

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Laura Rocha Guerino

**SUSCETIBILIDADE AO *Schistosoma mansoni*
APRESENTADA POR *Biomphalaria glabrata* INFECTADA
COM *Angiostrongylus costaricensis***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Laura Rocha Guerino
Elizângela
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, da
Universidade Estadual de Campinas, SP, para
obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães

CAMPINAS, SP
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Guerino, Laura Rocha	
G936v	Suscetibilidade ao <i>Schistosoma mansoni</i> apresentada por <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> / Laura Rocha Guerino. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.
Orientadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães.	
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.	
1. <i>Angiostrongylus costaricensis</i> . 2. <i>Schistosoma mansoni</i> . 3. <i>Biomphalaria glabrata</i> . 4. Esquistossomose. 5. Angiostrongilose. I. Zanotti-Magalhães, Eliana Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.	

Título em inglês: *Biomphalaria glabrata* susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection in the presence of *Angiostrongylus costaricensis* infection.

Palavras-chave em inglês: *Angiostrongylus costaricensis*; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria glabrata*; Schistosomiasis; Angiostrongylosis.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Toshie Kawano, Marlene Tiduko Ueta.

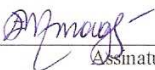
Data da defesa: 26/09/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

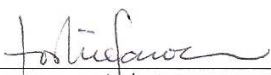
Campinas, 26 de setembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Maria Zanotti Magalhães (Orientador)


Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Toshie Kawano


Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

Pesq. Científico. Horácio Manuel Santana Teles

Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Ao meu esposo que, durante esses longos meses de trabalho, soube se fazer presente em todos os momentos, proporcionando-me auxílio e incentivo com muito carinho, amor, paciência e dedicação.

Aos meus filhos, Gabriela e Pedro, por serem, sempre, a expressão viva da energia e da simplicidade e a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à PROF^a.DR^a. Eliana Maria Zanotti-Magalhães, pela orientação ativa, amizade sincera, incentivo e importante participação na minha formação científica.

Ao Instituto de Biologia, UNICAMP, pela oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Luiz Augusto Magalhães pela contribuição em várias etapas deste trabalho e pelo carinho e bondade sempre dispensados à minha pessoa.

Às Professoras Doutoras Marlene Tiduko Ueta, Silmara Marques Allegretti e Toshie Kawano, pela contribuição como membros da pré-banca examinadora e pelas pertinentes sugestões apresentadas.

Aos Professores Doutores Arício Xavier Linhares e José Ferreira de Carvalho pela contribuição prestada na análise estatística dos dados.

Aos Professores do Departamento de Parasitologia pelos conhecimentos oferecidos ao longo destes anos.

Aos Senhores Ivo Gonçalves Pereira e João Batista Alves de Oliveira, sempre prestativos na ajuda técnica, minha gratidão pela dedicação e paciência.

Aos secretários Andréia Martinelli e Marco Antonio de Oliveira, do Departamento de Parasitologia do IB, pela prestimosa colaboração no tocante aos documentos e prazos.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela agradável convivência, apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, pela concessão da Bolsa Mestrado, o que contribuiu em muito para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	OBJETIVOS	10
3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	11
4.	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	Moluscos	13
4.2	Os parasitos	13
4.3	Verificação da Atração Miraxonal	14
4.4	Infecção concomitante	16
5.	RESULTADOS	18
5.1.	Artigo I – Atração de miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> por <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	
	Resumo	20
	Introdução	21
	Material e Métodos	23
	Resultados	25
	Discussão	26
	Referências Bibliográficas	30
5.2.	Artigo II – Suscetibilidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> submetida à infecção concomitante com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> e <i>Schistosoma mansoni</i>	

Resumo	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados	41
Discussão	44
Referências Bibliográficas	53
6. Conclusões	57
7. Referências Bibliográficas	59
8. Apêndice estatístico	67

RESUMO

Moluscos terrestres de várias espécies têm sido relatados como hospedeiros naturais do *Angiostrongylus costaricensis*.

Experimentalmente, *Biomphalaria glabrata* pode ser utilizada como hospedeira intermediária deste nematódeo, responsável pela angiostrongilíase abdominal. Os moluscos se infectam pela ingestão ou penetração ativa das larvas L1 de *A. costaricensis*.

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de atração exercida por *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* sobre miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e verificar a suscetibilidade de *B. glabrata* submetida à infecção concomitante com *A. costaricensis* e *S. mansoni*.

Para o estudo da atração miraxonal utilizamos *B. glabrata* infectada com 120 larvas L1 de *A. costaricensis* e após 20 dias de infecção os moluscos foram utilizados nos experimentos. Nesses experimentos foi utilizado um artefato de vidro composto por duas câmaras unidas por um canal e preenchido com água declorada. Os moluscos ou sua água de condicionamento (SCW) foram colocados aleatoriamente em uma das câmaras e dez miracídios foram colocados no centro do canal e seu comportamento foi observado por 15 minutos.

De acordo com os resultados obtidos, pudemos observar que *B. glabrata* infectada ou não com *A. costaricensis* ou sua SCW atraíram miracídios de *S. mansoni*. Verificamos ainda, haver maior atração miraxonal frente à SCW de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* (89%) do que o próprio molusco infectado com *A. costaricensis* (71%).

No estudo da suscetibilidade exemplares de *B. glabrata* foram expostos a 10 miracídeos de *S. mansoni* BH e a 120 larvas L1 de *A. costaricensis*. Após 30 dias de infecção os moluscos foram examinados para a verificação de eliminação de cercárias. Após 60 dias de infecção os moluscos sobreviventes tiveram seu corpo digerido por pepsina e ácido clorídrico para a recuperação de larvas L3 de *A. costaricensis*.

A infecção prévia de *B. glabrata* com *A. costaricensis* (com intervalo de 48 horas), facilitou a infecção pelo *S. mansoni*. Foi constatada maior taxa de infecção por *S. mansoni* (96,7%), maior número de cercárias liberadas (4955 cercárias/molusco) e baixa mortalidade dos moluscos (20%).

A exposição prévia de *B. glabrata* ao *A. costaricensis* e posteriormente ao *S. mansoni*, também facilitou o desenvolvimento do *A. costaricensis*, uma vez que na nona semana de infecção foi recuperada maior quantidade de larvas L3 (12 larvas/molusco), se comparado com moluscos expostos somente ao *A. costaricensis* (8 larvas/molusco). Entretanto a pré-infecção de *B. glabrata* com *S. mansoni* (com intervalo de 24 horas) e posteriormente com *A. costaricensis* mostrou-se muito prejudicial à *B. glabrata* provocando grande mortalidade dos moluscos (83%). A maior mortalidade dos moluscos provocou menor taxa de infecção pelo *S. mansoni* (63,3%), menor recuperação de larvas L3 de *A. costaricensis* (10 larvas/molusco) e menor número de cercárias liberadas (2722 cercárias/molusco).

ABSTRACT

Several species of land mollusks are natural hosts of the *Angiostrongylus costaricensis*.

Experimentally, *Biomphalaria glabrata* can be used as an intermediate host for this nematode, responsible for the abdominal angiostrongyliasis. The mollusks are infected through the ingestion or activate penetration by the first-stage larvae (L1) of *A. costaricensis*.

The objective of this work was to verify the ability of *B. glabrata*, infected with *A. costaricensis*, to attract miracidia of the BH strain of *Schistosoma mansoni* and to verify the susceptibility of *B. glabrata* infected concomitantly with *A. costaricensis* and *S. mansoni*.

For the study of the miraxonal attraction we used *B. glabrata* infected with 120 first-stage larvae of *A. costaricensis* and the mollusks were used in the experiments after twenty days of infection. In these experiments we used a glass apparatus consisting of two circular chambers connected by a channel and filled with chlorine free water. Aleatorily, the snails or their conditioning water (SCW) were placed in one chamber and ten miracidia were placed in the center of the channel and their behavior was observed for 15 minutes.

According to the results obtained, we could observe that *B. glabrata* infected or not infected with *A. costaricensis* and their SCW attracted *S. mansoni* miracidia. We also verified, a larger miraxonal attraction to the SCW of *B. glabrata* infected with *A. costaricensis* (89%) than to the actual mollusk infected with *A. costaricensis* (71%).

In the study of the susceptibility samples of *B. glabrata* were exposed to 10 miracidia of the BH strain of *S. mansoni* and to 120 first-stage larvae of *A. costaricensis*.

After thirty days of infection the mollusks were examined for the cercariae elimination. After sixty days of infection the surviving mollusks had their bodies digested by pepsin and hydrochloric acid for the recovery of third-stage larvae of *A. costaricensis*.

The prior infection of *B. glabrata* with *A. costaricensis* (with an interval of 48 hours), facilitated the infection with *S. mansoni*. A larger infection rate to *S. mansoni* was verified (96.7%), a larger number of liberated cercariae (4955 cercariae/mollusk) and a lower mortality of the mollusks (20%).

The prior infection of *B. glabrata* with *A. costaricensis* and posteriorly to *S. mansoni*, also facilitated the development of the *A. costaricensis*, because in the ninth week of infection a larger amount of third-stage larva was recovered (12 larvae/mollusk), if compared with mollusks exposed only to the *A. costaricensis* (8 larvae/mollusk). However the prior infection of *B. glabrata* with *S. mansoni* (with an interval of 24 hours) and posteriorly with *A. costaricensis* it was shown to be very harmful to *B. glabrata* causing a great mortality of the mollusks (83%). The larger mortality of the mollusks caused a smaller infection rate for the *S. mansoni* (63.3%), a smaller recovery of third-stage larvae of *A. costaricensis* (10 larvae/mollusk) and a smaller number of liberated cercariae (2722 cercariae/mollusk).

1 – INTRODUÇÃO

Angiostrongylus costaricensis (Morera & Céspedes, 1971) é um nematódeo da ordem Metastrongylida e da superfamília Angiostrongylidae, parasita da artéria mesentérica ileocecal de roedores silvestres, sendo identificados na América Central como hospedeiro definitivo o *Sigmodon hispidus* (Tesh e cols. 1973) e *Orizomys nigripes* e *Orizomys ratticeps* no sul do Brasil (Graeff-Teixeira e cols. 1990).

O ciclo de vida desse parasito envolve dois hospedeiros, o roedor (o hospedeiro definitivo) e um molusco, o hospedeiro intermediário. Os vermes adultos vivem nas artérias mesentéricas do hospedeiro definitivo e lá depositam seus ovos (Morera, 1973). Esses ovos são levados, através do sangue, para mucosa intestinal, onde embrionam e eclodem. As larvas L1 atravessam as paredes da mucosa intestinal e caem na luz do intestino, sendo liberadas junto com as fezes do hospedeiro vertebrado. O molusco, geralmente uma lesma terrestre da família Veronicellidae, pode ingerir as larvas (Morera, 1973) ou estas podem penetrar ativamente por sua pele (Thiengo, 1996; Mendonça e cols. 1999). No molusco, as larvas L1 migram para o tecido fibromuscular, local onde sofrem duas mudas, transformando-se em larva L2 e finalmente em larva L3, a forma infectante para o hospedeiro definitivo. As larvas L3 podem permanecer presas ao tecido fibromuscular ou podem ser liberadas junto com o muco excretado por esses animais. A evolução do *A. costaricensis* em *S. hispidus*, foi primeiramente descrito por Morera (1973). Recentemente uma nova concepção da migração e maturação desse parasita no hospedeiro definitivo (camundongos Swiss) foi proposta por Mota & Lenzi (1995). Eles demonstraram que no hospedeiro definitivo, o nematódeo utiliza os três sistemas vasculares: vias linfática/arterial e venosa. Após a penetração na parede intestinal as

larvas L3 alcançam os vasos linfáticos e atravessam os linfonodos mesentéricos onde ocorre a terceira muda para a larva L4. Essas saem pelos vasos linfáticos e chegam ao sangue venoso pelo ducto torácico passando rapidamente pelo coração e daí para a circulação pulmonar. Ao retornarem ao coração, os parasitos ganham a circulação arterial onde ocorre a quarta muda para L5 e finalmente se tornam adultos indo se instalar nos ramos ileocecais da artéria mesentérica superior, seu habitat definitivo.

As larvas que alcançam as vênulas intestinais dirigem-se ao fígado pela veia porta e permanecem em seus ramos intra-hepáticos, onde se transformam em vermes adultos e depositam seus ovos. Mota & Lenzi (2005) confirmaram esses resultados utilizando o *S. hispidus* como hospedeiro definitivo e ainda enfatizaram a migração do parasita para o fígado como um evento usual do ciclo, mudando a concepção de larva migrans visceral proposta por Morera e cols. (1982). Neste estudo também constataram que o ciclo de vida de *A. costaricensis* é muito mais complexo do que a descrição original feita por Morera (1973).

O conhecimento do ciclo de *A. costaricensis*, apesar de incompleto mostra uma complexidade de situações nas quais o homem aparece como hospedeiro eventual podendo se infectar acidentalmente ao ingerir o molusco ou alimentos contaminados com o muco contendo as larvas L3 do nematódeo. Como o homem é um hospedeiro acidental, nele o ciclo não se completa, pois as larvas L1 não são eliminadas junto às fezes, permanecendo presas à mucosa do intestino. Os sintomas são essencialmente dores abdominais, com endoarterites, reações inflamatórias aos ovos e larvas, ulcerações, formação de massa tumoral que simula tumores de colo e linfomas e obstruções parciais ou totais da luz do intestino (Morera, 1973). O diagnóstico da infecção humana é difícil, limitando-se a reações imunológicas ou biópsias. Não há tratamento medicamentoso

recomendado, pois as drogas de ação tecidual testadas podem agravar o quadro ao induzir migração errática dos vermes e trombozes arteriais (Graeff-Teixeira e cols. 1997).

No Brasil, a doença vem sendo detectada especialmente nos Estados do Rio Grande do Sul - onde foi diagnosticada a maioria dos relatos (Agostini e cols. 1984), Santa Catarina, Paraná (Ayala, 1987), São Paulo (Iabuki & Montenegro, 1979), Espírito Santo (Pena e cols. 1995) e Minas Gerais (Rocha e cols. 1991).

As lesmas da família Veronicellidae são muito importantes como hospedeiras intermediárias de *A. costaricensis* nas áreas endêmicas do Estado do Rio Grande do Sul (Rambo e cols. 1997), principalmente o *Phyllocaulis variegatus* – primeiro hospedeiro intermediário de *A. costaricensis* descrito no Brasil (Graeff-Teixeira e cols. 1989b) e o *Sarasinula linguaeformis* que tem as cargas parasitárias mais altas registradas até o momento no Brasil (Laitano e cols. 2001). No exame histológico dos moluscos, Thiengo (1996) observou que a infecção experimental de *Sarasinula marginata* com *A. costaricensis* pode ocorrer tanto por via digestiva como por penetração ativa do tegumento do corpo.

Bonetti & Graeff-Teixeira (1998) em infecções experimentais com *Phyllocaulis variegatus*, *Phyllocaulis soleiformis* e *Phyllocaulis boraceiensis* infectados com *A. costaricensis* demonstraram que o *P. variegatus* é o mais adaptado ao referido parasita. As espécies da família Limacidae como *Limax maximus* e *Limax flavus* e ainda *Bradybaena similis*, *Belocaulis angustipes* (Graeff-Teixeira e cols. 1993) *P. soleiformis*, *Helix aspersa* (Thiengo e cols. 1993) e *Deroceras laeve* (Maurer e cols., 2002) também foram encontradas infectadas naturalmente.

Em laboratório várias espécies de moluscos como *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*, *Megalobulimus* sp e *Achatina fulica*

foram susceptíveis ao *A. costaricensis* (Graeff-Teixeira e cols. 1989a; Monge e cols. 1978; Lima e cols. 1992; Carvalho e cols. 2003).

Não só as lesmas como várias espécies de moluscos terrestres e dulciaquícolas já foram encontradas com infecções naturais ou se infectaram experimentalmente, evidenciando assim a capacidade do *A. costaricensis* em adaptar-se a diferentes hospedeiros intermediários (Morera, 1988).

De acordo com Lima e cols. (1992), a *B. glabrata* é uma boa hospedeira para a manutenção do ciclo de *A. costaricensis*, sendo que de 87 exemplares expostos à infecção pelo nematódeo, 62 se infectaram. Ubelaker e cols. (1980) em seus estudos constataram que 96% de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* liberaram larvas L3 na água em que estavam acondicionadas. A infecção de *B. glabrata* com *A. costaricensis* é acompanhada por significantes alterações no número de amebócitos, nas concentrações de cálcio, glicose, fosfatase alcalina, fosfoquinase creatina e desidrogenase láctica na hemolinfa, sendo que algumas alterações ocorridas foram completamente diferentes daquelas verificadas em outros moluscos infectados com outros helmintos parasitos (Stewart e cols. 1985).

Segundo Valadão & Milward (1991), um dos graves e complexos problemas de saúde pública em nosso território é a esquistossomose mansônica. Esta doença parasitária apresenta uma nítida tendência à expansão que decorre, de modo particular, das migrações humanas a partir de áreas endêmicas. A esquistossomose é a segunda maior doença parasitária do mundo, depois da malária, com aproximadamente 200 milhões de pessoas infectadas, sendo estimado que 500 a 600 milhões de pessoas vivam em áreas de risco onde ocorre a transmissão de doença (WHO, 2002). Essa endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que gera a necessidade de

utilização de águas naturais contaminadas para exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ ou lazer. Atualmente, a esquistossomose mansônica é endêmica no Brasil, com aproximadamente oito milhões de pessoas infectadas (Katz & Peixoto, 2000).

Os hospedeiros intermediários naturais do *Schistosoma mansoni* no Brasil são constituídos por um grupo de planorbídeos como *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*.

Guaraldo e cols. (1981), estudando a evolução dos esporocistos de *S. mansoni* em *B. glabrata* e *B. tenagophila*, verificaram que a *B. glabrata* foi portadora de maior número de esporocistos primários viáveis, enquanto que em *B. tenagophila* predominaram esporocistos primários degenerados, envolvidos por infiltrados amebocitários.

A existência de atração exercida por moluscos vetores sobre miracídios de *S. mansoni* foi sugerida por Kloetzel (1958). O autor verificou que ao introduzir o molusco na água contendo miracídios, eles se aproximavam do hospedeiro, diminuíam a velocidade, às vezes estancando, curvando o corpo, rodopiando, como se estivessem em busca de algo que pressentissem. Aos poucos a concentração de larvas em torno do molusco se elevava. Um ou outro miracídio foi visto penetrar no molusco; um número muito mais elevado fixava-se provisoriamente, voltando mais tarde a circular em torno do molusco. O rastro deixado pelo molusco também ficava cercado de miracídios. Ao remover o molusco, o fenômeno não terminava, pois no lugar onde estivera o molusco, os miracídios continuavam a rodopiar ativamente, como à procura de algo. Essa atração dos miracídios pelos hospedeiros intermediários resulta da ação de substâncias emanadas pelo molusco na água, a qual é denominada de SCW (snail conditioned water) por Chernin (1972).

Analisando a hemolinfa e a SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, Brasio e cols. (1985b) apontaram alguns cátions e aminoácidos (Na, K, Mg, Ca, NH, alanina, glicina,

valina, treonina, serina, leucina, prolina, metionina, ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutâmico, lisina, tirosina, arginina) como substâncias responsáveis pela atração miraxonal. Observaram também, ao estudar as linhagens BH e SJ descritas por Paraense & Correa (1963), que a intensidade de atração é dependente da linhagem do trematódeo e da espécie do planorbídeo. Estes resultados indicaram uma adaptação em nível de linhagem do trematódeo e da espécie do planorbídeo. Brasio e cols. (1985 a) verificaram que, além da SCW, o muco e as fezes dos moluscos também exerceram forte poder de atração sobre miracídios.

Machado e cols. (1988) e Balan e cols. (1993) mostraram que *B. tenagophila* infectada com furcocercárias longifurcadas com ou sem ocelos impediram a infecção por *S. mansoni*. A presença de esporocistos primários ou secundários de *S. mansoni* em *B. glabrata* (Seta e cols. 1993; Magalhães e cols. 1997) induziram a perda da capacidade de atração miraxonal, o que resulta em maior vantagem para o trematódeo que é então mais atraído por moluscos não parasitados.

O parasitismo concomitante em um mesmo molusco pode levar a uma “incompatibilidade” entre os estágios larvares de certos trematódeos (Lim & Heyneman, 1972). Quando se referem a este fenômeno, os autores têm utilizado o termo antagonismo, cujo significado é o da rivalidade e incompatibilidade entre dois ou mais organismos. Este fenômeno competitivo poderia auxiliar no controle de certos parasitas como, por exemplo, de *S. mansoni*, quando larvas de trematódeos “rivais” predariam ou destruiriam seus esporocistos ou cercárias. Esta competição entre larvas de diferentes trematódeos seria resultante de dois tipos de antagonismo: o direto, quando as rédias predam e consomem as larvas de outros trematódeos (esporocistos, rédias, cercárias), e o indireto, quando há desenvolvimento retardado e degeneração das larvas, luta por espaço

vital, competição alimentar, mecanismos imunológicos e substâncias tóxicas (Lie e cols. 1965; Lie, 1966; Lie, 1973; Lie e cols. 1987; Lim & Heyneman, 1972).

No antagonismo entre rédias e esporocistos de diferentes espécies, as rédias prevalecem. Lie (1966) quando estudou o antagonismo entre esporocistos de *S. mansoni* e rédias de *Echinostoma* em *B. glabrata* verificou que os esporocistos morrem e são consumidos pelas rédias e o mecanismo pelo qual eles morrem é presumivelmente resultado do antagonismo direto. O desenvolvimento de *S. mansoni* em *B. glabrata* na dupla infecção com *Paryphostomum segregatum* foi impedido pelos dois tipos de antagonismo: direto, onde as rédias do *P. segregatum* destruíram os esporocistos do *S. mansoni*, evidente em órgãos onde tinham muitas rédias, como ovotestis e hepatopâncreas; indireto, onde o *P. segregatum* interferiu indiretamente no desenvolvimento das larvas de *S. mansoni*, sendo que ambos os tipos de antagonismo ocorreram simultaneamente, e muitas vezes foi difícil separar o efeito de cada um sobre os esporocistos de *S. mansoni* (Lie, 1967). Quando o antagonismo ocorre entre rédias de duas espécies diferentes a superioridade da espécie dominante aparentemente não é determinada pelo tamanho nem pelo número de rédias presentes no molusco e a população de rédias subordinada pode ser consumida por poucas rédias da população dominante (Lie e cols. 1967). Estes autores observaram que no antagonismo entre *P. segregatum* e *Echinostoma barbosai* em *B. straminea* poucas rédias de *P. segregatum* eliminavam rapidamente muitas rédias de *E. barbosai*. Observaram, ainda, que os moluscos expostos simultaneamente a ambos os parasitas desenvolviam dupla infecção facilmente, mas eventualmente as larvas de *E. barbosai* desapareciam de todos os tecidos do coração, e o desenvolvimento de *P. segregatum* foi retardado, como resultado do antagonismo indireto exercido por *E. barbosai*.

O antagonismo indireto entre esporocistos de duas espécies também pode ser evidente, como Basch e cols. (1969) demonstraram em seu trabalho com *S. mansoni* e o trematódeo *Cotylurus lutzi* em *B. glabrata*. Os autores observaram que, quando os moluscos foram expostos a ambos parasitos simultaneamente, alguns adquiriram uma dupla infecção resultando em completa inibição de *C. lutzi* e eventual liberação de cercárias de *S. mansoni* e, neste caso, os esporocistos tiveram, quase sempre, seu desenvolvimento um pouco retardado. Nesse experimento o *S. mansoni* sempre foi dominante sobre *C. lutzi*, não importando a espécie que penetrou primeiro no molusco.

Lie e cols. (1975) ao realizarem reinfecção de *B. glabrata* com *Echinostoma lindoense* observaram que pode ter ocorrido falha neste processo devido ao canibalismo das rédias originadas da primeira infecção. Os autores sugeriram que as rédias provavelmente consumiam esporocistos jovens de sua própria espécie quando expostas a intervalos de três ou mais dias.

Vários autores verificaram resistência à infecção em moluscos sensibilizados por infecções prévias (Lie e cols. 1980; Lie, 1982; Sullivan e cols. 1982; Machado e cols. 1988; Balan e cols. 1993). Mecanismos imunológicos podem estar envolvidos nos processos de incompatibilidade entre larvas de trematódeos no interior dos moluscos previamente sensibilizados, o que provocaria encapsulação, fagocitose e morte dos parasitos (Lie e cols. 1980; Lie, 1982).

Observações feitas em *B. tenagophila* naturalmente parasitadas por outros Digenea - que não *S. mansoni* - e superinfectadas experimentalmente com *S. mansoni*, mostraram-se resistentes ao desenvolvimento de esporocistos de *S. mansoni* constatando-se, ainda, ausência de reação amebocitária em torno dos esporocistos degenerados de *S. mansoni*, sugerindo a não participação dos amebócitos na resistência oferecida ao desenvolvimento

destas larvas (Machado e cols. 1988; Balan e cols. 1993). Esses dados são concordantes com Lie e cols. (1980) que constataram ausência de reação amebocitária aparente em torno dos esporocistos destruídos de *S. mansoni* em infecções de *B. glabrata* suscetíveis e expostas previamente a miracídios irradiados de *Echinostoma paraensei*, o que pode significar a ação de fatores humorais na destruição do parasito. Dados sugerem que, em moluscos com infecção dupla, a resistência apresentada está relacionada com algum outro fator de defesa e não por ativação dos amebócitos (Machado e cols. 1988).

Baseado nestas experiências achou-se importante e oportuno aprofundar os estudos sobre a suscetibilidade do molusco *B. glabrata* à infecção concomitante utilizando-se espécies parasitárias diferentes daquelas já estudadas.

Neste trabalho estudou-se a infecção concomitante de *B. glabrata* com *S. mansoni* e *A. costaricensis*, verificando-se a capacidade de atração miraxonal dos moluscos infectados com o nematódeo, a produção de cercárias, a produção de larvas L3 de *A. costaricensis*, a mortalidade dos moluscos e a infecciosidade pelo *S. mansoni* e pelo *A. costaricensis*.

2 – OBJETIVOS

1) Verificar a capacidade de atração exercida por *B. glabrata* infectada por *A. costaricensis* sobre miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH.

2) Verificar a suscetibilidade de *B. glabrata* submetida à infecção concomitante com *A. costaricensis* e *S. mansoni*.

3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram feitos dois experimentos:

- 1) Atração de miracídios de *S. mansoni* por *B. glabrata* infectada por *A. costaricensis*.
- 2) Verificação da suscetibilidade de *B. glabrata* submetida à infecção concomitante com *A. costaricensis* e *S. mansoni*.

Nos dois experimentos foram utilizados exemplares melânicos de *B. glabrata* criados no moluscário do Departamento de Parasitologia (UNICAMP) e originados de população proveniente de Belo horizonte (MG, Brasil) e a linhagem simpátrica de *S. mansoni*, mantida em camundongos Swiss, SPF. A linhagem de *A. costaricensis* utilizada foi a Crisciumal (RS) mantida em *B. glabrata* e *S. hispidus* (rato-de-algodão).

No primeiro experimento foram formados quatro grupos:

GRUPO I – 10 exemplares de *B. glabrata* sadias;

GRUPO II – 10 exemplares de *B. glabrata* infectadas com *A. costaricensis*;

GRUPO III - 10 amostras de SCW de *B. glabrata* sadia;

GRUPO IV - 10 amostras de SCW de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis*;

No segundo experimento foram formados quatro grupos:

GRUPO I - 30 exemplares de *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni*;

GRUPO II - 30 exemplares de *B. glabrata* infectadas com *A. costaricensis*;

GRUPO III - 30 exemplares de *B. glabrata* pré-infectadas com *A. costaricensis* e expostos ao *S. mansoni*;

GRUPO IV - 30 exemplares de *B. glabrata* pré-infectadas com *S. mansoni* e expostos ao *A. costaricensis*;

Os moluscos foram aleatoriamente escolhidos no tanque de criação de *B. glabrata* entre os que apresentavam 7 mm de diâmetro. A pré-infecção por *S. mansoni* foi realizada pela exposição individual do molusco a 10 miracídios por 2 horas e a infecção pelo *A. costaricensis* foi feita pela exposição individual do molusco a 120 larvas L1 por 12 horas.

A comparação dos diferentes grupos experimentais foi realizada através dos parâmetros parasitológicos como a quantificação do número de cercárias eliminadas pelos moluscos (grupos I, III e IV), o número de larvas L3 de *A. costaricensis* nos moluscos sobreviventes na 9ª semana (grupos II, III e IV), o número de moluscos infectados com *S. mansoni* (grupos I, III e IV), o número de moluscos infectados por *A. costaricensis* (grupos II, III e IV) e o número de moluscos mortos de todos os grupos.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Moluscos

Nos dois experimentos foram utilizados exemplares melânicos de *B. glabrata*, criados no moluscário do Departamento de Parasitologia da Universidade de Campinas, originados de população proveniente de Belo Horizonte (MG, Brasil).

4.2. Os Parasitos

4.2.1. *S. mansoni*

A linhagem BH de *S. mansoni* utilizada nos dois experimentos foi mantida em camundongos Swiss e *B. glabrata* simpátrica.

Para a pré-infecção de *B. glabrata* foram utilizados 10 miracídios BH obtidos das fezes de camundongos Swiss, SPF. Os moluscos foram expostos aos miracídios por um período de 2 horas (Standen, 1951).

4.2.2. *A. costaricensis*

A linhagem de *A. costaricensis* utilizada nos dois experimentos foi a Crisciumal (RS) mantida em *B. glabrata* e *S. hispidus* (rato-de algodão).

As L1 de *A. costaricensis* foram obtidas das fezes de *S. hispidus*, utilizando-se o método de Rugai e cols. (1954). Para infecção de *B. glabrata* foram utilizadas 120 larvas L1 de *A. costaricensis*. O período de exposição dos moluscos às larvas foi de 12 horas.

4.3 Verificação da atração miraxonal

Para a infecção de *B. glabrata* foram utilizadas 120 larvas L1 de *A. costaricensis*. A exposição às larvas foi de 12 horas e após 20 dias da infecção por *A. costaricensis* os moluscos foram utilizados nos experimentos.

4.3.1 Descrição do aparelho utilizado

Para a realização dos experimentos utilizamos um artefato de vidro composto de duas câmaras circulares (A e B), medindo cada uma, 30 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade, unidas por um canal (C), de 40 mm de comprimento, 11 mm de largura e 10 mm de profundidade (Brasio e cols. 1985a).

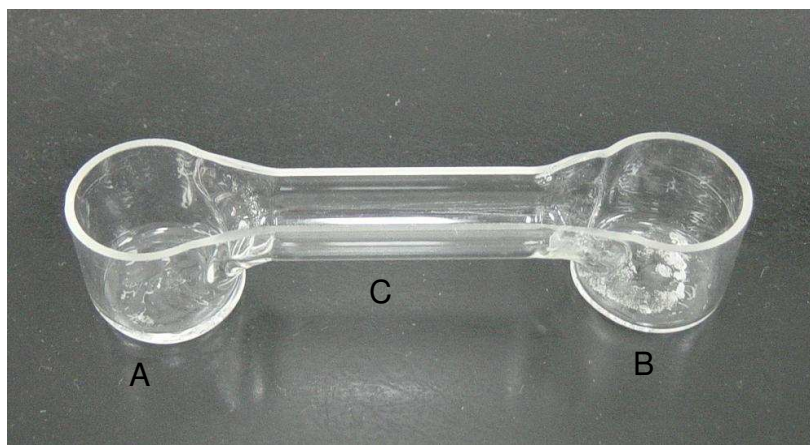


Figura 1 – Aparelho utilizado no experimento de atração miraxonal

4.3.2 Preparo da SCW (Snail Conditioned Water) dos moluscos

As amostras da água de condicionamento dos moluscos (SCW) utilizadas foram preparadas da seguinte forma: vinte moluscos com diâmetro aproximado de 10 mm foram colocados em 200 ml de água destilada e mantidos sem alimentação por um período de

24 horas. Após a retirada dos moluscos, a água foi filtrada em papel filtro e utilizada para o experimento (Chernin, 1972).

As amostras de SCW foram preparadas com moluscos sadios e, separadamente, com moluscos após vinte dias de infecção com *A. costaricensis*.

4.3.3 Teste da atração miraxonal

Os moluscos ou sua água de condicionamento (SCW) foram colocados aleatoriamente em uma das câmaras sendo que, o restante do artefato continha somente água declorada.

Dez miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH, foram depositados com uma pipeta, no centro do canal “C”.

O comportamento dos miracídios foi observado durante quinze minutos em lupa estereoscópica munida com lente frontal (X 0,5) e com iluminação abundante, homogeneamente dispersa. Decorrido os quinze minutos, foram contados os miracídios que migraram para cada câmara.

Os experimentos foram repetidos dez vezes e em cada replicação foram utilizados diferentes espécimes de moluscos ou de amostras de SCW. Após a realização de cada observação, o aparelho foi lavado cuidadosamente para evitar vestígios de muco e de fezes que pudessem interferir em outras observações (Brasio e cols. 1985a).

4.3.4 Análise Estatística

Utilizamos métodos estatísticos para análise da capacidade de atração entre moluscos infectados X moluscos sadios, SCW de moluscos infectados X SCW de moluscos sadios, SCW de moluscos sadios X moluscos sadios e SCW de moluscos

infectados X moluscos infectados. Para essas análises utilizamos o PROC GLM (General Linear Procedure) do software SAS (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006). Diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

4.4. Infecção concomitante

4.4.1. Infecção dos moluscos

Os moluscos dos grupos I e IV foram expostos, individualmente a 10 miracídios BH obtidos das fezes de camundongos Swiss, SPF, previamente infectados. A exposição dos moluscos aos miracídios foi de 2 horas (Standen, 1951), a uma temperatura de 28°C e a luz incandescente de 60 Watts.

Vinte e quatro horas após a exposição aos miracídios, os moluscos do grupo IV foram expostos individualmente a 120 larvas L1 do *A. costaricensis* por 12 horas. Após esse período as larvas L1 sobranes foram contadas.

Os moluscos dos grupos II e III foram expostos, individualmente, a 120 larvas L1 de *A. costaricensis* durante 12 horas. Após esse período as larvas L1 sobranes foram contadas.

Quarenta e oito horas após a exposição ao *A. costaricensis* os moluscos do grupo III foram expostos, individualmente, a 10 miracídios de *S. mansoni* durante 2 horas (Standen, 1951), a uma temperatura de 28°C e a luz incandescente de 60 Watts.

Trinta dias após a infecção pelo *S. mansoni*, os moluscos foram observados duas vezes por semana para a verificação da eliminação de cercárias e larvas L3 do *A.*

costaricensis através da exposição à lâmpada incandescente de 60 Watts e a temperatura de 28°C.

Os moluscos foram observados aproximadamente até 60 dias após a exposição aos miracídios, quando foram sacrificados para a observação da presença de esporocistos secundários e para a recuperação de larvas L3 por digestão com pepsina e ácido clorídrico (Wallace & Rosen, 1969).

Em todos os grupos os moluscos foram mantidos individualmente em frascos de 250 ml, com água decolorada. A limpeza dos frascos foi realizada uma vez por semana, para evitar a proliferação de algas e acúmulo de detritos, acrescentando-se carbonato de cálcio toda vez que a água foi trocada.

A alimentação dos moluscos foi feita, diariamente, *ad libitum*, com alface fresca.

Em todos os grupos expostos ao *S. mansoni*, as cercárias foram contadas de acordo com a técnica de Paraense & Correa (1989).

4.4.2. Análise Estatística

Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando o PROC GLM (general linear procedure) do software SAS (Statistical Analysis System, 2006). A sobrevivência dos moluscos foi analisada pelo método de produto-limite, de Kaplan-Meier.

5 - RESULTADOS

Artigo I – Atração de miracídios de *Schistosoma mansoni* por *Biomphalaria glabrata* pré-infectada por *Angiostrongylus costaricensis*.

Os resultados foram estatisticamente analisados pelo Prof^º Dr. Arício Xavier Linhares.

Artigo II – Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata* submetida à infecção concomitante com *Angiostrongylus costaricensis* e *Schistosoma mansoni*.

Os resultados foram estatisticamente analisados pelo Prof^º Dr. José Ferreira de Carvalho.

ATRAÇÃO DE MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* POR *Biomphalaria glabrata* PRÉ-
INFECTADA POR *Angiostrongylus costaricensis*

Guerino, L. R., Zannoti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A. e Linhares, A.X.

Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas,
UNICAMP, C. P. 6109, CEP 13083-970, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas,
SP, Brazil.

Correspondência para: Eliana Maria Zannoti-Magalhães, Departamento de Parasitologia,
Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Caixa Postal 6109,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, e-mail: emzm@unicamp.br

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis*, *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, atração miraxonal.

RESUMO

ATRAÇÃO DE MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* POR *Biomphalaria glabrata* PRÉ-INFECTADA POR *Angiostrongylus costaricensis*

Utilizando um artefato de vidro composto por duas câmaras unidas por um canal testamos a atração miraxonal exercida por *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus costaricensis* sobre larvas de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. Os moluscos ou sua água de condicionamento (SCW) foram colocados aleatoriamente em uma das câmaras sendo que, o restante do artefato continha somente água declorada. Dez miracídios foram colocados no centro do canal e seu comportamento foi observado por 15 minutos. Foram feitas dez replicações de cada experimento, utilizando-se espécimes de moluscos ou de amostras de SCW diferentes. Verificou-se que tanto *B. glabrata* sadia quanto àquela infectada com *A. costaricensis* ou sua água de condicionamento atraíram miracídios de *S. mansoni*. Observamos ainda, haver maior atração miraxonal frente à SCW de moluscos infectados com *A. costaricensis* (89%) do que o próprio molusco infectado com *A. costaricensis* (71%).

INTRODUÇÃO

Angiostrongylus costaricensis (Morera & Céspedes, 1971), causa a angiostrongilíase abdominal. A infecção do homem é considerada acidental, tendo este nematódeo como hospedeiros definitivos roedores silvestres, sendo identificados na América Central, o *Sigmodon hispidus* (Tesh e cols., 1973) e as espécies *Orizomys nigripes* e *Orizomys ratticeps*, no sul do Brasil (Graeff-Teixeira e cols., 1990). Como hospedeiros intermediários são relatados moluscos terrestres da família Veronicellidae, particularmente *Sarasinula linguaeformis* (Laitano e cols., 2001), *Phyllocaulis variegatus* (Graeff-Teixeira e cols., 1989b), da família Limacidae as espécies *Limax maximus* e *Limax flavus* e ainda *Bradybaena similaris*, *Belocaulus angustipes* (Graeff-Teixeira e cols., 1993), *P. soleiformis*, *Helix aspersa* (Thiengo e cols., 1993) e *Deroceras laeve* (Maurer e cols., 2002). Em laboratório várias espécies de moluscos como *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*, *Megalobulimus sp* e *Achatina fulica* foram susceptíveis ao *A. costaricensis* (Graeff-Teixeira e cols., 1989a; Monge e cols., 1978; Lima e cols., 1992; Carvalho e cols., 2003).

A existência de atração exercida por moluscos vetores sobre miracídios de *Schistosoma mansoni* foi sugerida por Kloetzel (1958) ao observar o comportamento do trematódeo na presença de *B. glabrata*. A atração dos miracídios pelos hospedeiros intermediários resulta da ação de substâncias emanadas pelo molusco na água, a qual foi denominada de SCW (snail conditioned water) por Chernin (1972). Analisando a hemolinfa e a SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, Brasio e cols. (1985b) apontaram alguns cátions e aminoácidos (Na, K,

Mg, Ca, NH, alanina, glicina, valina, treonina, serina, leucina, prolina, metionina, ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutâmico, lisina, tirosina, arginina) como responsáveis pela atração miraxonal. Observaram também, ao estudar as linhagens BH e SJ de *S. mansoni* descritas por Paraense & Correa (1963), que a intensidade de atração miraxonal é dependente da linhagem do trematódeo e da espécie do planorbídeo. Brasio e cols. (1985a) verificaram ainda que, além da SCW, o muco e as fezes dos moluscos também exercem forte poder de atração sobre miracídios.

Machado e cols. (1988) e Balan e cols. (1993) mostraram que *B. tenagophila* infectada com furcocercárias longifurcadas com ou sem ocelos impediram a infecção por *S. mansoni*. A presença de esporocistos primários ou secundários de *S. mansoni* em *B. glabrata* (Seta e cols., 1993; Magalhães e cols., 1997) induziram a perda da capacidade de atração miraxonal, o que resulta em maior vantagem para o trematódeo, que é então mais atraído por moluscos não parasitados.

Neste trabalho verificamos a capacidade de atração miraxonal exercida por *B. glabrata* pré-infectada com *A. costaricensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados exemplares melânicos de *B. glabrata* originados de população proveniente de Belo Horizonte (MG, Brasil) e a linhagem simpátrica de *S. mansoni*, mantida em camundongos Swiss, SPF.

A linhagem de *A. costaricensis* utilizada foi a Crisciumal (RS, Brasil) mantida em *B. glabrata* e *S. hispidus* (rato-de-algodão). As L1 de *A. costaricensis* foram obtidas das fezes de *S. hispidus*, utilizando-se o método de Rugai e cols. (1954). Para infecção de *B. glabrata* foram utilizadas 120 larvas L1 de *A. costaricensis*. O período de exposição dos moluscos às larvas foi de 12 horas e, após 20 dias da infecção, os moluscos foram utilizados nos experimentos.

Para a realização dos experimentos utilizamos um artefato de vidro composto de duas câmaras circulares (A e B), com 30 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade, unidas por um canal (C), de 40 mm de comprimento, 11 mm de largura e 10 mm de profundidade (Brasio e cols., 1985a).

Amostras da água de condicionamento dos moluscos (SCW) também foram utilizadas, sendo preparadas da seguinte forma: vinte moluscos com diâmetro aproximado de 10 mm foram colocados em 200 ml de água destilada e mantidos sem alimentação durante 24 horas (Chernin, 1972). Após a retirada dos moluscos, a água foi filtrada em papel filtro e utilizada para o experimento.

As amostras de SCW foram preparadas com moluscos sadios e, separadamente, com moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Foram constituídos quatro grupos: Grupo I – 10 exemplares de *B. glabrata* sadios; Grupo II – 10 exemplares de *B. glabrata* infectadas com *A. costaricensis*;

Grupo III -10 amostras de SCW de *B. glabrata* sadia; Grupo IV - 10 amostras de SCW de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis*;

Os moluscos ou amostras de SCW foram colocados na câmara “A” do artefato de vidro descrito acima, e a câmara “B” foi preenchida com água declorada.

Dez miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH, foram depositados com uma pipeta, no centro do canal “C”.

O comportamento dos miracídios foi observado durante quinze minutos, em lupa estereoscópica munida com lente frontal (X 0,5) e com iluminação abundante, homogeneamente dispersa. Decorridos os quinze minutos, foi contado o número de miracídios que migraram para cada câmara.

Os experimentos foram repetidos dez vezes e em cada replicação foram utilizados diferentes espécimes de moluscos ou de amostras de SCW. Após a realização de cada observação, o aparelho foi lavado cuidadosamente para evitar vestígios de muco e de fezes que pudessem interferir em outras observações (Brasio e cols.,1985a).

A capacidade de atração miraxonal foi analisada estatisticamente através do PROC GLM (General Linear Procedure), do software SAS (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006). Diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

RESULTADOS

Conforme os resultados contidos na Tabela 1, houve diferença significativa na capacidade de atração de miracídios quando se comparou o caramujo infectado e o caramujo sadio ($P= 0,0487$). Quando se comparou a atração de miracídios pela SCW de caramujo infectado e pela SCW de caramujo sadio não observamos diferença significativa ($P= 0,2945$) (Tabela 2). O Teste de Duncan não detectou diferença significativa na capacidade de atração de miracídios quando se comparou a atração exercida pela SCW originada de caramujo sadio e o caramujo sadio ($P= 0,7183$) (Tabela 3). Diferença significativa foi verificada quando se comparou a capacidade de atração de miracídios pela SCW originada de caramujo infectado e o caramujo infectado ($P= 0,0124$) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

O sucesso do parasitismo pode ser atribuído em parte à descoberta do hospedeiro, que pode estar próximo ou não. Dessa forma a existência de substâncias que atraem os parasitos para junto de seu hospedeiro constitui uma estratégia importante para o sucesso do parasitismo. Chernin (1972) e posteriormente Brasio e cols. (1985b), evidenciaram na água de condicionamento dos moluscos e na hemolinfa componentes como aminoácidos e cátions que atraem miracídios de *S. mansoni*.

Em nosso experimento, *B. glabrata* sadia (grupo I) atraiu 86% dos miracídios de *S. mansoni* e *B. glabrata* pré-infectada por *A. costaricensis* atraiu 71%. Embora se tenha constatado redução significativa da capacidade de atração por parte do molusco infectado pelo *A. costaricensis*, ainda assim, verificou-se que *B. glabrata* infectada por este nematódeo continua exercendo forte capacidade de atração miracidiana. Seta (1996) obteve resultados semelhantes quando submeteu miracídios da linhagem SJ aos moluscos *B. tenagophila* infectados com *S. mansoni*, observando 70% de atração. Em contraste, quando a autora utilizou *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* obteve apenas 17% de atração miraxonal. *Biomphalaria glabrata* infectada com *S. mansoni* contendo esporocistos primários (Seta e cols., 1993) ou esporocistos secundários (Magalhães e cols., 1997) perde o poder de atrair miracídios, o mesmo ocorrendo com a SCW.

Quando submetemos miracídios BH a SCW de *B. glabrata* sadia, (grupo III), verificamos que 84% dos miracídios são atraídos. Seta (1996) obteve 100% de atração miraxonal quando submeteu miracídios BH frente à SCW de *B. glabrata*

sadia. Estudos realizados por Machado e cols. (1988) em infecções concomitantes por diferentes espécies de trematódeos em *B. tenagophila* mostraram que o desenvolvimento da infecção natural de moluscos era freqüentemente mono-específica. Moluscos naturalmente infectados com equinostomocercária e distomocercária com acúleo apresentaram resistência parcial ao desenvolvimento do *S. mansoni* na superinfecção experimental, com índices de resistência de 73% e 87%, respectivamente. Segundo Balan e col. (1993) exemplares de *B. tenagophila* naturalmente parasitados por trematódeos e superinfectados experimentalmente por *S. mansoni* mostraram-se resistentes ao desenvolvimento de esporocistos de *S. mansoni*.

Alterações bioquímicas no molusco infectado por *S. mansoni* foram verificadas por vários autores (Target, 1962; Gilbertson e cols., 1967; Michelson & Dubois, 1973; Brasio e cols., 1985b; Seta, 1996). Estudos realizados por Stewart e cols. (1985) mostraram uma elevação no nível de glicose e de enzimas na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* em conseqüência das alterações nos tecidos parasitados, caracterizadas pelas intensas reações hemocitárias em torno das larvas (Bruno, 2005).

Concluímos que *B. glabrata* infectada por *A. costaricensis* atraiu com menor intensidade os miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH. A água de condicionamento de *B. glabrata* infectada por *A. costaricensis* atraiu mais miracídios BH do que o molusco infectado pelo nematódeo.

TABELA 1 - Número médio de miracídios de *S. mansoni* atraídos por *B. glabrata* sadia (CS) ou infectada (CI) por *A. costaricensis*.

Teste de Duncan*	Miracídios (Média $\pm$ dp)	Número de Miracídios	Tratamento
A	8,6 $\pm$ 1,26	10	CS
B	7,1 $\pm$ 1,85	10	CI

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

TABELA 2 - Número médio de miracídios de *S. mansoni* atraídos por SCW de *B. glabrata* sadia (ACCS) ou infectada (ACCI) por *A. costaricensis*.

Teste de Duncan*	Miracídios (Média $\pm$ dp)	Número de Miracídios	Tratamento
A	8,9 $\pm$ 0,87	10	ACCI
A	8,4 $\pm$ 1,17	10	ACCS

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

TABELA 3 - Número médio de miracídios de *S. mansoni* atraídos por *B. glabrata* sadia (CS) ou por sua SCW (ACCS).

Teste de Duncan*	Miracídios (Média $\pm$ dp)	Número de Miracídios	Tratamento
A	8,6 $\pm$ 1,26	10	CS
A	8,4 $\pm$ 1,17	10	ACCS

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

TABELA 4 - Número médio de miracídios de *S. mansoni* atraídos por *B. glabrata* infectada (CI) por *A. costaricensis* ou por sua SCW (ACCI).

Teste de Duncan*	Miracídios (Média $\pm$ dp)	Número de Miracídios	Tratamento
A	8,9 $\pm$ 0,87	10	ACCI
B	7,1 $\pm$ 1,85	10	CI

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balan, D. S. L., Magalhães, L. A. & Piedrabuena, A. E. 1993. Immunological and parasitological aspects of *Biomphalaria tenagophila* infected by *Schistosoma mansoni* and other Digenea. *Rev. Saúde Pública*, 27: 421-429.
- Brasio, B. C., Magalhães, L. A., Miller, J. & Carvalho, J. F. 1985a. Atração de miracídios de *Schistosoma mansoni* por hospedeiros invertebrados. Comportamento de miracídios frente a girinos de *Hyla fuscovaria*. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 19: 18-27.
- Brasio, B. C., Magalhães, L. A., Miller, J. & Carvalho, J. F., 1985b. Verificação da resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 19: 154-70.
- Bruno, T. I. B. 2005. Infecção de *Biomphalaria glabrata* com *Angiostrongylus costaricensis*: desenvolvimento larval e resposta hemocitária. Campinas. [Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas].
- Carvalho, O. S.; Teles H. M. S.; Mota, E. M.; Mendonça, C. L. G. F. & Lenzi, H. L. 2003. Potentiality of *Achatina fulica* Bodwdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36: 1-6.
- Chernin, E. 1972. Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail conditioned water. *J. Parasit.*, 58: 209-12.
- Gilbertson, D. E.; Etges, F. J. & Ogle, J. D. 1967. Free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph: comparison of four geographic strains and effect of infection by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 53: 565-568.

- Graeff-Teixeira, C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. 1989a. Suscetibilidade de *Megalobulimus* sp. à infecção por larvas de *Angiostrongylus costaricensis*. Anais do XI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, p.51.
- Graeff-Teixeira, C., Thomé, J. W., Pinto, S. C. C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. 1989b. *Phyllocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 65-68.
- Graeff-Teixeira, C., Ávila-Pires, F. D., Machado, R. C. C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. 1990. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 32: 147-150.
- Graeff-Teixeira, C., Thiengo, S. C., Thomé, J. W., Medeiros, A. B., Camilo-Coura, L. & Agostini, A. A. 1993. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in Southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 487-489.
- Kloetzel, K. 1958. Observações sobre o tropismo do miracídio do *Schistosoma mansoni* pelo molusco *Australorbis glabratus*. *Rev. Bras. Biol.*, 18: 223-32.
- Laitano, A. C, Genro, J. P.; Fontoura, R., Branco, S. S. L., Maurer, R. L., Graeff-Teixeira, C., Milanez, J. M., Chiaradia, L. A. & Thomé, J. W. 2001. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in Southern Brazil, in new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34: 95-97.
- Lima, L. C., Massara, C. L., Souza, C. P., Vidigal, T. D., Lenzi, H. L. & Carvalho, O. S. 1992. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo

- Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda Angiostrongylidae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34: 399-402.
- Machado, S. M. P., Magalhães, L. A., Artigas, P. T., Cordeiro, N. S. & Carvalho, J. F. 1988. Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 22: 484-488.
- Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M. & Carvalho, J. F. 1997. Observations on the miraxonal attraction exercised by sexually immature or adult *Biomphalaria glabrata* infected or not by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 31: 121-124.
- Maurer, R. L.; Graeff-Teixeira, C.; Thomé, J. W.; Chiaradia, L. A.; Sugaya, H. & Yoshimura, K. 2002. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 44: 53-54.
- Michelson, E. H. & Dubois, L. 1973. Increase alkaline phosphatase in the tissues and hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 763-767.
- Monge, E. A., Arroyo, R. & Solano, E. 1978. A new definitive host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes 1971). *J. Parasitol.*, 64: 34.
- Morera, P. & Céspedes, R. 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 18: 173-185.

- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. 1963. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. *Cien. e Cult.*, 15: 245-6.
- Rugai, E., Matos, T. & Brizola, A. P. 1954. Nova técnica para isolar larvas e nematóides das fezes. Modificação da técnica de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14: 5-8.
- SAS Institut Inc 2006. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA.
- Seta, L., Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M., Oliveira Filho, B., Marangoni, S., Carvalho, J. F. & Reis, E. R. 1993. Estudo da atração miraxonal em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* livres de infecção ou infectados por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2: 51.
- Seta, L. 1996. Estudo da atração miraxonal e da composição bioquímica da hemolinfa, da água de condicionamento e da glândula do albúmen de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni*. Campinas. [Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas].
- Stewart, G. L.; Ubelaker, J. E. & Curtis, D. 1985. Pathophysiology alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. *J. Invert. Pathol.*, 45: 152-157.
- Target, G. A. T. 1962. A study of the amino acids present in *Lymnaea stagnalis*, *Planorbis corneus* and *Australorbis glabratus* before and after infection with *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 56: 210-215.
- Tesh, R. B., Ackerman, L. J., Dietz, W. H. & Williams, J. A. 1973, *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathologic findings in wild rodents infected with the parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 348-356.

Thiengo, S. C.; Amato, S. B.; Aventino, A. & Araújo, J. L. B. 1993. Estudo sobre os hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Rev. Bras. Parasitol. Veter.*, 2: 64.

SUSCETIBILIDADE DE *Biomphalaria glabrata* SUBMETIDA À INFECÇÃO
CONCOMITANTE COM *Angiostrongylus costaricensis* E *Schistosoma mansoni*.

Guerino, L. R., Zannotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A. e Carvalho, J.F.

Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, UNICAMP, C.P. 6109, CEP 13083-970, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil.

Correspondência para: Eliana Maria Zannotti-Magalhães, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil, e-mail: emzm@unicamp.br

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis*, *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, infecção concomitante, suscetibilidade.

RESUMO

SUSCETIBILIDADE DE *Biomphalaria glabrata* SUBMETIDA À INFECÇÃO CONCOMITANTE COM *Angiostrongylus costaricensis* E *Schistosoma mansoni*.

Angiostrongylus costaricensis é um nematódeo parasita da artéria mesentérica de roedores silvestres. Alguns moluscos terrestres podem ser hospedeiros naturais deste nematódeo. Os moluscos podem ser infectados pela ingestão ou penetração ativa de larvas L1 de *A. costaricensis*. Neste trabalho verificou-se a infecção concomitante de *Biomphalaria glabrata* com *Schistosoma mansoni* e *A. costaricensis*. A infecção prévia de *B. glabrata* com *A. costaricensis* (com intervalo de 48 horas), facilitou o desenvolvimento do *S. mansoni*. O aumento da suscetibilidade foi verificado pela elevação da taxa de infecção por *S. mansoni* (96,7%), pelo maior número de cercárias liberadas e pela baixa mortalidade dos moluscos (20%) quando comparado com os moluscos infectados somente com *S. mansoni* (36,7%). A infecção de *B. glabrata* previamente com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni* também facilitou o desenvolvimento do *A. costaricensis* uma vez que na nona semana de infecção foi recuperada maior quantidade de larvas L3 de *A. costaricensis* (12 larvas/molusco), enquanto nos moluscos expostos somente ao *A. costaricensis* o número de larvas recuperadas foi menor (8 larvas/molusco). Entretanto a pré-infecção de *B. glabrata*, com *S. mansoni* (com intervalo de 24 horas), e posteriormente com *A. costaricensis* mostrou-se muito prejudicial à *B. glabrata* provocando grande mortalidade dos moluscos (83%). A maior mortalidade dos moluscos provocou menor taxa de infecção pelo *S. mansoni* (63,3%), menor recuperação de larvas L3 pelo *A. costaricensis* (10 larvas/molusco) e menor número de cercárias liberadas.

INTRODUÇÃO

A suscetibilidade de planorbídeos à infecção pelo *S. mansoni* é controlada geneticamente como demonstrado por Newton (1953,1954) e posteriormente por Richards & Merrit (1972), Richards (1973) e Santana e cols. (1978). Outros fatores podem influenciar a suscetibilidade dos moluscos como a linhagem do trematódeo (Paraense & Correa, 1963a e 1963b), a idade do hospedeiro (Newton, 1953), e a infecção simultânea com outros parasitas. Lie e cols. (1977) demonstraram que, em infecções concomitantes, *B. glabrata* pré-exposta ao *Echinostoma paraensei* tornava-se mais suscetível ao *S. mansoni*.

Os mecanismos envolvidos nas infecções mistas podem ser de antagonismo direto, através da predação por parte das rédias das larvas de outros trematódeos (esporocistos, rédias, cercárias) ou por antagonismo indireto através da competição alimentar ou pelo espaço, por mecanismos imunológicos e substâncias tóxicas (Lie e cols., 1965; Lie,1966 ; Lim & Heyneman ,1972 ; Lie,1973).

Observações feitas em *B. tenagophila* naturalmente parasitadas por outros Digenea que não *S. mansoni*, e superinfectadas experimentalmente com *S. mansoni*, mostraram-se resistentes ao desenvolvimento de esporocistos de *S. mansoni*, constatando-se, ainda, ausência de reação amebocitária em torno dos esporocistos degenerados (Machado e cols., 1988 ; Balan e cols.,1993).

Em infecções simultâneas por *A. cantonensis* e *S. mansoni* em *B. glabrata*, Yousif & Lämmler (1977) não verificaram efeito inibitório do nematódeo no desenvolvimento do *S. mansoni*. Pereira e cols. (2006) verificaram que a infecção prévia de *B. glabrata* por *Angiostrongylus vasorum* aumentou a suscetibilidade do molusco ao *S. mansoni*.

Neste trabalho, estudamos o desenvolvimento do *S. mansoni* e do *A. costaricensis* em infecções concomitantes em *B. glabrata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados exemplares melânicos de *B. glabrata* originados de população proveniente de Belo Horizonte (MG, Brasil) e a linhagem simpátrica de *S. mansoni*, mantida em camundongos Swiss. Para a infecção de *B. glabrata* foram utilizados 10 miracídios BH obtidos das fezes de camundongos Swiss, previamente infectados. Os moluscos foram expostos aos miracídios por um período de 2 horas (Standen, 1951), a uma temperatura de 28°C e a luz incandescente de 60 Watts.

A linhagem de *A. costaricensis* utilizada foi a Crisciumal (RS, Brasil) mantida em *B. glabrata* e *Sigmodon hispidus* (rato-de-algodão). As larvas L1 de *A. costaricensis* foram obtidas das fezes de *S. hispidus*, utilizando-se o método de Rugai e cols. (1954). Para infecção de *B. glabrata* foram utilizadas 120 larvas L1 de *A. costaricensis*.

Foram constituídos quatro grupos: Grupo I – 30 exemplares de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni*; Grupo II – 30 exemplares de *B. glabrata* infectados com *A. costaricensis*; Grupo III -30 exemplares de *B. glabrata* pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*; Grupo IV - 30 exemplares de *B. glabrata* pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Os moluscos dos grupos I e IV foram expostos individualmente a 10 miracídios. Vinte e quatro horas após a exposição aos miracídios, os moluscos do grupo IV foram expostos individualmente a 120 larvas L1 do *A. costaricensis* por 12 horas. Após esse período as larvas L1 sobrantes foram contadas.

Os moluscos dos grupos II e III foram expostos individualmente a 120 larvas L1 de *A. costaricensis* por 12 horas. Após esse período as larvas L1 sobrantes foram contadas.

Quarenta e oito horas após a exposição ao *A. costaricensis* os moluscos do grupo III foram expostos individualmente a 10 miracídios de *S. mansoni*.

Trinta dias após a infecção pelo *S. mansoni* os moluscos foram observados duas vezes por semana para a verificação da eliminação de cercárias e larvas L3 do *A. costaricensis* pela exposição à lâmpada incandescente de 60 Watts e a temperatura de 28°C. Sessenta dias após a exposição aos miracídios, os moluscos sobreviventes foram sacrificados para a verificação da presença de esporocistos secundários e para a recuperação de larvas L3 por digestão com pepsina e ácido clorídrico (Wallace & Rosen, 1969).

Em todos os grupos os moluscos foram mantidos individualmente em frascos de 250 ml com água declorada. A limpeza dos frascos foi realizada uma vez por semana para evitar a proliferação de algas e acúmulo de detritos, acrescentando-se carbonato de cálcio toda vez que a água foi trocada. A alimentação dos moluscos foi feita, diariamente, *ad libitum*, com alface fresca.

Em todos os grupos expostos ao *S. mansoni*, as cercárias foram contadas de acordo com a técnica de Paraense & Correa (1989).

Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando o PROC GLM (General Linear Procedure) do software SAS (Statistical Analysis System, 2006). A sobrevivência dos moluscos foi analisada pelo método de produto-limite, de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Os dados referentes à suscetibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni* e ao *A. costaricensis* se encontram na Tabela 1.

O grupo III (pré-infectados por *A. costaricensis* e posteriormente por *S. mansoni*) apresentou o maior número de moluscos positivos para *S. mansoni* com 96,7%, seguidos pelo grupo I (infectados somente com *S. mansoni*) com 73,3% e pelo grupo IV (pré-infectados por *S. mansoni* e posteriormente por *A. costaricensis*) com 63,3% (Tabela 1). A comparação da positividade para o *S. mansoni* (Grupos IVxI e IIIxI) foi feita através das razões de chance (or, odds ratio). Se a razão de chance, or (IV,I)>1, então IV apresenta maior positividade do que I. Se or(IV,I)<1, IV apresenta menor positividade do que I. A razão de chance de IV para I (o mesmo valendo III para I) é determinado pelo quociente: $or(IV,I) = \{p+(IV)/p-(IV)\} / \{p+(I)/p-(I)\}$, onde $p+(IV)$ é a probabilidade de positivo para o grupo IV; $p+(I)$ para o grupo I e analogamente, $1-p+(IV)=p-(IV)$ é a probabilidade de negativo para o grupo IV; $p-(I)$ para o grupo I. A mesma análise foi feita para comparar os grupos III e I. Os resultados das comparações estão apresentados em intervalos de confiança de 95%. Se o “1” estiver fora do intervalo, então haverá diferença nas positivities dos dois grupos. Conforme a Tabela 2, a positividade no grupo III (pré-infectados por *A. costaricensis* e posteriormente por *S. mansoni*) foi maior e significativamente diferente daquela apresentada pelo grupo I (infectados somente com *S. mansoni*). Para os grupos IV e I não houve diferença de positividade.

Na Figura 1, estão apresentados os resultados referentes ao número de cercárias eliminadas pelos moluscos dos grupos I, III e IV. Os moluscos do grupo IV (pré-infectados por *S. mansoni* e posteriormente por *A. costaricensis*) começaram a eliminar cercárias na

quinta semana após a exposição aos miracídios de *S.mansoni*, enquanto os demais grupos começaram a eliminar cercárias após seis semanas. O período patente manteve-se até a nona semana, após a qual os moluscos foram sacrificados. A significância estatística foi determinada pelo teste qui-quadrado de Pearson, para comparar as proporções da primeira ocorrência, por grupos. Resultou 66,2 (8 gl) com nível de significância $p < 0.0001$.

O total de cercárias recuperadas foi comparado entre os grupos. A comparação foi feita através de modelos lineares, com análise de variância. As médias de mínimos quadrados foram usadas para as comparações. Esta análise de variância básica mostrou que houve evidências de diferenças entre as médias ($p=0.008$). Testes adicionais foram feitos mostrando as comparações das médias duas a duas. Os níveis de significância foram corrigidos para o efeito de múltiplas comparações pelo método de Tukey, verificando-se que houve evidência de diferença somente entre os grupos III e IV. O grupo IV produziu menos cercárias.

Quanto ao número de moluscos positivos para *A. costaricensis* (tabela 1) em que foram recuperadas larvas L3 após a nona semana de infecção, os moluscos do grupo II (infectados somente com *A. costaricensis*) foram os mais susceptíveis, com 83,3% de moluscos infectados, seguido pelos moluscos do grupo III (pré-infectados por *A. costaricensis* e posteriormente por *S. mansoni*), com 80,0% de infectados. Os moluscos do grupo IV (pré-infectados por *S. mansoni* e posteriormente por *A. costaricensis*) foram os menos susceptíveis com apenas 16,7% de moluscos positivos para *A. costaricensis* (Tabela 1). O total de larvas L3 recuperadas na 9ª semana de infecção foi comparado entre os grupos II, III e IV. A estatística qui-quadrado de Pearson resultou em $p < 0.0001$,

resultado altamente significativo. A regressão logística confirmou esse resultado e acrescentou comparações entre os grupos. A tabela 3 mostra as estimativas das razões de chance, de cada grupo, comparado com o grupo IV. Nota-se que não houve evidência de diferença entre os grupos III e IV. Houve evidência de diferença nas taxas de recuperação entre os grupos II e IV, o grupo II mostrou menor taxa de recuperação. Somente um molusco do grupo IV, durante a exposição à lâmpada incandescente, liberou uma larva L3 na 5ª semana após a infecção. Quando se comparou o número de larvas recuperadas pelo número de larvas expostas verificou-se que os moluscos dos grupos III e II diferiram nitidamente. Já não foi nítida a diferença entre os moluscos dos grupos IV e II (Tabela 4). Quando se comparou o número de larvas recuperadas pelo número de larvas infectantes constatou-se que os moluscos dos grupos III e IV diferiram do grupo II (Tabela 5).

Na figura 2 estão apresentados os resultados referentes à sobrevivência dos moluscos dos grupos I, II, III e IV ao longo das nove semanas de duração do experimento. O teste da hipótese de igualdade das curvas de sobrevivência, feito pela estatística de log-rank resultou significativo ($p < 0.0001$), implicando em evidência de diferença entre as curvas de sobrevivência; decidiu-se testar a igualdade entre os grupos I, II e III, concluindo-se que houve apenas fraca evidência de diferença entre as três curvas ($p=0,06$). O grupo IV (pré-infectados por *S. mansoni* e posteriormente por *A. costaricensis*) teve sobrevida menor e os grupos I, II e III tiveram curvas de sobrevivência parecidas.

DISCUSSÃO

O estabelecimento da infecção prévia com *A. costaricensis* em *B. glabrata* aumentou a suscetibilidade do molusco à infecção ao *S. mansoni*. Entretanto isto não aconteceu quando os moluscos foram pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*. O aumento da suscetibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni* foi também reportado em moluscos pré-infectados com *E. paraensei* (Lie e cols., 1977 ; Lie., 1982) e em *B. tenagophila* pré-infectados com *A. vasorum* (Pereira e cols. 2006). Vários autores, ao contrário, verificaram resistência em moluscos sensibilizados por infecções prévias (Lie e cols., 1980; Lie, 1982; Sullivan e cols., 1982; Machado e cols., 1988 ; Balan e cols. 1993). Em contraste, Yousif & Lämmler (1977) constataram que a pré-infecção de *B. glabrata* com *A. cantonensis* não inibiu nem retardou a subsequente infecção dos moluscos com *S. mansoni*.

O aumento da suscetibilidade nos moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* (grupo III) refletiu na alta taxa de infecção por *S. mansoni* (96,7%), tendo em vista que no grupo I, onde os moluscos foram expostos somente ao trematódeo, a taxa de infecção foi de 73%. Embora a quantidade de cercárias eliminadas pelos moluscos do grupo III tenha sido maior do que a do grupo I, essa diferença não foi significativa. A infecção de *B. glabrata* previamente com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni* facilitou o desenvolvimento do nematódeo também, uma vez que na nona semana de infecção foi recuperado maior número de larvas L3 de *A. costaricensis* (12 larvas/molusco) enquanto que em moluscos expostos somente ao *A. costaricensis* (grupo II) o número de larvas recuperadas foi menor (8 larvas/molusco) (tabela 1).

Os moluscos com infecção prévia com *A. costaricensis* apresentaram uma taxa de mortalidade de 20%, enquanto que os moluscos infectados somente com *S. mansoni* apresentaram uma taxa de mortalidade de 36,7%. Resultados opostos foram obtidos por Pereira e cols. (2006) quando constataram que *B. tenagophila* pré-infectada com *A. vasorum* e posteriormente com *S. mansoni* apresentaram uma mortalidade maior que a observada em moluscos infectados somente com *S. mansoni*. Nossos dados se assemelham àqueles obtidos por Basch e cols. (1969) sobre antagonismo entre o *S. mansoni* e o trematódeo *Cotylurus lutzi* em *B. glabrata*, onde foi relatado que quando moluscos são pré-infectados com *C. lutzi* e posteriormente pelo *S. mansoni*, esta infecção se dá tão facilmente como naqueles infectados apenas pelo *S. mansoni*. A pré-infecção com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis* foi muito prejudicial à *B. glabrata* provocando grande mortalidade dos moluscos (83%). A maior mortalidade influenciou na menor taxa de infecção pelo *S. mansoni* (63% dos moluscos expostos ao trematódeo) e pelo *A. costaricensis* (16,7% dos moluscos expostos ao nematódeo). O início do período patente foi seguido pelo aumento acentuado da mortalidade do hospedeiro. Esses dados são concordantes com Pan (1965), que observou reação generalizada nos tecidos do hospedeiro com o trânsito das cercárias maduras. Para Barbosa (1959) a ação espoliadora e mecânica das larvas de *S. mansoni* nos tecidos do molusco, determina a redução da sobrevivência do hospedeiro.

O número de larvas L3 recuperadas por molusco foi maior nos moluscos que receberam infecção dupla (grupo III = 12 larvas/ molusco; grupo IV = 10 larvas/molusco) do que moluscos infectados somente pelo *A. costaricensis* (grupo II= 8 larvas/molusco). Larvas L3 de *A. costaricensis* foram recuperadas em todos os moluscos sobreviventes nos

grupos III e IV (que receberam infecção concomitante com *S. mansoni*). Em apenas dois moluscos do grupo II (infecção somente por *A. costaricensis*) não foram recuperadas larvas do nematódeo na 9ª semana de infecção.

O aumento da suscetibilidade da *B. glabrata* ao *S. mansoni* observada no grupo pré-infectado com *A. costaricensis* (grupo III) pode ser devido a uma deficiência de ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que, no momento que os miracídios recém penetrados nos tecidos do molusco recrutam hemócitos para o local da infecção, um baixo número dessas células migraria para o local, pois estaria ocorrendo o encapsulamento das larvas de *A. costaricensis* recém penetradas no molusco (48 horas antes do *S. mansoni*). Loker e cols. (1986) sugeriram que larvas do *E. paraensei* liberam produtos que interferem na habilidade dos hemócitos de *B. glabrata* matar os esporocistos de *S. mansoni*.

A maioria dos estudos indica que os hemócitos são os principais elementos envolvidos na destruição de microorganismos e parasitos que penetram em seus tecidos, incluindo larvas de trematódeos (Van Der Knaap & Loker, 1990). Em torno das larvas de *A. cantonensis*, Harris & Cheng (1975) observaram o encapsulamento entre 24 e 48 horas após infecção de *B. glabrata*. Mendonça e cols. (1999) verificaram em *Sarasinula marginata* infectada com *A. costaricensis* reação perilarval 2 horas após a infecção, no tecido fibromuscular e 6 horas nas larvas localizadas nas vísceras. Como as larvas de *A. costaricensis* intramolusco estão sempre envolvidas por reação amebocitária (Mendonça e cols., 1999; Bruno, 2005), provavelmente as larvas de *S. mansoni* se desenvolveram sob menor ação dos mecanismos de defesa do molusco, explicando dessa forma a maior

positividade apresentada no grupo III e a alta mortalidade dos moluscos no período pré-patente apresentada no grupo IV.

Tabela 1: Suscetibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni* e ao *A. costaricensis*.

Grupos	Nº de Moluscos	Nº de moluscos positivos ao <i>S. mansoni</i>	Nº de moluscos positivos ao <i>A. costaricensis</i> *	Nº Médio de L1 infectante de <i>A. costaricensis</i>	Nº Médio de L3 <i>A. costaricensis</i> recuperadas
Grupo I	30	22 (73,3%)	-	-	-
Grupo II	30	-	25 (83,3%)	97	8
Grupo III	30	29 (96,7%)	24 (80,0 %)	118	12
Grupo IV	30	19 (63,3%)	5 (16,7%)	98	10

* Nº de moluscos em que foram recuperadas larvas L3 de *A. costaricensis* na 9ª semana de infecção.

Grupo I: Moluscos infectados com *S. mansoni*.

Grupo II: Moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Tabela 2 - Taxa de infecção por *S. mansoni*.

Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de Confiança 95%	
Grupo IV X I	0.628	0.209	1.884
Grupo III X I	10.545	1.227	90.662

Grupo I: Moluscos infectados com *S. mansoni*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Tabela 3 - Recuperação de larvas L3 de *A. costaricensis*.

Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de Confiança 95%	
Grupo II x IV	0.679	0.491	0.938
Grupo III x IV	0.901	0.657	1.235

Grupo II: Moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Tabela 4 - Larvas Recuperadas (L3) por Larvas Expostas (L1).

Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de Confiança 95%	
Grupo IV X II	1.354	0.984	1.864
Grupo III X II	1.601	1.329	1.929

Grupo II: Moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

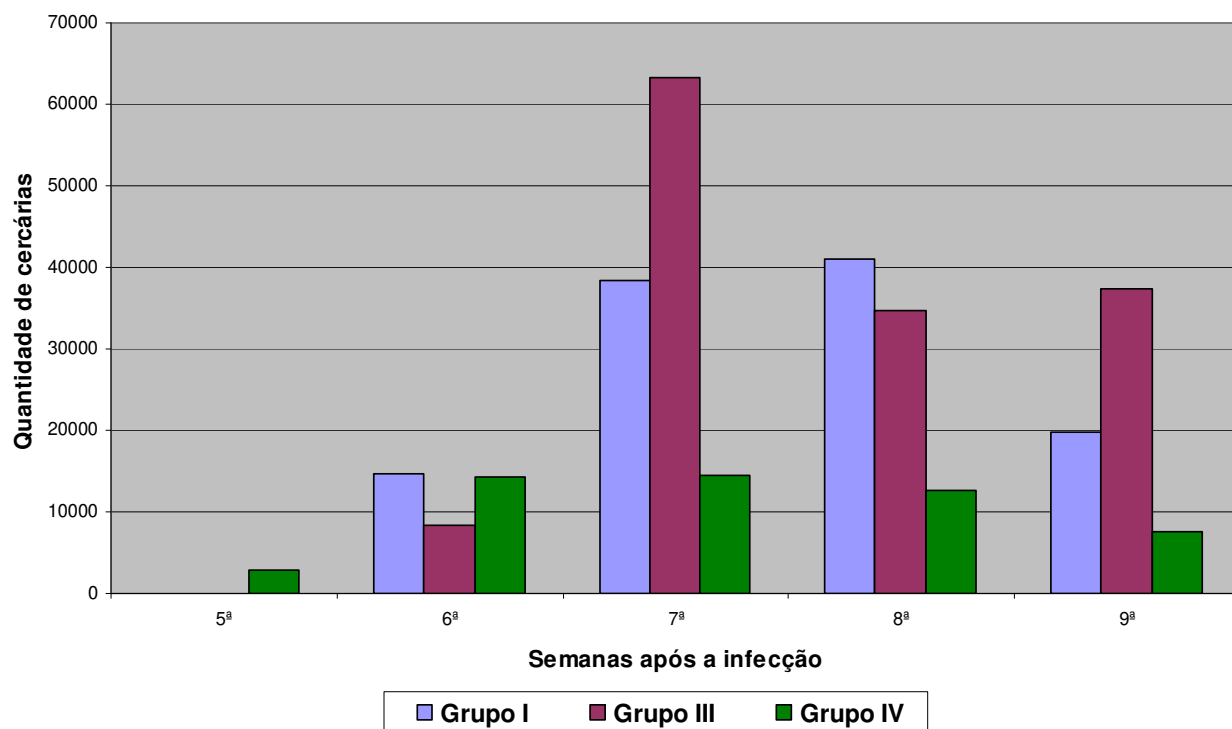
Tabela 5 - Larvas Recuperadas (L3) por larvas Infectantes (L1).

Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de Confiança 95%	
Grupo IV X II	1.474	1.066	2.037
Grupo III X II	1.327	1.101	1.601

Grupo II: Moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

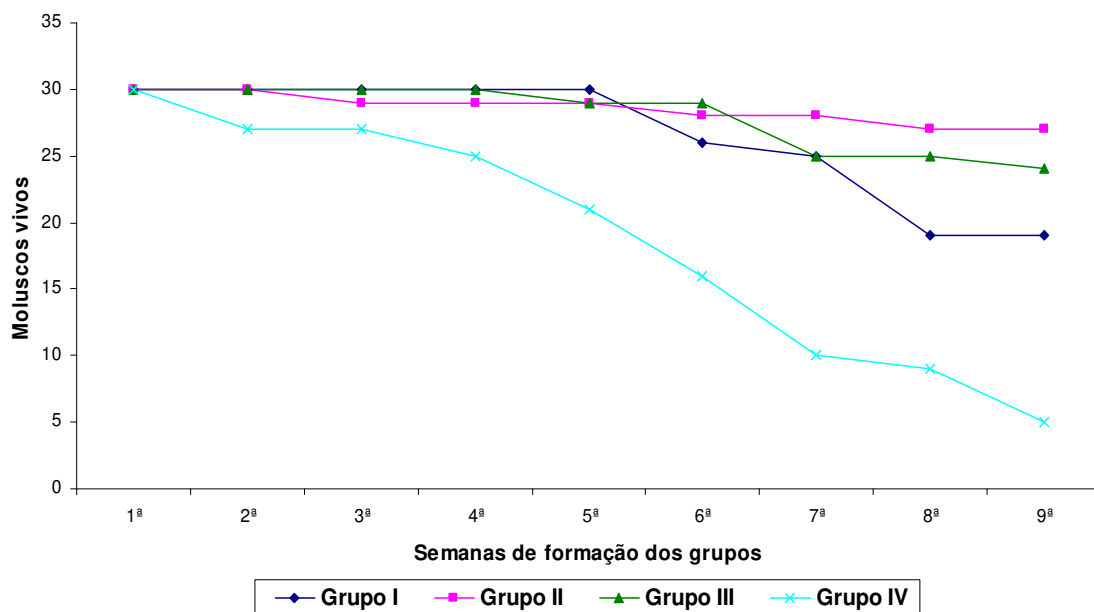


Grupo I: Moluscos infectados com *S. mansoni*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Figura 1-Quantidade de cercárias eliminadas pelos moluscos dos grupos de I, III e IV.



Grupo I: Moluscos infectados com *S. mansoni*.

Grupo II: Moluscos infectados com *A. costaricensis*.

Grupo III: Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni*.

Grupo IV: Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis*.

Figura 2-Sobrevivência de *B. glabrata* exposta ao *S. mansoni* e ao *A. costaricensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (ARTIGO)

- Balan, D. S. L., Magalhães, L. A. & Piedrabuena, A. E. 1993. Immunological and parasitological aspects of *Biomphalaria tenagophila* infected by *Schistosoma mansoni* and other Digenea. *Rev. Saúde Pública*, 27: 421-429.
- Barbosa, F. S. 1959. O Parasito. *Rev. Bras. Malariol. E Doenças Tropicais* 11: 119-150.
- Basch, P. F; Lie, K. J; Heyneman, D. 1969. Antagonistic interaction between strigeid and Schistosome sporocysts within a snail host. *J. Parasitol.*, 55: 733-758.
- Bruno, T. I. B. – Infecção de *Biomphalaria glabrata* com *Angiostrongylus costaricensis*: desenvolvimento larval e resposta hemocitária. Tese de doutoramento. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- Harris, K. R. & Cheng, T. C. 1975. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. *Int. J. Parasitol.*, 5: 521-528.
- Lie, K. J. 1966. Antagonistic interaction between *Schistosoma mansoni* sporocysts and *Echinostome rediae* in the snail *Australorbis glabratus*. *Nature*, 211: 1213-1215.
- Lie, K. J. 1973. Larval trematode antagonism: principles and possible application as a control method. *Exp. Parasit.*, 33: 343-349.
- Lie, K. J. 1982. Swellengrebel lecture: Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Trop. Geogr.Med.*, 34: 111-122.

- Lie, K. J.; Basch, P. F.; Umathevy, T. 1965. Antagonism between two species of larval trematodes in the same snail. *Nature*, 206: 422-423.
- Lie, K. J.; Heyneman, D.; Richards, C. S. 1977. *Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural resistance in *Biomphalaria glabrata* induced by miracidia of *Echinostoma paraensei*. *Exp.Parasit.*, 43: 54-62.
- Lie, K. J.; Jeong, K. H.; Heyneman, D. 1980. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann.Trop. Med. Parasitol.*, 74: 157-166.
- Lim, H. K. & Heyneman, D. 1972. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. *Adv. Parasitol.*, 10: 191-268.
- Loker, E. S.; Bayne, C. J.; Yui, M. A. 1986. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated inference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exp.Parasit.*, 62: 149-154.
- Machado, S. M. P., Magalhães, L. A., Artigas, P. T., Cordeiro, N. S. & Carvalho, J. F. 1988. Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 22: 484-488.
- Mendonça, C. L. G. F.; Carvalho, O. S.; Mota, E. M.; Pelajo-Machado, M.; Caputo, L. F. G. & Lenzi, H. L. 1999. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 549-556.

- Newton, W. L. 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp.Parasit.*, 2: 242 -257.
- Newton, W. L. 1954. Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. *J.Parasitol.*, 40: 352-355.
- Pan, C.-T. 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trop.Med. Hyg.*, 14: 931-976.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. 1963a. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, 5: 23-29.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. 1963b. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, 5: 15-22.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. 1989. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 281-288.
- Pereira, C. A. J.; Martins-Souza, R. L.; Coelho, W. S & Negrão-Corrêa, D. 2006. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*, 98: 224-233.
- Richards, C. S. & Merritt, J. W. Jr. 1972 Genetic in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 425-434.
- Richards, C. S. 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 748-756.

- Rugai, E., Matos, T. & Brizola, A. P. 1954. Nova técnica para isolar larvas e nematóides das fezes. Modificação da técnica de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14: 5-8.
- Santana, J. V.; Magalhães, L. A. & Rangel, H. A. 1978. Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 12: 67-77.
- SAS Institut Inc 2006. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA.
- Standen, O. D. 1951. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45: 225-241.
- Sullivan, J. T.; Richards, C.; Lie, K. J. & Heyneman, D. 1982. *Ribeiroia marini*: Irradiated miracidia and induction of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.*, 53: 17-25.
- Van Der Knaap, W. P. W. & Loker, E. S. 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today*, 6: 175-182.
- Wallace, G. D. & Rosen. L. 1969. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Malacologia*, 7: 427-439.
- Yousif, F. & Lämmler, G. 1977. Experimental double infection of *Biomphalaria glabrata* snails with *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni*. *Z. Parasitenk*, 54: 269-274.

6- CONCLUSÕES

6.1) Estudo da atração miraxonal

1) Em síntese, nossos resultados mostraram que tanto *B. glabrata* sadia quanto a infectada com *A. costaricensis* ou suas águas de condicionamento atraíram miracídios de *S. mansoni*. *Biomphalaria glabrata* infectada com *A. costaricensis* atraiu um menor número de miracídios do que *B. glabrata* sadia.

2) Moluscos sadios atraíram mais miracídios (86%) que os moluscos infectados com *A. costaricensis* (71%).

3) Não houve diferença significativa na atração de miracídios entre a SCW de *B. glabrata* sadia (84%) e a SCW de *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* (89%).

4) A SCW de molusco infectado com *A. costaricensis* atraiu mais miracídios que o próprio molusco infectado (71%).

6.2) Infecção concomitante de *B. glabrata* com *A. costaricensis* e *S. mansoni*.

1) Moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni* apresentaram maior taxa de infecção pelo *S. mansoni* (96,6%) do que moluscos expostos somente ao *S. mansoni* (73,3%).

2) Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis* liberaram menos cercárias (2722 cercárias/molusco) do que moluscos pré-infectados com *A. costaricensis* e posteriormente com *S. mansoni* (4955 cercárias/molusco).

3) Maior número de larvas L3 de *A. costaricensis* foi recuperado em moluscos pré-infectados ao nematódeo e posteriormente ao *S. mansoni* (12 larvas/molusco).

4) Moluscos pré-infectados com *S. mansoni* e posteriormente com *A. costaricensis* apresentaram maior mortalidade (83,3%) quando comparados com os moluscos infectados somente por *S. mansoni* (36,7%) e com os moluscos pré-infectados pelo *A. costaricensis* e posteriormente por *S. mansoni* (20%).

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini, A. A.; Marcolan, A. M.; Lisot, J. M. C.; Lisot, J. U. F. Angiostrongilíase abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 443-445, 1984.
- Ayala, M. A. R. Angiostrongiloidíase abdominal. Seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 29-36, 1987.
- Balan, D. S. L.; Magalhães, L. A. & Piedrabuena, A. E. Immunological and parasitological aspects of *Biomphalaria tenagophila* infected by *Schistosoma mansoni* and other Digenea. *Rev. Saúde Pública*, 27: 421-429, 1993.
- Basch, P. F.; Lie, K. J. & Heyneman, D. Antagonistic interaction between strigeid and Schistosome sporocysts within a snail host. *J. Parasitol.*, 55: 733-758, 1969.
- Bonetti, V. B. D. O. & Graeff-Teixeira, C. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of molluscs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31: 289-294, 1998.
- Brasio, B. C.; Magalhães, L. A.; Miller, J. & Carvalho, J. F. Atração de miracídios de *Schistosoma mansoni* por hospedeiros invertebrados. Comportamento de miracídios frente a girinos de *Hyla fuscovaria*. *Rev. Saúde Plública. S. Paulo*, 19: 18-27, 1985a.
- Brasio, B. C.; Magalhães, L. A.; Miller, J. & Carvalho, J. F. Verificação da resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de

- moluscos planorbídeos. Pesquisa de substâncias quimiotáticas. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 19: 154-70, 1985b.
- Carvalho, O. S.; Teles H. M. S.; Mota, E. M.; Mendonça, C. L. G. F. & Lenzi, H. L. Potentiality of *Achatina fulica* Bodwdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36: 1-6, 2003.
- Chernin, E. Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail conditioned water. *J. Parasitol.*, 58: 209-212, 1972.
- Graeff-Teixeira, C.; Ávila-Pires, F. D.; Machado, R. C. C.; Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 32: 147-150, 1990.
- Graeff-Teixeira, C.; Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. Suscetibilidade de *Megalobulimus* sp. à infecção por larvas de *Angiostrongylus costaricensis*. Anais do XI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, p.51, 1989a.
- Graeff-Teixeira, C.; Thiengo, S. C.; Thomé, J. W.; Medeiros, A. B.; Camilo-Coura, L. & Agostini, A. A. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 487-489, 1993.
- Graeff-Teixeira, C.; Thomé, J. W.; Pinto, S. C. C.; Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. *Phyllocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 65-68, 1989b.

- Graeff-Teixeira, C.; Agostini A. A.; Camilo-Coura, L.; Ferreira-da Cruz M. F. Soroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in Southern Brazil. *Trop. Méd. Int. Health.*, 2: 254-260, 1997.
- Guaraldo, A. M. A.; Magalhães, L. A.; Rangel, H. A. & Pareja, G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni*, em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, *Rev. Saúde Pública S.Paulo*, 15: 436-448, 1981.
- Iabuki, K & Montenegro, M. R. Apendicite por *Angiostrongylus costaricensis*. Apresentação de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21: 33-36, 1979.
- Katz, N. & Peixoto, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev.Soc. Bras. Med. Trop.*, 33: 303-308, 2000.
- Kloetzel, K. Observações sobre o tropismo do miracídio do *Schistosoma mansoni* pelo molusco *Australorbis glabratus*. *Rev. Bras. Biol.*, 18: 223-232, 1958.
- Laitano, A. C.; Genro, J. P.; Fontoura, R.; Branco, S. S. L.; Maurer, R. L.; Graeff-Teixeira, C.; Milanez, J, M.; Chiaradia, L. A. & Thomé, J. W. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 34: 95-97, 2001.
- Lie, K. J. Antagonism of *Paryphostomum segregatum* rediae to *Schistosoma mansoni* sporocysts in the snail *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 53: 969-976, 1967.

- Lie, K. J. Antagonistic interaction between *Schistosoma mansoni* sporocysts and *Echinostoma rediae* in the snail *Australorbis glabratus*. *Nature*, 211: 1213-1215, 1966.
- Lie, K. J. Larval trematode antagonism: principles and possible application as a control method. *Exp. Parasitol.*, 33: 343-349, 1973.
- Lie, K. J. Swellengrebel lecture: Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Trop. Geogr.Med.*, 34: 111-122, 1982.
- Lie, K. J.; Basch, P. F. & Hoffman, M. A. Antagonism between *Paryphostomum segregatum* and *Echinostoma barbosai* in the snail *Biomphalaria straminea*. *J. Parasitol.*, 53: 1205-1209, 1967.
- Lie, K. J.; Basch, P. F. & Umathevy, T. Antagonism between two species of larval trematodes in the same snail. *Nature*, 206: 422-423, 1965.
- Lie, K. J.; Heyneman, D. & Kostanian, N.; Failure of *Echinostoma lindoense* to reinfect snails already harboring that species. *Int. J. Parasitol.*, 5: 483-486, 1975.
- Lie, K. J.; Jeong, K. H. & Heyneman, D. Molluscan host reaction to helminthic. In: E. J. L. Soulsby (ed). *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*. Vol.IV: Protozoa, Arthropods and Invertebrates, Chapter 7, CRC Press, Florida, 211-270, 1987.
- Lie, K. J.; Jeong, K. H. & Heyneman, D. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 74: 157-166, 1980.

- Lim, H. K. & Heyneman, D. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. *Adv. Parasitol.*, 10: 191-268, 1972.
- Lima, L. C.; Massara, C. L.; Souza, C. P.; Vidigal, T. D.; Lenzi, H. L. & Carvalho, O. S. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (nematoda angiostrongylidae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34: 399-402, 1992.
- Machado, S. M. P.; Magalhães, L. A.; Artigas, P. T.; Cordeiro, N. S. & Carvalho, J. F. Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 22: 484-488, 1988.
- Magalhães, L. A.; Zanotti-Magalhães, E. M. & Carvalho, J. F. Observations on the miraxonal attraction exercised by sexually immature or adult *Biomphalaria glabrata* infected or not by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde Pública S. Paulo*, 31: 121-124, 1997.
- Maurer, R. L.; Graeff-Teixeira, C.; Thomé, J. W.; Chiaradia, L. A.; Sugaya, H. & Yoshimura, K. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 44: 53-54, 2002.
- Mendonça, C. L. G. F.; Carvalho, O. S.; Mota, E. M.; Pelajo-Machado, M.; Caputo, L. F. G. & Lenzi, H. L. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 549-556, 1999.

- Monge, E. A.; Arroyo, R. & Solano, E. A new definitive host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes 1971). *J. Parasitol.*, 64: 34, 1978.
- Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 613-621, 1973.
- Morera, P. Angiostrongilíase Abdominal – Um Problema de Saúde Pública *Rev. Soc. Bras. Med, Trop.*, 21: 81-83, 1988.
- Morera, P.; Perez, F.; Mora, F.; Castro L. Visceral larva migrans-like syndrome caused by *Angiostrongylus costaricensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 67-70, 1982.
- Mota, E. M. & Lenzi, H. L. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90: 707-709, 1995.
- Mota, E. M. & Lenzi, H. L. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways base don experimental *Sigmodon hispidus* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100: 407-420, 2005.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 281-288, 1989.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. *Cien. e Cult.*, 15: 245-6, 1963.
- Pena, G. P. M.; Andrade Filho, J. S.; Assis, S. C. *Angiostrongylus costaricensis*: first record f its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 37: 369-374, 1995.
- Rambo, P. R.; Agostini, A. A. & Graeff-Teixeira. C. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil: Prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 9-14, 1997.

- Rocha, A.; Sobrinho, J. M. & Salomão, E. C. Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24: 265 -268, 1991.
- Rugai, E.; Matos, T. & Brizola, A. P. Nova técnica para isolar larvas e nematóides das fezes. Modificação da técnica de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14: 5-8, 1954.
- SAS Institut Inc 2006. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA.
- Seta, L., Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M., Oliveira Filho, B., Marangoni, S., Carvalho, J. F. & Reis, E. R. Estudo da atração miraxonal em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* livres de infecção ou infectados por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Parasitol., Vet.*, 2: 51, 1993.
- Standen, O. D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45: 225-241, 1951.
- Stewart, G.L.; Ubelaker, J. E. & Curtis, D. Pathophysiology alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. *J. Invert. Pathol.*, 45: 152-157, 1985.
- Sullivan, J. T.; Richards, C.; Lie, K. J. & Heyneman, D. *Ribeiroia marini*: Irradiated miracidia and induction of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.*, 53: 17-25, 1982.
- Tesh, R. B.; Ackerman, L. J.; Dietz, W. H. & Williams, J. A. *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathologic findings in wild rodents infected with the parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 348-356, 1973.

- Thiengo, S. C. Mode of infection of *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 277-278, 1996.
- Thiengo, S. C.; Amato, S. B.; Aventino, A. & Araújo, J. L. B. Estudo sobre os hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Rev. Bras. Parasitol. Veter.*, 2: 64, 1993.
- Ubelaker, J. E.; Bullick, G. R. & Caruso, J. Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 66: 856-857, 1980.
- Valadão, R. & Milward-De-Andrade, R. Interação de planorbídeos vetores da esquistossomose mansoni e o problema da expansão de endemia na região amazônica. *Rev. Saúde. Pública S. Paulo*, 25: 353-358, 1991.
- Wallace, G. D. & Rosen. L. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Malacologia*, 7: 427-439, 1969.
- WHO-World Health Organization. Shistosomiasis. Fact Sheet nº 115, Geneva, 2002.

8 – APÊNDICE ESTATÍSTICO

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATRAÇÃO MIRAXONAL

REALIZADA PELO

PROF^o DR. ARÍCIO XAVIER LINHARES

1) Análise estatística referente à comparação da atração miraxonal dos moluscos sadios x moluscos infectados com *A. costaricensis*.

The SAS System

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	2	CI CS

Number of observations 20

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: resp

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	11.25000000	11.25000000	4.47
Error	18	45.30000000	2.51666667	
Corrected Total	19	56.55000000		

Source	Pr > F
Model	0.0487
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	resp Mean
0.198939	20.20892	1.586401	7.850000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	1	11.25000000	11.25000000	4.47

Source	Pr > F
trat	0.0487

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	1	11.25000000	11.25000000	4.47

Source	Pr > F
trat	0.0487

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for resp

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	2.516667

Number of Means	2
Critical Range	1.491

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	8.6000	10	CS
B	7.1000	10	CI

2) Análise estatística referente à comparação da atração miraxonal da SCW dos moluscos sadios x SCW de moluscos infectados com *A. costaricensis*.

The SAS System

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	2	ACCI ACCS

Number of observations 20

The GLM Procedure

Dependent Variable: resp

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	1.25000000	1.25000000	1.17
Error	18	19.30000000	1.07222222	
Corrected Total	19	20.55000000		

Source	Pr > F
Model	0.2945
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	resp Mean
0.060827	11.97089	1.035482	8.650000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	1	1.25000000	1.25000000	1.17

Source	Pr > F
trat	0.2945

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	1	1.25000000	1.25000000	1.17

Source	Pr > F
trat	0.2945

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for resp

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	1.072222

Number of Means	2
Critical Range	.9729

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	8.9000	10	ACCI
A			
A	8.4000	10	ACCS

3) Análise estatística referente à comparação da atração miraxonal da SCW dos moluscos sadios x moluscos sadios.

The SAS System

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	2	ACCS CS

Number of observations 20

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: resp

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	0.20000000	0.20000000	0.13
Error	18	26.80000000	1.48888889	
Corrected Total	19	27.00000000		

Source	Pr > F
--------	--------

Model	0.7183
-------	--------

Error	
-------	--

Corrected Total	
-----------------	--

R-Square	Coeff Var	Root MSE	resp Mean
0.007407	14.35530	1.220200	8.500000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	1	0.20000000	0.20000000	0.13

Source	Pr > F
--------	--------

trat	0.7183
------	--------

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	1	0.20000000	0.20000000	0.13

Source	Pr > F
--------	--------

trat	0.7183
------	--------

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for resp

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	1.488889

Number of Means	2
Critical Range	1.146

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	8.6000	10	CS
A			
A	8.4000	10	ACCS

4) Análise estatística referente à comparação da atração miraxonal da SCW dos moluscos infectados x moluscos infectados, ambos com *A. costaricensis*.

The SAS System

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	2	ACCI CI
Number of observations 20		

The GLM Procedure

Dependent Variable: resp

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	16.20000000	16.20000000	7.71
Error	18	37.80000000	2.10000000	
Corrected Total	19	54.00000000		

Source	Pr > F
Model	0.0124
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	resp Mean
0.300000	18.11422	1.449138	8.000000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	1	16.20000000	16.20000000	7.71

Source	Pr > F
trat	0.0124

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	1	16.20000000	16.20000000	7.71

Source	Pr > F
trat	0.0124

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for resp

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	2.1

Number of Means	2
Critical Range	1.362

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	8.9000	10	ACCI
B	7.1000	10	CI

RELATÓRIO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INFECÇÃO CONCOMITANTE

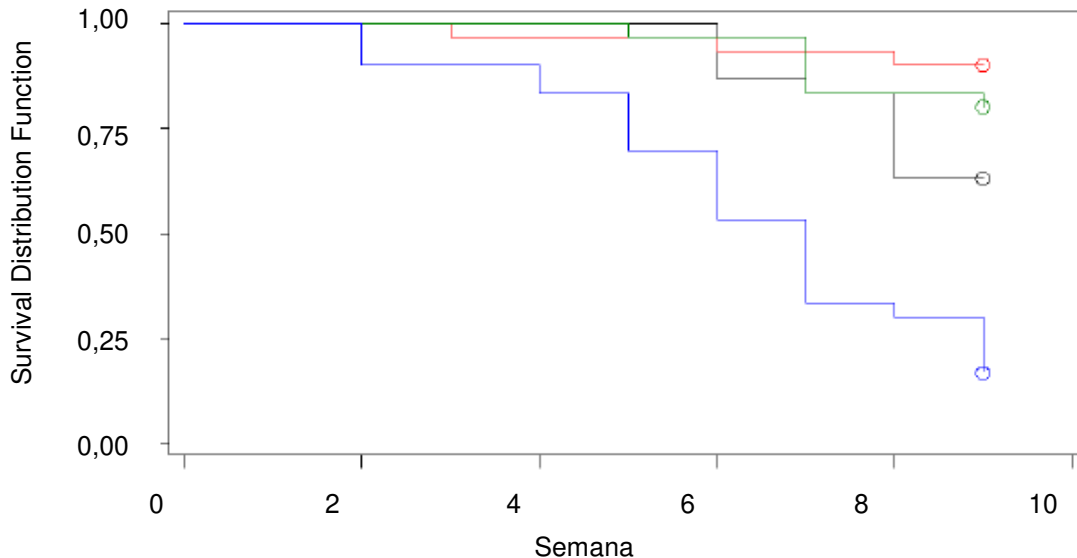
REALIZADA PELO

PROFº DR. JOSÉ FERREIRA DE CARVALHO

1) Relatório da análise estatística referente à sobrevivência dos moluscos dos grupos I, II, III, IV.

As mortes de moluscos foram anotadas a cada semana. A análise abaixo compara as curvas de sobrevivência dos quatro grupos.

As curvas de sobrevivência estão no gráfico:



STRATA:

— grupo = I
— grupo = II
— grupo = III
— grupo = IV

○ ○ ○ Censored grupo = I
○ ○ ○ Censored grupo = II
○ ○ ○ Censored grupo = III
○ ○ ○ Censored grupo = IV

A análise leva em conta a *censura* de dados. Dados censurados são dados truncados. Os dados de sobrevivência são truncados na nona semana, a última do experimento. A curva representa as estimativas obtidas pelo método de produto-limite, de Kaplan-Meier. O teste da hipótese de igualdade das curvas de sobrevivência, feito pela estatística de log-rank, resultou em um qui-quadrado 54.0 (3 gl), com $p < 0.0001$.

Como o teste resultou significativo, implicando em evidência de diferença entre as curvas de sobrevivência, decidiu-se testar a igualdade entre os grupos I, II e III. Neste caso, o log-rank resultou na estatística qui-quadrado 5.77 (2 gl), com $p = 0.06$. Este resultado mostra que há apenas fraca evidência de diferença entre as três curvas.

Com alguma hesitação, conclui-se que o grupo IV tem sobrevida menor e que os grupos I, II e III têm curvas de sobrevivência parecidas.

2) Relatório da análise estatística referente ao estudo do período pré-patente de cercárias dos grupos I, III e IV.

Estudo do período pré-patente

Estuda-se aqui o tempo, em semanas, até a primeira verificação da ocorrência de cercárias.

Os resultados estão a seguir:

The FREQ Procedure

Frequency Row Pct Col Pct	Table of inicSemana by Grupo				
	inicSemana	Grupo			Total
		I	III	IV	
	5	0 0.00 0.00	0 0.00 0.00	17 100.00 89.47	17
	6	19 40.43 90.48	27 57.45 90.00	1 2.13 5.26	47
	7	2 50.00 9.52	2 50.00 6.67	0 0.00 0.00	4
	8	0 0.00 0.00	0 0.00 0.00	1 100.00 5.26	1
	9	0 0.00 0.00	1 100.00 3.33	0 0.00 0.00	1
	Total	21	30	19	70
	Frequency Missing = 20				

Nota-se que a primeira ocorrência produziu-se na sexta semana, em sua maioria, com exceção do grupo IV, que ocorreu na quinta semana. A significância estatística foi determinada pelo teste qui-quadrado de Pearson, para comparar as proporções da primeira ocorrência, dos grupos. Resultou 66.2 (8 gl), com nível de significância $p < 0.0001$. O nível de significância foi calculado por métodos exatos.

Análise da produção de cercárias

O total de cercárias recuperadas foi comparado entre grupos. Como as exposições foram feitas aos mesmos números de miracídios, a comparação faz sentido.

A comparação foi feita através de modelos lineares, com análise de variância. Os dados, a distribuição e o modelo foram verificados através de análises de resíduos. As médias de mínimos quadrados são usadas para as comparações.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	128916797	64458399	5.05	0.0084
Error	85	1084359490	12757170		
Corrected Total	87	1213276287			

Esta análise de variância básica mostra que há evidência de diferenças entre as médias ($p = 0.008$).

Grupo	totCercarias LSMEAN	LSMEAN Number
I	3788.76667	1
III	4789.80000	2
IV	1846.85714	3

Esta tabela contém as médias de mínimos quadrados. A tabela seguinte mostra as comparações das médias duas a duas. Os níveis de significância são corrigidos para o efeito de múltiplas comparações pelo método de Tukey.

Least Squares Means for effect Grupo Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: totCercarias			
i/j	I	III	IV
I		0.5257	0.1024
III	0.5257		0.0066
IV	0.1024	0.0066	

Verifica-se que há evidência de diferença somente entre os grupos III e IV. O grupo IV produziu menos cercárias.

3) Relatório da análise estatística referente à recuperação de larvas de *A. costaricensis*, larvas recuperadas por larvas expostas.

Estimativas das razões de chance			
Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de confiança 95%	
grupo IV vs II	1.354	0.984	1.864
grupo III vs II	1.601	1.329	1.929

Os grupos III e II diferem nitidamente. Já não é tão nítida a diferença entre os grupos IV e II.

4) Relatório da análise estatística referente à recuperação de larvas de *A. costaricensis*, larvas recuperadas por larvas infectantes.

Estimativas das razões de chance			
Efeito	Estimativa Pontual	Intervalo de confiança 95%	
grupo IV vs II	1.474	1.066	2.037
grupo III vs II	1.327	1.101	1.601

Neste caso, os grupos III e IV diferem do grupo II.

5) Análise estatística referente aos moluscos infectados com *A. costaricensis*: Comparação das taxas de infecção.

The FREQ Procedure

Frequency Row Pct	Table of grupo by inf			
	grupo	inf		Total
		+	-	
	II	25 83.33	5 16.67	30

III	24 80.00	6 20.00	30
IV	5 16.67	25 83.33	30
Total	54	36	90

Statistics for Table of grupo by inf

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	35.2778	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	2	37.0506	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	27.4691	<.0001
Phi Coefficient		0.6261	
Contingency Coefficient		0.5307	
Cramer's V		0.6261	

Pearson Chi-Square Test	
Chi-Square	35.2778
DF	2
Asymptotic Pr > ChiSq	<.0001
Exact Pr >= ChiSq	9.277E-09

Likelihood Ratio Chi-Square Test	
Chi-Square	37.0506
DF	2
Asymptotic Pr > ChiSq	<.0001

Likelihood Ratio Chi-Square Test	
Exact Pr >= ChiSq	1.995E-08

Mantel-Haenszel Chi-Square Test	
Chi-Square	27.4691
DF	1
Asymptotic Pr > ChiSq	<.0001
Exact Pr >= ChiSq	8.994E-08

Sample Size = 90

The FREQ Procedure

Grupo=II

inf	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
+	25	83.33	25	83.33
-	5	16.67	30	100.00

Binomial Proportion for inf = +	
Proportion (P)	0.8333
ASE	0.0680
95% Lower Conf Limit	0.7000
95% Upper Conf Limit	0.9667
Exact Conf Limits	
95% Lower Conf Limit	0.6528
95% Upper Conf Limit	0.9436

Test of H0: Proportion = 0.5	
ASE under H0	0.0913
Z	3.6515
One-sided Pr > Z	0.0001
Two-sided Pr > Z	0.0003
Exact Test	
One-sided Pr >= P	1.625E-04
Two-sided = 2 * One-sided	3.249E-04

Sample Size = 30

The FREQ Procedure

Grupo=III

inf	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
+	24	80.00	24	80.00
-	6	20.00	30	100.00

Binomial Proportion for inf = +	
Proportion (P)	0.8000
ASE	0.0730
95% Lower Conf Limit	0.6569
95% Upper Conf Limit	0.9431
Exact Conf Limits	

Binomial Proportion for inf = +	
95% Lower Conf Limit	0.6143
95% Upper Conf Limit	0.9229

Test of H0: Proportion = 0.5	
ASE under H0	0.0913
Z	3.2863
One-sided Pr > Z	0.0005
Two-sided Pr > Z	0.0010
Exact Test	
One-sided Pr >= P	7.155E-04
Two-sided = 2 * One-sided	0.0014

Sample Size = 30

The FREQ Procedure

Grupo=IV

inf	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
+	5	16.67	5	16.67
-	25	83.33	30	100.00

Binomial Proportion for inf = +	
Proportion (P)	0.1667

Binomial Proportion for inf = +	
SE	0.0680
95% Lower Conf Limit	0.0333
95% Upper Conf Limit	0.3000
Exact Conf Limits	
95% Lower Conf Limit	0.0564
95% Upper Conf Limit	0.3472

Test of H0: Proportion = 0.5	
ASE under H0	0.0913
Z	-3.6515
One-sided Pr < Z	0.0001
Two-sided Pr > Z	0.0003
Exact Test	
One-sided Pr <= P	1.625E-04
Two-sided = 2 * One-sided	3.249E-04

Sample Size = 30

6) Análise estatística referente à comparação das taxas de infecção dos moluscos infectados com *S. mansoni*.

The SAS System

The FREQ Procedure

Frequency Row Pct	Table of inf by res			
	inf	res		Total
		+	-	
		SM	22 73.33	8 26.67
	AC,SM	29 96.67	1 3.33	30
	SM,AC	19 63.33	11 36.67	30
	Total	70	20	90

Statistics for Table of inf by res

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	10.1571	0.0062
Likelihood Ratio Chi-Square	2	12.3541	0.0021
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.8582	0.3542
Phi Coefficient		0.3359	
Contingency Coefficient		0.3185	
Cramer's V		0.3359	

Sample Size = 90

The LOGISTIC Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.INFSM
Response Variable	res
Number of Response Levels	2
Frequency Variable	f
Model	Binary logit
Optimization Technique	Fisher's scoring

Number of Observations Read	6
Number of Observations Used	6
Sum of Frequencies Read	90
Sum of Frequencies Used	90

Response Profile		
Ordered Value	res	Total Frequency
1	+	70
2	-	20

Probability modeled is res= '+'.

Class Level Information			
Class	Value	Design Variables	
inf	SM,AC	1	0
	AC,SM	0	1

Class Level Information			
Class	Value	Design Variables	
	SM	-1	-1

Model Convergence Status
Convergence criterion (GCONV=1E-8) satisfied.

Model Fit Statistics		
Criterion	Intercept Only	Intercept and Covariates
AIC	97.347	88.993
SC	99.847	96.492
-2 Log L	95.347	82.993

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-Square	DF	Pr > ChiSq
Likelihood Ratio	12.3541	2	0.0021
Score	10.1571	2	0.0062
Wald	6.8039	2	0.0333

Type 3 Analysis of Effects			
Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
inf	2	6.8039	0.0333

Analysis of Maximum Likelihood Estimates						
Parameter		DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept		1	1.6418	0.3871	17.9906	<.0001
inf	SM,AC	1	-1.0953	0.4446	6.0685	0.0138
grupo	AC,SM	1	0.7255	0.7033	6.0189	0.0142

Odds Ratio Estimates			
Effect	Point Estimate	95% Wald Confidence Limits	
Inf SM, AC vs SM	0.628	0.209	1.884
Inf AC, SM vs SM	10.545	1.227	90.662

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses			
Percent Concordant	56.6	Somers' D	0.429
Percent Discordant	13.8	Gamma	0.609
Percent Tied	29.6	Tau-a	0.150
Pairs	1400	c	0.714