicamp. Faculdade de Ciências Médicas, 1966.
- Mc Kay, D. & Jenkin, C.R. Immunity in the invertebrates. II. Adaptative immunity in the Crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). *J. Immunol.* 17:127, 1969.
- Michelson, E.H. Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically important snails. *J. Parasitol.* 52(n3):466-72, 1966
- Michelson, E.H. & Dubois, L. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* 15:105-111, 1975.
- Moukassa, J.B. & Jourdane, J. Dynamic of the leucocytic response of *Biomphalaria glabrata* during the larval development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma liei*. *J. Invertebr. Pathol.* 55:306-11, 1990.

- Monroy, F.P. & Loker, E.S. Production of heterogeneous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma paraense* and *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79(3):416-23, 1993.
- Mullainadhan, P. and Renwranztz, L. Lectin-dependent recognition of foreing cells by hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Immunobiol.* 171:263-73, 1986.
- Newton, W.L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol.* 2:242-57, 1953.
- Niemann, G.M. and Lewis, F.A. *Schistosoma mansoni*: Influence of *Biomphalaria glabrata* size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. *Exp. Parasitol.* 70:286-92, 1990.
- Noda, S. and Loker, E.S. Effects of infection with *Echinostoma paraense* on the circulating haemocyte population of the host snail *B. glabrata*. *Parasitology* 98:35-41, 1989.
- Ottaviani, E. The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus* ((L.) (Gastropoda, Pulmonata) *Dev. Comp. Immunol.* 7:209-16, 1983.
- Ottaviani, E. & Franchini, A. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) *Acta Zoo.* 69(3):157-62, 1988.
- Ottaviani, E. and Vergine, C. All-implant in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). I. Histological and Histochemical study. *Zool. Jb. Physiol.* 94:261-67, 1990.
- Pan, C.T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 119:237-99, 1958.
- Pan, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 14:931-76, 1965.
- Paraense, W.L. & Corrêa, L.R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 5:15-22, 1963.

- Paraense, W.L. & Corrêa, L.R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 64:822, 1978.
- Prowse, R.H. and Tait, N.M. *In vitro* phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Muller). *Immunology* 17:437-43, 1969.
- Ratcliffe, N.A. Invertebrate Immunity - A Primer for the non-specialist (review). *Immunology lett.* 10:253-70, 1985.
- Renwrentz, L. & Cheng, T.C. Agglutinin receptors attachment of erythrocytes to hemocytes of *Helix pomatia*. *J.Invertebr. Pathol.* 29:88-96, 1977.
- Renwrentz, L. & Stahmer, A. Opsonizing properties of isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 149:535-46 1983.
- Richards, C.S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22(6):748-56, 1973.
- Richards, C.S. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* 25:493-502, 1984
- Richards, C.S. and Merritt, J.W.Jr. Genetic in the susceptibility of juvenile *B. glabrata* to *S. mansoni* infection. *American J. Tropical Med. Hyg.* 21(4):425-34, 1975.
- Richards, E.H. & Rewrantz, L.R. Two lectins on surface of *Helix pomatia* haemocytes; a Ca^{2+} - dependent, GalNac-specific lectin and Ca^{2+} - independent, mannose 6-phosphate-specific lectin wich recognises activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.* 161:43-54, 1991.
- Santana, J.V. Mecanismo de defesa em *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *Schistosoma mansoni*. Campinas Tese (Doutoramento) Unicamp - Instituto de Biologia, 1990.
- Santana, J.V.; Magalhães, L.A. and Rangel, H.A. Seleção de linhagens de *B. tenagophila* e *B. glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde Publ. São Paulo* 12:67-77, 1978.

- Sas Institute Inc., SAS\STAT^R User's Guide, Version 6, Fourth Edition, v2, Cary, NC: SAS Institut INC, p:846 1989.
- Seta, L. Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, a inoculação de tinta nanquim ou fratura de concha. Campinas Tese (Mestrado) - Unicamp. Instituto de Biologia, 1990.
- Sminia, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch.* 13:497-526, 1972.
- Sminia, T. ; van der Knaap, W.P.W. and Edelen-Bosch, P. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Dev. Comp. Immunol.* 3:37-44, 1979.
- Sminia, T. & van der Knaap, W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology *Dev. Comp. Immunol.* 11:17-28, 1987
- Standen, O.D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 45(2):221-41, 1951.
- Standen, O.D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. of Royal Soc. of Trop. Med. Hyg.* 45:17-28, 1987.
- Stauber, L.A. The fate of India ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica*. *Bio Bull.* 98:227-41, 1950
- Stumpfh, J.L. & Gilbertson, D.E. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata* factor affecting variability. *J. Invertebr. Pathol.* 32:177-81, 1978
- Sullivan, J.T.; Cheng, T.C. and Howland, K.H. Mitotic responses of the anterior pericardial wall of *B. glabrata* (Mollusca) subjected to challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 44:114-116, 1984
- Tripp, M.R. Disposal by the oyster of intracardially injected red blood cells of vertebrate. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* 48:143-47, 1958.
- Tripp, M.R. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.* 119:273-82, 1960.

- Tripp, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.* 47:747-51, 1961.
- Tripp, M.R. Defense mechanism of moluscs. *J. Reticuloendothel.. Soc.* 7:173-82, 1970.
- van der Knaap, W.P.W.; Boerrigter-Barendsen, L.H.; Hoeven, van der D.S.P. and Sminia T. Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail, *Lymnae stagnalis*. *Cell tissue Res.* 219:291-96, 1981.
- van der Knaap, W.P.W.; Meuleman, E.A. and Sminia, T. Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitol. Res.* 73:57-65, 1987.
- van der Knaap, W.P.W. and Loker, E.S. Immune Mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today* 6(6):175-82, 1990.
- Vasta, G.R., Sullivan, J.T.; Cheng, T.C.; Marchalonis, J.J. & Warr, G.W. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *J. Invertebr. Pathol.* 40:367-77, 1982.
- Vasta, G.R.; Cheng, T.C. & Marchalonis, J.J. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 88:475-88, 1984.
- Wagge, L.E. Amoebocytes. *Cytology* IV:31-78, 1955
- Zelck, U. & Becker, W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surroding *Biomphalaria glabrata* tissue. *J. Invertebr. Pathol.* 55:93-99, 1990.

Anexo I Tabelas

.

..

.

.

Tabelas 2 e 3 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B.glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 1						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	48	2	4.0	4.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	48	2	4.0	4.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 3	48	2	4.0	4.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0

Semana 2						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	30	18	36.0	40.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	31	17	34.0	38.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 3	47	1	2.0	6.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	40	9	18.0	20.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	3	6.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	49	1	2.0	2.0	0	0.0

Tabelas 4 e 5 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B.glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo

Semana 3						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	12	18	36.0	76.0	8	66.7
Grupo 1 , subgrupo 2	25	6	12.0	50.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 3	46	1	2.0	8.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	49	0	0.0	2.0	0	0.0

Semana 4						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	10	2	4.0	80.0	8	80.0
Grupo 1 , subgrupo 2	24	1	2.0	52.0	5	20.8
Grupo 1 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	43	3	6.0	14.0	6	13.9
Grupo 4 , subgrupo 2	48	1	2.0	4.0	0	0.0

Tabelas 6 e 7 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo

Semana 5						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	8	2	4.0	84.0	7	87.5
Grupo 1 , subgrupo 2	20	4	8.0	60.0	18	90.0
Grupo 1 , subgrupo 3	42	4	8.0	16.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	39	1	2.0	22.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	42	1	2.0	16.0	10	23,8
Grupo 4 , subgrupo 2	47	1	2.0	6.0	0	0.0

Semana 6						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	2	6	12.0	96.0	1	50.0
Grupo 1 , subgrupo 2	12	8	16.0	76.0	9	75.0
Grupo 1 , subgrupo 3	41	1	2.0	18.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	39	0	0.0	22.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	40	2	4.0	20.0	14	35.0
Grupo 4 , subgrupo 2	46	1	2.0	8.0	0	0.0

Tabelas 8 e 9 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não por hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 7						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	2	0	0.0	96.0	1	50.0
Grupo 1 , subgrupo 2	5	7	14.0	90.0	4	80.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	1	2.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	37	2	4.0	26.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	36	4	8.0	28.0	27	75.0
Grupo 4 , subgrupo 2	45	1	2.0	10.0	0	0.0

Semana 8						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrup 1	0	2	4.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	5	0	0.0	90.0	3	60.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	36	1	2.0	28.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	30	6	12.0	40.0	23	76.6
Grupo 4 , subgrupo 2	44	1	2.0	12.0	0	0.0

Tabelas 10 e 11 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 9						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	0	0	0.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	5	0	0.0	90.0	3	60.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	36	1	2.0	28.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	28	2	4.0	44.0	22	78.5
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	0.0	12.0	0	0.0

Semana 10						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	0	0	0.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	5	0	0.0	90.0	3	60.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	36	1	2.0	28.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	28	0	0.0	44.0	20	71.4
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	0.0	12.0	0	0.0

Tabelas 12 e 13 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 11						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	0	0	0.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	0	0	10.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	36	1	2.0	28.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	26	2	4.0	48.0	18	69.2
Grupo 4 , subgrupo 2	43	1	2.0	14.0	0	0.0

Semana 12						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 1 , subgrupo 1	0	0	0.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 2	0	0	0.0	100.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 3	40	0	0.0	20.0	0	0.0
Grupo 1 , subgrupo 4	36	1	2.0	28.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	23	3	6.0	54.0	14	60.8
Grupo 4 , subgrupo 2	43	0	0.0	14.0	0	0.0

Tabelas 14 e 15 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 1						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 3	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	49	1	2.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0

Semana 2						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 3	49	2	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	3	6.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	49	1	2.0	2.0	0	0.0

Tabela 16 e 17 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 3						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 2	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 3	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0

Semana 4						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 2	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 3	48	1	2.0	4.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	48	2	4.0	4.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	43	3	6.0	14.0	6	13.9
Grupo 4 , subgrupo 2	48	1	2.0	4.0	0	0.0

Tabela 18 e 19 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 5						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	45	5	10.0	10.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 2	46	3	6.0	8.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 3	48	0	0.0	4.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	47	1	2.0	6.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	42	1	2.0	16.0	10	23.8
Grupo 4 , subgrupo 2	47	1	2.0	6.0	0	0.0

Semana 6						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	44	1	2.0	12.0	11	25.0
Grupo 2 , subgrupo 2	46	0	0.0	8.0	2	4.3
Grupo 2 , subgrupo 3	48	0	0.0	4.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	47	0	0.0	6.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	40	2	4.0	20.0	14	35.0
Grupo 4 , subgrupo 2	46	1	2.0	8.0	0	0.0

Tabela 20 e 21 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 7						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	38	6	12.0	24.0	33	86.8
Grupo 2 , subgrupo 2	46	0	0.0	8.0	22	47.8
Grupo 2 , subgrupo 3	48	0	0.0	4.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	47	0	0.0	6.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	36	4	8.0	28.0	27	75.0
Grupo 4 , subgrupo2	45	1	2.0	10.0	0	0.0

Semana 8						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	29	9	18.0	42.0	25	86.2
Grupo 2 , subgrupo 2	37	9	18.0	26.0	26	70.2
Grupo 2 , subgrupo 3	46	2	4.0	8.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	44	3	6.0	12.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	30	6	12.0	40.0	23	76.6
Grupo 4 , subgrupo 2	44	1	2.0	12.0	0	0.0

Tabelas 22 e 23 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 9						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	19	10	20.0	62.0	16	84.2
Grupo 2 , subgrupo 2	19	18	36.0	62.0	13	68.4
Grupo 2 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	42	2	4.0	16.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	28	2	4.0	44.0	22	78.5
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	12.0	4.0	0	0.0

Semana 10						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	17	2	4.0	66.0	15	88.2
Grupo 2 , subgrupo 2	10	9	18.0	80.0	4	40.0
Grupo 2 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	41	1	2.0	18.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	28	0	0.0	44.0	20	71.4
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	0.0	12.0	0	0.0

Tabelas 24 e 25 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 11						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	8	9	18.0	84.0	6	75.0
Grupo 2 , subgrupo 2	10	0	0.0	80.0	4	40.0
Grupo 2 , subgrupo 3	46	2	4.0	8.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	40	1	2.0	20.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	26	2	4.0	48.0	18	69.2
Grupo 4 , subgrupo 2	43	1	2.0	14.0	0	0.0

Semana 12						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 2 , subgrupo 1	6	2	4.0	88.0	4	66.6
Grupo 2 , subgrupo 2	7	3	6.0	86.0	1	14.2
Grupo 2 , subgrupo 3	44	2	4.0	12.0	0	0.0
Grupo 2 , subgrupo 4	39	1	2.0	22.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	23	3	6.0	54.0	14	60.8
Grupo 4 , subgrupo 2	43	0	0.0	14.0	0	0.0

Tabelas 26 e 27 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 1						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3, subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3, subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	47	3	6.0	6.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0

Semana 2						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	47	0	0.0	6.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	3	6.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	49	1	2.0	2.0	0	0.0

Tabelas 28 e 29 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 3						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	46	1	2.0	8.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 2	49	0	0.0	2.0	0	0.0

Semana 4						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	43	3	6.0	14.0	6	13.9
Grupo 4 , subgrupo 2	48	1	2.0	4.0	0	0.0

Tabelas 30 e 31 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 5						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	1	2.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	42	1	2.0	16.0	10	23.8
Grupo 4 , subgrupo 2	47	1	2.0	6.0	0	0.0

Semana 6						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	50	0	0.0	0.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	46	0	0.0	8.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	40	2	4.0	20.0	14	35.0
Grupo 4 , subgrupo 2	46	1	2.0	8.0	0	0.0

Tabelas 32 e 33 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 7						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	48	2	4.0	4.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 2	47	3	6.0	6.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 3	44	2	4.0	12.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	36	4	8.0	28.0	27	75.0
Grupo 4 , subgrupo 2	45	1	2.0	10.0	0	0.0

Semana 8						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	45	3	6.0	10.0	33	73.3
Grupo 3 , subgrupo 2	45	2	4.0	10.0	4	8.8
Grupo 3 , subgrupo 3	44	0	0.0	12.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	30	6	12.0	40.0	23	76.6
Grupo 4 , subgrupo 2	44	1	2.0	12.0	0	0.0

Tabelas 34 e 35 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 9						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	39	6	12.0	22.0	33	84.6
Grupo 3 , subgrupo 2	44	1	2.0	12.0	4	9.10
Grupo 3 , subgrupo 3	42	2	4.0	16.0	0	0.00
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.00
Grupo 4 , subgrupo 1	28	2	4.0	44.0	22	78.5
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	0.0	12.0	0	0.00

Semana 10						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	28	11	22.0	44.0	18	64.2
Grupo 3 , subgrupo 2	36	8	16.0	28.0	24	66.6
Grupo 3 , subgrupo 3	42	0	0.0	16.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	28	0	0.0	44.0	20	71.4
Grupo 4 , subgrupo 2	44	0	0.0	12.0	0	0.0

Tabelas 36 e 37 - Dados semanais da taxa de mortalidade e infecção de *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas ou não ao trematódeo.

Semana 11						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	25	3	6.0	50.0	16	64.0
Grupo 3 , subgrupo 2	34	2	4.0	32.0	22	64.7
Grupo 3 , subgrupo 3	42	0	0.0	16.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	26	2	4.0	48.0	18	69.2
Grupo 4 , subgrupo 2	43	1	2.0	14.0	0	0.0

Semana 12						
	Vivos	Mortos	Taxa de Mortalidade		Eliminando cercárias	Taxa de infecção
			No período	Acumulada		
Grupo 3 , subgrupo 1	25	0	0.0	50.0	16	64.0
Grupo 3 , subgrupo 2	32	2	4.0	36.0	20	62.5
Grupo 3 , subgrupo 3	42	0	0.0	16.0	0	0.0
Grupo 3 , subgrupo 4	49	0	0.0	2.0	0	0.0
Grupo 4 , subgrupo 1	23	3	4.0	48.0	14	60.8
Grupo 4 , subgrupo 2	43	0	0.0	14.0	0	0.0

Tabela 38 - Número médio de larvas de *Schistosoma mansoni* observadas em *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa total de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas a 100 miracídios.

Horas	30 minutos	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Degenerados
Grupo1, subgrupo1	21.5	22.5	7	7	10	1
Grupo1, subgrupo2	31	15.5	32	3.5	23.5	3
Grupo4, subgrupo1	26	3.5	11.5	1.5	14	0

Tabela 39 - Número médio de larvas de *Schistosoma mansoni* observadas em *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com hemolinfa livre de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas a 100 miracídios.

Horas	30 minutos	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Degenerados
Grupo2, subgrupo1	23	27.5	11.5	4	13	2.5
Grupo2, subgrupo2	20.5	17.5	11.5	11.5	12.5	0
Grupo4, subgrupo1	26	3.5	11.5	1.5	6.5	0

Tabela - 40 Número médio de larvas de *Schistosoma mansoni* observadas em *B. glabrata* melânica inoculadas ou não com suspensão de células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* e posteriormente expostas a 100 miracídios.

Horas	30 minutos	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Íntegros	Degenerados
Grupo3, subgrupo1	11	24.5	5.5	5.5	9	1
Grupo3, subgrupo2	13	4	30.5	13.5	5	1
Grupo4, subgrupo1	26	3.5	11.5	11.5	6.5	0

Grupo 4, Subgrupo1 (controle infectado).

Tabelas 41 a 44 - Índice de fagocitose de granulócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total de molusco infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

Grupo 1, subgrupo 1				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	28.5	38.0	33.25	4.75
12	26.5	27.5	25.75	0.75
24	20.0	43.5	31.75	11.7
48	13.0	18.0	15.50	2.50
72	24.5	34.5	29.50	5.00

Grupo 1, subgrupo 2				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	35.0	35.0	35.00	0.00
12	33.0	32.5	32.75	0.25
24	27.5	20.5	24.00	3.50
48	27.0	28.0	27.50	0.50
72	48.0	23.0	35.50	12.5

Grupo 1, subgrupo 3				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	55.0	61.0	58.00	3.00
12	53.0	54.0	53.50	0.50
24	21.5	26.0	23.75	2.25
48	18.0	15.5	16.75	1.25
72	19.5	18.0	18.75	0.75

Grupo 1, subgrupo 4				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	30.0	26.5	28.25	1.75
12	41.5	23.5	32.50	9.00
24	25.5	15.0	20.25	5.25
48	37.0	19.5	28.25	8.75
72	38.0	22.0	30.00	8.00

Tabelas 45 a 48 - Índice de fagocitose de granulócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa livre de células de molusco infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

Grupo 2, subgrupo 1				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	43.5	36.5	40.00	3.50
12	8.5	23.0	15.75	7.25
24	27.5	26.0	26.75	0.75
48	24.0	21.0	22.50	1.50
72	44.6	38.4	41.26	2.80

Grupo 2 subgrupo 2				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	42.25	43.66	42.95	0.70
12	14.50	18.50	16.50	2.00
24	29.00	33.00	31.00	2.00
48	36.00	43.00	39.50	3.50
72	14.50	18.00	16.25	1.75

Grupo 2, subgrupo 3				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	25.00	21.00	32.00	2.00
12	49.50	32.50	41.00	8.50
24	39.00	39.50	39.25	0.25
48	20.00	21.00	20.50	0.05
72	20.00	32.50	26.25	6.25

Grupo 2, subgrupo 4				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	36.50	57.00	46.75	10.25
12	30.50	31.50	31.00	0.50
24	20.50	14.00	17.25	3.25
48	24.50	33.00	28.75	4.25
72	34.50	29.50	32.00	2.50

Tabelas 49 a 52 - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células de molusco infectado ou sadio e infectado posteriormente, frente a eritrócitos de carneiro.

Grupo 3, subgrupo 1				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	60.0	90.0	75.00	15.0
12	43.0	40.0	41.50	1.50
24	70.5	72.5	71.50	1.00
48	45.0	68.5	56.75	11.7
72	60.0	55.0	57.75	2.25

Grupo 3, subgrupo 2				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	60.0	52.5	56.25	3.75
12	31.5	30.5	31.00	0.50
24	69.0	68.5	68.75	0.25
48	44.0	55.0	49.50	5.50
72	55.0	55.5	55.25	0.25

Grupo 3, subgrupo 3				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	40.0	41.0	40.50	0.50
12	36.0	75.0	55.50	19.5
24	61.0	40.0	50.50	10.5
48	37.0	15.0	26.00	11.0
72	48.0	42.5	45.25	2.75

Grupo 3, subgrupo 4				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	36.5	40.0	38.25	1.75
12	40.0	41.0	40.50	0.50
24	42.0	31.0	36.50	5.50
48	47.5	46.0	46.75	0.75
72	55.5	58.5	57.00	1.50

Tabela 53 - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* melânica infectada, frente a eritrócitos de carneiro.

Grupo 4, subgrupo 1				
Horas	Lâmina 1	Lâmina 2	Média	Desvio-padrão
30'	25.00	21.00	23.00	2.00
12	9.00	15.00	12.00	3.00
24	18.50	32.50	25.50	7.00
48	23.30	22.00	22.65	0.65
72	25.00	13.50	19.25	5.75

Tabela 54 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos não estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total

	G1, s1		G1, s2		G1, s3		G1, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	3.1	1.9	3.1	1.9	3.1	1.9	3.1	1.9	7.2	3.3
0,5	8.8	5.9	10.2	17.0	11.6	8.7	3.3	2.2	23.1	11.2
2	7.5	6.6	14.2	14.1	2.5	1.4	3.3	2.5	15.0	5.6
4	2.3	1.4	7.1	4.3	2.0	1.2	6.0	4.7	17.0	10,1
6	6.0	5.5	2.3	1.8	10.9	5.9	6.6	3.1	5.0	2.4
8	12.9	10.1	5.8	3.4	10.1	7.6	4.4	2.5	8.0	5.1
10	15.3	11.4	8.5	3.6	10.2	6.8	3.9	2.9	8.9	3.8
12	8.0	4.0	4.0	2.8	10.6	12.6	3.4	3.3	4.0	1.9
24	9.7	8.3	6.4	4.5	16.7	9.3	13.3	18.5	4.3	3.9
48	2.4	1.8	5.7	4.5	16.8	10.4	8.7	5.2	7.1	1.6
72	6.9	3.7	6.2	2.2	8.3	9.4	8.9	9.1	10.9	4.2

Tabela 55 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa total.

	G1, s1		G1, s2		G1, s3		G1, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	2.4	1.7	2.4	1.7	2.4	1.7	2.4	1.7	25.6	24.1
0,5	13.1	9.6	10.2	11.2	29.9	41.2	18.1	16.8	46.2	27.7
2	13.5	12.1	17.6	13.2	23.6	11.8	17.3	9.7	36.5	28.8
4	3.8	3.2	11.1	6.5	15.4	9.3	26.0	18.6	18.1	13.9
6	3.0	2.5	3.6	2.3	4.8	2.7	6.7	4.7	13.1	7.4
8	5.7	4.5	4.0	3.4	6.8	3.4	3.6	2.4	12.7	9.3
10	4.2	4.3	13.9	11.0	32.2	26.2	8.2	3.6	18.1	21.4
12	17.0	12.0	13.6	9.1	10.4	8.9	12.6	7.9	12.5	12.6
24	20.7	19.5	24.7	18.0	24.0	13.9	8.8	6.2	11.4	5.6
48	5.3	3.7	8.1	4.6	12.4	10.4	13.5	4.4	17.8	7.0
72	6.9	3.7	15.6	8.2	5.1	3.3	6.4	6.0	4.0	4.2

Tabela 56 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos não estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa sem células

	G2, s1		G2, s2		G2, s3		G2, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	5.0	3.0	5.0	3.0	5.0	3.0	5.0	3.0	7.2	3.3
0,5	7.3	3.3	3.8	1.9	5.3	3.6	10.0	7.4	23.1	11.2
2	5.7	3.8	5.3	3.2	12.7	9.5	7.1	4.3	15.0	5.6
4	10.6	5.4	5.1	3.4	10.8	15.3	8.2	4.1	17.0	10.1
6	7.0	3.4	12.9	12.3	8.4	6.7	6.0	4.9	5.0	2.4
8	16.7	7.7	11.3	5.3	7.4	3.7	8.8	5.1	8.0	5.1
10	12.5	6.9	10.8	4.8	6.4	3.2	7.4	4.0	8.9	3.8
12	10.6	6.6	7.2	6.3	10.6	7.3	10.7	9.5	4.0	1.9
24	7.8	3.1	4.3	3.1	10.2	7.5	5.3	2.8	4.3	3.9
48	8.6	5.3	7.1	3.4	10.0	7.1	4.2	3.2	7.1	1.6
72	6.9	3.9	3.3	1.4	3.2	1.8	4.3	3.2	10.9	4.2

Tabela 57 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com hemolinfa sem células

	G2, s1		G2, s2		G2, s3		G2, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	7.8	6.6	7.8	6.6	7.8	6.6	7.8	6.6	25.6	24.2
0,5	17.8	15.9	15.5	22.8	13.9	20.5	24.6	29.4	46.2	27.7
2	16.7	17.2	6.5	6.0	22.5	17.6	21.7	23.1	36.5	28.8
4	35.3	26.9	15.6	13.8	12.0	5.1	19.1	15.6	18.1	13.9
6	31.7	20.2	17.1	11.3	22.9	16.7	10.4	4.7	13.1	7.4
8	24.8	30.0	15.9	18.6	21.0	21.9	13.3	9.9	12.7	9.3
10	10.6	8.9	6.0	4.8	16.5	12.6	17.3	15.9	18.1	21.4
12	24.2	34.9	16.1	24.7	15.1	13.7	34.6	35.8	12.5	12.6
24	16.9	32.7	14.6	7.1	17.4	9.6	19.3	10.2	11.4	5.6
48	11.3	7.3	16.5	11.6	11.5	11.1	9.9	5.6	17.8	7.0
72	20.0	20.9	9.0	4.8	12.4	12.2	7.8	6.6	4.0	4.2

Tabela 58 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos não estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células

	G3, s1		G3, s2		G3, s3		G3, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	7.2	3.4	7.2	3.4	7.2	3.4	7.2	3.4	7.2	3.3
0,5	7.3	3.5	7.0	3.3	7.7	7.1	7.8	5.0	23.1	11.2
2	7.7	7.4	4.4	2.3	16.9	12.2	5.5	2.4	15.0	5.6
4	10.0	6.4	6.3	6.1	7.6	5.2	18.1	4.5	17.0	10.1
6	5.7	5.0	4.3	2.5	9.5	5.6	11.9	5.5	5.0	2.41
8	7.9	9.1	9.3	5.6	8.9	2.8	11.5	9.6	8.0	5.16
10	5.1	3.2	3.1	1.9	14.3	25.2	14.5	5.6	8.9	3.81
12	9.2	7.8	9.4	5.5	9.9	5.4	14.2	8.6	4.0	1.9
24	5.0	2.4	7.9	4.3	7.3	4.3	11.9	6.8	4.3	3.9
48	9.7	6.6	6.1	4.3	5.8	3.4	8.1	3.8	7.1	1.6
72	6.6	5.7	5.0	2.4	7.5	4.9	6.2	3.5	10.9	4.2

Tabela 59 - Número médio ($0,1/\text{mm}^3$) de amebócitos estrelados em *B. glabrata* melânica inoculada com suspensão de células

	G3, s1		G3, s2		G3, s3		G3, s4		G4, s1	
Horas	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0	25.6	24.2	25.6	24.2	25.6	24.1	25.6	24.2	25.6	24.1
0,5	15.2	17.0	15.7	10.4	38.8	22.5	15.9	15.4	46.2	27.7
2	19.5	28.0	10.0	7.7	34.2	32.7	18.2	15.0	36.5	28.8
4	26.0	18.0	23.6	16.2	32.7	36.5	27.7	15.0	18.1	13.9
6	21.7	14.7	36.3	22.2	21.7	20.1	31.6	26.2	13.1	7.4
8	15.4	10.3	13.5	7.9	22.2	17.2	20.9	19.2	12.7	9.3
10	15.1	11.8	22.7	17.8	20.7	13.0	29.7	16.2	18.1	21.4
12	34.0	23.4	23.3	11.5	17.0	13.2	48.9	52.3	12.5	12.6
24	16.9	13.2	26.6	26.4	25.0	13.2	11.9	6.8	11.4	5.6
48	24.6	22.7	26.6	22.7	16.5	9.4	18.3	10.8	17.8	7.1
72	23.7	21.3	20.1	17.4	14.2	8.2	11.0	7.4	4.0	4.2

Anexo II - Estatístico
Tabelas-resumo do SAS

Análise da infecção

The SAS System

CATMOD PROCEDURE

Response: INF	Response Levels (R)=	2
Weight Variable: FREQ	Populations (S)=	6
Data Set: SOBR	Total Frequency (N)=	600
Frequency Missing: 0	Observations (Obs)=	24

POPULATION PROFILES

Sample	HEMOL	ORIGEM	Sample Size
1	C	I	100
2	C	I*	100
3	S	I	100
4	S	I*	100
5	T	I	100
6	T	I*	100

RESPONSE PROFILES

Response	INF
1	N
2	S

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS

Iteration	Sub Iteration	-2 Log Likelihood	Convergence Criterion	Parameter Estimates	
				1	2
0	0	831.77662	1.0000	0	0
1	0	800.87478	0.0372	0.0467	0.0733
2	0	800.78471	0.000112	0.0549	0.0660
3	0	800.78469	1.908E-8	0.0551	0.0658
4	0	800.78469	4.259E-16	0.0551	0.0658

The SAS System

Iteration	Parameter Estimates			
	3	4	5	6
0	0	0	0	0
1	-0.3867	0.0467	-0.2067	-0.2667
2	-0.4027	0.0545	-0.2154	-0.2821
3	-0.4028	0.0546	-0.2155	-0.2822
4	-0.4028	0.0546	-0.2155	-0.2822

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.43	0.5122
HEMOL	2	13.03	0.0015
ORIGEM	1	0.42	0.5157
HEMOL*ORIGEM	2	17.11	0.0002
LIKELIHOOD RATIO	0	.	.

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.0551	0.0840	0.43	0.5122
HEMOL	2	0.0658	0.1175	0.31	0.5751
	3	-0.4028	0.1184	11.57	0.0007
ORIGEM	4	0.0546	0.0840	0.42	0.5157
HEMOL*ORIGEM	5	-0.2155	0.1175	3.37	0.0665
	6	-0.2822	0.1184	5.68	0.0172

The SAS System

----- ORIGEM=I -----

CATMOD PROCEDURE

Response: INF	Response Levels (R)=	2
Weight Variable: FREQ	Populations (S)=	3
Data Set: SOBR	Total Frequency (N)=	300
Frequency Missing: 0	Observations (Obs)=	12

POPULATION PROFILES

Sample	HEMOL	Sample Size
1	C	100
2	S	100
3	T	100

RESPONSE PROFILES

Response INF

1	N
2	S

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS

Iteration	Sub Iteration	-2 Log Likelihood	Convergence Criterion
0	0	415.88831	1.0000
1	0	387.95374	0.0672
2	0	387.86375	0.000232
3	0	387.86374	3.9394E-8
4	0	387.86374	1.466E-15

The SAS System

----- ORIGEM=I -----

Iteration	Parameter Estimates		
	1	2	3
0	0	0	0
1	0.0933	-0.1333	-0.6533
2	0.1094	-0.1494	-0.6847
3	0.1097	-0.1497	-0.6851
4	0.1097	-0.1497	-0.6851

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.81	0.3669
HEMOL	2	25.31	0.0000
LIKELIHOOD RATIO	0	.	.

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.1097	0.1216	0.81	0.3669
HEMOL	2	-0.1497	0.1677	0.80	0.3720
	3	-0.6851	0.1710	16.05	0.0001

CONTRASTS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Contrast	DF	Chi-Square	Prob
C vs S	1	3.44	0.0638
C vs T	1	0.80	0.3720
S vs T	1	16.05	0.0001

The SAS System

----- ORIGEM=I* -----

CATMOD PROCEDURE

Response: INF	Response Levels (R)=	2
Weight Variable: FREQ	Populations (S)=	3
Data Set: SOBR	Total Frequency (N)=	300
Frequency Missing: 0	Observations (Obs)=	12

POPULATION PROFILES

Sample	HEMOL	Sample Size
1	C	100
2	S	100
3	T	100

RESPONSE PROFILES

Response	INF
1	N
2	S

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS

Iteration	Sub Iteration	-2 Log Likelihood	Convergence Criterion
0	0	415.88831	1.0000
1	0	412.92104	0.007135
2	0	412.92095	2.1174E-7
3	0	412.92095	3.579E-15

The SAS System

----- ORIGEM=I* -----

Iteration	Parameter Estimates		
	1	2	3
0	0	0	0
1	-7.99E-17	0.2800	-0.1200
2	0.000455	0.2814	-0.1206
3	0.000455	0.2814	-0.1206

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.00	0.9969
HEMOL	2	2.95	0.2293
LIKELIHOOD RATIO	0	.	.

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.000455	0.1160	0.00	0.9969
HEMOL	2	0.2814	0.1645	2.93	0.0872
	3	-0.1206	0.1639	0.54	0.4617

CONTRASTS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Contrast	DF	Chi-Square	Prob
C vs S	1	2.00	0.1577
C vs T	1	2.93	0.0872
S vs T	1	0.54	0.4617

Análise da mortalidade

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
 HEMOL = C ORIGEM = I INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
1.0000	0.9400	0.0600	0.0336	3	47	3
3.0000	0.9200	0.0800	0.0384	4	46	1
7.0000	0.8800	0.1200	0.0460	6	44	2
9.0000	0.8400	0.1600	0.0518	8	42	2
12.0000*	.	.	.	8	0	42

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	9.0000	.
Mean	8.3200	Standard Error	0.3120

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = C ORIGEM = I INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
7.0000	0.9600	0.0400	0.0277	2	48	2
8.0000	0.9000	0.1000	0.0424	5	45	3
9.0000	0.7800	0.2200	0.0586	11	39	6
10.0000	0.5600	0.4400	0.0702	22	28	11
11.0000	0.5000	0.5000	0.0707	25	25	3
12.0000*	.	.	.	25	0	25

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	10.0000	.
25%	10.0000	9.0000	10.0000
Mean	10.2000	Standard Error	0.1607

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
 HEMOL = C ORIGEM = I* INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
4.0000	0.9800	0.0200	0.0198	1	49	1
12.0000*	.	.	.	1	0	49

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	.	.
Mean	4.0000	Standard Error	.

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
 HEMOL = C ORIGEM = I* INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	48	0
7.0000	0.9375	0.0625	0.0349	3	45	3
8.0000	0.8958	0.1042	0.0441	5	43	2
9.0000	0.8750	0.1250	0.0477	6	42	1
10.0000	0.7083	0.2917	0.0656	14	34	8
11.0000	0.6667	0.3333	0.0680	16	32	2
12.0000*	.	.	.	16	0	32

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper]	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	10.0000	10.0000	.
Mean	10.4167	Standard Error	0.1690

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
 HEMOL = S ORIGEM = I INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	48	0
2.0000	0.9792	0.0208	0.0206	1	47	1
4.0000	0.9583	0.0417	0.0288	2	46	1
8.0000	0.9167	0.0833	0.0399	4	44	2
12.0000*	.	.	.	4	0	44

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	.	.
Mean	7.7917	Standard Error	0.1700

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
 HEMOL = S ORIGEM = I INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	48	0
5.0000	0.8958	0.1042	0.0441	5	43	5
6.0000	0.8750	0.1250	0.0477	6	42	1
7.0000	0.7500	0.2500	0.0625	12	36	6
8.0000	0.5625	0.4375	0.0716	21	27	9
9.0000	0.3542	0.6458	0.0690	31	17	10
10.0000	0.3125	0.6875	0.0669	33	15	2
11.0000	0.1250	0.8750	0.0477	42	6	9
12.0000*	.	.	.	42	0	6

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	11.0000	9.0000	11.0000
50%	9.0000	8.0000	9.0000
25%	7.5000	7.0000	8.0000
Mean	8.7500	Standard Error	0.2837

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = S ORIGEM = I* INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	49	0
4.0000	0.9592	0.0408	0.0283	2	47	2
5.0000	0.9388	0.0612	0.0342	3	46	1
8.0000	0.8776	0.1224	0.0468	6	43	3
9.0000	0.8367	0.1633	0.0528	8	41	2
10.0000	0.8163	0.1837	0.0553	9	40	1
11.0000	0.7959	0.2041	0.0576	10	39	1
12.0000*	.	.	.	10	0	39

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	9.0000	.
Mean	10.3061	Standard Error	0.2603

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais
The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates
HEMOL = S ORIGEM = I* INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	47	0
3.0000	0.9787	0.0213	0.0210	1	46	1
5.0000	0.9149	0.0851	0.0407	4	43	3
8.0000	0.7234	0.2766	0.0652	13	34	9
9.0000	0.3404	0.6596	0.0691	31	16	18
10.0000	0.1489	0.8511	0.0519	40	7	9
12.0000*	.	.	.	40	0	7

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper]	
75%	10.0000	9.0000	.
50%	9.0000	.	.
25%	8.0000	8.0000	9.0000
Mean	8.7660	Standard Error	0.2223

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = T ORIGEM = I INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
1.0000	0.9600	0.0400	0.0277	2	48	2
2.0000	0.9400	0.0600	0.0336	3	47	1
3.0000	0.9200	0.0800	0.0384	4	46	1
5.0000	0.8400	0.1600	0.0518	8	42	4
6.0000	0.8200	0.1800	0.0543	9	41	1
7.0000	0.8000	0.2000	0.0566	10	40	1
12.0000*	.	.	.	10	0	40

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	5.0000	.
Mean	6.4000	Standard Error	0.2231

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = T ORIGEM = I INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
1.0000	0.9600	0.0400	0.0277	2	48	2
2.0000	0.6000	0.4000	0.0693	20	30	18
3.0000	0.2400	0.7600	0.0604	38	12	18
4.0000	0.2000	0.8000	0.0566	40	10	2
5.0000	0.1600	0.8400	0.0518	42	8	2
6.0000	0.0400	0.9600	0.0277	48	2	6
8.0000	0	1.0000	0	50	0	2

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	3.0000	3.0000	6.0000
50%	3.0000	2.0000	3.0000
25%	2.0000	.	.
Mean	3.2400	Standard Error	0.2366

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = T ORIGEM = I* INFECCAO = N

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0
1.0000	0.9800	0.0200	0.0198	1	49	1
2.0000	0.8000	0.2000	0.0566	10	40	9
5.0000	0.7800	0.2200	0.0586	11	39	1
7.0000	0.7400	0.2600	0.0620	13	37	2
8.0000	0.7200	0.2800	0.0635	14	36	1
12.0000*	.	.	.	14	0	36

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	7.0000	2.0000	.
Mean	6.6800	Standard Error	0.3576

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

HEMOL = T ORIGEM = I* INFECCAO = S

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq	SEMANA	Survival	Fai
0.0000	1.0000	0	0	0	50	0			
1.0000	0.9600	0.0400	0.0277	2	48	2			
2.0000	0.6200	0.3800	0.0686	19	31	17			
3.0000	0.5000	0.5000	0.0707	25	25	6			
4.0000	0.4800	0.5200	0.0707	26	24	1			
5.0000	0.4000	0.6000	0.0693	30	20	4			
6.0000	0.2400	0.7600	0.0604	38	12	8			
7.0000	0.1000	0.9000	0.0424	45	5	7			
11.0000	0	1.0000	0	50	0	5			

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	6.0000	6.0000	7.0000
50%	3.5000	2.0000	6.0000
25%	2.0000	2.0000	3.0000
Mean	4.6000	Standard Error	0.4131

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values

Stratum	Total	Failed	Censored	%Censored
C	50	8	42	84.0000
B	50	25	25	50.0000
A	50	1	49	98.0000
D	48	16	32	66.6667
S	48	4	44	91.6667
F	48	42	6	12.5000
G	49	10	39	79.5918
H	47	40	7	14.8936
T	50	10	40	80.0000
J	50	50	0	0.0000
K	50	14	36	72.0000
L	50	50	0	0.0000
Total	590	270	320	54.2373

Legend for Strata Symbols

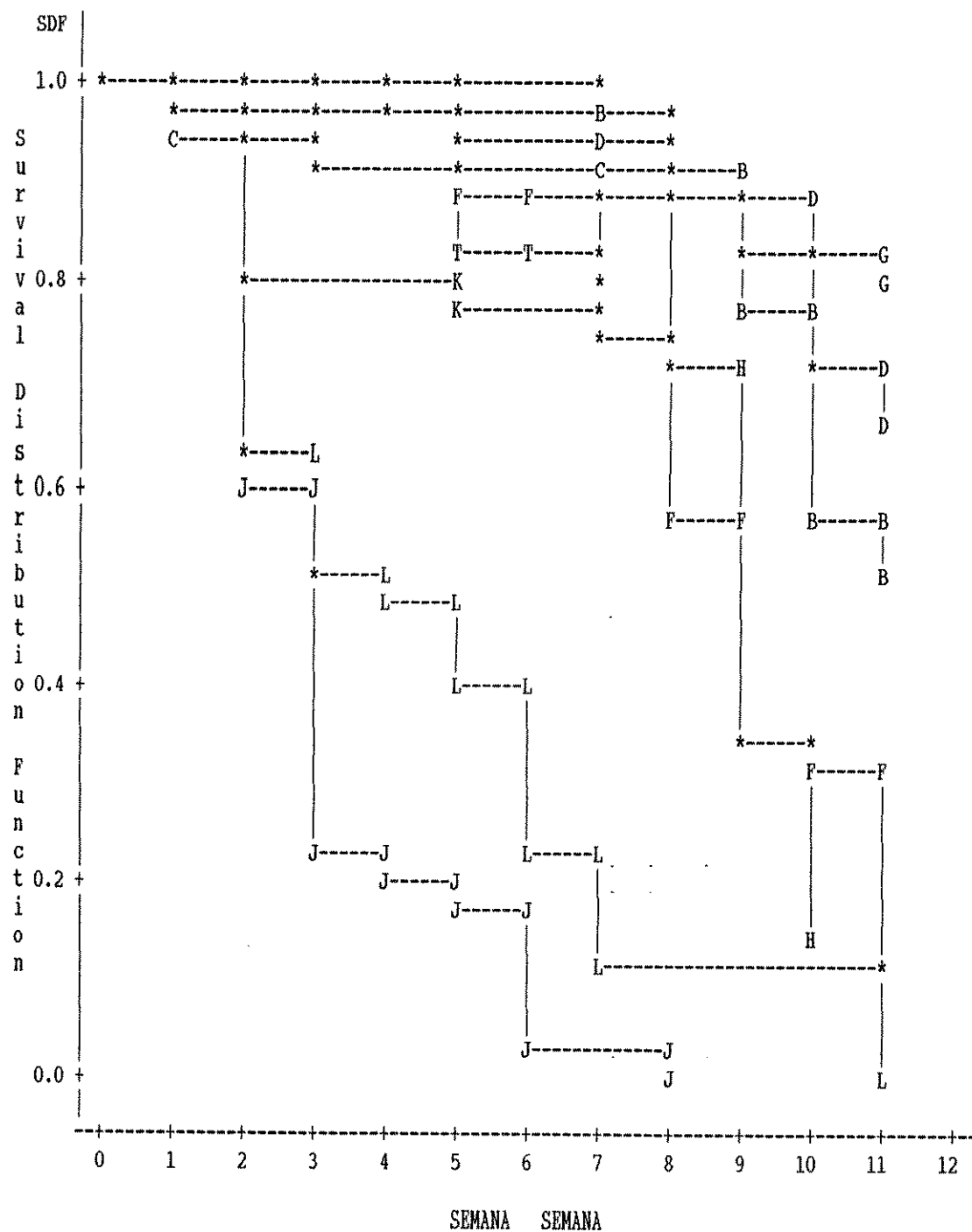
Symbol	HEMOL	ORIGEM	INFECCAO
C	C	I	N
B	C	I	S
A	C	I*	N
D	C	I*	S
S	S	I	N
F	S	I	S
G	S	I*	N
H	S	I*	S
T	T	I	N
J	T	I	S
K	T	I*	N
L	T	I*	S

NOTE: There were 72 observations with missing values, negative time values or frequency values less than 1.

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Survival Function Estimates



Dados Totais

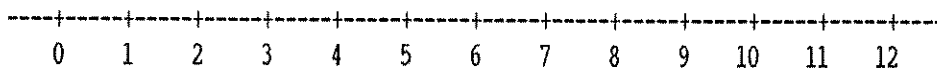
The LIFETEST Procedure

Censored Observations

Strata

L +
K +
J +
T +
H +
G +
F +
S +
D +
A +
B +
C +

K
T
H
G
F
S
D
A
B
C

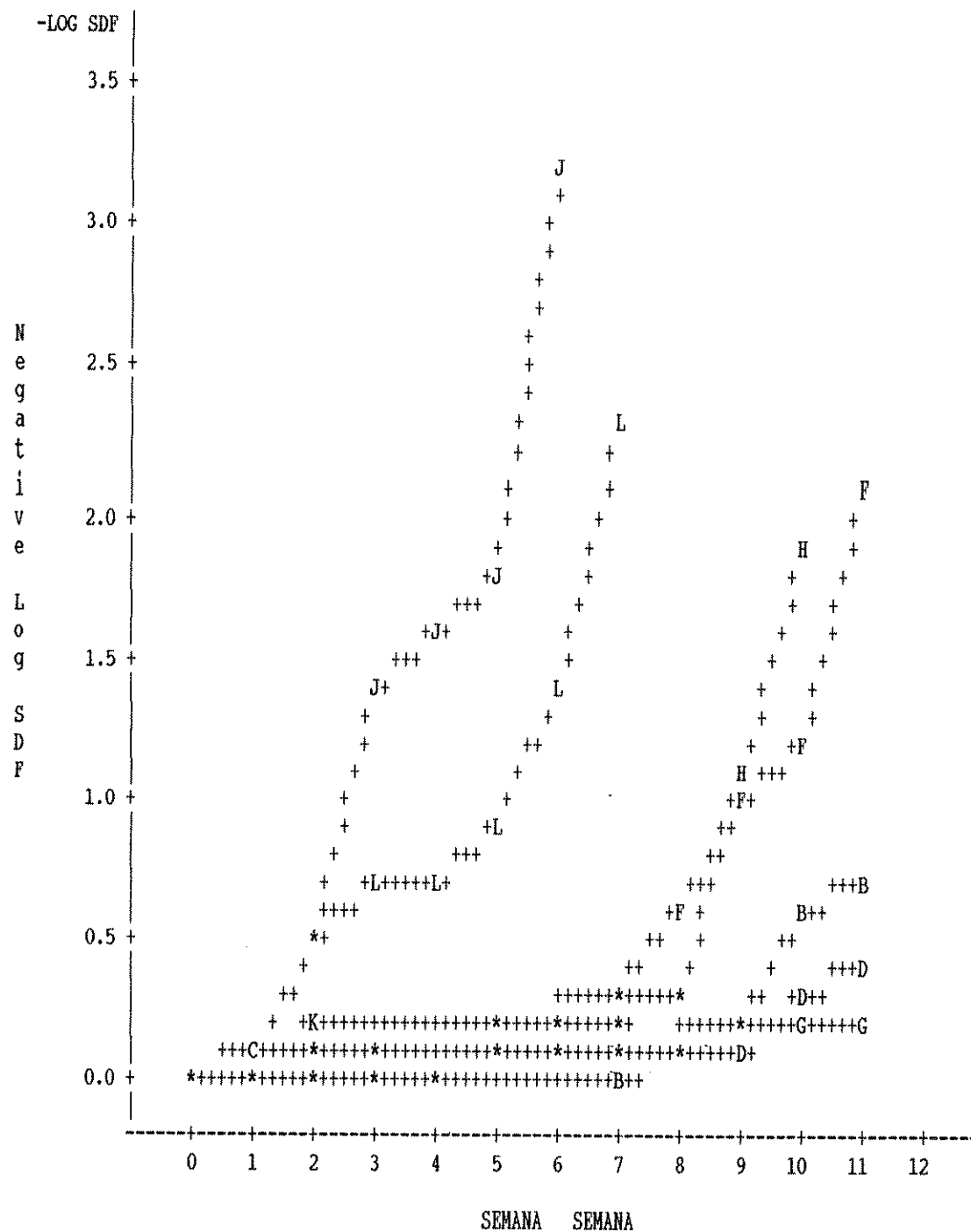


SEMANA SEMANA

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

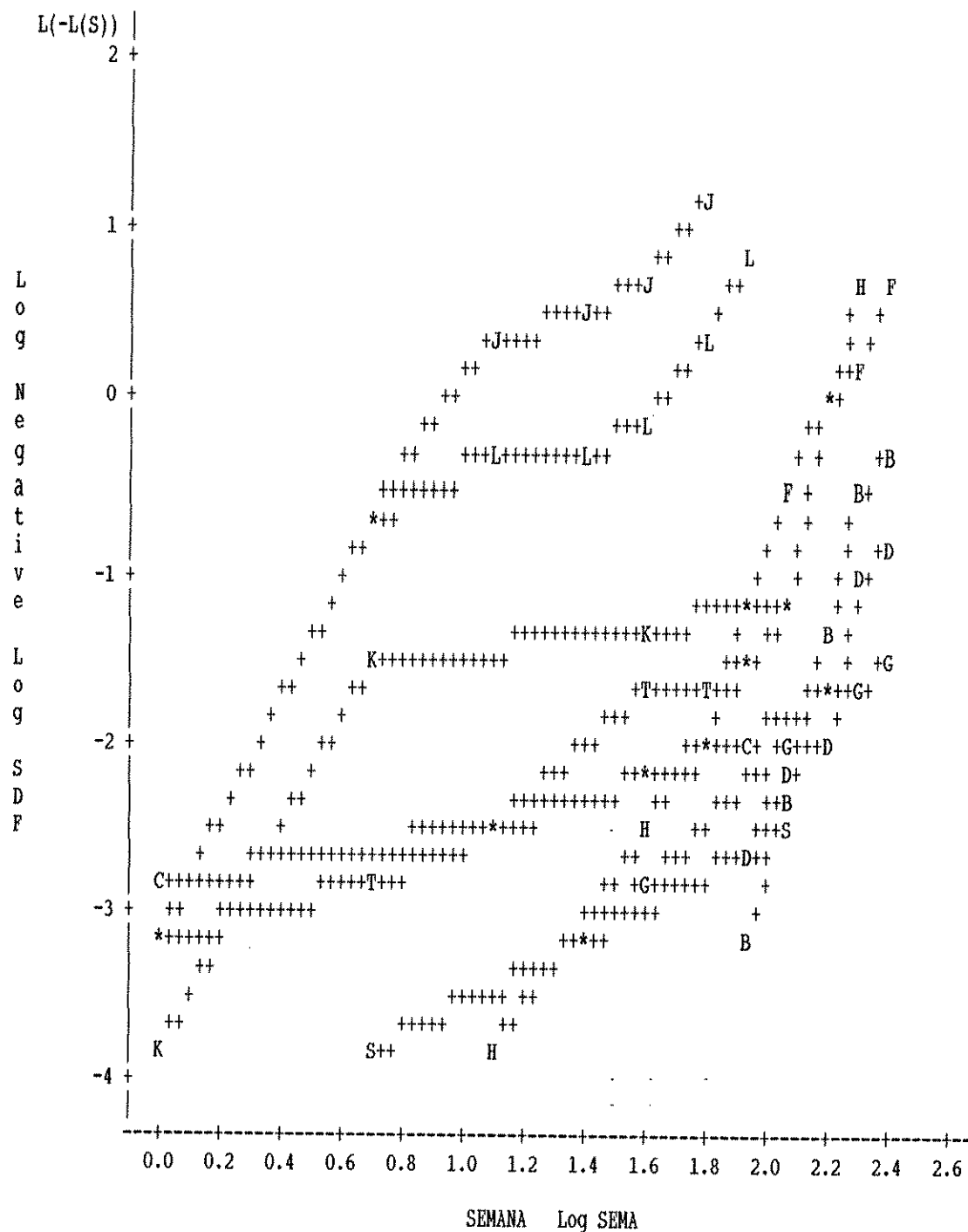
-Log(Survival Function) Estimates



Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Log(-Log(Survival Function)) Estimates



Dados Totais
The LIFETEST Procedure

Legend for Strata Symbols

Symbol	HEMOL	ORIGEM	INFECCAO
C	C	I	N
B	C	I	S
A	C	I*	N
D	C	I*	S
S	S	I	N
F	S	I	S
G	S	I*	N
H	S	I*	S
T	T	I	N
J	T	I	S
K	T	I*	N
L	T	I*	S

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Testing Homogeneity of Survival Curves over Strata
Time Variable SEMANA

Rank Statistics

Stratum	Log-Rank	Wilcoxon
C	-18.498	-8137
B	-1.737	-2650
A	-28.136	-12813
D	-10.372	-5874
S	-22.983	-10417
F	21.453	7705
G	-16.667	-7950
H	19.054	6607
T	-15.250	-6436
J	42.757	22970
K	-9.293	-3143
L	39.673	20138

Covariance Matrix for the Log-Rank Statistics

Stratum	C	B	A	D	S	F
C	22.3493	-2.4678	-2.7311	-2.4487	-2.5224	-1.8505
B	-2.4678	22.5493	-2.7140	-2.4642	-2.5122	-1.9125
A	-2.7311	-2.7140	24.2605	-2.6988	-2.7867	-2.0163
D	-2.4487	-2.4642	-2.6988	22.2735	-2.4952	-1.8625
S	-2.5224	-2.5122	-2.7867	-2.4952	22.6990	-1.8778
F	-1.8505	-1.9125	-2.0163	-1.8625	-1.8778	17.7710
G	-2.4814	-2.4835	-2.7372	-2.4602	-2.5298	-1.8741
H	-1.8811	-1.9665	-2.0478	-1.9027	-1.9073	-1.5856
T	-2.3497	-2.3436	-2.5926	-2.3260	-2.3957	-1.7676
J	-0.5797	-0.6145	-0.6132	-0.5896	-0.5838	-0.5830
K	-2.1598	-2.1571	-2.3812	-2.1392	-2.2019	-1.6336
L	-0.8772	-0.9135	-0.9416	-0.8865	-0.8862	-0.8075
Dados Totais				18:05		

The LIFETEST Procedure

Covariance Matrix for the Log-Rank Statistics

Stratum	G	H	T	J	K	L
C	-2.4814	-1.8811	-2.3497	-0.5797	-2.1598	-0.8772
B	-2.4835	-1.9665	-2.3436	-0.6145	-2.1571	-0.9135
A	-2.7372	-2.0478	-2.5926	-0.6132	-2.3812	-0.9416
D	-2.4602	-1.9027	-2.3260	-0.5896	-2.1392	-0.8865
S	-2.5298	-1.9073	-2.3957	-0.5838	-2.2019	-0.8862
F	-1.8741	-1.5856	-1.7676	-0.5830	-1.6336	-0.8075
G	22.4934	-1.9073	-2.3582	-0.5981	-2.1685	-0.8951
H	-1.9073	18.0152	-1.7905	-0.5729	-1.6551	-0.7985
T	-2.3582	-1.7905	21.4227	-0.5814	-2.0567	-0.8608
J	-0.5981	-0.5729	-0.5814	6.3614	-0.5590	-0.4863
K	-2.1685	-1.6551	-2.0567	-0.5590	19.9240	-0.8119
L	-0.8951	-0.7985	-0.8608	-0.4863	-0.8119	9.1651

Covariance Matrix for the Wilcoxon Statistics

Stratum	C	B	A	D	S	F
C	4899833	-530779	-564286	-518965	-525378	-428034
B	-530779	5049027	-577245	-535122	-538314	-448907
A	-564286	-577245	5266950	-565231	-573241	-462047
D	-518965	-535122	-565231	4930375	-526665	-433861
S	-525378	-538314	-573241	-526665	4959689	-433072
F	-428034	-448907	-462047	-433861	-433072	4238453
G	-523483	-538110	-570436	-525549	-531439	-436093
H	-435195	-458998	-469891	-442076	-440242	-388762
T	-496345	-509131	-540765	-497807	-503815	-413289
J	-179470	-189895	-189592	-182237	-180721	-180834
K	-460519	-472815	-501277	-462009	-467438	-385313
L	-237379	-249712	-252936	-240854	-239366	-228242

Dados Totais

The LIFETEST Procedure

Covariance Matrix for the Wilcoxon Statistics

Stratum	G	H	T	J	K	L
C	-523483	-435195	-496345	-179470	-460519	-237379
B	-538110	-458998	-509131	-189895	-472815	-249712
A	-570436	-469891	-540765	-189592	-501277	-252936
D	-525549	-442076	-497807	-182237	-462009	-240854
S	-531439	-440242	-503815	-180721	-467438	-239366
F	-436093	-388762	-413289	-180834	-385313	-228242
G	4965849	-443535	-502425	-185149	-466318	-243313
H	-443535	4290661	-418857	-177432	-390410	-225263
T	-502425	-418857	4741224	-180561	-443128	-235102
J	-185149	-177432	-180561	1977046	-174918	-156237
K	-466318	-390410	-443128	-174918	4448359	-224213
L	-243313	-225263	-235102	-156237	-224213	2532617

Legend for Strata Symbols

Symbol	HEMOL	ORIGEM	INFECCAO
C	C	I	N
B	C	I	S
A	C	I*	N
D	C	I*	S
S	S	I	N
F	S	I	S
G	S	I*	N
H	S	I*	S
T	T	I	N
J	T	I	S
K	T	I*	N
L	T	I*	S

Test of Equality over Strata

Test	Chi-Square	DF	Pr > Chi-Square
Log-Rank	606.1252	11	0.0001
Wilcoxon	539.9394	11	0.0001
-2Log(LR)	334.4920	11	0.0001

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

COMP = 1

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	100	0
1.0000	.	.	.	2	98	2
1.0000	0.9600	0.0400	0.0196	4	96	2
2.0000	.	.	.	22	78	18
2.0000	0.6100	0.3900	0.0488	39	61	17
3.0000	.	.	.	57	43	18
3.0000	0.3700	0.6300	0.0483	63	37	6
4.0000	.	.	.	65	35	2
4.0000	0.3400	0.6600	0.0474	66	34	1
5.0000	.	.	.	70	30	4
5.0000	0.2800	0.7200	0.0449	72	28	2
6.0000	.	.	.	80	20	8
6.0000	0.1400	0.8600	0.0347	86	14	6
7.0000	0.0700	0.9300	0.0255	93	7	7
8.0000	0.0500	0.9500	0.0218	95	5	2
11.0000	0	1.0000	0	100	0	5

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	6.0000	4.0000	6.0000
50%	3.0000	.	.
25%	2.0000	.	.

Mean 3.9200 Standard Error 0.2465
Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

COMP = 2

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	95	0
3.0000	0.9895	0.0105	0.0105	1	94	1
5.0000	.	.	.	6	89	5
5.0000	0.9053	0.0947	0.0300	9	86	3
6.0000	0.8947	0.1053	0.0315	10	85	1
7.0000	0.8316	0.1684	0.0384	16	79	6
8.0000	.	.	.	25	70	9
8.0000	0.6421	0.3579	0.0492	34	61	9
9.0000	.	.	.	52	43	18
9.0000	0.3474	0.6526	0.0489	62	33	10
10.0000	.	.	.	71	24	9
10.0000	0.2316	0.7684	0.0433	73	22	2
11.0000	0.1368	0.8632	0.0353	82	13	9
12.0000*	.	.	.	82	7	6
12.0000*	.	.	.	82	0	7

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	10.0000	10.0000	11.0000
50%	9.0000	.	.
25%	8.0000	.	.

Mean 8.8316 Standard Error 0.1869

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Product-Limit Survival Estimates

COMP = 3

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
0.0000	1.0000	0	0	0	395	0
1.0000	.	.	.	3	392	3
1.0000	.	.	.	5	390	2
1.0000	0.9848	0.0152	0.00615	6	389	1
2.0000	.	.	.	15	380	9
2.0000	.	.	.	16	379	1
2.0000	0.9570	0.0430	0.0102	17	378	1
3.0000	.	.	.	18	377	1
3.0000	0.9519	0.0481	0.0108	19	376	1
4.0000	.	.	.	21	374	2
4.0000	.	.	.	22	373	1
4.0000	0.9418	0.0582	0.0118	23	372	1
5.0000	.	.	.	27	368	4
5.0000	.	.	.	28	367	1
5.0000	0.9266	0.0734	0.0131	29	366	1
6.0000	0.9241	0.0759	0.0133	30	365	1
7.0000	.	.	.	33	362	3
7.0000	.	.	.	35	360	2
7.0000	.	.	.	37	358	2
7.0000	.	.	.	39	356	2
7.0000	0.8987	0.1013	0.0152	40	355	1
8.0000	.	.	.	43	352	3
8.0000	.	.	.	46	349	3
8.0000	.	.	.	48	347	2
8.0000	.	.	.	50	345	2
8.0000	0.8709	0.1291	0.0169	51	344	1
9.0000	.	.	.	57	338	6
9.0000	.	.	.	59	336	2
9.0000	.	.	.	61	334	2
9.0000	0.8430	0.1570	0.0183	62	333	1
10.0000	.	.	.	73	322	11
10.0000	.	.	.	81	314	8
10.0000	0.7924	0.2076	0.0204	82	313	1
11.0000	.	.	.	85	310	3
11.0000	.	.	.	87	308	2
11.0000	0.7772	0.2228	0.0209	88	307	1
12.0000*	.	.	.	88	282	25
12.0000*	.	.	.	88	250	32
12.0000*	.	.	.	88	214	36

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

SEMANA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left	Freq
12.0000*	.	.	.	88	175	39
12.0000*	.	.	.	88	135	40
12.0000*	.	.	.	88	93	42
12.0000*	.	.	.	88	49	44
12.0000*	.	.	.	88	0	49

* Censored Observation

Summary Statistics for Time Variable SEMANA

Quantile	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower, Upper)	
75%	.	.	.
50%	.	.	.
25%	.	11.0000	.
Mean	10.0911	Standard Error	0.1154

NOTE: The last observation was censored so the estimate of the mean is biased.

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values

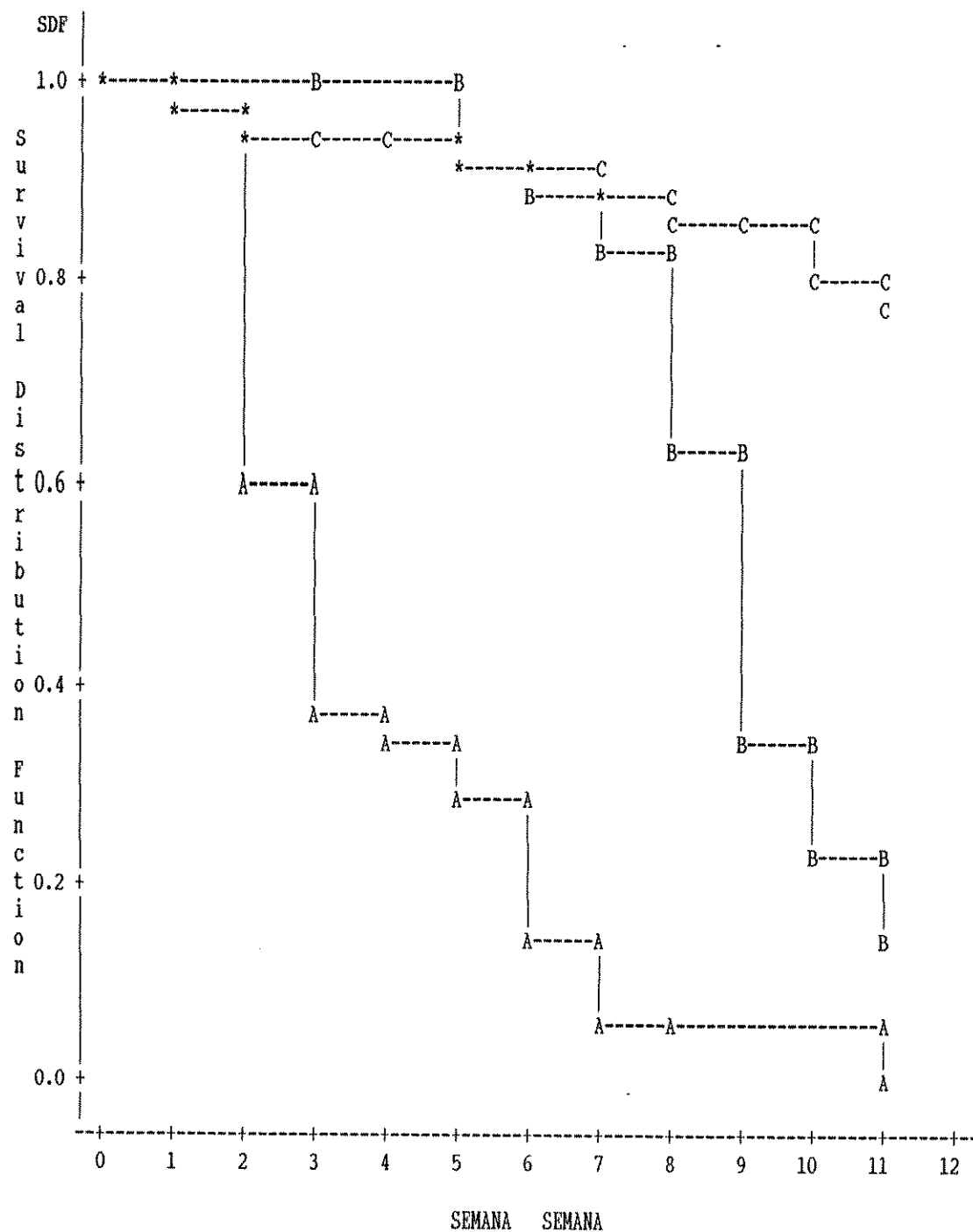
COMP	Total	Failed	Censored	%Censored
1	100	100	0	0.0000
2	95	82	13	13.6842
3	395	88	307	77.7215
Total	590	270	320	54.2373

NOTE: There were 72 observations with missing values, negative time values or frequency values less than 1.

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Survival Function Estimates



Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

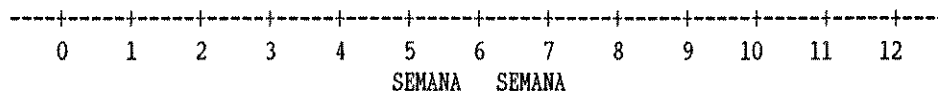
Censored Observations

Strata

C +

B +

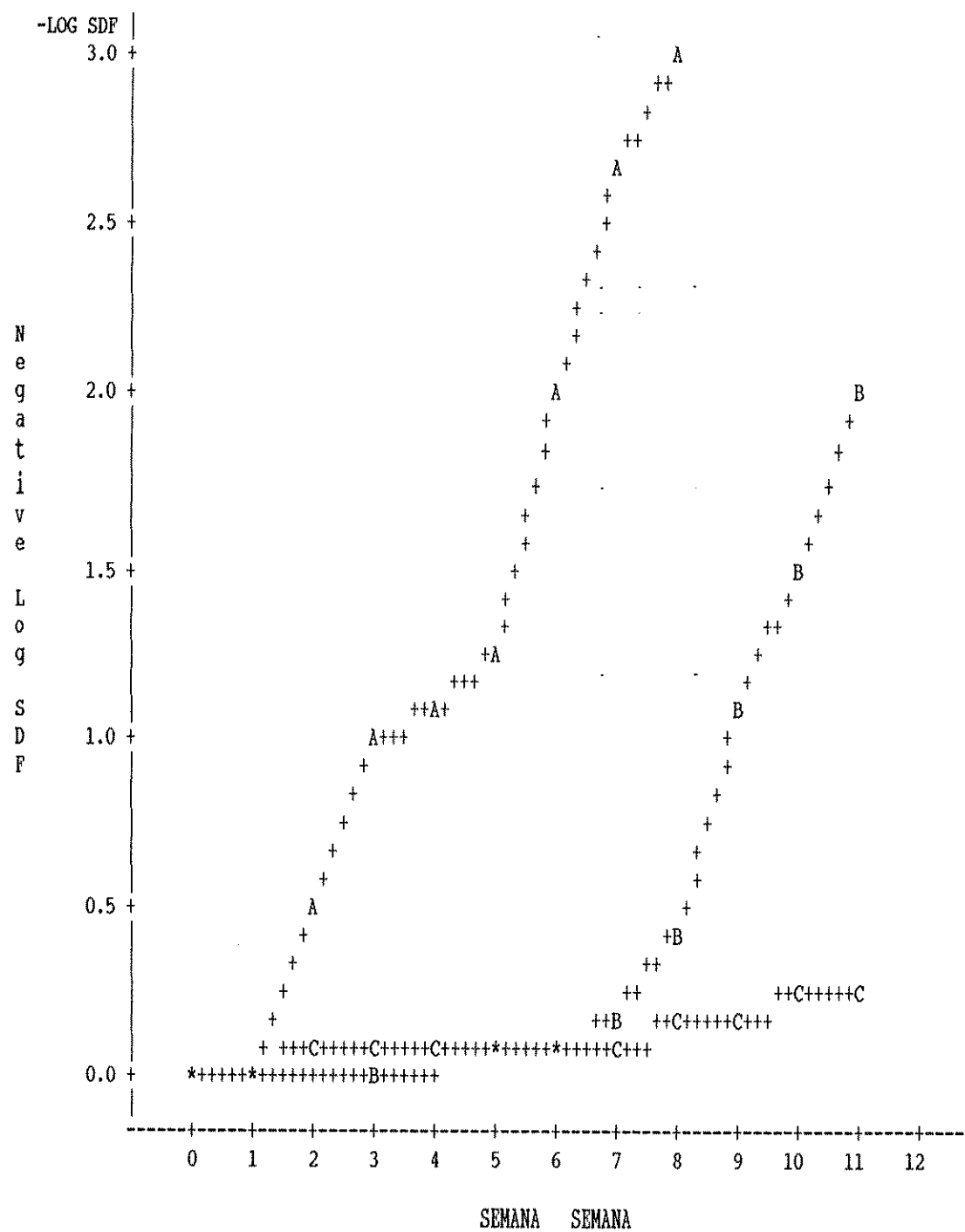
A +



Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

-Log(Survival Function) Estimates



Scatter plot showing the relationship between $\text{Log}(-L(S))$ (Y-axis) and SEMANA Log SEMA (X-axis). The Y-axis is labeled "Log Negative Log Sema" and ranges from -5 to 2. The X-axis ranges from 0.0 to 2.6. Data points are plotted as '+' symbols, with some points labeled with letters (A, B, C) and '+' signs, indicating specific experimental conditions or groups. The plot shows a general upward trend, with data points clustered around a diagonal line, suggesting a positive correlation between the variables.

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Legend for Strata Symbols

A:COMP=1 B:COMP=2 C:COMP=3

Comparacao de Grupos

The LIFETEST Procedure

Testing Homogeneity of Survival Curves over Strata
Time Variable SEMANA

Rank Statistics

COMP	Log-Rank	Wilcoxon
1	82.43	43108
2	40.51	14312
3	-122.94	-57420

Covariance Matrix for the Log-Rank Statistics

COMP	1	2	3
1	14.5539	-2.7619	-11.7920
2	-2.7619	32.6150	-29.8531
3	-11.7920	-29.8531	41.6452

Covariance Matrix for the Wilcoxon Statistics

COMP	1	2	3
1	4197189	-811771	-3385418
2	-811771	7751590	-6939819
3	-3385418	-6939819	10325236

Test of Equality over Strata

Test	Chi-Square	DF	Pr >
			Chi-Square
Log-Rank	565.1014	2	0.0001
Wilcoxon	510.2964	2	0.0001
-2Log(LR)	289.9208	2	0.0001

Comparacao de Grupos

----- ORIGEM=I -----

CATMOD PROCEDURE

Response: RESP	Response Levels (R)=	2
Weight Variable: F	Populations (S)=	3
Data Set: INF	Total Frequency (N)=	150
Frequency Missing: 0	Observations (Obs)=	6

POPULATION PROFILES

Sample	HEMOL	ORIGEM	Sample Size
1	C	I	50
2	S	I	50
3	T	I	50

RESPONSE PROFILES

Response	RESP
1	I
2	N

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS

Iteration	Sub Iteration	-2 Log Likelihood	Convergence Criterion	Parameter Estimates			
				1	2	3	4
0	0	207.94415	1.0000	0	0	0	0
1	0	190.91871	0.0819	0.1867	0.4533	0.4533	0
2	0	190.89404	0.000129	0.1909	0.4723	0.4723	0
3	0	190.89404	3.0984E-9	0.1909	0.4724	0.4724	0

Comparacao de Grupos

----- ORIGEM=I -----

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	1.21	0.2704
HEMOL	2	14.71	0.0006
ORIGEM	0*	.	.
LIKELIHOOD RATIO	0	.	.

NOTE: Effects marked with '*' contain one or more
redundant or restricted parameters.

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.1909	0.1733	1.21	0.2704
HEMOL	2	0.4724	0.2444	3.74	0.0533
	3	0.4724	0.2444	3.74	0.0533
ORIGEM	4	.	.	.	.

Comparacao de Grupos

----- ORIGEM=I* -----

CATMOD PROCEDURE

Response: RESP	Response Levels (R)=	2
Weight Variable: F	Populations (S)=	3
Data Set: INF	Total Frequency (N)=	150
Frequency Missing: 0	Observations (Obs)=	6

POPULATION PROFILES

Sample	HEMOL	ORIGEM	Sample Size
1	C	I*	50
2	S	I*	50
3	T	I*	50

RESPONSE PROFILES

Response	RESP
1	I
2	N

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS

Iteration	Sub Iteration	-2 Log Likelihood	Convergence Criterion	Parameter Estimates			
				1	2	3	4
0	0	207.94415	1.0000	0	0	0	0
1	0	207.46377	0.002310	0.0533	-0.1333	0.0267	0
2	0	207.46377	7.2483E-9	0.0534	-0.1335	0.0266	0

Comparacao de Grupos

----- ORIGEM=I* -----

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.11	0.7438
HEMOL	2	0.37	0.8298
ORIGEM	0*	.	.
LIKELIHOOD RATIO	0	.	.

NOTE: Effects marked with '*' contain one or more
redundant or restricted parameters.

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES

Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	0.0534	0.1636	0.11	0.7438
HEMOL	2	-0.1335	0.2312	0.33	0.5637
	3	0.0266	0.2312	0.01	0.9084
ORIGEM	4	.	.	.	.

Análise do número de amebócitos na hemolinfa circulante

The SAS System

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
HEMOLINF	2	S T
ORIGEM	2	I I*
INFECCAO	2	N S

Number of observations in data set = 80

The SAS System

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ESTR ESTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	125895.211	15736.901	3.36	0.0025
Error	71	332458.677	4682.517		
Corrected Total	79	458353.888			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ESTR Mean
	0.274668	46.13056	68.4289		148.338

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HEMOLINF	1	42274.0125	42274.0125	9.03	0.0037
ORIGEM	1	7585.5125	7585.5125	1.62	0.2072
HEMOLINF*ORIGEM	1	3062.8125	3062.8125	0.65	0.4214
INFECCAO	1	6354.6125	6354.6125	1.36	0.2479
HEMOLINF*INFECCAO	1	5968.5125	5968.5125	1.27	0.2627
ORIGEM*INFECCAO	1	348.6125	348.6125	0.07	0.7858
HEMOLI*ORIGEM*INFECC	1	32764.5125	32764.5125	7.00	0.0100
HORA	1	27536.6232	27536.6232	5.88	0.0179

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HEMOLINF	1	42274.0125	42274.0125	9.03	0.0037
ORIGEM	1	7585.5125	7585.5125	1.62	0.2072
HEMOLINF*ORIGEM	1	3062.8125	3062.8125	0.65	0.4214
INFECCAO	1	6354.6125	6354.6125	1.36	0.2479
HEMOLINF*INFECCAO	1	5968.5125	5968.5125	1.27	0.2627
ORIGEM*INFECCAO	1	348.6125	348.6125	0.07	0.7858
HEMOLI*ORIGEM*INFECC	1	32764.5125	32764.5125	7.00	0.0100
HORA	1	27536.6232	27536.6232	5.88	0.0179

The SAS System

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: N_ESTR					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	12774.8641	1596.8580	1.29	0.2639
Error	71	88059.3234	1240.2722		
Corrected Total	79	100834.1875			
	R-Square	C.V.	Root MSE	N_ESTR Mean	
	0.126692	44.47356	35.2175	79.1875	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HEMOLINF	1	127.51250	127.51250	0.10	0.7494
ORIGEM	1	8590.51250	8590.51250	6.93	0.0104
HEMOLINF*ORIGEM	1	171.11250	171.11250	0.14	0.7114
INFECCAO	1	15.31250	15.31250	0.01	0.9118
HEMOLINF*INFECCAO	1	456.01250	456.01250	0.37	0.5462
ORIGEM*INFECCAO	1	446.51250	446.51250	0.36	0.5504
HEMOLI*ORIGEM*INFECC	1	1814.51250	1814.51250	1.46	0.2305
HORA	1	1153.37658	1153.37658	0.93	0.3382

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HEMOLINF	1	127.51250	127.51250	0.10	0.7494
ORIGEM	1	8590.51250	8590.51250	6.93	0.0104
HEMOLINF*ORIGEM	1	171.11250	171.11250	0.14	0.7114
INFECCAO	1	15.31250	15.31250	0.01	0.9118
HEMOLINF*INFECCAO	1	456.01250	456.01250	0.37	0.5462
ORIGEM*INFECCAO	1	446.51250	446.51250	0.36	0.5504
HEMOLI*ORIGEM*INFECC	1	1814.51250	1814.51250	1.46	0.2305
HORA	1	1153.37658	1153.37658	0.93	0.3382

The SAS System

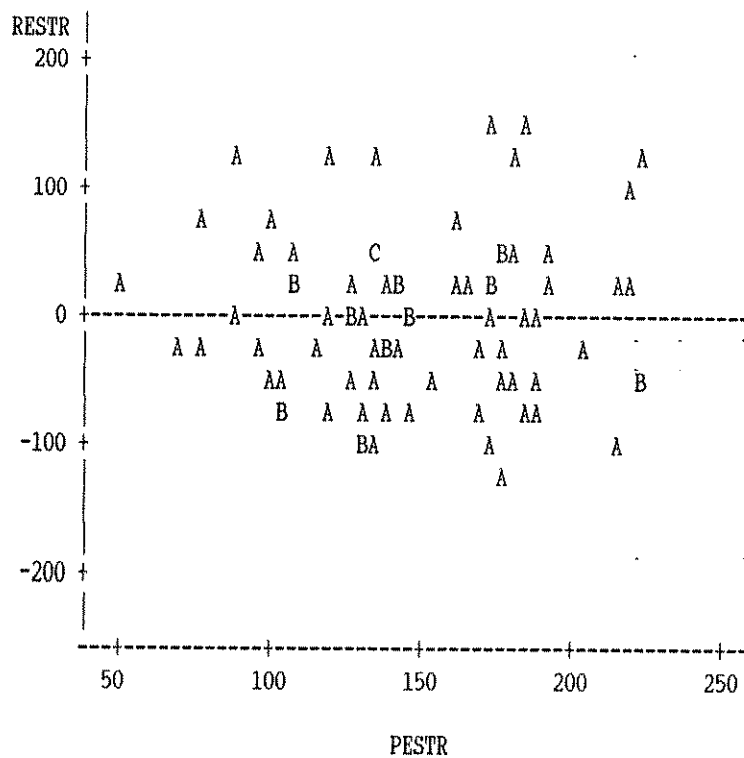
General Linear Models Procedure

Level of ORIGEM	N	-----ESTR-----		-----N_ESTR-----	
		Mean	SD	Mean	SD
I	40	158.075000	84.0431475	89.5500000	38.1393867
I*	40	138.600000	67.0441110	68.8250000	30.1763088

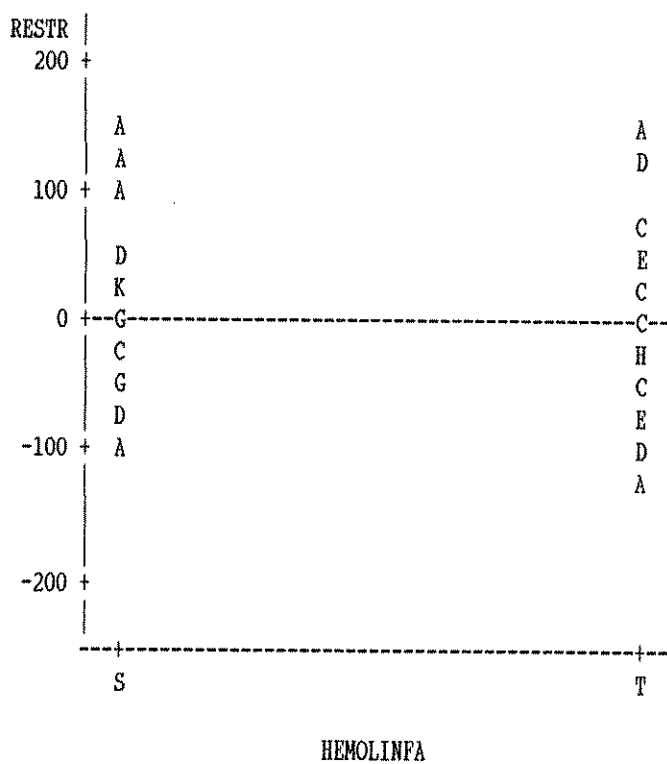
Level of ORIGEM	N	-----HORA-----	
		Mean	SD
I	40	18.6500000	22.5320854
I*	40	18.6500000	22.5320854

The SAS System

Plot of RESTR*PESTR. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.

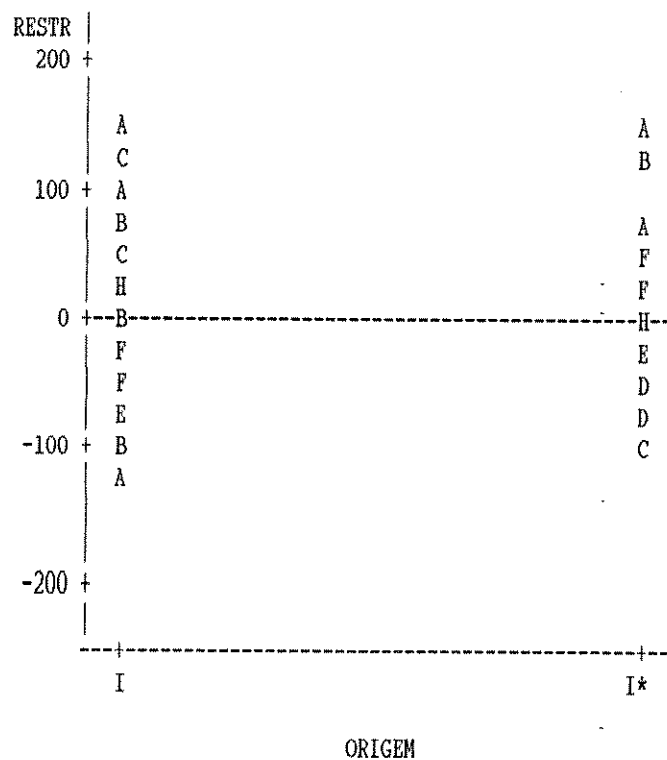


Plot of RESTR*HEMOLINF. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.

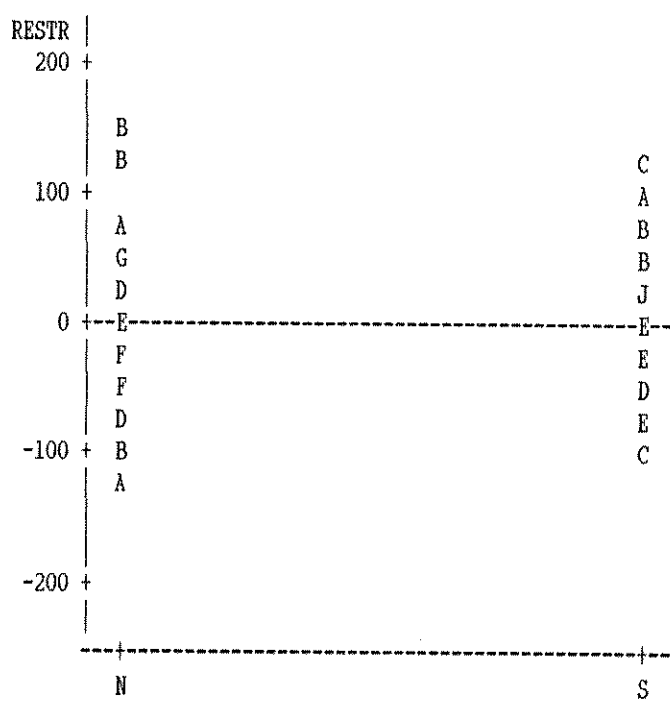


The SAS System

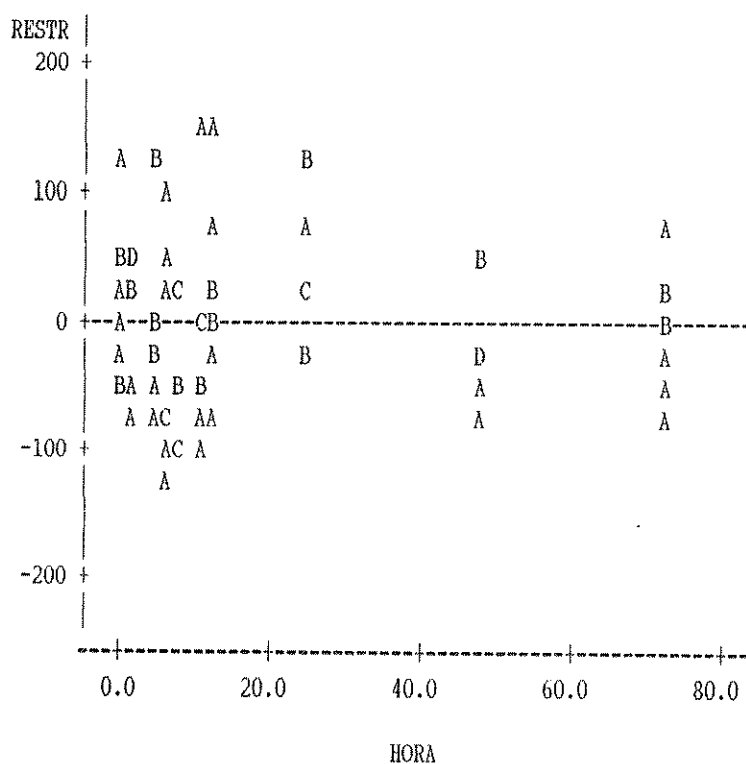
Plot of RESTR*ORIGEM. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



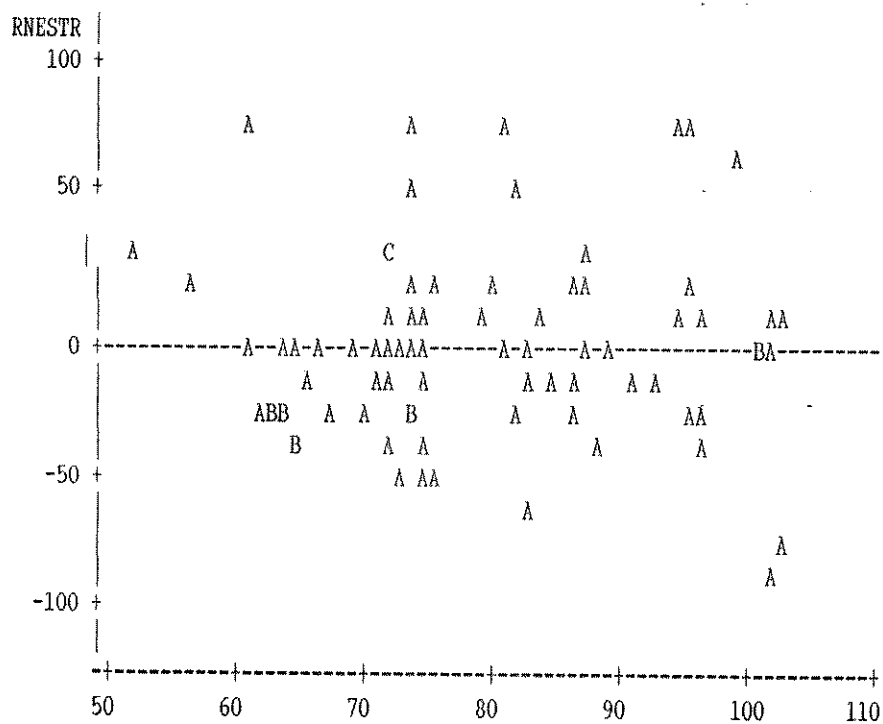
Plot of RESTR*INFECCAO. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



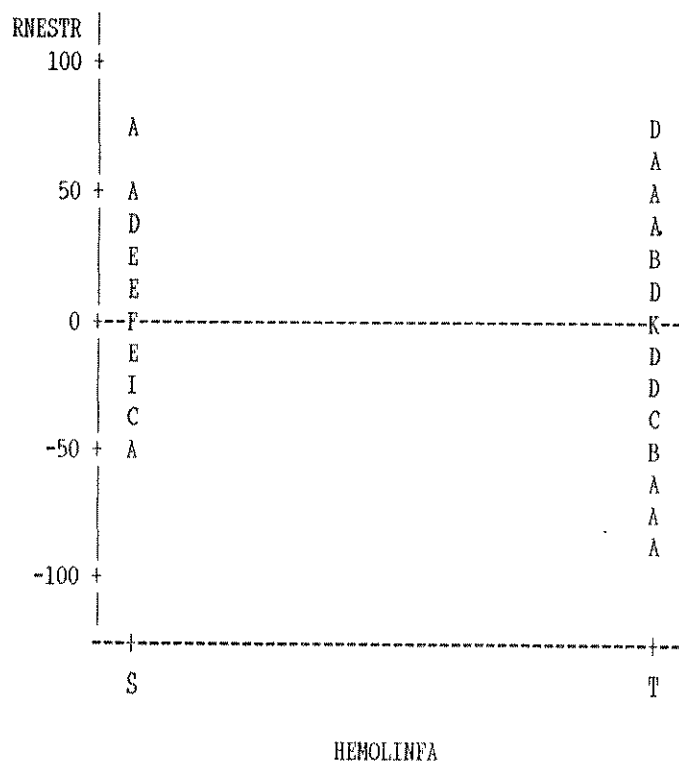
Plot of RESTR*HORA. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



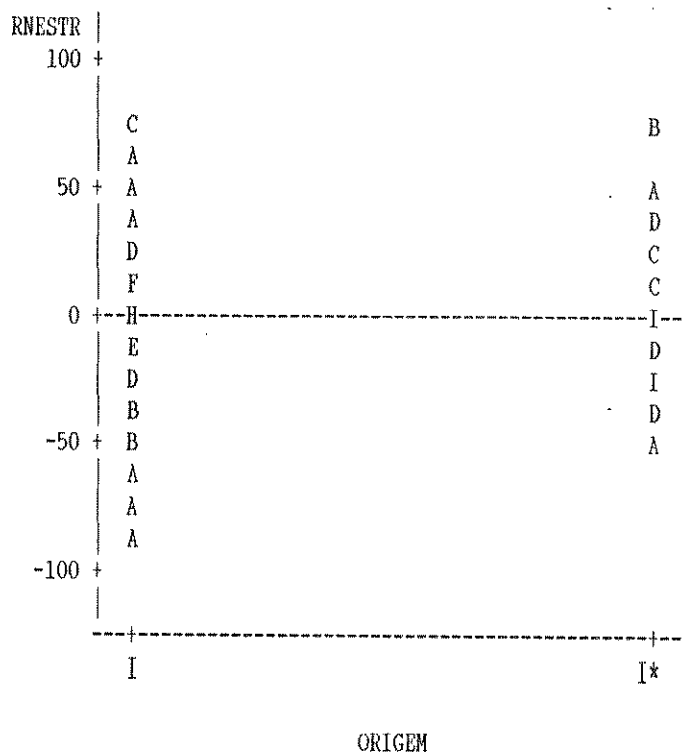
Plot of RNESTR*PNESTR. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



Plot of RNESTR*HEMOLINF. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.

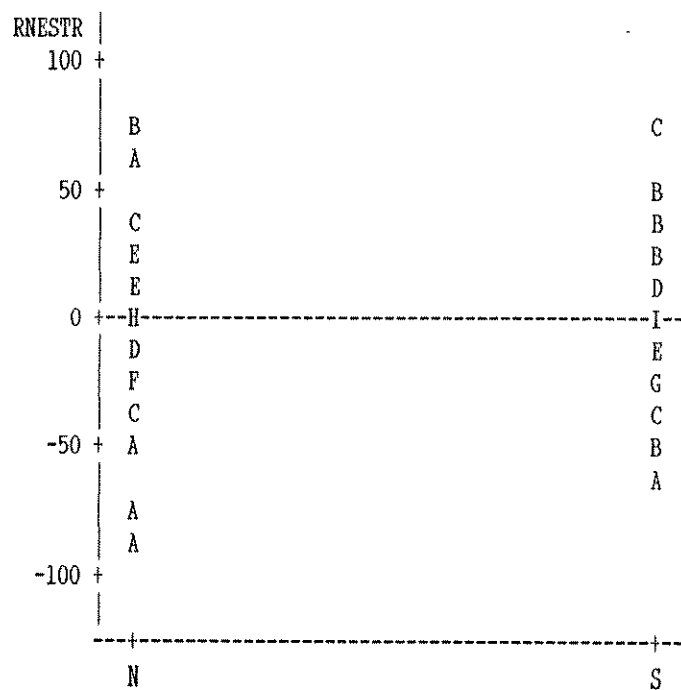


Plot of RNESTR*ORIGEM. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



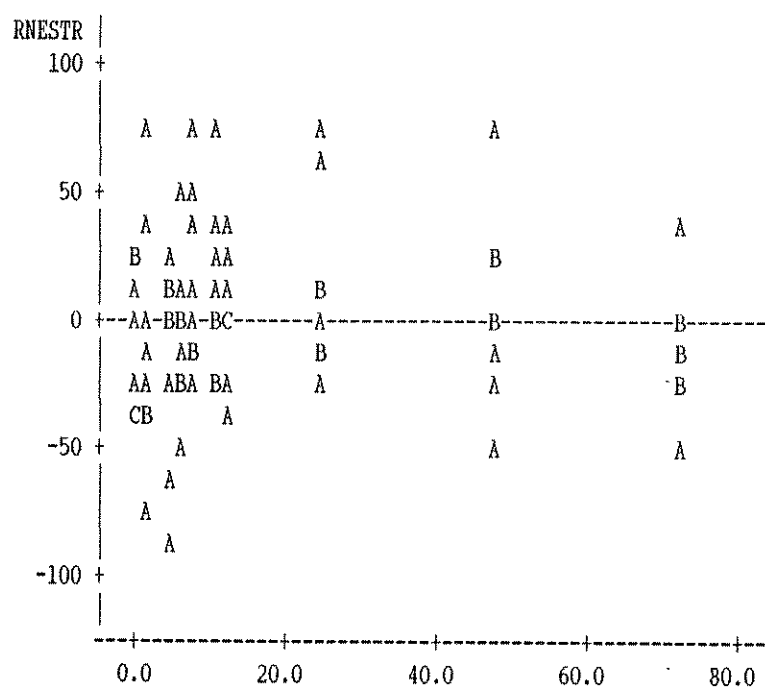
The SAS System

Plot of RNESTR*INFECCAO. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



INFECCAO

Plot of RNESTR*HORA. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



HORA

The SAS System

----- HEMOLINFA=S -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
ORIGEM	2	I I*
INFECCAO	2	N S

Number of observations in by group = 40

The SAS System

----- HEMOLINFA=S -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ESTR ESTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	51614.5375	12903.6344	3.47	0.0172
Error	35	130030.2375	3715.1496		
Corrected Total	39	181644.7750			

	R-Square	C.V.	Root MSE	ESTR Mean
	0.284151	35.57684	60.9520	171.325

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ORIGEM	1	10144.2250	10144.2250	2.73	0.1074
INFECCAO	1	3.0250	3.0250	0.00	0.9774
ORIGEM*INFECCAO	1	19936.2250	19936.2250	5.37	0.0265
HORA	1	21531.0625	21531.0625	5.80	0.0215

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ORIGEM	1	10144.2250	10144.2250	2.73	0.1074
INFECCAO	1	3.0250	3.0250	0.00	0.9774
ORIGEM*INFECCAO	1	19936.2250	19936.2250	5.37	0.0265
HORA	1	21531.0625	21531.0625	5.80	0.0215

The SAS System

----- HEMOLINFA=T -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
ORIGEM	2	I I*
INFECCAO	2	N S

Number of observations in by group = 40

The SAS System

----- HEMOLINFA=T -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ESTR ESTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	33734.9359	8433.7340	1.47	0.2320
Error	35	200700.1641	5734.2904		
Corrected Total	39	234435.1000			

R-Square	C.V.	Root MSE	ESTR Mean
0.143899	60.41093	75.7251	125.350

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ORIGEM	1	504.1000	504.1000	0.09	0.7686
INFECCAO	1	12320.1000	12320.1000	2.15	0.1516
ORIGEM*INFECCAO	1	13176.9000	13176.9000	2.30	0.1385
HORA	1	7733.8359	7733.8359	1.35	0.2534

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ORIGEM	1	504.1000	504.1000	0.09	0.7686
INFECCAO	1	12320.1000	12320.1000	2.15	0.1516
ORIGEM*INFECCAO	1	13176.9000	13176.9000	2.30	0.1385
HORA	1	7733.8359	7733.8359	1.35	0.2534

The SAS System

----- ORIGEM=I -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
INFECCAO	2	N S

Number of observations in by group = 20

The SAS System

----- ORIGEM=I -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ESTR ESTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	20109.3036	10054.6518	2.60	0.1034
Error	17	65734.4464	3866.7321		
Corrected Total	19	85843.7500			

R-Square	C.V.	Root MSE	ESTR Mean
0.234255	33.20857	62.1831	187.250

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INFECCAO	1	9724.0500	9724.0500	2.51	0.1312
HORA	1	10385.2536	10385.2536	2.69	0.1196

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INFECCAO	1	9724.0500	9724.0500	2.51	0.1312
HORA	1	10385.2536	10385.2536	2.69	0.1196

The SAS System

----- ORIGEM=I -----

General Linear Models Procedure

Level of INFECCAO	N	-----ESTR-----		-----HORA-----	
		Mean	SD	Mean	SD
N	10	165.200000	43.3071716	18.6500000	23.4521380
S	10	209.300000	81.1309641	18.6500000	23.4521380

The SAS System

----- ORIGEM=I* -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
INFECCAO	2	N S

Number of observations in by group = 20

The SAS System

----- ORIGEM=I* -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ESTR ESTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	21367.8466	10683.9233	2.83	0.0872
Error	17	64288.9534	3781.7031		
Corrected Total	19	85656.8000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		ESTR Mean
	0.249459	39.57243	61.4956		155.400

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INFECCAO	1	10215.2000	10215.2000	2.70	0.1186
HORA	1	11152.6466	11152.6466	2.95	0.1041

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
INFECCAO	1	10215.2000	10215.2000	2.70	0.1186
HORA	1	11152.6466	11152.6466	2.95	0.1041

The SAS System

----- ORIGEM=I* -----

General Linear Models Procedure

Level of		-----ESTR-----		-----HORA-----	
INFECCAO	N	Mean	SD	Mean	SD
N	10	178.000000	80.6432473	18.6500000	23.4521380
S	10	132.800000	43.3482026	18.6500000	23.4521380

Cortes Histológicos

Foram feitas análises separadas para as células integras e degeneradas. Em ambas, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA).

Para as células integras, os fatores utilizados foram Hemolinfa (níveis C, S e T), Origem (níveis I e I*) e Hora (níveis 0,5, 12, 24, 48 e 72 horas). Nenhuma interação ou fator principal, com exceção da hora, foi significativo ao nível de significância de 10%. Desta forma, é possível fazer as comparações desejadas, descritas no objetivo do trabalho.

Primeiramente, é apresentada uma tabela com as médias e os desvios padrão do número de células integras para cada combinação hemolinfa x origem x hora.

Tabela 1.

Grupos	horário	média	DP
C I	0.5	11.0000000	0.0000000
C I	12	24.5000000	0.7071068
C I	24	5.0000000	4.9497475
C I	48	5.0000000	4.9497475
C I	72	8.0000000	4.2426407
C I*	0.5	13.0000000	5.6568542
C I*	12.0	4.0000000	1.4142136
C I*	24.0	30.0000000	14.8492424
C I*	48.0	13.0000000	4.9497475
C I*	72.0	4.5000000	0.7071068
S I	0.5	23.0000000	14.1421356
S I	12.0	27.5000000	30.4055916
S I	24.0	11.5000000	16.2634560
S I	48.0	4.0000000	0.0000000
S I	72.0	10.5000000	9.1923882
S I*	0.5	20.5000000	9.1923882
S I*	12.0	17.5000000	2.1213203
S I*	24.0	11.5000000	13.4350288
S I*	48.0	11.5000000	10.6066017
S I*	72.0	11.0000000	11.3137085
T I	0.5	21.5000000	4.9497475
T I	12.0	22.5000000	3.5355339
T I	24.0	7.0000000	5.6568542
T I	48.0	7.0000000	2.8284271
T I	72.0	9.0000000	11.3137085
T I*	0.5	31.0000000	42.4264069
T I*	12.0	15.5000000	9.1923882
T I*	24.0	32.0000000	16.9705627
T I*	48.0	3.5000000	0.7071068
T I*	72.0	20.5000000	2.1213203

Com relação à comparação entre os tempos para cada combinação hemolinfa x origem, utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias, onde apenas os grupos CI, CI* e o controle (XY) apresentaram diferença significativa do número de células íntegras entre as horas com níveis de significância de 5, 8 e 8%, respectivamente. A seguir são apresentadas as tabelas com a ordenação das médias para esses três grupos.

Tabela 2. Grupo CI

Grupo	Tukey	Média	N	HORA	
	A	24,500	2	12,0	.
	A				
B	A	11,000	2	0,5	
B					
B		8,000	2	72,0	
B					
B		5,500	2	48,0	
B					
B		5,500	2	24,0	

Tabela 3. Grupo CI*

Grupo	Tukey	Média	N	HORA	
	A	30,500	2	24,0	.
	A				
B	A	13,500	2	48,0	
B	A				
B	A	13,000	2	0,5	
B	A				
B	A	4,500	2	72,0	
B					
B		4,000	2	12,0	

Tabela 4. Grupo Controle

Grupo	Tukey	Média	N	HORA	
	A	26,000	2	0,5	.
	A				
B	A	11,500	2	24,0	
B					
B		6,500	2	72,0	
B					
B		3,500	2	12,0	
B					
B		1,500	2	48,0	

Os demais grupos não apresentam diferença significativa do número de células íntegras entre as horas (p-valor > 12%).

Com relação à comparação entre os grupos de hemolinfa e origem, não se conseguiu detectar diferença significativa do número de células íntegras entre os grupos (p-valor=57,46%). É apresentada uma tabela com as médias e desvios padrão para cada grupo.

Tabela 5.

	GRUPO	N	Média	DP
C	I	10	10.9000000	7.9645046
C	I*	10	13.1000000	11.5417118
S	I	10	15.3000000	15.7059790
S	I*	10	14.4000000	8.5660830
T	I	10	13.4000000	8.8468450
T	I*	10	20.5000000	19.1209600
X	Y	10	9.8000000	9.8972499

Para as células degeneradas, utilizou-se os fatores hemolinfa e origem. Nesse caso, nenhum dos fatores principais e a interação foram significativos (p-valor > 54%). Também não houve diferença no número de células degeneradas entre os grupos de hemolinfa e origem (p-valor = 66,61%). A seguir é apresentada uma tabela com as médias e os desvios padrão do número de células degeneradas para cada grupo.

Tabela 6.

	GRUPO	N	Média	DP
C	I	2	1.00000000	1.41421356
C	I*	2	1.00000000	0.00000000
S	I	2	2.50000000	3.53553391
S	I*	2	1.50000000	2.12132034
T	I	2	1.00000000	1.41421356
T	I*	2	3.00000000	0.00000000
X	Y	2	0.00000000	0.00000000

Taxa de Fagocitose

A ANOVA apontou apenas o fator hemolinfa como significativo (p-valor = 0.08%). Os outros fatores e todas as interações não foram significativos (p-valor = 19.5%).

Foi feito um teste de Tukey para comparar as médias de proporções de fagocitose para os grupos de hemolinfa. A seguir é apresentada a tabela com o agrupamento das proporções, o nível de significância utilizado foi de 5%.

Grupo Tukey	Média	N	HEMOL
A	0.48876	20	C
B	0.30239	20	T
B	0.29911	20	S

É apresentada também uma tabela com as médias e os desvios padrão das proporções de células que fagocitam para as combinações hemolinfa x origem x infecção x hora.

Grupo	Hora	Média	DP
C I N	0.5	0.40500	0.00707
C I N	12.0	0.55500	0.27577
C I N	24.0	0.50500	0.14849
C I N	48.0	0.26000	0.15556
C I N	72.0	0.45250	0.03889
C I S	0.5	0.75000	0.21213
C I S	12.0	0.41500	0.02121
C I S	24.0	0.71500	0.01414
C I S	48.0	0.56750	0.16617
C I S	72.0	0.57778	0.03143
C I*N	0.5	0.38250	0.02475
C I*N	12.0	0.40500	0.00707
C I*N	24.0	0.36500	0.07778
C I*N	48.0	0.46750	0.01061
C I*N	72.0	0.57000	0.02121
C I*S	0.5	0.43750	0.05303
C I*S	12.0	0.69000	0.00707
C I*S	24.0	0.31250	0.00354
C I*S	48.0	0.49500	0.07778
C I*S	72.0	0.44750	0.00354
S I N	0.5	0.23000	0.02828
S I N	12.0	0.41000	0.12021
S I N	24.0	0.39250	0.00354
S I N	48.0	0.20500	0.00707
S I N	72.0	0.26250	0.08839
S I S	0.5	0.40000	0.04950
S I S	12.0	0.15750	0.10253
S I S	24.0	0.26750	0.01061
S I S	48.0	0.22500	0.02121
S I S	72.0	0.41265	0.03964

SI*N	0.5	0.46750	0.14496
SI*N	12.0	0.31000	0.00707
SI*N	24.0	0.17250	0.04596
SI*N	48.0	0.28750	0.06010
SI*N	72.0	0.32000	0.03536
SI*S	0.5	0.42958	0.00996
SI*S	12.0	0.16500	0.02828
SI*S	24.0	0.31000	0.02828
SI*S	48.0	0.39500	0.04950
SI*S	72.0	0.16250	0.02475
TIN	0.5	0.59250	0.06010
TIN	12.0	0.53500	0.00707
TIN	24.0	0.23750	0.03182
TIN	48.0	0.16750	0.01768
TIN	72.0	0.18750	0.01061
TIS	0.5	0.33250	0.06718
TIS	12.0	0.27000	0.00707
TIS	24.0	0.31750	0.16617
TIS	48.0	0.15500	0.03536
TIS	72.0	0.29500	0.07071
TI*N	0.5	0.28250	0.02475
TI*N	12.0	0.32500	0.12728
TI*N	24.0	0.20250	0.07425
TI*N	48.0	0.28250	0.12374
TI*N	72.0	0.30000	0.11314
TI*S	0.5	0.35000	0.00000
TI*S	12.0	0.32750	0.00354
TI*S	24.0	0.25787	0.07477
TI*S	48.0	0.27500	0.00707
TI*S	72.0	0.35500	0.17678

Foi utilizado um teste Tukey para comparar as proporções dos grupos de hemolinfa, origem e infecção. O resultado é mostrado a seguir com nível de significância de 5%.

Grupo	Tukey	Média	N	Grupo
	A	0.60506	5	C I S
B	A	0.47650	5	C I* S
B	A	0.43800	5	C I* N
B	A	0.43550	5	C I N
B		0.34400	5	T I N
B		0.31307	5	T I* S
B		0.31150	5	S I* N
B		0.30000	5	S I N
B		0.29253	5	S I S
B		0.29242	5	S I* S
B		0.27850	5	T I* N
B		0.27400	5	T I S

Gráficos das diferenças dos índices de fagocitose entre os horários

