

MARIA LECTÍCIA PEREIRA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

“ RESPOSTA IMUNE EM *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA* SELECIONADA
GENETICAMENTE PARA O CARÁTER RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR
SCHISTOSOMA MANSONI. ”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Maria Lectícia Pereira
Siqueira de Oliveira
Aprovada pela Comissão Julgadora.

26/02/98

TESE DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP

ORIENTADOR

Profa. Dra. ELIANA MARIA ZANOTTI-MAGALHÃES

CAMPINAS
1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

3812899

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	UNICAMP
	OL4r
V.	
TOMBO B.	34103
PREÇO	395,98
C	D
	y
PREÇO	88,11,00
DATA	02/06/98
N.º CPD	

CM-00112421-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Oliveira, Maria Lectícia Pereira Siqueira de

OL4r Resposta imune em *Biomphalaria tenagophila* selecionada geneticamente para o caráter resistência à infecção por *Schistosoma mansoni* / Maria Lectícia Pereira Siqueira de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
79f.: ilus.

Orientadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

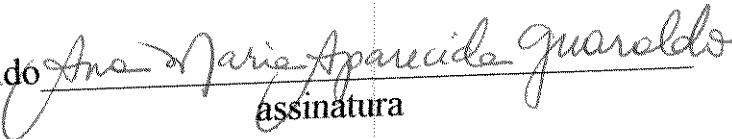
1. *Biomphalaria tenagophila*. 2. *Schistosoma mansoni*.
3. Esquistossomose. I. Zanotti-Magalhães, Eliana Maria.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

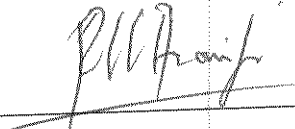
Campinas, 26 de fevereiro de 1998.

BANCA EXAMINADORA:

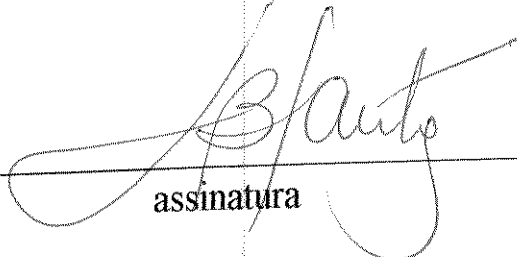
TITULARES:

Prof. Dr. Eliana Maria Zanotti-Magalhães (orientador)  _____
assinatura

Profa. Dra. Ana Maria aparecida Guaraldo  _____
assinatura

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo  _____
assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dra. Leonilda Maria Barbosa Santos  _____
assinatura

AOS MEUS PAIS CARLOS
e MARIA JOSÉ "IN MEMÓRIAN"
AO MEU ESPOSO JOSÉ MARIA
e MINHAS FILHAS LARA E LAÍS

"BEM AVENTURADO AQUELE QUE
TEME AO *SENBOR* E ANDA NOS
SEUS CAMINHOS.
BENDITO SEJA O *SENBOR* MINHA
ROCHA, QUE ENSINA AS MINHAS
MÃOS."

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora ELIANA MARIA ZANOTTI-MAGALHÃES pela orientação científica, ensinamentos práticos e incentivo.
- Ao Dr. LUÍS AUGUSTO MAGALHÃES pela atenção e preocupação com meu desempenho.
- Ao Dr. JOSÉ LUÍS DE CARVALHO pela análise estatística dos resultados.
- A profa. MARLENE pelo uso do laboratório e os constantes recados.
- A Dra. ANA GUARALDO pelas críticas na correção da tese e incentivo nos momentos mais difíceis.
- Aos colegas do laboratório de parasitologia IVO e JOÃO pelo apoio técnico na manutenção dos moluscos.
- Ao professor GILBERTO FERNANDES pelo meu encaminhamento ao Departamento de Imunologia..

CONTEÚDO

RESUMO

1- INTRODUÇÃO.....	01
. A ESQUISTOSSOMOSE.....	01
. O HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO.....	03
. MECANISMOS DE DEFESA.....	06
2- OBJETIVOS.....	11
. PARÂMETROS AVALIADOS.....	11
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.1.1- GRUPOS DE ESTUDO.....	13
3.1.2- MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS E LINHAGEM DO TREMATÓDEO.....	13
3.2- ÍNDICE DE INFECÇÃO E MORTALIDADE.....	14
3.3- NÚMERO DE AMEBÓCITOS.....	14
3.4- ATIVIDADE FAGOCITÁRIA.....	15
3.4.1- PROCESSO DE FAGOCITOSE.....	15
3.5- REAÇÃO AMEBOCITÁRIA NOS TECIDOS.....	16
3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4- RESULTADOS.....	17
4.1- TAXA DE INFECÇÃO.....	17
4.2- TAXA DE MORTALIDADE.....	17
4.3- NÚMERO DE AMEBÓCITOS.....	18
4.4- ÍNDICE DE FAGOCITOSE.....	19

4.5- ANÁLISE DOS ESPOROCISTOS.....	19
5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	50
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
. APÊNDICE ESTATÍSTICO.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

.TABELA 1- TAXA DE INFECÇÃO.....	21
.TABELAS 2-5- TAXA DE MORTALIDADE.....	21-23
.TABELAS 6-26- NÚMERO DE AMEBÓCITOS.....	23- 33
. TABELA 27- ÍNDICE DE FAGOCITOSE.....	34
.TABELA 28- CLASSIFICAÇÃO DOS ESPOROCISTOS.....	35
. TABELAS 29- 33- APÊNDICE ESTATÍSTICO.....	71- 73

ÍNDICE DE FIGURAS

. FIGURAS 2, 3, 8 e 9 GRANULÓCITOS.....	36-37; 40-41
.GRÁFICOS 4 -7 - NÚMERO DE AMEBÓCITOS.....	38-39
. GRÁFICO DE ATIVIDADE FAGOCITÁRIA.....	42
. FIGURAS 11 - 17- ESPOROCISTOS.....	43-49
. FIGURAS 18 e 19 - APÊNDICE ESTATÍSTICO.....	74-75

RESUMO

A suscetibilidade de moluscos hospedeiros do *Schistosoma mansoni* é controlada geneticamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune celular em *Biomphalaria tenagophila* selecionada geneticamente para o caráter resistência ao *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ procedente do Vale do Rio Paraíba do Sul. Avaliamos nas gerações parental, F1 e F2 as taxas de infecção e mortalidade, o número de amebócitos na circulação lacunar, a atividade fagocitária dos amebócitos frente à hemácias formolisadas de carneiro e a reação amebocitária nos tecidos em torno das larvas do trematódeo.

O processo de seleção por autofecundação de moluscos resistentes, não implicou em alteração significativa da taxa de infecção, entretanto nossos resultados mostraram que a seleção genética para o caráter resistência aumentou os índices de sobrevivência dos moluscos infectados ($P > 0.0001$). Uma forte proliferação celular ocorreu para neutralizar a presença das larvas que se caracterizou pelo aumento significativo do número de amebócitos na circulação tanto de granulócitos como hialinócitos ($P > 0.0001$). A atividade fagocitária dos amebócitos não foi diferente nas três gerações. Uma intensa reação amebocitária ocorreu nos tecidos da região céfalo podal nas primeiras horas pós infecção demonstrando a resistência do hospedeiro à infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Concluimos que no processo de resistência apresentado por *Biomphalaria tenagophila* ao *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ, o aumento do número de amebócitos na circulação foi fator decisivo, assegurando maior sobrevivência dos planorbídeos.

1-INTRODUÇÃO

A ESQUISTOSSOMOSE

As primeiras observações sobre o agente etiológico da esquistossomose foram feitas por BILHARZ em 1852, no Egito. Posteriormente, WEILAND em 1858, denominou o helminto de *Schistosoma*. A denominação da espécie *Schistosoma mansoni* foi dada por SAMBON em 1907, perante a Sociedade Zoológica de Londres. O agente causador da esquistossomose mansônica, *Schistosoma mansoni*, é o helminto trematódeo pertencente à classe Digenea que infecta o homem, alguns roedores e marsupiais.

A esquistossomose é endêmica em 74 países, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993) a segunda maior doença parasitária do mundo, depois da malária, com estimativa de 200 milhões de pessoas infectadas. Estima-se que 600 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção e é responsável por 300 a 500.000 mortes por ano (BERGQUIST, 1995; CAPRON *et al*, 1995). Os altos índices endêmicos mencionados refletem o desequilíbrio entre a presença e ação do parasita e a capacidade de resistência do hospedeiro. A doença foi provavelmente introduzida no Brasil durante o tráfico de escravos africanos, ocupados na cultura de cana de açúcar na região do Nordeste. Hoje, acredita-se que 5 milhões de brasileiros são acometidos pela esquistossomose mansônica, apesar dos esforços da vigilância epidemiológica. Isto reflete um problema político-sócio-econômico evidente dos países em desenvolvimento.

O controle da esquistossomose no Brasil priorizado a partir de 1976, com o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), usou quimioterapia em larga escala com milhões de doses de oxamniquine, conseguindo uma acentuada redução da prevalência e mortalidade da doença em áreas endêmicas do Nordeste. A redução de formas hepatosplênicas da doença através do uso de drogas específicas, uma possibilidade demonstrada por KLOETZEL (1967) tornou-se uma posterior estratégia de controle pela WHO (1985, 1993), isto é, a redução de formas clínicas severas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a quimioterapia é um método efetivo no controle da esquistossomose humana (WHO, 1993; STURROCK, 1995), colocando o metrifonato, oxaminiquine e o praziquantel como drogas mais aceitas. Programas nacionais de controle da esquistossomose têm sido criados em todo o mundo, embora o único país que conseguiu erradicar a doença tenha sido o Japão (WHO, 1993), usando moluscidas e forramento dos canais de irrigação com concreto. O uso de moluscidas (SUCEN, 1989; MC CULLOUGH, 1992) associados à quimioterapia, suprimento de água potável, educação em saúde e participação da comunidade em programas de saúde locais (WHO, 1990; SCHAL, 1995) constituem estratégias de erradicação da doença.

O Estado de São Paulo, devido à sua importância na economia nacional tem recebido um grande contingente de migrantes de várias regiões, principalmente dos Estados do Nordeste e de outros Estados do Sudeste brasileiro, onde a esquistossomose apresenta alta endemicidade (FREITAS, 1972). A análise das investigações epidemiológicas dos casos notificados no período de 1981 - 1992 (SUCEN, 1989) considerou que apenas duas regiões, Litoral e Vale do

Paraíba, concentram 86% dos casos autóctones detectados com *Biomphalaria tenagophila*. Na bacia do Paranapanema, na fronteira com o Estado do Paraná, a transmissão se processa por intermédio da *Biomphalaria glabrata*. A região de Marília é responsável por 4,8 % dos casos autóctones do Estado(GLASSER, 1995).

O HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

Vários fatores determinam a atração molusco-miracídio (CHENG, 1967) e levam o miracídio a encontrar o seu hospedeiro intermediário. Foi demonstrado que a atração do miracídio exercida pelos hospedeiros intermediários faz-se mediante a ação de substâncias liberadas pelo caramujo na água, a qual se denominou água de condicionamento “ SCW “ (CHERNIN, 1972). A atração miraxonal exercida por moluscos vetores sobre miracídios de *Schistosoma mansoni* foi demonstrada sob diferentes circunstâncias (BRASIO *et al*, 1985; MAGALHÃES *et al*, 1991, 1997). Quando os moluscos são selecionados geneticamente para o caráter susceptibilidade atraem mais vigorosamente os miracídios ou seja possuem maior poder de atração miraxonal (BRASIO *et al*, 1985; ZANOTTI-MAGALHÃES, 1991).

Os vetores do *Schistosoma mansoni* encontrados no Brasil pertencem a três espécies: *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835) e a *Biomphalaria straminea* (DUNKER, 1848). Existem vários focos da endemia em diversos Estados e a sua maior prevalência se encontra nas zonas quentes e úmidas do Nordeste e Sudeste brasileiros.

Das três espécies hospedeiras intermediárias presentes no território paulista, apenas *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* são responsáveis pela transmissão da endemia (SUCEM, 1989).

A *Biomphalaria tenagophila* possui uma ampla distribuição geográfica, apresentando maior concentração de criadouros no Leste do Estado de São Paulo com focos distribuídos nas regiões do Vale do Rio Paraíba, Litoral, grande São Paulo, Baixada Santista, Vale do Ribeira, (SUCEN, 1982) e ainda nos Estados de Espírito Santo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (VAZ, 1989). Em Minas Gerais, no triângulo mineiro, focos isolados foram encontrados com uma prevalência de 0,1 % sendo considerada como uma região livre de transmissão da esquistosomose (CARVALHO *et al*, 1994).

A *B. glabrata*, espécie relacionada aos principais focos de transmissão da doença, possui uma ampla distribuição geográfica e é bastante compatível com o trematódeo. Esta espécie é encontrada em localidades próximas ao litoral e municípios do interior de Estados da região Nordeste. Também é encontrada nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Alguns criadouros podem ser encontrados nos Estados de São Paulo, Paraná e Pará (TELES, 1986; TELES & VAZ, 1987).

A *B. straminea* é encontrada no litoral e interior do Nordeste e alguns criadouros são encontrados em Estados do Norte, Sudeste e municípios do litoral de Santa Catarina (TELES, 1988) e zona do triângulo mineiro.

Os moluscos de *B.tenagophila* criados no moluscário do Departamento de Parasitologia da Unicamp são descendentes de caramujos

provenientes do Vale do Rio Paraíba do Sul. Nesta região existem focos autóctones da esquistossomose com níveis de infecção abaixo de 10 %. Estudos já demonstraram que a *B. tenagophila*, desta região, é pouco susceptível à infecção pelo *S. mansoni* local dificultando a manutenção do ciclo evolutivo do parasita em laboratório (PARAENSE & CORREIA, 1963; SANTANA, 1978). Baixos índices de infecção natural também foram demonstrados no campo quando em 1981 foram examinados cerca de 104.844 moluscos do Vale do Paraíba com resultados de 0,1 % de infecção (SUCEN, 1982). Algumas populações de *B.tenagophila* podem se tornar altamente suscetíveis à linhagem do verme do Vale do Paraíba (PARAENSE & CORREIA, 1978).

Sabe-se que o caráter suscetibilidade do molusco está na dependência de fatores genéticos, (NEWTON, 1952, 1953 ; RICHARDS, 1972), ajuste fisiológico molusco / verme, (FILES & CRAM, 1949; PARAENSE & CORREIA, 1963), e presença concomitante de outras infecções parasitárias (REIS *et al*, 1988). A susceptibilidade à infecção não depende apenas do hospedeiro intermediário, como também da linhagem geográfica do parasita (FILES & CRAM, 1949).

NEWTON (1952) demonstrou que o cruzamento de progenies de moluscos susceptíveis e não susceptíveis de *Biomphalaria glabrata* com uma linhagem de Porto Rico de *Schistosoma mansoni* é um caráter hereditário. A susceptibilidade e resistência à infecção por dependerem da constituição genética, podem então ser transferidas para as gerações subsequentes. Foi demonstrado nos estudos de RICHARDS & MERRITS (1972) e RICHARDS (1973, 1975) que a

susceptibilidade à infecção é regulada por fatores genéticos, sendo a resistência expressa por um único gen dominante.

Fatores extrínsecos considerados, não genéticos, como tamanho e idade do molusco, número de miracídios usados para a exposição, fatores ambientes também exercem influência sobre a susceptibilidade e taxa de infecção.

O hospedeiro desenvolve mecanismos de proteção para prevenir-se de infecções, mas uma vez que o miracídio penetra no molusco vencendo a barreira externa que constitui o epitélio, mecanismos de defesa internos se opõem ao parasita, onde o estabelecimento ou posterior infecção vão depender primordialmente dos fatores genéticos que controlam tanto a infectibilidade do parasita como o seu nível de resistência (ROLLISON , 1985). A sobrevivência das larvas é consequência de interações como a resistência do caramujo e a capacidade de interferência do parasita.

É possível obter mudanças no grau de suscetibilidade ao *S.mansoni* em populações de caramujos, *B.tenagophila* ou *B.glabrata*, pela seleção genética de progenies obtidas por autofecundação, (NEWTON, 1952, RICHARDS, 1975; SANTANA *et al*, 1978 ; ZANOTTI - MAGALHÃES *et al*, 1987, 1991, 1993, 1995 ; MASCARA , 1995).

MECANISMOS DE DEFESA DO MOLUSCO

Mecanismos de defesa contra agentes estranhos estão presentes de algum modo em todos os filos de invertebrados. Os invertebrados não possuem linfócitos antígeno específicos, não produzem imunoglobulinas e complemento. Eles

se defendem dos agentes estranhos pelos mecanismos de defesa natural que envolve elementos celulares e humorais em cooperação.

A infecção do caramujo se dá pela exposição deste a um determinado número de miracídios que se transformam em esporocistos primários em 48 horas após a penetração. Em moluscos mais susceptíveis ao *S.mansoni*, como *B. glabrata*, os esporocistos se desenvolvem quase sem reação tecidual. Em linhagens resistentes desta espécie como a 10-R2 originalmente desenvolvida por RICHARDS (1975), os esporocistos são encapsulados e destruídos logo após a penetração (RICHARDS & MERRIT, 1972 ; LOKER, 1982). Em *B.tenagophila* do Vale do Rio Paraíba, infectadas pela linhagem SJ, predominam esporocistos primários degenerados, envolvidos por amebócitos (GUARALDO ,1981). Como já dito anteriormente, variações no grau de suscetibilidade de diferentes espécies de moluscos podem ser obtidas para diferentes linhagens de *S.mansoni* (FILES & CRAM, 1949; PARAENSE & CORREIA, 1963, 1978; DIAS *et al*, 1987).

A resposta imune é melhor estudada em moluscos capazes de responder à invasão do parasita , podendo ser parcialmente ou totalmente resistentes (LIE, 1982). A resposta humoral tem um importante papel na destruição das larvas modulando a resposta celular através das lectinas que agem como opsoninas (KNAAP, 1990), sendo ambas importantes para definir a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro.

A fagocitose em moluscos constitui um processo importante na eliminação do agente estranho. Em 1883, ano da descoberta da fagocitose METCHNIKOFF demonstrou o papel de fagócitos na destruição da cauda de girinos e

em 1884, ele observou a fagocitose de *Monospora* em um crustáceo *Daphnia*. A partir destas descobertas passou para a história como defensor da “teoria celular” da imunidade, na qual a fagocitose e inflamação foram os elementos centrais de suas investigações. A partir daí ficou estabelecido um elo filogenético entre a atividade imunológica com atividades biológicas básicas, como digestão, nutrição. Alguns autores sugerem que as células fagocitárias, denominadas amebócitos (TAKATSUKI, 1934 ; SMINIA ,1972) que detectam, encapsulam e removem o agente estranho são produzidas pela "APO" (Órgão produtor de amebócitos), órgão situado entre a cavidade do manto e pericárdio (JEONG, 1983). Posteriormente foram identificados dois tipos de células denominadas como granulócitos e hialinócitos (CHENG, 1980, 1981; HARRIS, 1975; KNAAP, 1983; SMINIA, 1981, 1987). Atualmente muitos autores se referem ao termo hemócitos como as células de defesa em invertebrados que se assemelham aos macrófagos de vertebrados (YOSHINO & LODES, 1989; LOKER, 1992; LODES & YOSHINO, 1993; BARBARA, 1995). Em nosso trabalho o termo hemócitos se refere a granulócitos e hialinócitos.

Os granulócitos são caracterizados como células maiores com aspecto estrelado por se espriarem na superfície do vidro, emitindo pseudópodes, possuem grânulos citoplasmáticos e maior conteúdo de enzimas lisossomais. Aos granulócitos são atribuídas muitas funções como digestão, excreção e transporte de íons e nutrientes. Estas células são consideradas a maior arma da resposta imune em moluscos (KNAAP, 1990). Os hialinócitos são células menores, com uma menor relação núcleo-citoplasma, menor conteúdo de enzimas, não possuem grânulos, nem emitem pseudópodes.

As funções imunes têm sido bem demonstradas em reações como fagocitose (ABDUL-SALAM *et al*, 1980), encapsulação (SMINIA, 1974), aglutinação (KNAAP, 1981 a ; FISTAD, 1974) e opsonização (ANDERSON, 1976; SMINIA, 1979).

Em invertebrados a eficiência do sistema de defesa celular é dependente de fatores humorais (KNAAP *et al*, 1981), mediados por lectinas pelas suas propriedades aglutinantes e opsonizantes. As lectinas estão presentes nos fluidos corporais de invertebrados e a elas são atribuídas várias funções fisiológicas e imunológicas. São proteínas sintetizadas por hemócitos e liberadas na hemolinfa com alta afinidade por carboidratos (BAYNE, 1983, 1985 ; KNAAP, 1990).

Em moluscos resistentes, os esporocistos são encapsulados pelos amebócitos (SMINIA, 1980; GUARALDO *et al*, 1981) e destruídos pela forte atividade fagocitária destas células. Este processo é mediado por fatores humorais presentes na hemolinfa . A ativação da resposta celular ocorre logo após a penetração do parasita no hospedeiro onde a presença de grande número de amebócitos que formam uma cápsula em torno da larva está associada com a degeneração dos esporocistos (LIE, 1981).

Proteínas e polipeptídeos têm um importante papel na modulação da resposta imune celular em moluscos resistentes, (*B.grabata* 10-R2), quando interagem com o tegumento do esporocisto, (CHISTOPHER, 1985; BAYNE, 1986). A superfície do tegumento do esporocisto primário do *S.mansoni* serve como interface para a comunicação molecular entre o parasita e o hospedeiro intermediário. O requerimento de moléculas do plasma pelo tegumento larval é essencial para o

abastecimento de nutrientes, importantes para o crescimento e desenvolvimento do parasita (BAYNE, 1986). Proteínas excretórias-secretórias,” E-S products “ (ESP), liberados durante a transformação do miracídio em esporocisto primário, quando sintetizadas in vitro por esporocistos de *S.mansoni* estimulam a atividade proteinase do hemócitos, com um efeito modulador na fagocitose, o que pode representar um mecanismo inicial de defesa do hospedeiro contra o miracídio recém penetrado (YOSHINO & LODES, 1988, 1989, 1993).

O tegumento do esporocisto, além de servir como requerimento de nutrientes é o alvo primário dos mecanismos de defesa interno exercido pelos hemócitos no reconhecimento, encapsulação e destruição de larvas incompatíveis com o hospedeiro (YOSHINO & VASTA, 1996). A reação de encapsulação da larva em hospedeiros incompatíveis ocorre rapidamente e envolve três componentes: os hemócitos, fatores plasmáticos e o tegumento do esporocisto. Ensaio de ligação entre plasma e lectinas heterólogas tem demonstrado a presença de polipeptídeos associados a superfície do tegumento do esporocisto que formam glicoconjugados na superfície dos esporocistos do *S.mansoni*. Carboidratos de membrana, especialmente aqueles associados com glicoproteínas e glicolípides, representam os mais importantes componentes dos esporocistos primários sugerindo que eles sirvam como ligantes (lectinas associadas a hemócitos) representando um alvo molecular do reconhecimento imune por hemócitos (YOSHINO & VASTA, 1996).

Interações dinâmicas entre larvas e componentes celulares e humorais do sistema de defesa do molusco determinam o estabelecimento da infecção, onde a sobrevivência do parasita no hospedeiro pode ser conseguida através de mecanismos

que se operam no tegumento, como resultado da maturação do parasita e trocas em sua estrutura. Muitos antígenos da resposta imune contra o parasita estão localizados no tegumento (FREDERICO, 1996) e antígenos presentes no plasma são retidos e processados no tegumento de esporocistos (BAYNE & LOKER, 1986).

Moluscos que parasitam trematódeos suportam sucessivas formas larvais que se multiplicam por poliembrionia e utilizam o hospedeiro como estágio de transporte. Os mecanismos de defesa de moluscos resistentes à infecção por *S.mansoni* que se opõem ao parasita devem ser melhor esclarecidos. Os trabalhos realizados até agora visaram o estudo da resposta imune, celular e humoral, em populações de moluscos susceptíveis ao *S.mansoni*.

2-OBJETIVOS

Avaliar a resposta amebocitária celular em *Biomphalaria tenagophila* selecionada geneticamente para o caráter resistência à infecção por *S.mansoni* da linhagem SJ observando os seguintes parâmetros.

Parâmetros avaliados

- 1- Taxa de infecção dos moluscos frente ao *S.mansoni* .
- 2- Número de amebócitos na hemolinfa circulante nos tempos de 10h, 18h, 24h, 48h, 72h, e 96h após a infecção ao *S.mansoni*.
- 3- Atividade fagocitária dos amebócitos na hemolinfa frente a hemácias formolizadas de carneiro.
- 4- Verificação da reação amebocitária nos tecidos de moluscos infectados nos períodos 10h, 24h, 48h, 72h e 96h.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Grupos de estudo

Para a realização deste trabalho foram utilizados grupos de moluscos selecionados geneticamente por auto fecundação para o caráter resistência à infecção por *S.mansoni* da linhagem SJ.

O esquema abaixo ilustra a obtenção dos moluscos resistentes

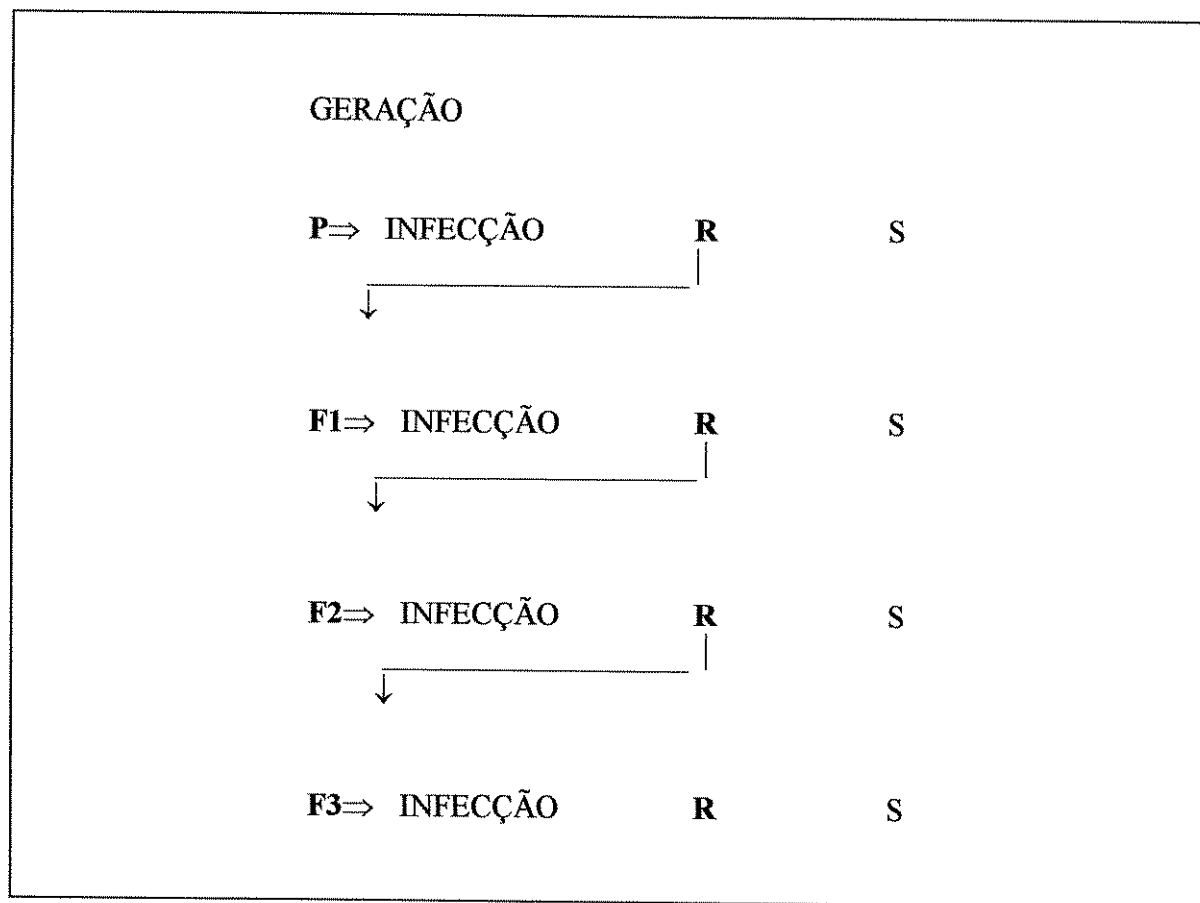


Figura 1- Esquema do método de seleção da linhagem de *B.tenagophila* resistente (R) à linhagem SJ do *S. mansoni*

S - Susceptível

3.1.1 Dentre estes grupos estão:

1- Geração parental de *B.tenagophila* exposta ao *S.mansoni*. (100 moluscos).

2- Geração F₁ de *B.tenagophila* obtida a partir da geração parental resistente à infecção por *S.mansoni* (70 moluscos).

3- Geração F₂ de *B.tenagophila* obtida a partir da geração F₁ resistente à infecção por *S.mansoni*. (90 moluscos).

4-Geração F₃ de *B.tenagophila* obtida a partir da geração F₂ resistente à infecção por *S.mansoni* (30 moluscos).

3.1.2- Manutenção dos moluscos e linhagem do *S.mansoni*.

Os exemplares de *B.tenagophila* utilizados para constituição da geração parental foram obtidos de população oriunda de São José dos Campos e mantida em laboratório. Os caramujos medindo 3-5 mm de diâmetro foram isolados em frascos individuais, sendo alimentados com alface “ ad libitum ”. Por ocasião do aparecimento das primeiras desovas, estes moluscos foram expostos à infecção por *S.mansoni* da linhagem SJ.

A linhagem SJ de *S.mansoni* foi mantida em camundongos Swiss e *B.tenagophila* de São José dos Campos não selecionada geneticamente.

Os miracídeos utilizados nas infecções dos moluscos dos grupos experimentais foram oriundos das fezes dos camundongos infectados. A infecção foi realizada utilizando-se 10 miracídeos para cada molusco em exposição individual, segundo

técnica de STANDEN (1951). Foram utilizados um número de 100 moluscos para a geração parental, 70 para a geração F_1 e 90 para F_2 e 30 para F_3 .

3.2-DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO E MORTALIDADE DOS MOLUSCOS DA GERAÇÃO P, F_1 e F_2 e F_3 .

Após o 30^o dia da exposição aos miracídios os moluscos foram expostos à luz e calor por 2 horas para se verificar a eliminação de cercárias, (PELLEGRINO *et al*, 1955). Este procedimento foi repetido semanalmente até completar 12 semanas após a infecção e registrando o número de moluscos que morreram no período.

3.3-DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE AMEBÓCITOS NA CIRCULAÇÃO LACUNAR DOS MOLUSCOS DA GERAÇÃO P E F_1 E F_2 .

Um número de 7 moluscos de cada geração foram avaliados quanto ao número de amebócitos circulantes após a infecção por 10 miracídios de *S.mansoni* da linhagem SJ nos tempos de: 10, 18, 24, 48, 72 e 96 horas. Destes moluscos, com 5-7 mm de diâmetro, foi retirada a hemolinfa, por punção da região céfalo-podal, com auxílio de pipeta Pasteur de plástico para evitar aderência das células. Esta hemolinfa livre de muco foi imediatamente colocada em tubos “Eppendorf” e posteriormente em câmara de Neubauer e observada em microscopia de fase para contagem de amebócitos, granulócitos e hialinócitos. O número de amebócitos foi expresso em cél / $0,1\text{mm}^3$. Como controle utilizamos hemolinfa de 7 exemplares de *B. tenagophila* sem infecção.

3.4-ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DOS AMEBÓCITOS DA HEMOLINFA DOS MOLUSCOS DA GERAÇÃO P F₁ E F₂ FRENTE A HEMÁCIAS FORMOLIZADAS DE CARNEIRO.

A verificação da capacidade de fagocitose dos granulócitos dos moluscos infectados se fez por ensaios “in vitro” frente à hemácias formolizadas de carneiro, (ABDUL- SALAM *et al*, 1980). A formolização das hemácias de carneiro colhidas em solução de Alsever foi realizada segundo o método de Stavitsky, 1964. Os testes de fagocitose foram realizados nos períodos de 10h, 18h, 24h, 48h, 72h e 96h após a infecção dos moluscos.

3.4.1- Processo de Fagocitose :

Um “ pool ”de hemolinfa de 7 moluscos para cada intervalo de tempo foi obtido para a realização da fagocitose. Deste utilizou-se 100 µl que foram depositados em gotas de 50 µl em duas lâminas que foram incubadas em estufa à 25 ° C por 60 minutos, com a finalidade de que os amebócitos espraiassem pela lâmina.A cada lâmina foi acrescentado 50 µl de hemácias de carneiro formolizadas na concentração de $3.0 \cdot 10^6$ cels / ml. Após incubação e lavagens em meio mínimo essencial (MME), as preparações foram fixadas em metanol e coradas pelo May-Gruenwald e Giemsa.Depois foram observadas ao microscópio denominando-se o índice de fagocitose segundo a fórmula de (ABDUL- SALAM *et al* , 1980).

Nº de amebócitos fagocitando pelo menos uma hemácia x 100

Nº total de amebócitos

3.5-REAÇÃO AMEBOCITÁRIA NOS TECIDOS DOS MOLUSCOS DAS GERAÇÕES P, F₁ E F₂.

Dois exemplares de moluscos das gerações P, F₁ e F₂ foram utilizados para avaliação da viabilidade dos esporocistos após infecção com 100 miracídios de *S.mansoni* da linhagem SJ nos tempos 10, 18, 24, 48, 72 e 96 h após a exposição às larvas.

Dos moluscos foi retirada a região a céfalo podal abaixo do colar do manto sendo a peça fixada em Bouin aquoso a 5 % por um período de 12 horas. Foram obtidos cortes transversais seriados de 5 µm de espessura que foram corados pelo tricrômico de Gomori (GUARALDO *et al*, 1980) montadas em Bálsamo de Canadá. A observação em microscopia óptica comum permitiu verificar a viabilidade dos esporocistos e as reações teciduais envolvidas na resposta do molusco.

3.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada no sistema SAS ®. Os índices de sobrevivência de cada grupo de moluscos foram analisados pelo Lifetest Procedure. O número de amebócitos na hemolinfa e a taxa de fagocitose dos amebócitos frente a hemácias de carneiro formolizadas foram analisados segundo General Linear Models Procedure. O software utilizado foi a versão 6.08 , SAS ® (CARY, NC, USA, 1989).

4- RESULTADOS

4.1. -TAXA DE INFECÇÃO DOS MOLUSCOS.

A infecção dos moluscos das gerações P, F₁, F₂ e F₃ foi verificada semanalmente a partir de 30 dias da data da exposição aos miracídios, pela observação da eliminação de cercárias durante 12 semanas. Os resultados referentes à taxa de infecção estão apresentados na tabela 1. A análise estatística realizada (tabela 29) do apêndice estatístico mostrou não haver diferença significativa entre as taxas de infecção verificadas nas diferentes gerações de moluscos ($p > 0.693$).

4.2. -TAXA DE MORTALIDADE DOS MOLUSCOS.

A mortalidade dos moluscos das gerações P, F₁, F₂ e F₃ foi verificada semanalmente e durante 12 semanas. Os resultados estão apresentados nas tabelas 2, 3, 4, 5. A morte ocorreu a partir da 5 semana de infecção e a análise estatística realizada (tabela 30) do apêndice estatístico que comparou a sobrevivência dos moluscos das quatro gerações, mostrou-se altamente significante ($p > 0.0001$). Há evidências de diferenças entre as curvas de sobrevivência (Figuras 18 e 19), conforme mostrado no apêndice estatístico. Os membros da geração P e F₃ tiveram vida mais curta.

4.3. NÚMERO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES EM MOLUSCOS DAS GERAÇÕES P, F₁ E F₂.

Os amebócitos na hemolinfa circulante foram diferenciados em granulócitos amebócitos e hialinócitos. A Figura 2 mostra as características dos amebócitos e hialinócitos, quando visualizados em microscopia de contraste e fase. Os granulócitos apresentam-se como células maiores, espriam no vidro e emitem pseudópodes. Os hialinócitos são menores que os granulócitos, não aderem ao vidro, são mais refringentes quando visualizados em microscopia de contraste e fase. Características morfológicas dos granulócitos podem ser melhor observadas em preparações coradas por May-Grünwald - Giemsa (Figura 3).

O número de amebócitos na hemolinfa circulante foi verificado às 10, 18, 24, 48,72 e 96 horas após a exposição dos moluscos aos miracídeos. Os resultados estão apresentados nas tabelas de 6 a 26. Grupos controles constituídos de animais não expostos ao *S.mansoni*, tiveram a hemolinfa coletada e determinou-se o número de amebócitos presentes.

Resumidamente os dados da variação cinética do número de amebócitos estão compilados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

A análise estatística referente aos granulócitos mostrou haver discreta diferença no efeito de período por geração; na geração F₁, esta diferença foi menor; em F₂ e parental, não há evidência desse efeito (tabela 31) do apêndice estatístico. As diferenças notáveis estão entre as gerações. As médias foram: P = 66; F₁ = 110 e F₂ = 110.

A análise estatística referente aos hialinócitos revelou que estes aumentaram discretamente com o período: 0.3/unidade para F_1 ; 0.17/unidade para F_2 ; zero para a geração parental. Efeitos notavelmente diferentes existem entre gerações; as médias foram: $P = 44$; $F_1 = 40$ e $F_2 = 61$ (tabela 32), do apêndice estatístico

4.4. -ÍNDICE DE FAGOCITOSE.

Na tabela 27 estão apresentados os índices de fagocitose verificados com granulócitos de moluscos das gerações P, F_1 , F_2 frente a hemáceas de carneiro. A análise dos dados obtidos não revelou efeito de geração, nem de período para o índice de fagocitose (tabela 33) no apêndice. A média geral de fagocitose observada foi 32, praticamente igual para todas as gerações.

No processo de fagocitose os granulócitos apresentaram-se emitindo pseudópodes finos, denominados filópodes, envolvendo as hemáceas, notando-se a presença de vacúolos no interior do citoplasma (Figuras 8 e 9).

A atividade fagocitária das gerações parental, F_1 e F_2 está mostrada na figura 10.

4.5. -ANÁLISE DOS ESPOROCISTOS EM CORTES HISTOLÓGICOS DOS MOLUSCOS.

Os esporocistos de *S. mansoni* observados nos moluscos das gerações parental, F_1 e F_2 foram caracterizados pelo aspecto celular, acelular, degenerados ou íntegros (GUARALDO *et al*, 1981), conforme apresentado na tabela 28.

Não foram evidenciados esporocistos totalmente íntegros nas três gerações de moluscos estudadas. Os esporocistos primários se caracterizaram por estarem envolvidos por reação amebocitária com fortes características eosinofílicas (Figura 11).

As larvas de *S. mansoni* foram observadas em processo de degeneração logo após a penetração intramolusco (10 horas após a infecção) com o citoplasma das células somáticas apresentando-se com características eosinofílicas, desorganização das células germinativas, observando-se ainda um aspecto celular da massa neural e grânulos citoplasmáticos e algumas células somáticas íntegras (Figura 12). Neste caso as larvas estavam envolvidas por círculos concêntricos de amebócitos poligonais, formando uma cápsula que podemos chamar tipo II, por apresentar-se em várias camadas (Figura 13).

Na figura 14 é possível visualizar o aspecto do esporocisto 24 horas após a infecção, notando-se um grande afluxo de amebócitos em direção ao esporocisto, as vezes circundando dois esporocistos (Figura 15).

Nas gerações parental e F₂ os esporocistos apresentaram-se envolvidos por pequena reação amebocitária, sendo os amebócitos caracteristicamente achatados e alongados. Os esporocistos degenerados 72 horas após a infecção eram acelulares com um espaço vacuolizado (Figura 16).

Moluscos da geração F₁ apresentaram esporocistos totalmente degenerados 96 horas após a infecção (Figura 17), observando-se vacuolização da larva, com pequena camada de amebócitos circundando-a.

TABELAS

TABELA 1- TAXA DE INFECÇÃO APRESENTADA POR MOLUSCOS DAS GERAÇÕES PARENTAL, F1, F2 e F3 EXPOSTOS AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

Moluscos/ gerações	Número de Moluscos expostos à infecção	Número de Moluscos que eliminaram cercárias	Taxa de infecção (%)
Parental	100	5	5.0
F1	70	5	7,14
F2	90	8	8,89
F3	30	3	10.0

TABELA 2- MORTALIDADE DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

SEMANA	MOLUSCOS VIVOS	MOLUSCOS MORTOS
0-4	100	0
5	88	12
6	75	13
7	61	14
8	59	2
9	59	0
10	49	10
11	40	9
12	38	2

TABELA 3- MORTALIDADE DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

SEMANA	MOLUSCOS VIVOS	MOLUSCOS MORTOS
0-4	70	0
5	66	4
6	65	1
7	61	4
8	60	1
9	51	9
10	51	0
11	50	1
12	48	2

TABELA 4- MORTALIDADE DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

SEMANA	MOLUSCOS VIVOS	MOLUSCOS MORTOS
0-4	90	0
5	89	1
6	87	2
7	85	2
8	81	4
9	79	2
10	78	1
11	76	2
12	74	2

TABELA 5- MORTALIDADE DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₃ EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

SEMANA	MOLUSCOS VIVOS	MOLUSCOS MORTOS
0-4	30	0
5	27	3
6	26	1
7	25	1
8	25	0
9	23	2
10	16	7
11	15	1
12	15	0

TABELA 6-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila GERAÇÃO PARENTAL NÃO EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ (GRUPO CONTROLE).

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	46	20	66
02	71	59	130
03	82	102	184
04	58	39	97
05	76	80	156
06	62	70	132
07	80	90	170
MÉDIA ARITMÉTICA	67.8	65.7	133.5

TABELA 7- NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM $0,1 \text{ mm}^3$ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 10 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	53	38	91
02	57	12	69
03	66	14	80
04	46	10	56
05	94	42	136
06	110	20	130
07	58	11	69
MÉDIA ARITMÉTICA	69.1	21.0	90.1

TABELA 8- NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM $0,1 \text{ mm}^3$ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 18 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	52	63	115
02	37	28	64
03	23	46	69
04	14	15	29
05	20	23	43
06	24	06	30
07	43	07	50
MÉDIA ARITMÉTICA	30.4	26.8	57.2

TABELA 9- NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 24 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	45	30	75
02	63	36	99
03	29	33	62
04	76	24	100
05	81	30	111
06	27	23	50
07	13	05	18
MÉDIA ARITMÉTICA	47.7	14.7	73.5

TABELA 10- NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 48 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	28	10	38
02	82	25	107
03	46	12	58
04	51	34	85
05	39	07	46
06	50	12	62
07	48	04	52
MÉDIA ARITMÉTICA	49.0	14.7	64.0

TABELA 11-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 72 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	295	15	310
02	78	11	81
03	152	52	204
04	97	26	123
05	82	14	96
06	48	14	62
07	113	21	134
MÉDIA ARITMÉTICA	122.0	21.7	144.2

TABELA 12- NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO PARENTAL 96 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	45	30	75
02	51	34	85
03	70	11	81
04	109	14	123
05	46	20	66
06	112	21	133
07	100	28	128
MÉDIA ARITMÉTICA	76.1	22.5	98.0

TABELA 13-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ NÃO EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	123	39	164
02	100	24	132
03	113	31	144
04	83	27	110
05	164	21	185
06	85	15	100
07	114	13	127
MÉDIA ARITMÉTICA	113.1	24.2	137.4

TABELA 14-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 10 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	99	71	170
02	160	41	201
03	166	33	199
04	154	27	181
05	125	23	148
06	116	30	146
07	215	17	232
MÉDIA ARITMÉTICA	147.8	34.5	182.4

TABELA 15-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 18 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	159	22	181
02	59	42	101
03	97	15	112
04	63	6	69
05	90	25	115
06	105	15	15
07	109	16	125
MÉDIA ARITMÉTICA	97.4	20.1	164.6

TABELA 16-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 24 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	69	38	107
02	108	16	124
03	160	21	181
04	113	20	133
05	44	17	61
06	114	19	133
07	89	25	114
MÉDIA ARITMÉTICA	99.5	22.2	121.8

TABELA 17-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 48 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	93	27	120
02	127	35	162
03	119	43	162
04	129	21	150
05	111	21	132
06	188	40	228
07	95	22	117
MÉDIA ARITMÉTICA	123.0	29.8	153.0

TABELA 18-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ E HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 72 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	60	34	94
02	44	17	61
03	52	22	74
04	84	46	130
05	189	41	230
06	60	44	104
07	120	37	157
MÉDIA ARITMÉTICA	87.0	34.4	121.4

TABELA 19-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₁ 96 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCOS	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	164	31	195
02	75	26	101
03	133	23	156
04	58	9	67
05	123	35	158
06	104	19	123
07	61	17	78
MÉDIA ARITMÉTICA	102.3	22.8	125.4

TABELA 20-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ NÃO EXPOSTA AO S. mansoni DA LINHAGEM SJ (GRUPO CONTROLE).

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	94	39	133
02	72	16	88
03	36	25	61
04	33	05	38
05	28	17	46
06	70	27	97
07	64	16	80
MÉDIA ARITMÉTICA	57	21	78

TABELA 21-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ 10 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	329	14	343
02	109	4	113
03	155	11	166
04	85	4	89
05	107	7	114
06	87	13	100
07	131	7	138
MÉDIA ARITMÉTICA	143	9	152

TABELA 22-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ 18 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	90	11	101
02	45	16	61
03	26	7	33
04	152	27	179
05	174	17	191
06	90	10	100
07	142	13	155
MÉDIA ARITMÉTICA	102.0	15.0	117.0

TABELA 23-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ 24 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	79	41	120
02	57	25	82
03	90	11	111
04	124	29	153
05	84	19	103
06	60	18	78
07	97	9	105
MÉDIA ARITMÉTICA	85.0	22.0	107.0

TABELA 24-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM 0,1 mm³ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F₂ 48 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	38	8	46
02	114	26	128
03	57	18	65
04	25	36	31
05	180	20	190
06	110	20	130
07	160	8	168
MÉDIA ARITMÉTICA	98.0	11.1	109.0

TABELA 25-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM $0,1 \text{ mm}^3$ DE HEMOLINFA DE B. tenagophila DA GERAÇÃO F_2 72 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	200	13	213
02	254	15	269
03	120	12	132
04	114	20	134
05	156	37	193
06	145	14	159
07	210	18	228
MÉDIA ARITMÉTICA	171.0	18.0	189.0

TABELA 26-NÚMERO DE AMEBÓCITOS EM $0,1 \text{ mm}^3$ DE HEMOLINFA DE B. t enagophila DA GERAÇÃO F_2 96 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO A 10 MIRACÍDIOS DE S. mansoni DA LINHAGEM SJ.

MOLUSCO	AMEBÓCITOS ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	AMEBÓCITOS NÃO ESTRELADOS (NÚMERO ABSOLUTO)	TOTAL
01	48	4	52
02	127	5	132
03	185	3	188
04	144	13	157
05	91	10	101
06	81	5	86
07	141	7	148
MÉDIA ARITMÉTICA	117.0	7.0	124.0

TABELA 27- ÍNDICES DE FAGOCITOSE FRENTE A HEMÁCIAS DE CARNEIRO, APRESENTADOS POR GRANULÓCITOS DE MOLUSCOS DAS GERAÇÕES P, F1 E F2.

PERÍODO (HORAS)	GERAÇÃO PARENTAL (%)	GERAÇÃO (%) F1	GERAÇÃO (%) F2
0	38.8	29.0	33.3
10	28.8	52.5	35.6
18	18.7	31.0	19.0
24	21.3	34.0	32.4
48	30.1	25.5	47.0
72	46.2	24.0	25.0
96	33.9	31.2	35.1
MÉDIA ARITIMÉTICA	31.1	32.4	32.4

TABELA 28- CLASSIFICAÇÃO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS E DAS REAÇÕES AMEBOCITÁRIAS OBSERVADAS EM CORTES HISTOLÓGICOS DE MOLUSCOS DAS GERAÇÕES PARENTAL, F₁ e F₂.

GERAÇÃO	PERÍODO (HORAS)	NÚMERO DE MOLUSCOS	REAÇÃO AMEBOCITÁRIA	CARACTERÍSTICA (AD- CD- NE)
P	10	2	NÃO OBSERVADO	NE
P	18	2	“	NE
P	24	2	“	NE
P	48	2	“	NE
P	72	2	“	CD
P	96	2	“	AD
F1	10	2	++++	CD
F1	18	2	NÃO OBSERVADO	NE
F1	24	2	++++	CD
F1	48	2	NÃO OBSERVADO	AD
F1	72	2	“	NE
F1	96	2	“	AD
F2	10	2	NÃO OBSERVADO	NE
F2	18	2	“	“
F2	24	2	“	“
F2	48	2	“	“
F2	72	2	“	AD
F2`	96	2	“	NE

*CARACTERÍSTICA DOS ESPOROCISTOS

AD- ACELULAR -DEGENERADO CD- CELULAR DEGENERADO NE- NÃO ENCONTRADO

*REAÇÃO AMEBOCITÁRIA- ++- BRANDA

++++- FORTE

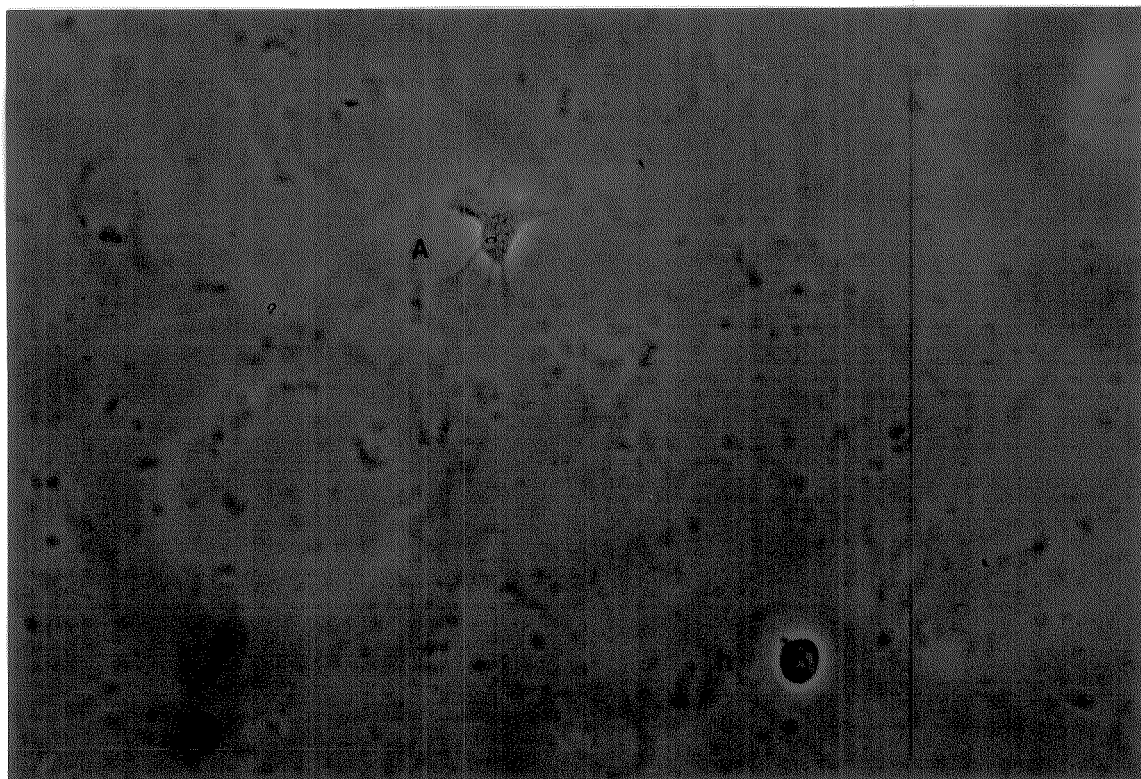


Figura 2- Fotomicrografia de granulócito e hialinócito de B. tenagophila , observados em microscopia de fase, 500 X.

A- Amébócito H- Hialinócito

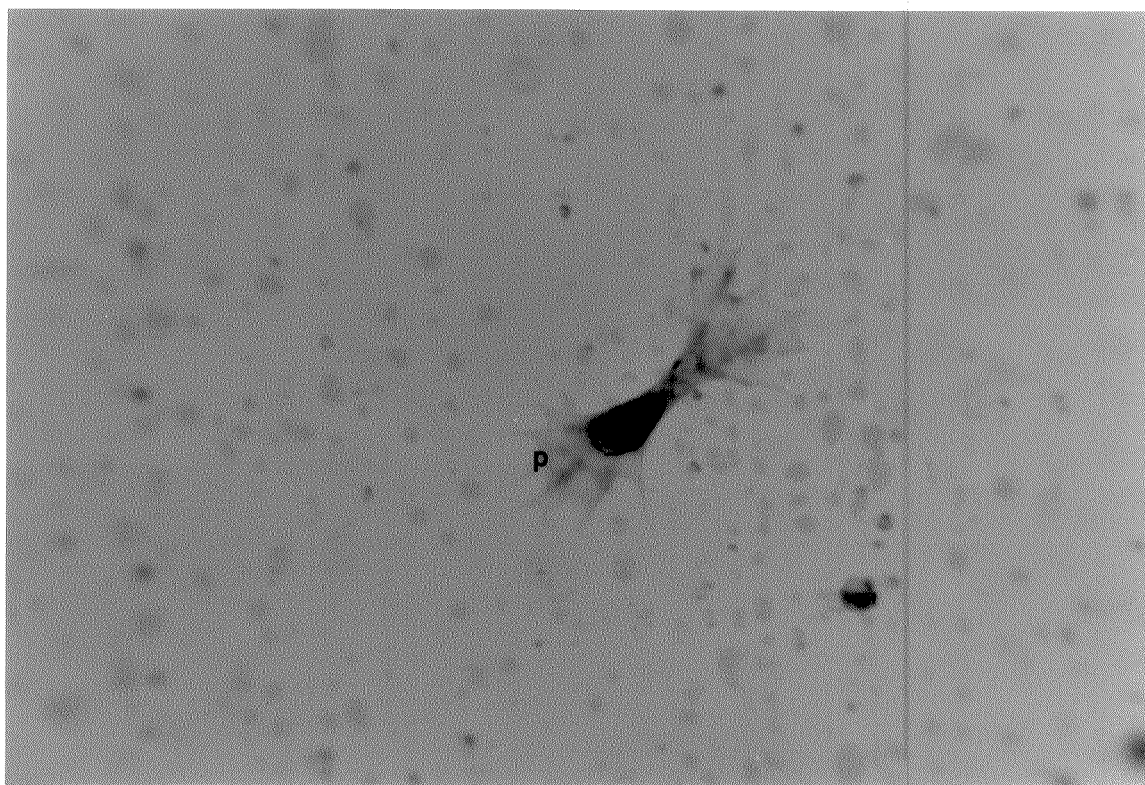


Figura 3- Granulócito de B. tenagophila corado pelo May-Gruenwald e Giemsa, 1250 X. Geração F₂.
P- Pseudópodes.

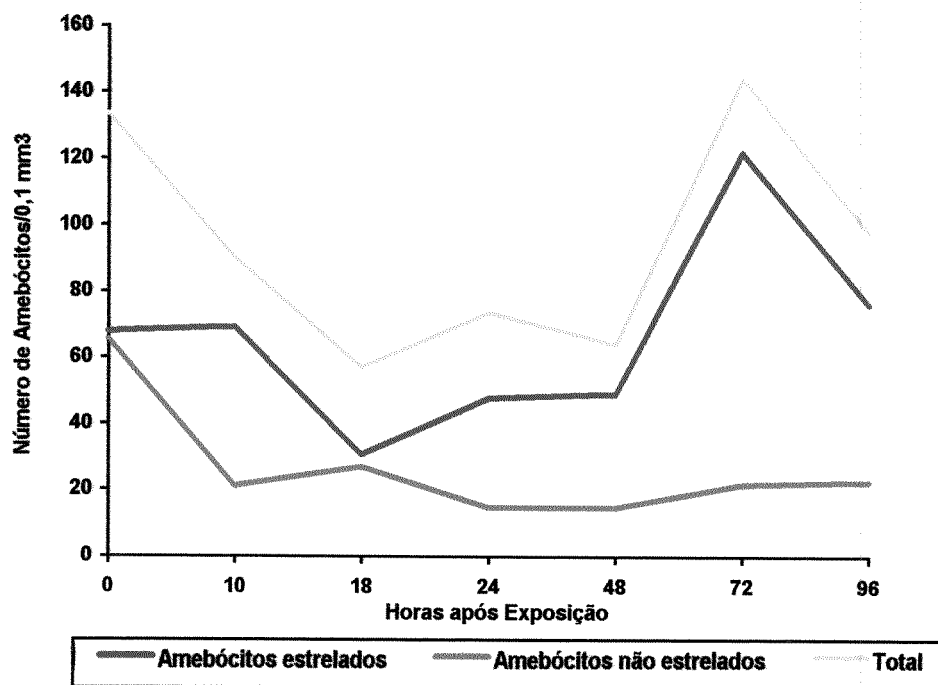


Fig. 4 - Número de amebócitos na circulação lacunar de *B. tenagophila* da geração Parental nos tempos 0 hora (grupo controle), 10, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após exposição a 10 mirácidos de *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ.

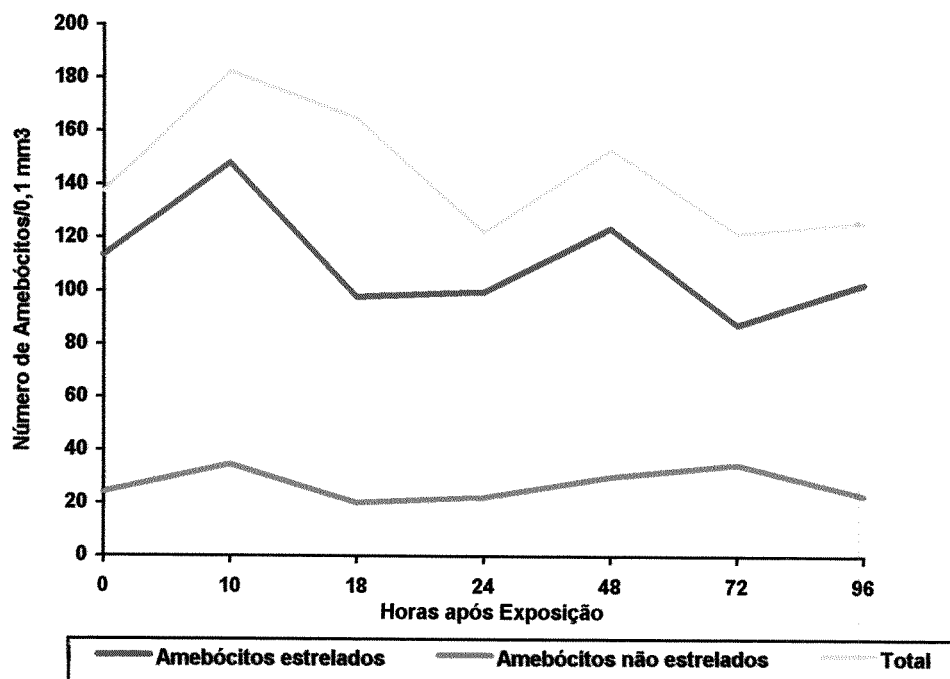


Fig. 5- Número de amebócitos na circulação lacunar de *B. tenagophila* da geração F1 nos tempos 0 hora (grupo controle), 10, 18, 48, 72 e 96 horas após exposição a 10 mirácidos de *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ.

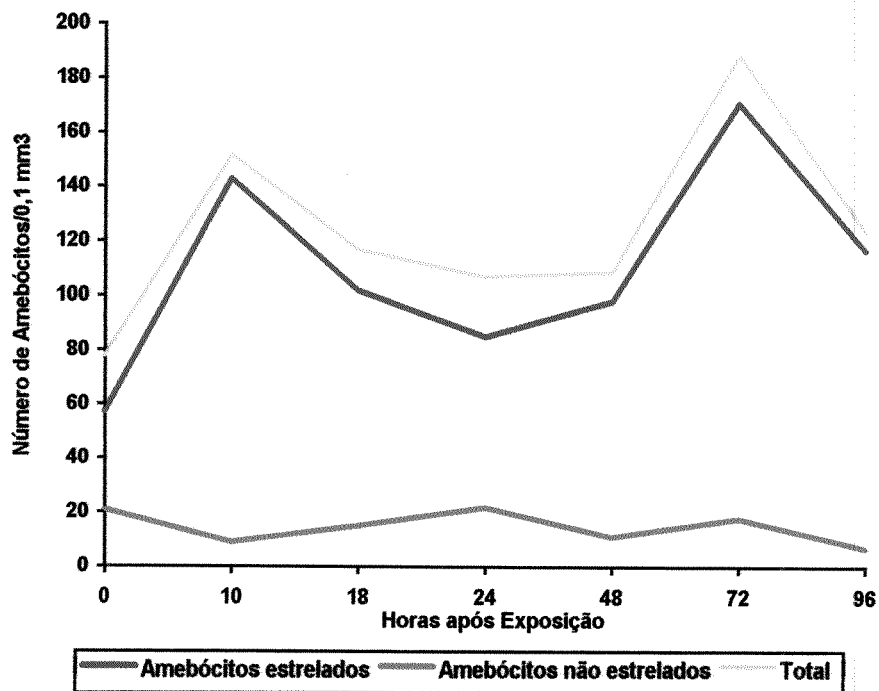


Fig. 6 - Número de amebócitos na circulação lacunar de *B. tenagophila* da geração F2 nos tempos 0 hora (grupo controle), 10, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após exposição a 10 miracídeos de *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ.

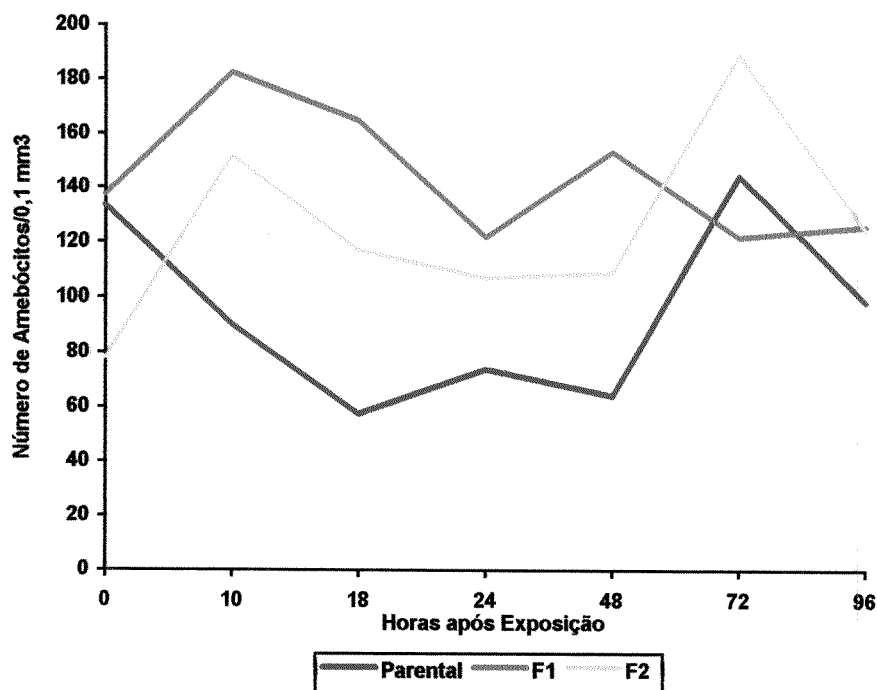


Fig. 7 - Número de amebócitos totais na circulação lacunar de *B. tenagophila* das gerações Parental, F1 e F2 nos tempos 0 hora (grupo controle), 10, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após exposição a 10 miracídeos de *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ.

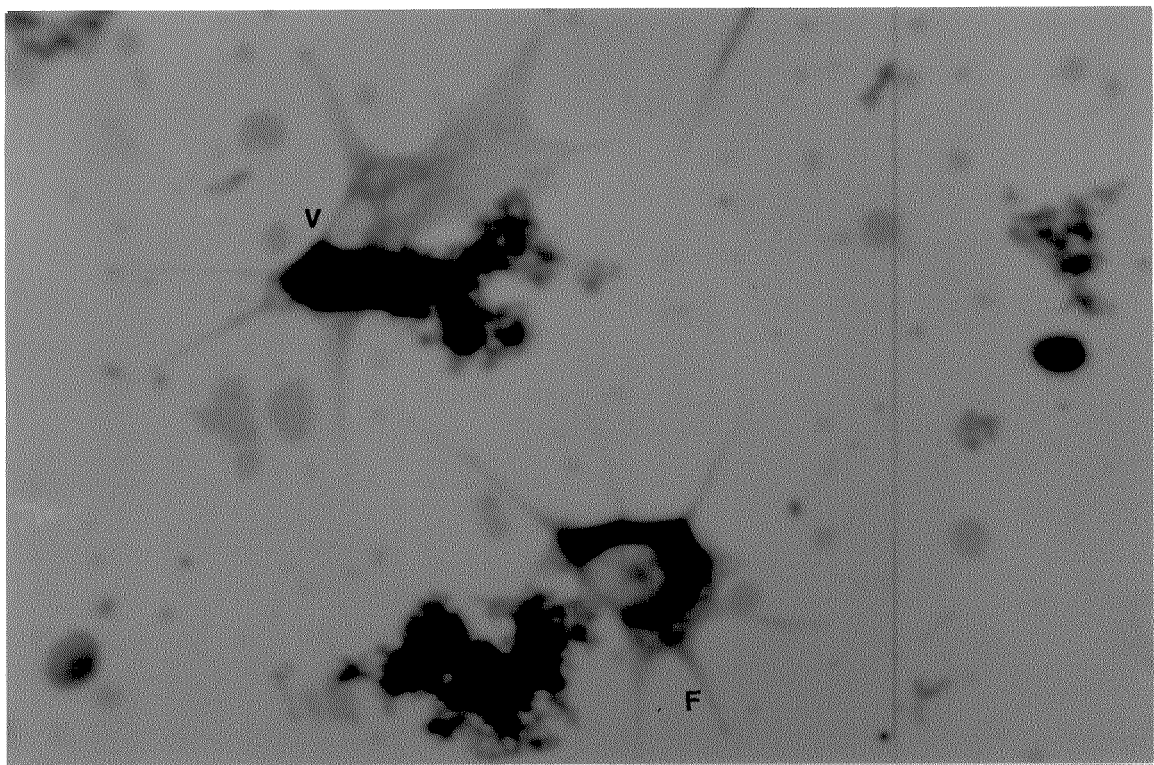


Fig. 8- Granulócitos corados pelo May - Gruenwald e Giemsa. Presença de vacúolos e filópodes.
V- Vacúolos F- Filópodes.

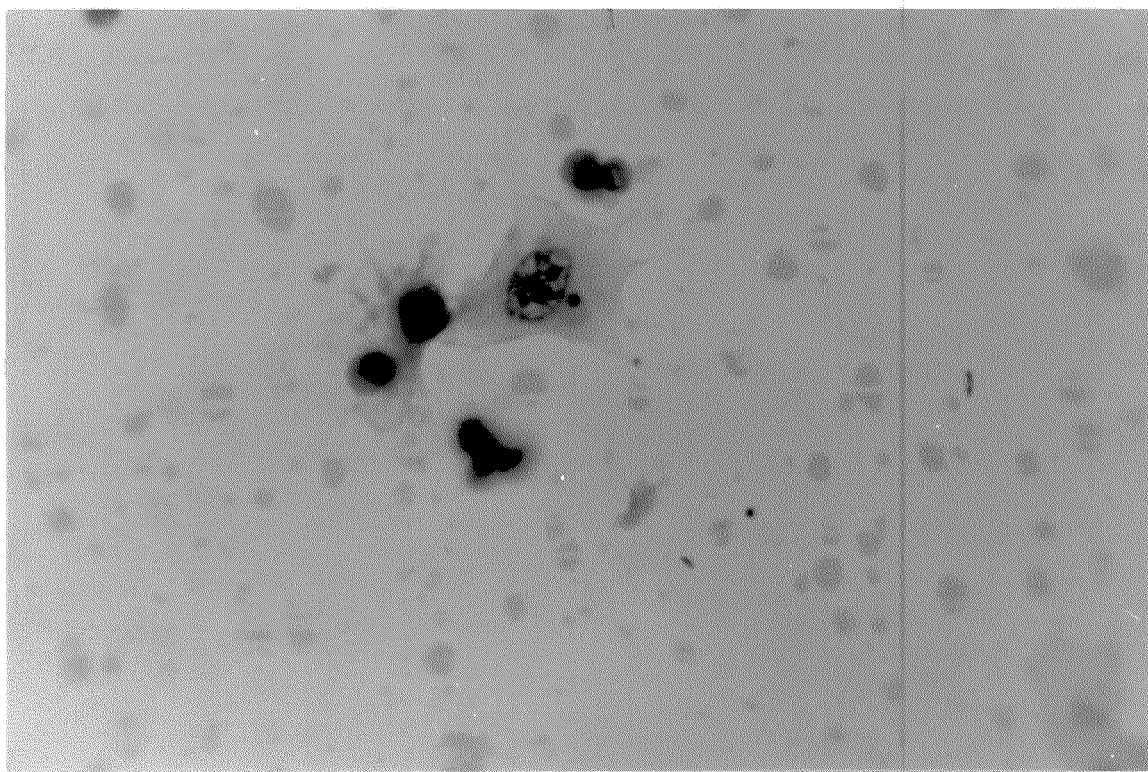


Fig. 9 - Granulócito fagocitando hemácias de carneiro formolizadas, corados pelo May -Gruenwald e Giemsa, 1250 X.

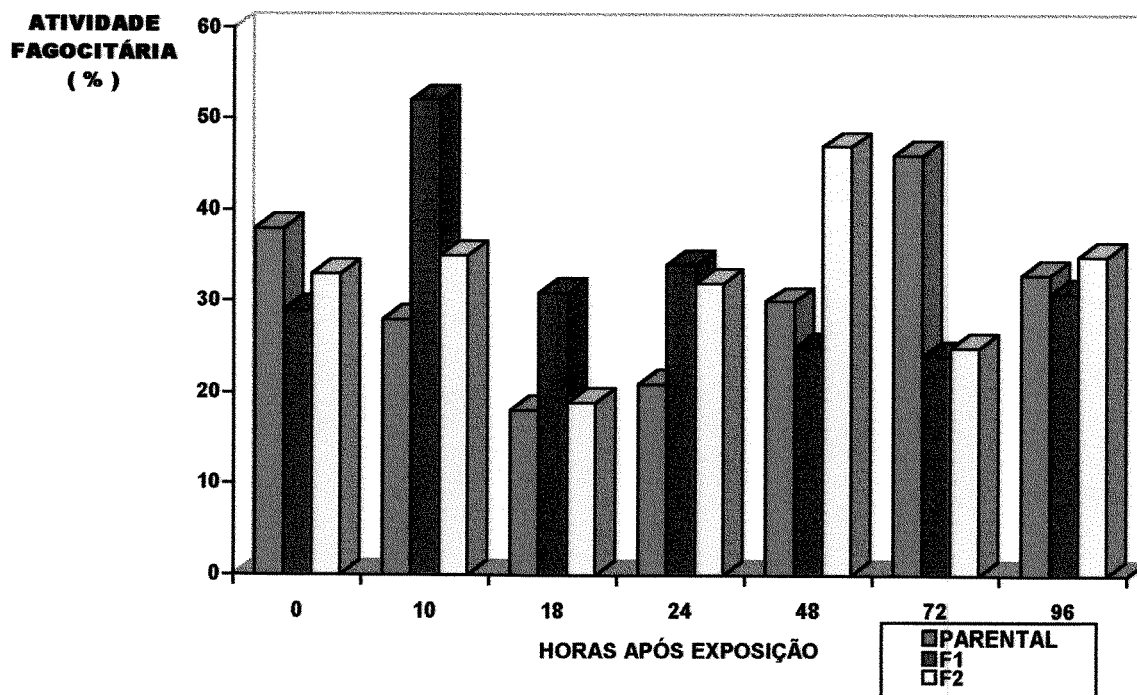


FIG- 10- Atividade Fagocitária dos amebócitos da hemolinfa circulante frente a hemácias formolizadas de carneiro das gerações Parental F1 e F2.

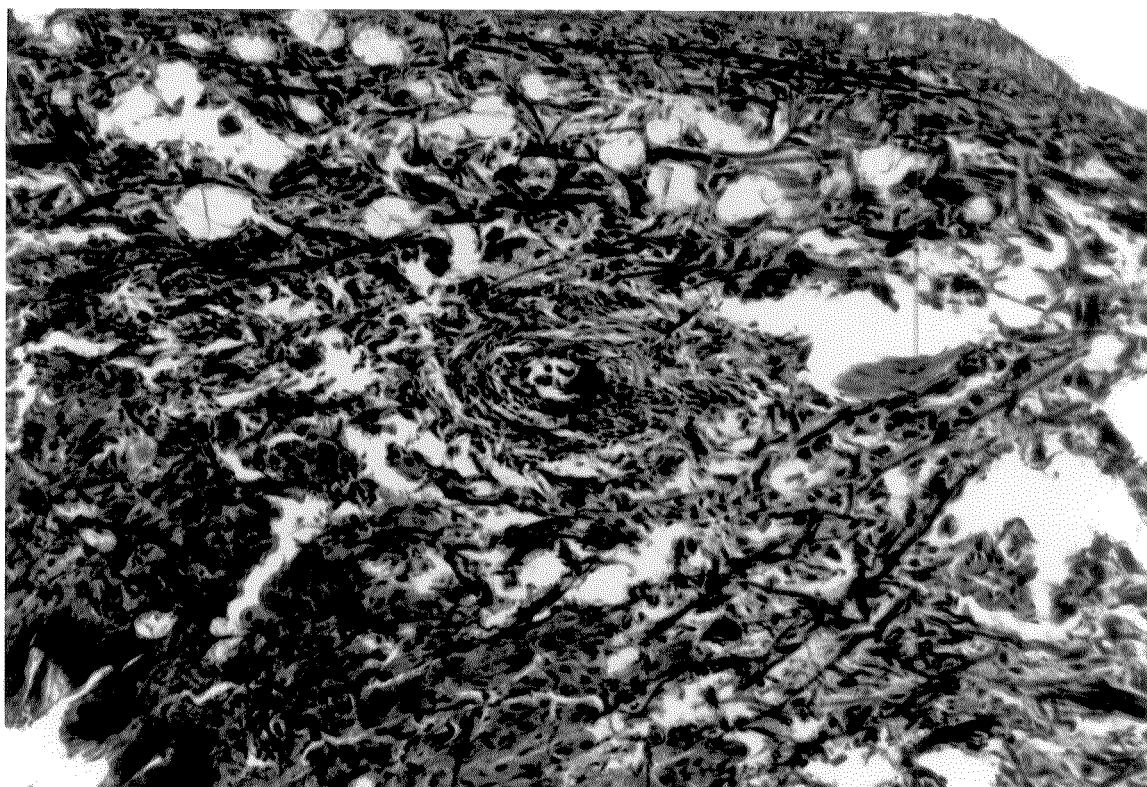


Fig. 11- Esporocisto primário , 96 horas após infecção corado pelo Tricômico de Gomori. Geração F_1 , 1000 X.

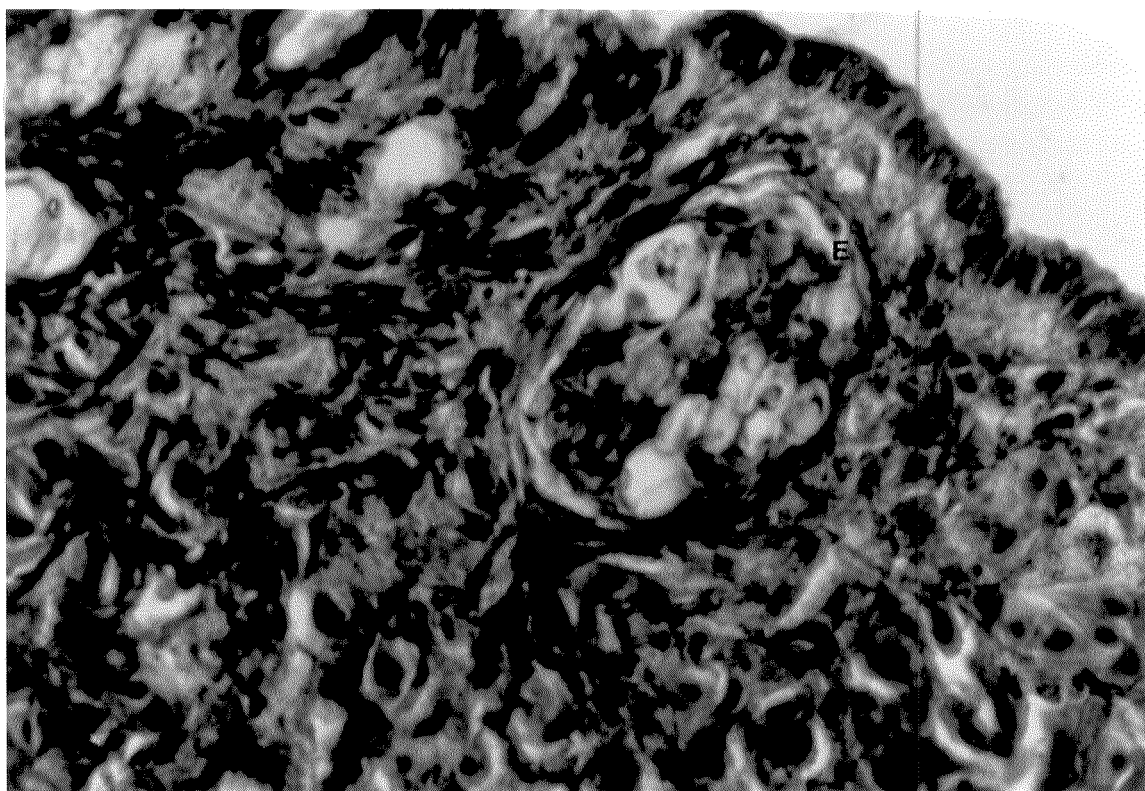


Fig. 12 - Esporocisto primário, 10 horas após infecção corado pelo Tricômico de Gomori. Geração F_1 , 100 X.

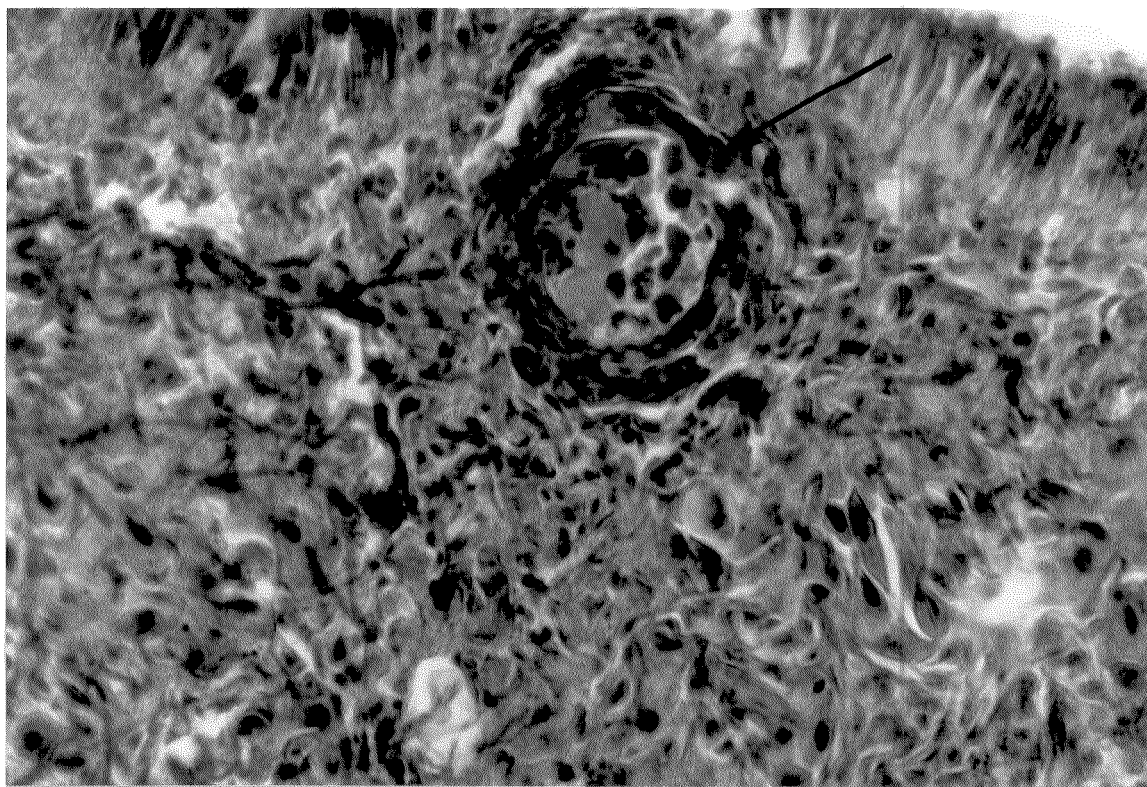


Fig. 13 - Esporocisto primário 10 horas após infecção mostrando reação amebocitária, Geração F₁, 400 X.

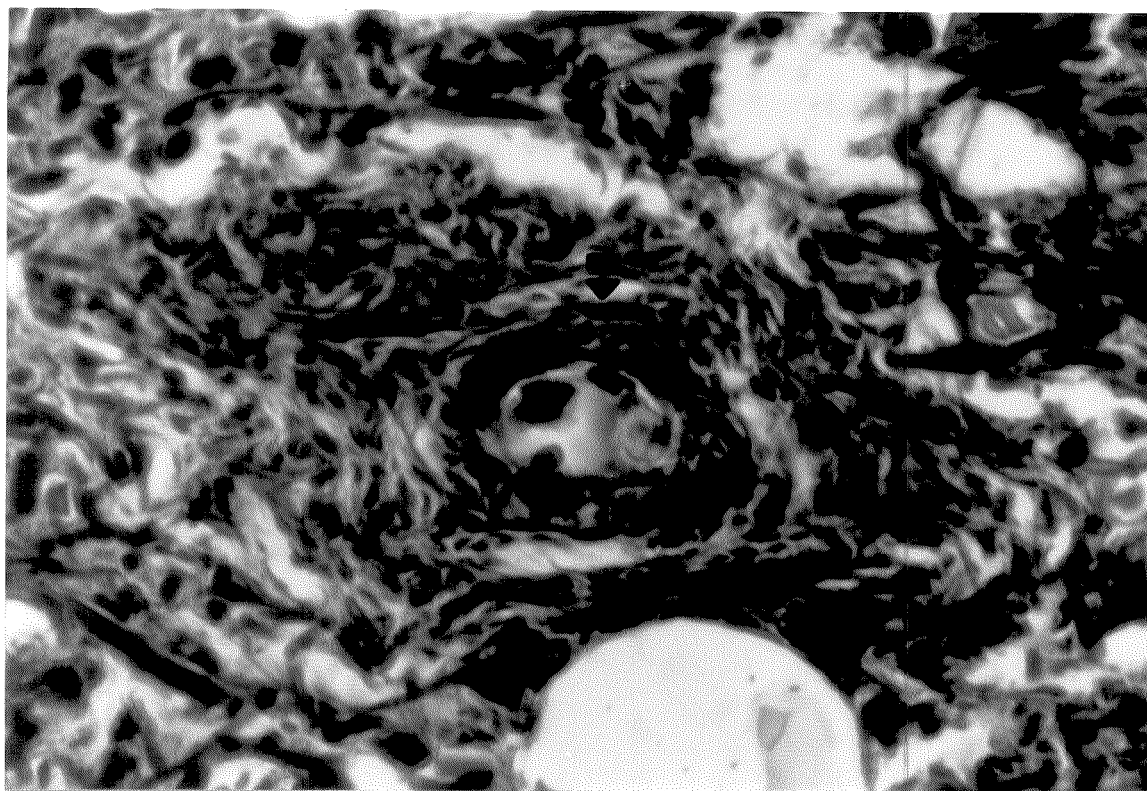


Fig. 14 - Esporocisto primário 24 horas após infecção corado pelo Tricômico de Gomori mostrando cápsula tipo II. Geração F1, 400 X.

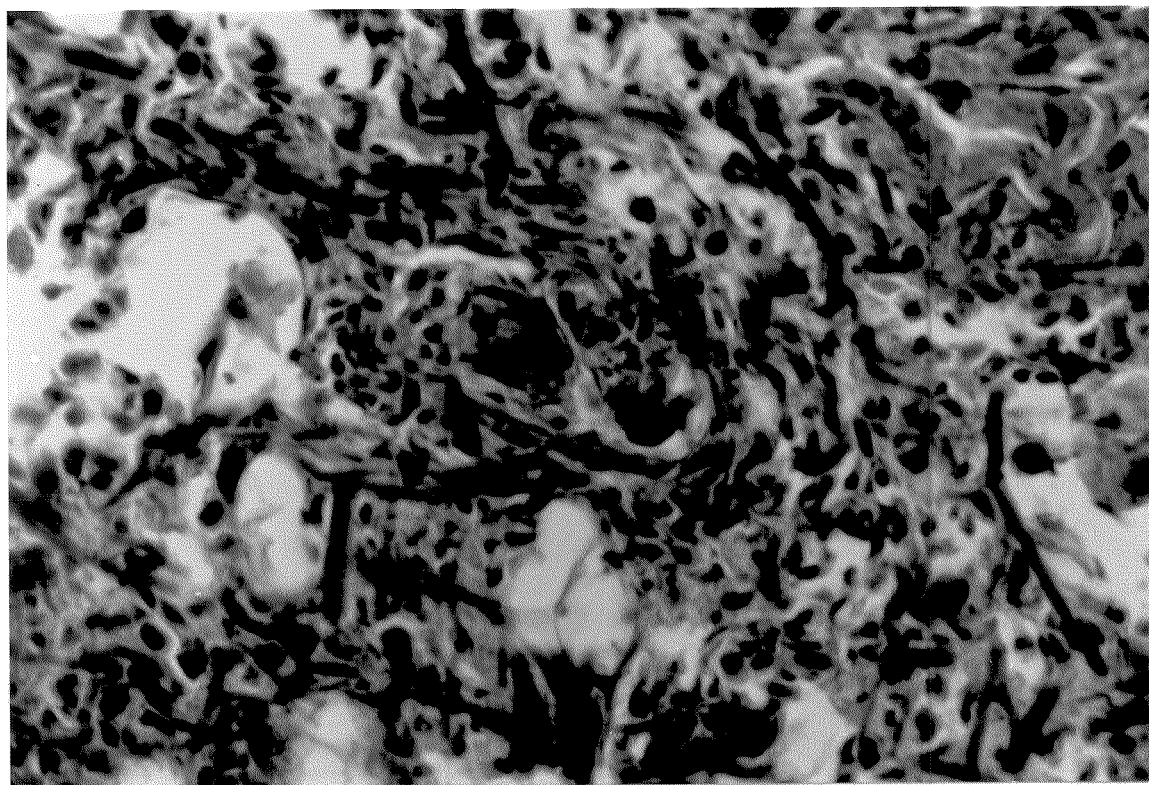


Fig. 15- Presença de 2 esporocistos , 24 horas após infecção. Geração F 1, 400 X.

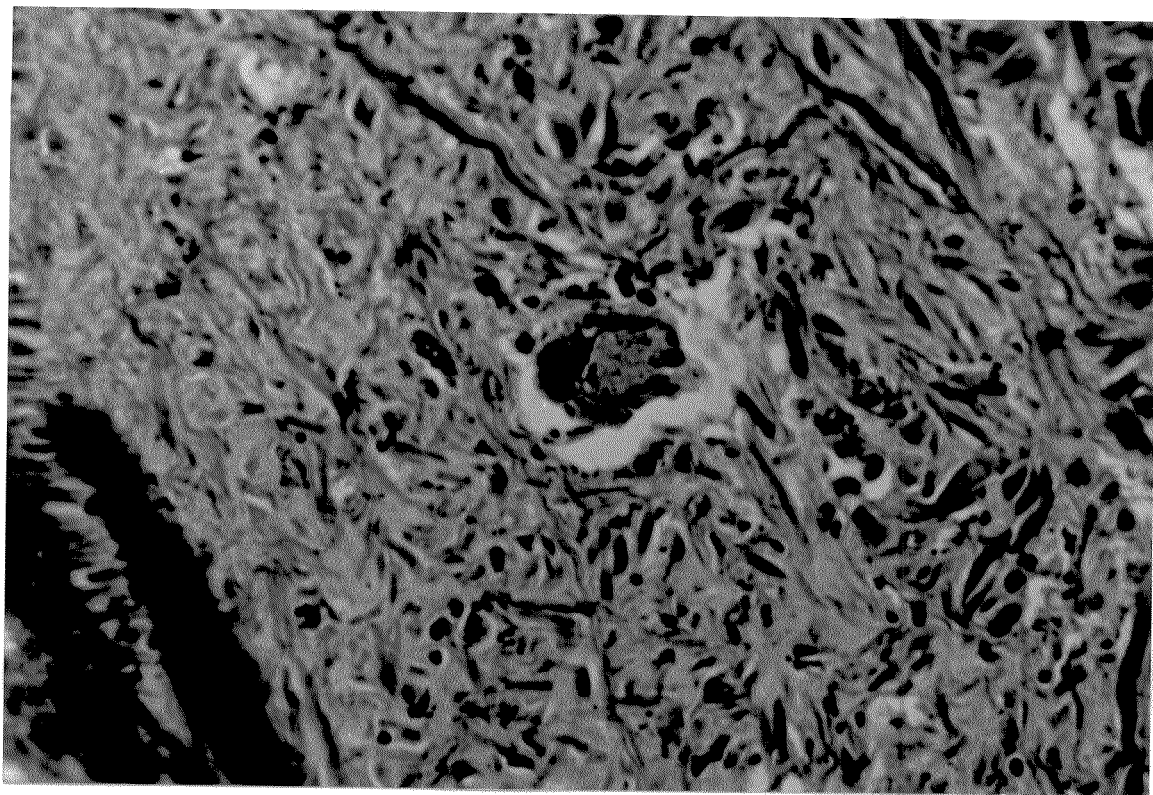


Fig. 16 - Esporocisto primário 72 horas após infecção corado pelo Tricômico de Gomori. geração F 2, 1000 X.

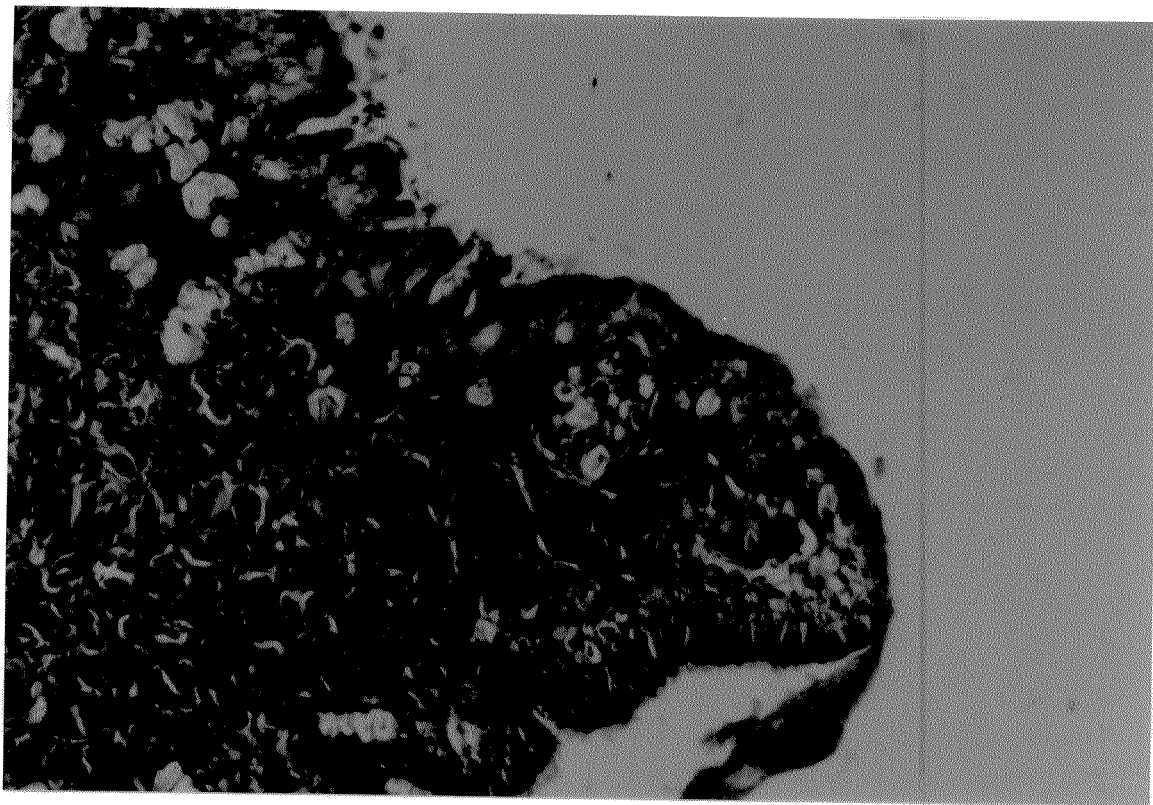


Fig. 17 - Fotomicrografia visualizando a região céfalo- podal com esporocistos primários degenerados, 400 X.

5- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.

Modificações no grau de susceptibilidade de populações de moluscos vetores do *Schistosoma mansoni* têm sido obtidas através da seleção dos moluscos por autofecundação de progenies suscetíveis ou por cruzamento de populações suscetíveis e resistentes (NEWTON, 1953; RICHARDS & MERRIT, 1972 ; SANTANA *et al* 1978; ZANOTTI- MAGALHÃES *et al* 1991; MASCARA, 1995).

Utilizando o método de seleção de moluscos preconizado por SANTANA *et al* (1978), nos propuzemos a estudar a população de *Biomphalaria tenagophila* originada de progenies selecionadas para o caráter resistência ao *Schistosoma mansoni* da linhagem SJ. Tal investigação visou complementar as informações sobre os mecanismos envolvidos na susceptibilidade/resistência do hospedeiro invertebrado frente ao trematódeo.

Nossos resultados sobre a suscetibilidade a infecção dos moluscos selecionados para o caráter resistência não mostraram taxas significativamente diferentes nas várias progenies obtidas. Teria a *B. tenagophila* de São José dos Campos um limite de resistência à infecção pela respectiva linhagem simpátrica do *S. mansoni*?

Vários autores, evidenciaram uma forte resistência da *B. tenagophila* à infecção esquistossomótica (LUTZ, 1918; MOURA, 1945; COUTINHO, 1949; MOURA, 1952; RUIZ, 1952; DEANE *et al*, 1953; ANTUNES, 1953; CORREA *et al*, 1956; ANDRADE & MARTINS, 1956; PARAENSE & DESLANDES, 1956; MARTINS, 1957; CODA *et al*, 1959; PIZA *et al*, 1959; PIZA *et al*, 1960; CORREA *et al*, 1962). Apesar dessa característica, *B. tenagophila* constitui o principal vetor do *S. mansoni* em vários Estados, sobretudo no Estado de São Paulo. Trabalhos de COUTINHO (1956), RUIZ (1957) e COELHO (1957 e 1962) confirmaram em laboratório a resistência dessa espécie

à infecção esquistossomótica. PARAENSE & CORRÊA (1963) ao investigarem a susceptibilidade de *B. tenagophila* procedente do Vale do Rio Paraíba do Sul, exposta a linhagem simpátrica do trematódeo verificaram taxas de infecção que variaram de 65,8% a 100%, dependendo do número de miracídios utilizados para infecção dos moluscos. Para os autores, a taxa de infecção dos moluscos seria dependente de uma adaptação fisiológica entre o parasita e o hospedeiro.

SANTANA *et al* (1978) verificaram uma estreita relação entre a suscetibilidade de populações de moluscos selecionados e a mortalidade dos mesmos, confirmando observações de SCHREIDER & SCHUBERT, (1949); PARAENSE & SANTOS (1949) e PAN (1965) de que moluscos parasitados por trematódeos apresentam menor espectância de vida. Nossos resultados referentes a sobrevivência dos caramujos selecionados para o caráter resistência confirmaram as observações citadas na literatura. Moluscos da geração parental, apresentaram menor sobrevivência, conforme demonstrado nos gráficos apresentados no Apêndice Estatístico. Na geração F₃ a mortalidade foi alta a partir da 9^a. semana de infecção. Nestes moluscos observamos a presença de fungos, na concha dos moluscos. Aventamos a hipótese deste fato poder ter uma relação com a maior mortalidade nesta geração de moluscos (F 3) neste período.

Observa-se pelas curvas de sobrevivência dos moluscos de todas as gerações testadas , apresentados no apêndice estatístico, que a morte ocorreu principalmente, a partir da 5^a. semana, no período em que ocorreu a eliminação de cercárias. A presença de larvas em órgãos vitais dos moluscos e o mecanismo de migração das cercárias podem ter provocado a morte dos moluscos, acentuadamente na geração parental. Com maior carga

parasitária na geração Parental estes danos seriam maiores e teriam provocado maior número de mortes.

O processo de seleção de *B. tenagophila* para o caráter resistência conferiu maior sobrevivência dos moluscos expostos ao *S. mansoni*, indicando ter sido a infecção esquistossomótica mais branda e menos prejudicial nos moluscos das gerações F₁, F₂ e F₃.

O mecanismo de defesa dos moluscos é atribuído a células denominadas hemócitos (amebócitos), que além da função na imunidade desempenha papel importante na excreção e nutrição e no transporte de cálcio, durante o reparo da concha (SMINIA, 1974, SETA,1996). Na resposta de defesa os hemócitos fazem a encapsulação do material não-próprio, evoluindo para fagocitose, produção de superóxidos, a produção de enzimas lisossomais e culminando com a eliminação do não-próprio.

RICHARDS (1975) reportou uma intensa atividade no órgão produtor de amebócitos (APO), localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, com a formação de um acúmulo de amebócitos. Estudos posteriores (LO VERDE, 1982; RICHARDS,1975) mostraram que somente os moluscos resistentes ao *S. mansoni* exibiam este acúmulo, sugerindo a importância desse fato, no mecanismo de defesa do molusco. LO VERDE & RICHARDS (1982) demonstraram que granulócitos e hialinócitos acumulavam-se no tecido cardíaco de *B. glabrata*, verificando-se atividade de fagocitose em ambas as células e pela primeira vez nos hialinócitos. Neste último tipo de célula foi possível a visualização de lisossomas, embora em menor número do que nos granulócitos.

Nossos resultados indicaram maior número de granulócitos nas gerações F₁ e F₂ quando comparado com moluscos da geração parental. Desde que os granulócitos

desempenham um papel importante no mecanismo de defesa, é de se esperar que moluscos mais resistentes à infecção esquistossomótica devam apresentar maior número destas células na hemolinfa e nos tecidos. Durante o processo de seleção de *B. tenagophila* para o caráter resistência houve o aumento do número de granulócitos e hialinócitos, conferindo com os dados da literatura. Este fato parece indicar a atividade do APO em decorrência da infecção esquistossomótica. Trabalhos anteriores em que foram estudados os números de granulócitos e hialinócitos verificaram-se aumentos precoces de granulócitos em *B. tenagophila* exposta ao *S. mansoni* (REIS *et al*, 1995; SETA *et al*, 1996). SANTANA (1990) verificou em populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila* selecionadas para o caráter susceptibilidade um aumento significativo de amebócitos circulantes 24 horas após a exposição ao *S. mansoni*. Nossos resultados referentes a cinética do amebócitos na circulação após a infecção esquistossomótica, mostraram que os hialinócitos, aumentaram significativamente com o período de infecção nas gerações F₁ e F₂. ALLEGRETI (1991) verificou um aumento imediato de hialinócitos entre 0-12 horas após a infecção de *B. glabrata* com *S. mansoni*. O conjunto dessas informações pode direcionar para a existência de uma célula primordial (hialinócito) que após a estimulação através da infecção parasitária se transformaria em granulócito, com intensa atividade fagocitária.

A fagocitose em moluscos constitui processo importante na eliminação do agente estranho. STAUBER (1950, 1961) verificou a fagocitose como resposta imunológica em ostras. Posteriormente, TRIPP (1966) descobriu uma hemaglutinina em *Crassostrea virginica*, que atuava como opsonina, acelerando o processo de fagocitose por hemócitos. O processo inicia-se pela migração dos amebócitos para os tecidos, circundando o corpo estranho com uma resposta aparentemente granulomatosa (PAN,1965). Estudos

histopatológicos em *B. tenagophila* e *B. glabrata* experimentalmente infectadas por trematódeos demonstraram a interação entre amebócitos e estágios larvais dos parasitas (COELHO, 1962; PAN, 1965; HARRIS & CHENG, 1975). Estudos *in vitro*, utilizando preparações de amebócitos em monocamadas e variações do pH, temperatura, tempo de incubação foram bem definidos por ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980). Muitos outros pesquisadores estudaram o comportamento e morfologia dos amebócitos isolados da hemolinfa de moluscos, confirmando a capacidade fagocitária destas células pelo englobamento ou encapsulação do corpo estranho (SMINIA,1974,1981; HARRIS & CHENG, 1975; COOPER,1976; REWRANTZ,1981)

Em nosso trabalho a atividade fagocitária foi utilizada empregando monocamadas de granulócitos testados frente a hemáceas formolizadas de carneiro. No processo de seleção de *B. tenagophila* para o caráter resistência à infecção por *S. mansoni*, não detectamos pela metodologia adotada alteração na capacidade fagocitária dos amebócitos nas diferentes gerações (parental, F₁ e F₂). O mecanismo de defesa celular pode envolver outras variáveis que participam do processo de fagocitose.

SANTANA (1990) verificou uma redução significativa no índice de fagocitose dos granulócitos de *B. glabrata* mais susceptíveis.

ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980 b) estudando a atividade de fagocitose *in vitro* dos granulócitos de *B. glabrata* pertencente a população susceptível ao *S. mansoni* da linhagem NIH, não observaram diferença significativa nos índices de fagocitose nos períodos de 24 horas e 2 semanas pós-infecção, quando comparados com os índices apresentados por moluscos normais.

Nossos resultados concordam com os dados da literatura (SANTANA, 1990) para populações de *B. tenagophila*. Para esta espécie não foi evidenciada uma alteração na atividade fagocitária dos granulócitos durante o desenvolvimento do parasita intramolusco.

Fatores humorais presentes na hemolinfa atuando como opsoninas (ANDERSON, 1976; FINSTAD, 1974; SMINIA & BAREDSSEN, 1980) promovem a atuação dos granulócitos durante o processo de fagocitose.

O grau de resistência dos moluscos pode ser indicado pela velocidade com que os amebócitos encapsulam as larvas de digenéticos. Modelos experimentais da reação de encapsulação foram estudados indicando que nos moluscos fortemente resistentes o encapsulamento ocorre em 24 horas (fast reacting) sendo mortos e fagocitados. Uma forte resposta quimiotática dos amebócitos do hospedeiro para o parasita é observada nestas circunstâncias (LIE, 1980). Nas reações mais lentas (slow reacting) o mecanismo de encapsulação do parasita é suprimido e os esporocistos morrem em 1 a 2 semanas. Podemos considerar que em nossa população de molusco, o processo de encapsulação e morte das larvas de *S. mansoni* realizou-se rapidamente (fast-reacting), uma vez que 24 horas após a infecção os esporocistos se encontravam degenerados, envolvidos por uma forte reação amebocitária (Figuras 14 e 15).

GUARALDO *et al* (1981) estudando as reações teciduais em *B. glabrata* e *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* verificaram intensa reação amebocitária em torno das larvas em *B. tenagophila*, com a maior parte dos esporocistos degenerados, enquanto em *B. glabrata* as reações foram mais brandas e predominavam esporocistos íntegros. Estas observações em *B. tenagophila* do Vale do Rio Paraíba exposta ao *S. mansoni* da linhagem

SJ confirmaram os resultados obtidos por COELHO (1962) para esta espécie de molusco. Em concordância, não verificamos a presença de esporocistos íntegros nos tecidos de *B. tenagophila* selecionados para o caráter resistência.

LIE *et al* (1980) descreveram reações tissulares induzidas por *S. mansoni* em *B. glabrata* exposta previamente a miracídios de *Echinostoma paraensei*, observando esporocistos de *S. mansoni* degenerados e sem reação amebocitária ou com número reduzido dessas células junto aos esporocistos. Observação semelhante foi feita por BALAN *et al* (1993) em superinfecções em *B. tenagophila*. Os autores acima sugerem que a morte dos esporocistos de *S. mansoni* se deveu a ação de fatores humorais.

Em síntese, podemos concluir que o processo de seleção de *B. tenagophila* para o caráter resistência ao *S. mansoni* da linhagem SJ se manifestou através do aumento do número de amebócitos na hemolinfa dos moluscos. Em consequência disso, a sobrevivência dos moluscos aumentou através das gerações, observando-se nos tecidos larvas do trematódeo degeneradas.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-SALAM, J. M.; MICHELSON, E. H.- *Biomphalaria glabrata* amebocytes: assay of factors influencing "in vitro" phagocytosis. **J. of Invertebr. Pathol.** 36: 52-59, 1980.
- ALLEGRETTI, S. M. - Comportamento de *Biomphalaria glabrata* variantes melânica e albina frente à infecção por *Shistosoma mansoni*. Campinas, 1991 [Tese de mestrado - Instituto de Biologia.Unicamp].
- ANDRADE, R. M. & MARTINS, R. S.- Contribuição para o conhecimento dos criadouros de planorbídeos no Distrito Federal II. Resultado geral das pesquisas efetuadas para a localização de focos de transmissão da esquistossomose mansoni. **Rev. Bras. Malar. Doenc. Trop.** 8: 379-385, 1956.
- ANDERSON, R. S. & GOOD, R. A. - Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. **J. Invert. Pathol.** 27: 57-64, 1976.
- ANTUNES, P. A. A. - A esquistossomíase em São Paulo: estudos epidemiológicos da esquistossomíase na baixada de Santos. **Anais X Congr. Brasil. Hig.** Belo Horizonte, 393-397, 1953.
- BALAN, D. de S. L. ; MAGALHÃES, L.A.; PIEDRABUENA, E.A. - Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea. **Rev. Saúde Pública.** 27: 421-429, 1993.
- BARBARA, J. D. & YOSSHINO, T. P. - *Schistosoma mansoni*: Excretory-Secretory Polypeptides Exhibit Selective Binding to Plasma Components of the Snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology.** 81: 292-301, 1995.

- BAYNE, C. J. ; LOKER, E. S. & YUI, M. A. - Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda) . **Parasitology**. 92: 653-64, 1986.
- BAYNE, C. J. in : WILBUR, K. M.; SALEUDDIN, A. M. - Plasma components whict mediate cellular defences in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and comparative immunology**. 9: 523-530, 1985.
- BERGQUIST, N. R.- Controlling schistosomíasis by vaccination : a realistic opinion. **Parasitology Today**. 11: 191-4, 1995.
- BILHARZ, T. - Fernere Beobachtungen uber das die Pfortader des Menschen bewhnende Distomum Haematobium und sein Verhaltniss zu gewissen phathologischen Bildungen. **Zeitschr. F. wiss Zool**, 4: 72-76, 1852.
- BRAZIO , C.B.; MAGALHÃES, A. L.; MILLER, J.; CARVALHO, J.F. - Atração de miracídios de *Shistosoma mansoni* por hospedeiros invertebrados: Comportamento de miracídios frente a girinos de *Hyla Fuscovaria* . **Rev. Saúde Pública , S. Paulo**, 19: 18-27, 1985.
- CAPRON, A. RIVEU, G.; MARIE J; BOULANGER,D.; CAPROM, M.; PIERCE, R. Development of a vaccine Strategy against Human and Bovine Schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90 : 235-240, 1995.
- CARVALHO, O. S. ; MASSARA,C.L.; NETO, S. O. V.; ALVARENGA, A. G.; VIDIGAL, T. A.'; GUERA,H. L.; SANTO, A. M.; CHAVES, A. KATZ, N. - Schistosomiasis Mansoni in the Region of the Triângulo Mineiro, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. R. J.** 89: 509-512, 1994.

- CARY, N.C.,USA- SAS / STAT ® - User's guide Sas Institute Inc. Version 6.08
4 th edition 1: 943, 1989.
- CHENG, T. C. - Marine molluscs as hosts for symbioses: with a review of known
parasites of commercially important species. **Advan Mar. Biol.** 5: 1-424, 1967.
- CHENG, T. C. SCHOENBERG, D. A. - Phagocytic funnel-like pseudopodia in
lectin- treated Gastropode homocytes. **J. Invert. Pathol.** 36, 141-43-, 1980.
- CHENG , T.C.; Bivalves. In: RATCLIFFE N. A.; ROWLEY, A. F.Eds.,**Invertebra-
te blood cells**. London, Academic Press, 233-300, 1981.
- CHERNIN, E. Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by
exposure to snail conditioned water. **J. Parasitol.** 58: 209-12, 1972.
- CODA, D. FALCI, N. & MENDES, F. A. T. Contribuição para o estudo e a profila-
xia da esquistossomose mansônica no Estado de São. Paulo. **Rev. Inst. Adolfo
Lutz.** 19: 25-68, 1959.
- COELHO, M. V. - Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de schistosoma
mansoni em *Australorbis nigricans*. **Rev. Bras. Biol.** 17 : 325-337, 1957.
- COELHO , M. V. - Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por
Schistosoma mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 4: 289-295, 1962.
- COOPER, E. L.- Comparative Immunology , Prentice-Hall, New Jersey, 1976.
- CORREA, R. R. CODA, D. OLIVEIRA, U. A. - Um foco autóctone de esquistosso-
mose no Vale do Paraíba. **Folia Clin. Biol.** 26: 85-90, 1956.
- CORREA, R. R. ; PIZA, J. T.; RAMOS, A. S. & CAMARGO, L. V. - Planorbídeos
do estado de São Paulo: sua relação com a esquistossomose . **Archos Hig. Saúde
Pública**, 27: 139-159, 1962.

- COUTINHO, J. O. - Contribuição para o estudo de hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* em Santos , São Paulo. **Rev. Clin. S. Paulo**, 25: 31-38, 1949.
- COUTINHO, J. O. - Nota sobre a infestação experimental do *Australorbis nigricans* (Spix) do Município de São Paulo, pelo *Schistosoma mansoni*. **Archos Fac. Hig. Saúde Pública. Univ. S. Paulo**, 10: 61-64, 1956.
- DEANE, L. M.; MARTINS, R. S. LOBO, M. B. - Um foco ativo de esquistossomose mansônica em Japarepaguá, Distrito Federal. **Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop.**, 5 : 249-252, 1953.
- DIAS, L. C. S. & UETA, M. T.; GUARALDO, A. M. A. - Susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria Straminea* e *Biomphalaria tenagophila* a diferentes cepas de *S. mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 29: 205-212 , 1987.
- D' ORBIGNY, A.; 1835- Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum , in suo per American Meredionalem itinerare collectorum. **Mag. Zool.** 5: 61-62 : 26-28 (Planorbis).
- DUNKER, W., - Diagnoses specierum novarum generis *Planorbis colletionis* Cumingianae. **Proc. Zool Soc. Lond.** 16: 40-43 London, 1848.
- FILES, V. e CREAM, E. B. - A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *S. mansoni*. **J Parasitol.** 35, 555-560, 1949.
- FINSTAD, C. GOOD, R. A. and LITMAN, G. W. - The erythrocyte agglutinin from *Linum polyphemus* hemolymph: molecular struture and biological function. **Ann. N. Y. Acad. Science.** 234: 170, 1974.

- FREITAS, C. A. - Situação atual da esquistossomose no Brasil. **Rev. Brasil.Malariol. D. Trop.** 24: 3-63, 1972.
- FREDERICO, G. C. - The tegument of *Shistosoma mansoni*: functional and Immunological features. **Parasite Immunology.** 18:15-20, 1996.
- GLASSER, C. M.- Schistosomiasis Control in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 90 : 307-309, 1995.
- GUARALDO, A. M.; MAGALHÃES , L. A.; RANGEL, H. A. & PAREJA, G.- Evolução dos esporocistos de *S. mansoni* (Sambon, 1907) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) e *Biomphalaria tenagophila* (D"Orbigny, 1935). **Rev. Saúde Pública.** 15: 436-48, 1981.
- HARRIS, K. R; CHENG, T. C.. - The fine struture of encapsulation in *Biomphalaria glabrata* **Am. N. Y. Acad. Science.**266-446, 1975.
- JEONG, K. H.- The ultraestruature of the amebocyte producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 217-28, 1983.
- JOHNSTON , L. A. and YOSHINO, T. P.- Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology.** 112: 469-479, 1996.
- KLOETZEL, K.- A sugestion for the prevention of severe clinical forms of schistosomiasis mansoni. **Bull WHO** ,37: 686-687, 1967.
- KNAAP, W.P. W.; BAREDESEN, L., H., SMINIA, T. - Immunocytochemical demonstratin of a humoral defence factor in blood cells (amebocytes) of the pond snail, *Lymnae stagnalis*. **Cell Tissue Res.** 219: 291-296, 1981.
- KNAAP, W. P. W. ;BAREDESEN, L. H.;SMINIA, T. - Some properties of an agglu-

- tinin in the haemolymph of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (in preparation). **Dev. Comp.Immunol.** 5: 21-32, 1981a.
- KNAAP, W. P. W., and LOKER, E. S. - Immune Mechanisms in Trematode- Snail Interactions. **Parasitology Today.** 6:175-182, 1990.
- 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.
- LIE, K. L. ;JEONG, K. H., & HEYNEMAN, D. - Seletive interference with granulocyte function induced by *Echistoma paraensei* (trematoda) larvae in *Biomphalaria glabrata* (mollusca) . **J. Parasitol.** 67: 790-796, 1981.
- LIE, K. J. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *B. glabrata*. A discussion of the interference theory. **Trop. Geogr. Med.** 34:111-122, 1982.
- LOKER, E. S. BAYNE, C. J. BUCKLEY,P.M.- Ultrastruture of encapsulation of *S. mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of 10 R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.** 68: 84-94, 1982.
- LOKER, E. S. ;DANIEL, F.; HERTEL, A. - Excretory-Secretory products of *Echisnostoma Paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. **J. Parasitol.** 78: 104-115, 1992.
- LO- VERDE, F. T.; JERSON, J. & RICHARDS, C.S. - Amebocytic accumulattion in *B. glabrata*: Fine struture. **Dev. and Comp. Immun.** 6 : 441-449, 1982.
- LUTZ, A. - Caramujos de água doce do gênero Planorbis, observados no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 10: 65-82, 1918.

- MAGALHÃES, L. A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. ; CARVALHO, J. F.;
FARAONE, M.- Atração miraxonal exercida por *Biomphalaria straminea*,
Lymnaea columella e *Fhysa* sp, sobre miracídios de *Schistosoma mansoni* da
linhagem BH. **Rev. Saúde Pública.** 25: 23-7, 1991.
- MAGALHÃES, L. A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; CARVALHO, J. F.-
Observations on the miraxional attraction exercised by sexually immature or adult
Biomphalaria glabrata infected or not by *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúd.**
Pública. 31: 121-4, 1997.
- MARTINS, R. S.- Focos ativos de esquistossome em Niteroi. Estado do Rio de
Janeiro. **Revta. Bras. Malar. Doenc. Trop.** 9: 361-364, 1957.
- MASCARA. D. Relação hospedeiro-Parasita: *Biomphalaria tenagophila*-*Schistosoma mansoni*. Identificação de marcador molecular em linhagens selecionadas. São
Paulo, 1995.[**Tese de Doutorado, Inst. de Biociências , Universidade de
São Paulo**].
- MC. CULLOUGH, F. S. - The role of Mollusciciding in Shistosomiasis Control. **Bull
WHO**, 34, 1992.
- METCHNIKOFF, E. **Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, 46: 177., 1884.
- MOURA, S.A. Schistoomose mansoni autóctone em Santos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**
5: 279-311, 1945.
- MOURA, S. A. S - Contribuição do Laboratório Regional de Santos na epidemiologia
da esquistossomose mansoni em Santos. **Revta. Inst. Adolfo Lutz**, 12: 97-109,
1952.

- NEWTON, W. L. - The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in : *Australorbis glabratus*. **Exp. Parasit.** 2: 242-257, 1952.
- NEWTON, W. L. - The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.** 39 : 362-366, 1953
- PAN, C. - Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of tropical Medicine and Hygiene.** 14, (6), 1965.
- PARAENSE, W. L. & SANTOS, J.M. - O sexo do *Schistosoma mansoni* nas infestações produzidas por cercárias e um único molusco. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 47: 35-49, 1949.
- PARAENSE, W. L. & DESLANDES, N. - *Australorbis nigricans* as the transmitter of schistosomiasis in Santos, State of S. Paulo. **Revta. Bras. Malar. Doenç. Trop.** 8: 235-245, 1956
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L.R. - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. Apresentado na XV Reunião da S B P C, Campinas, 1963.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S.P.** 5: 15-22, 1963.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L.R. - Variation in susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 5: 23-29, 1963.

- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L.R. - Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* population to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** 64: 822-826, 1978.
- PECE (CONSELHO DE DESENVOLVIMENTO SOCIAL).- Programa especial de controle da esquistossomose no Brasil. 41, 1976.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO D. G. - A simplified method for the concentration of cercarie. **J. Parasit.** 41: 329-30, 1955.
- PIZA, J. T. et al. - A esquistossomose no vale Paraíba. **Rev Inst. Adolfo Lutz**, 19: 97-143, 1959.
- PIZA, J. T. et al. - Vale do Paraíba, foco endêmico de esquistossomose. **Arq. Hig. S. Paulo**, 21: 35-40, 1960
- REIS, M. S. M. P.; CORDEIRO, N. S.; ARTIGAS, P. T.; MAGALHÃES, L. A.; 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, S. Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**. S. Paulo, 21: 484-8, 1988.
- REWRANTZ, L. ; SCHANCKE, W.; HARM, W.; ERL, E.; GERCKEN, J. - Discriminative ability and function of the immunological recognition system of the snail *Helix pomatia*. **J. Comp. Physiol.**, 141, 477, 1981.
- ROLLISON, D. and SOUTHGATE, V. R. (1985) in **Ecology and Genetics of Host-Parasite Interactions** (Rollison and Andersons eds), 91-109, Academic Press.
- RICHARDS, C. S. & MERRIT, T. W. - Genetic factors in the susceptibility of juve-

- nile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 21: 425-34, 1972
- RICHARDS, C. S.- Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 22: 748-56, 1973.
 - RICHARDS, C. S. - Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, 70: 231-41, 1975.
 - RUIZ, J. M. - Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros, 2. Fauna de Santos, Estado de São Paulo. **Mem. Inst. Butantã**, 24: 17-36, 1952.
 - RUIZ, J. M. - Esquistossomose experimental. 5. Dados sobre a infestação experimental de *Biomphalaria tenagophila* (D'ORBIGNY) e *Australorbis glabratus* (Say). **Rev. Bras. Biol.**, 17: 179-85, 1957.
 - SAMBON, L. W. - Descriptions of some new species of animal parasites. **Proc. Zool. Soc. London**. 282-283, 1907a.
 - SANTANA, J. V. ; MAGALHÃES, L. A. ; RANGEL, H. A. - Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior susceptibilidade ao *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, S. Paulo, 11 : 67-77, 1978.
 - SANTANA, W. - Mecanismos de defesa em moluscos *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *Schistosoma mansoni*. Campinas, 1990 [Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, , Unicamp].
 - SAY, T. - Account of two new genera, and several new species of fresh water and land shells. **J. Acad. Nat. Sci. Phil.**, 1 : 276-284. Philadelphia., 1818.

- SCHALL, V. T. - Health Education, Public information, and communication in Schistosomiasis control in Brasil : a brief retrospective. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 90 : 229-234, 1995.
- SCREIBER, F. C. & SCHUBERT, M. - Experimental infection of the snail *Australorbis glabratus* with the trematode *Schistosoma mansoni* and the production of cercarie. **J. Parasitol.**, 35: 91-100, 1949.
- SETA, L.; MAGALHÃES, L. A. CARVALHO, J. F. - Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta nanquim e fratura de concha. **Rev. Saúde Pública**, 30: 332-40, 1996.
- SMINIA, T.- Struture and function of blood and connective tissue cells of the flesh water pulmonate *Lymnea Stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histoquemistry. **Zellforsch. Mikroscopy. Anat.**:130: 497-526, 1972.
- SMINIA, T. - Encapsulation of foreigen materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell. Tiss. Res.** 153 : 307-326, 1974.
- SMINIA, T. KNAAP, V. & BAREDESEN, L. A. - Comparative morfological and enzyme histoquemical study on *B. glabrata* and *Bulinus truncatus*. **J. Morph.**, 165: 31-9, 1980.
- SMINIA, T. - Gastropods , in **Invertebrate blood cells**, 1, Ratcliffe, N. A. and Rowley , A. F. ., Eds. Academic. Press, New York, 191, 1981.
- SMINIA, T.; KNAAP, W. P.- Cells and molecules in **molluscan Immunol**, 11: 17-28, 1987.
- STANDEN, O. D. - The effect of temperature, light and salinity upon the hatching

- of the ova of *S.mansoni* . **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 45: 225-241, 1951.
- STAUBER, L. A.- The fate of india k injected intracardially into the oyster, *Ostrea Virginica* Gmelin. **Biol Bull.**, 98, : 227-241, 1950.
 - STAUBER, L. A. - Immunity in Invertebrates, with special reference to the **Oyster**. **Proc. Nat. Shelfish. Ass.**, 50: 7-20, 1961.
 - STURROCK, Current Concepts of Snail Control- **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, R J, 90: 241-248, 1995.
 - SUCEN, - Situação da esquistossomose mansônica no estado de S. Paulo. II Encontro sobre a esquistossomose: Imprensa Oficial do Estado de S. Paulo, 1982.
 - SUCEN, -Superintendência de controle de endemias. Programa de controle de esquistossomose. Imprensa Oficial do Estado de S. Paulo, 1982
 - TAKATSUKI, S. I. - On the nature and functions of the amebocytes of *Ostrea edulis*. **Quart. J. Microsc. Science.** 76: 379, 1934.
 - TELES, H. M. S. - Sobre o encontro de *Biomphalaria glabata* (SAY, 1818) em dois municípios do Estado de S. Paulo (Brasil). **Rev. Saúde Pública** , 20: 242-3, 1986.
 - TELES, H. M. S. VAZ, I. F. - Distribuição de *Biomphalaria Glabata* (Say, 1818), (Pulmonata Planorbidae) no Estado de S. Paulo (Brasil). **Rev. Saúde Pública**. 21: 518-12, 1987.
 - TELES H. M. S. - Distribuição de *B. Straminea* (Dunker,1848), (Pulmonada - Planorbidae) no Estado de S. Paulo (Brasil). **Ciencia e Cultura** ,40:.173-6, 1988.
 - TRIPP-M. R.- Hemagglutinin in the blood of the oyster *Cassotrea virginica*. **J. Invert Pathol.** 8: 478-484, 1966.

VAZ, J.F- Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1935)

(Gastropoda pulmonata). **Ciência e Cultura**, 41: 14-27, 1989.

- WEINLAND, D. F.- 1958- Human Cestoides: An Essay on the Tapeworms of Man
Etc., to which is added an Appendix, Containing a Catalogue of all Species of
Helminthes hitherto found in Man. Cambridge.
- WHO, 1985. The control of shistosomiasis . Tecnical Report Series, 728. Geneva.
- WHO, 1990. Healt education in the control of schistosomiasis, Geneva, p. 62.
- WHO, 1993. The Control of schistosomiasis. Tecnal Report Series, 830, Geneva.
- YOSHINO, T. P.& ; LODES, M. J. - Secretry Proteins biosintesis in snail
hemocytes: In vitro modulation by larval Schistosoma excretory - secretory
products. **J. Parasitol ogy**, 74: 538-547, 1988.
- YOSHINO , T. P. & LODES M. J. - Caracterization of excretory -secretory proteins
syntetised in vitro by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. **J. Parasitology**,
75 : 853-862, 1989.
- YOSHINO, T. P.& LODES, M. J. - Polypeptides Syntetized in vitro by *B.*
glabrata hemocytes bind to *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. **J. of**
Invertr.Pathol. 61: 117-122, 1993.
- YOSHINO, T. P. & VASTA, G. R.- (1996) . Parasite invertebrate host immune
interations. **In Invertebrate Immune Responses**, 2 , Cooper, E. L.
- ZANOTTI-MAGALHÃES E. M. - Observações sobre a capacidade de infecção do
molusco vetor e a patogenecidade do *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907)
no hospedeiro vertebrado. Campinas, 1987 [**Tese de Doutorado - Intituto**
de Biologia, Universidade Estadual de Campinas].

- ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. -
Atração miraxonal exercida por *Biomphalaria tenagophila* selecionada
geneticamente para o caráter susceptibilidade. **Rev. Saúde Pública**, S. Paulo 25
134-8, 1991.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. ; MAGALHÃES, L. A. ; CARVALHO, J. F. Re-
lationship between the pathogenicity of *Schistosoma mansoni* in mice and
susceptibility of the vector mollusc. II. Number of eggs in the feces and size
of granulomas in the viscera. **Rev. Saúde Pública**, 27: 412-20, 1993.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. ; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Re-
lação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a
susceptibilidade do molusco vetor .III. Mortalidade, pesos corporal e das
vísceras. **Rev. Saúde Pública**, 29 : 265-70, 1995.

APÊNDICE ESTATÍSTICO

APÊNDICE ESTATÍSTICO

TABELA 29- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À TAXA DE INFECÇÃO DOS MOLUSCOS

STATISTICA	GL	VALOR	PROBABILIDADE
Qui-quadrado	3	1.452	0.693
“	3	1.481	0.687

TABELA 30- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE A MORTALIDADE DOS MOLUSCOS.

Teste	Qui-quadrado	GL	Qui- quadrado (P >)
LOG-RANK	45.0689	3	0.0001
WILCOXON	45.0775	3	0.0001
-2 LOG (LR)	36.3075	3	0.0001

TABELA 31- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE AO NÚMERO DE GRANULÓCITOS NOS MOLUSCOS DAS GERAÇÕES P, F1 E F2.

Fonte	GL	Soma dos quadrados Tipo III	Quadrados médios	Valor de F	P > F
PERÍODO	1	8752.44475152	8752.4447515252	3.80	0.0532
GERAÇÃO	2	49842.66524612	2492133262306	10.83	0.0001
PERÍODO* GERAÇÃO	2	18281.50187015	9140.75093507	3.97	0.0210

TABELA 32- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE AO NÚMERO DE HALINÓCITOS NOS MOLUSCOS DAS GERAÇÕES P, F1 E F2.

Fonte	DF	Soma dos quadrados Tipo III SS	Quadrados médios	Valor de F	P > F
PERÍODO	1	1303.82936691	1303.82936691	5.87	0.0167
GERAÇÃO	2	458453571863	2292.26785931	10.32	0.0001
PERÍODO* GERAÇÃO	2	18281.50187015	9140.75093507	3.97	0.0210

TABELA 33-- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE AO ÍNDICE DE FAGOCITOSE.

Fonte > F	GL	Soma dos quadrados Tipo III SS	Quadrados médios	Valor de F	P
PERÍODO	1	1.22638474	1.22638474	0.01	0.9091
GERAÇÃO	2	146.22395776	73.11197888	0.80	0.4657
PERÍODO* GERAÇÃO	2	192.42477953	96.21238976	1.06	0.3714

The SAS System

The LIFETEST Procedure

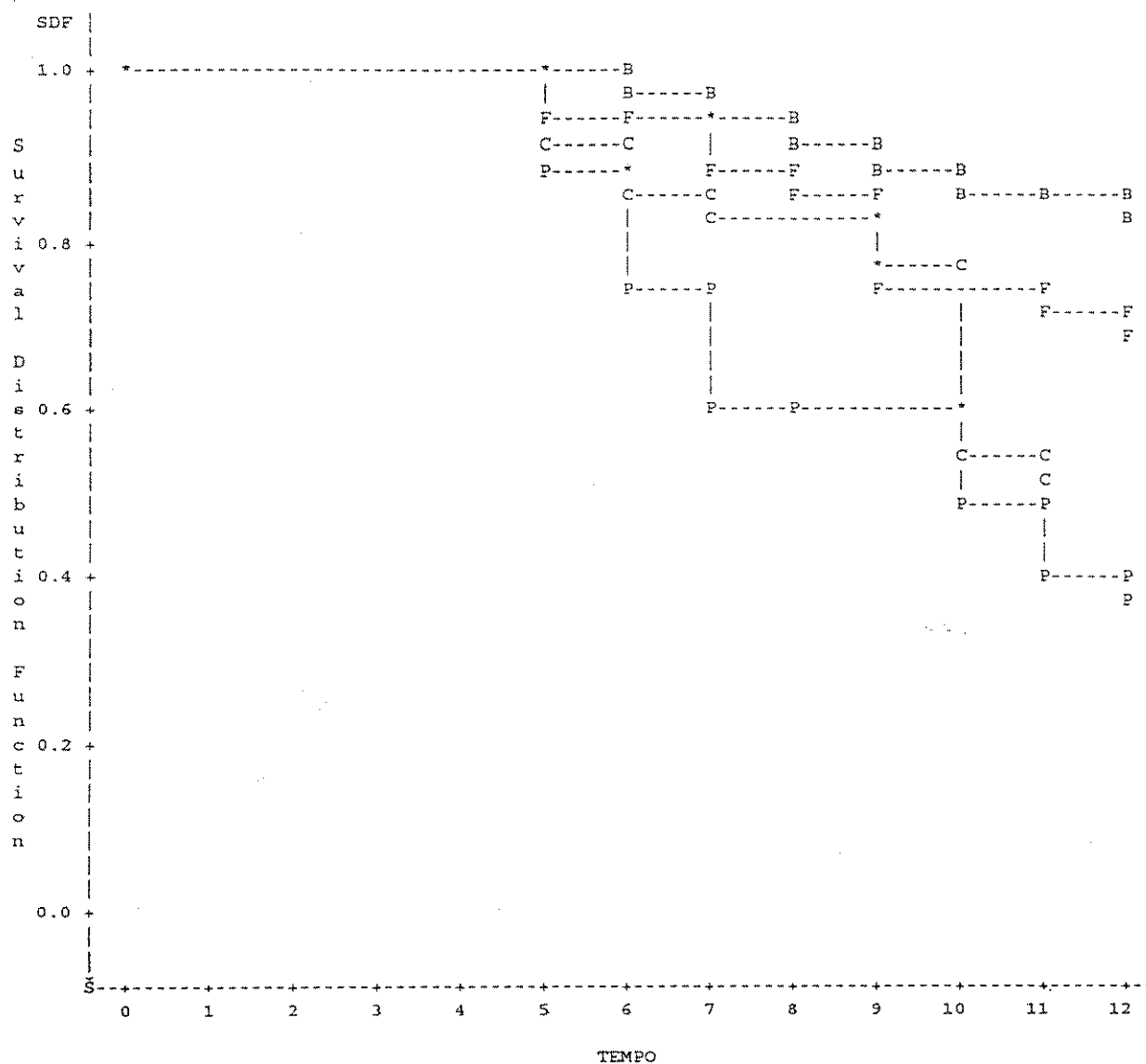
Summary of the Number of Censored and Uncensored Values

GERACAO	Total	Failed	Censored	%Censored
F1	70	22	48	68.5714
F2	90	16	74	82.2222
F3	30	15	15	50.0000
P	100	62	38	38.0000
Total	290	115	175	60.3448

The SAS System

The LIFETEST Procedure

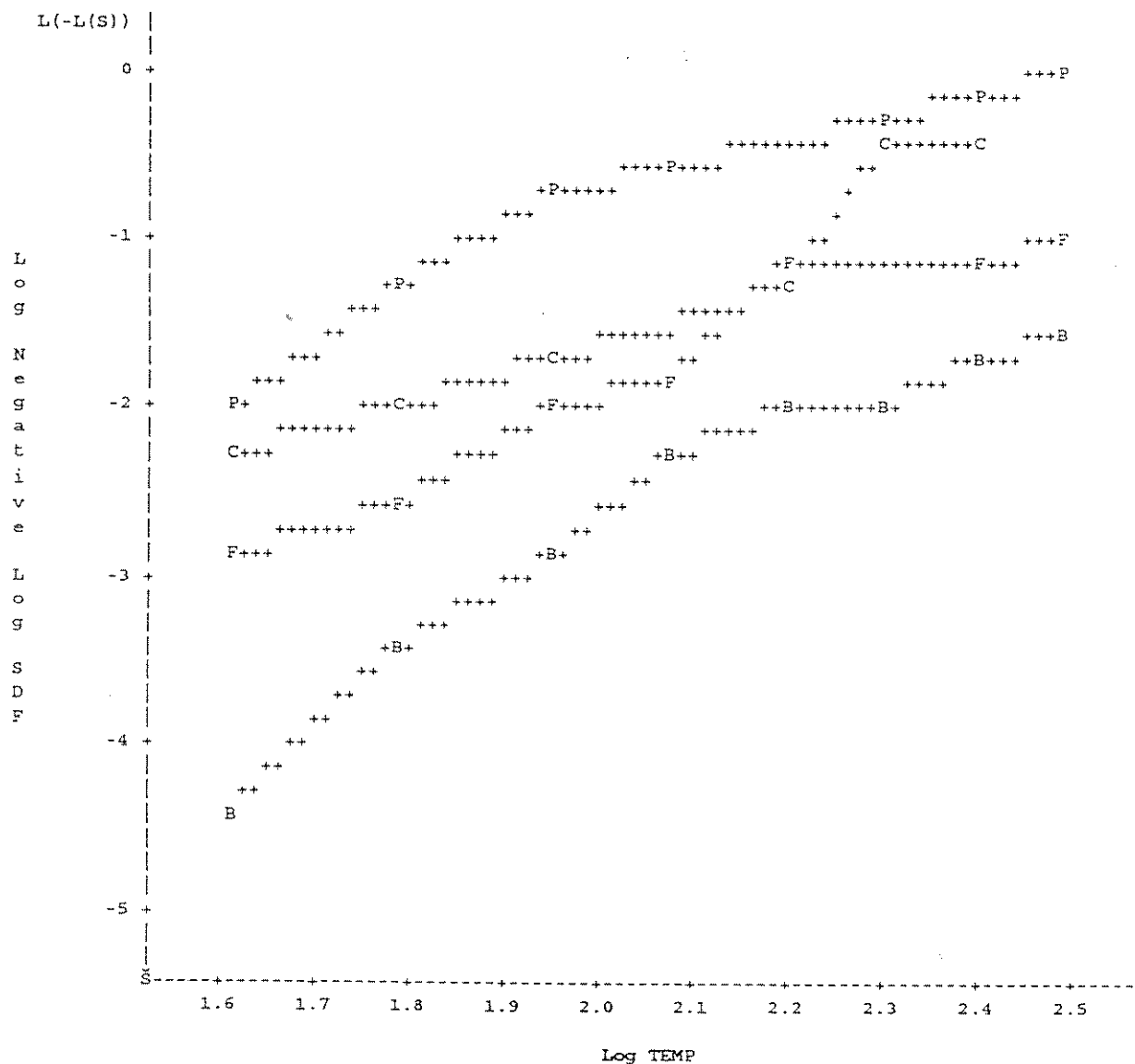
Survival Function Estimates



The SAS System

The LIFETEST Procedure

Log(-Log(Survival Function)) Estimates



The SAS System

The LIFETEST Procedure

FIG - 19

Legend for Strata Symbols

F:GERACAO=F1 B:GERACAO=F2 C:GERACAO=F3 P:GERACAO=P