



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

COMPORTAMENTO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) ALBINA  
INOCULADA COM HEMOLINFA TOTAL OU LIVRE DE AMEBÓCITOS, FRENTE  
À INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese de ( ) candidato a)  
*Soely Maria Pissini Machado*  
*Reis*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

24/7/96

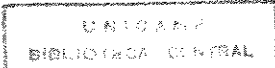
**SOELY MARIA PISSINI MACHADO REIS**

*1. A. M. 12*

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor  
em Ciências, na área de Parasitologia

1996



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	T/UNICAMP
	R277c
V.	Ex.
TOMBO BC/	28.217
PROC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/08/96
N.º CPD	

CM-00091424-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

R277c Reis, Soely Maria Pissini Machado  
Comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) albina inoculada com hemolinfa total ou livre de amebócitos, frente à infecção por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. / Soely Maria Pissini Machado Reis. -- Campinas, SP : [s.n], 1996.

Orientador: Luis Augusto Magalhães.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

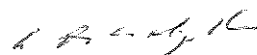
1. Parasitologia. 2. *Biomphalaria glabrata*.  
3. *Schistosoma mansoni*. 4. Doenças transmissíveis.  
I. Magalhães, Luis Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 24 de julho de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Prof. Dr. Luis Augusto Magalhães (orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães



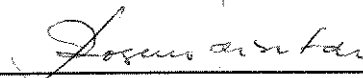
Assinatura

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Junior



Assinatura

Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro



Assinatura

Profa. Dra. Ana M. Aparecida Guaraldo



Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Nelson da Silva Cordeiro

Assinatura

Profa. Dra. Urara Kawazoe

Assinatura

“Se em certa altura  
Tivesse voltado para a esquerda em vez de para a direita;  
Se em certo momento  
Tivesse dito sim em vez de não, ou não em vez de sim;  
Se em certa conversa  
Tivesse tido as frases que só agora, no meio-sono. elaboro  
Se tudo isso tivesse sido assim,  
Seria outro hoje, e talvez o universo inteiro  
Seria insensivelmente levado a ser outro também.”

**FERNANDO PESSOA**

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

Ao Gabriel e Nathália,  
por serem, sempre, a expressão  
viva da energia, da simplicidade  
que me dão força  
para continuar ...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Augusto Magalhães, pela orientação, amizade, incentivo e importante participação na minha formação científica.

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

A FAPESP e FAEP pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos Professores Dr. Nelson da Silva Cordeiro, Odair Benedito Ribeiro e Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela contribuição como membros da pré-banca examinadora e pelas sugestões.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Zanotti-Magalhães pela contribuição em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José de Carvalho pelo auxílio, prestado na análise estatística.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

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

À todos os amigos da FEA/UNICAMP, que de alguma forma tornaram possível o término deste trabalho.

Ao meu irmão Luis pelo constante apoio, e enriquecedora contribuição no início de minha vida acadêmica

Ao Sr. Reis e Sra., com carinho, por TUDO.

Aos meus pais a minha maior gratidão, pelos ensinamentos de honestidade, confiança e coragem frente aos desafios.

# ÍNDICE

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Considerações sobre às células da hemolinfa	4
3.2 Fagocitose e Degranulação	9
3.3 Fatores humorais	12
3.4 Fatores que influenciam a suscetibilidade ou resistência dos moluscos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Planejamento experimental	18
4.2 Manutenção em laboratório de <i>B. glabrata</i> e do <i>S. mansoni</i>	18
4.3 Grupos experimentais	19
4.4 Obtenção de miracídios de <i>S. mansoni</i> da linhagem BH	23
4.5 Infecção experimental de <i>B. glabrata</i> com miracídios da linhagem BH do <i>S. mansoni</i>	23
4.6 Determinação da suscetibilidade e mortalidade de <i>B. glabrata</i>	24
4.7 Obtenção da hemolinfa	24

4.7.1 Hemolinfa total de <i>B. glabrata</i>	24
4.7.2 Hemolinfa sem células de <i>B. glabrata</i>	24
4.8 Inoculação da hemolinfa total ou sem células em <i>B. glabrata</i>	25
4.9 Contagem de células circulantes na hemolinfa de <i>B. glabrata</i>	25
4.10 Obtenção dos cortes histológicos	26
4.11 Formolização de eritrócitos de carneiro para utilização na fagocitose	26
4.12 Preparo de monocamadas de amebócitos para verificação da taxa de fagocitose	27
4.13 Avaliação do índice de fagocitose	28
4.14 Tratamento estatístico	28
5. RESULTADOS	30
5.1 Suscetibilidade e mortalidade de <i>B. glabrata</i>	30
5.1.1 Infecção	30
5.1.2 Mortalidade	35
5.2 Viabilidade das larvas de <i>S. mansoni</i> e as reações teciduais em <i>B. glabrata</i>	38
5.3 Avaliação da atividade fagocítica em <i>B. glabrata</i>	53
5.4 Avaliação do número de células circulantes na hemolinfa de <i>B. glabrata</i>	59
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95



ANEXO I	I
ANEXO II	II
ANEXO III	III
ANEXO IV	VI

## Lista de Tabelas

Tabela 1.....	33
Taxa de infecção e mortalidade de <i>B. glabrata</i> , submetidas aos diferentes tratamentos.	
Tabela 2.....	36
Infectividade em <i>B. glabrata</i> submetida aos diferentes tratamentos ao longo de 12 semanas.	
Tabela 3.....	36
Número de <i>B. glabrata</i> mortas submetida aos diferentes tratamentos ao longo de 12 semanas.	
Tabela 4.....	41
Número médio de larvas de <i>S. mansoni</i> observado em <i>B. glabrata</i> submetidas aos diferentes tratamentos.	
Tabela 5.....	54
Índice de fagocitose de amebócitos estrelados de <i>B. glabrata</i> frente a eritrócitos de carneiro nos respectivos grupos experimentais.	
Tabela 6.....	64
Número médio de amebócitos em 0.1 mm <sup>3</sup> de hemolinfa circulante em <i>B. glabrata</i> infectadas com <i>S. mansoni</i> .	
Tabela 6.1.....	64
Número médio de amebócitos em 0.1 mm <sup>3</sup> de hemolinfa circulante em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.	
Tabela 6.2.....	65
Número médio de amebócitos em 0.1 mm <sup>3</sup> de hemolinfa circulante em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.	
Tabela 6.3.....	65
Número médio de amebócitos em 0.1 mm <sup>3</sup> de hemolinfa circulante em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	
Tabela 6.4.....	66
Número médio de amebócitos em 0.1 mm <sup>3</sup> de hemolinfa circulante em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	

## Lista de Figuras

- Figura 1.....34  
Taxa de infecção de *B. glabrata*\_albina inocula com hemolinfa total, hemolinfa sem célula de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.
- Figura 2.....37  
Taxa de mortalidade de *B. glabrata* albina inoculada com hemolinfa total, hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.
- Figura 3.....42  
Número médio de larvas integras e degeneradas observadas em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total e hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.**30 minutos após tratamento.**
- Figura 4.....43  
Número médio de larvas integras e degeneradas observadas em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total e hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.**12 horas após tratamento.**
- Figura 5.....44  
Número médio de larvas integras e degeneradas observadas em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total e hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.**24 horas após tratamento.**
- Figura 6.....45  
Número médio de larvas integras e degeneradas observadas em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total e hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.**72 horas após tratamento.**
- Figura 7.....46  
Corte histológico da região céfalo podal de *B glabrata* exposta ao *S. mansoni*, 24 horas após exposição ao parasita.

Figura 8.....	47
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e posteriormente exposta ao <i>S. mansoni</i> , 24 horas após exposição.	
Figura 9.....	48
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> exposta ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculada com hemolinfa total de moluscos livres de infecção, 24 horas após inóculo.	
Figura 10.....	49
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostos ao <i>S. mansoni</i> , 24 horas após exposição.	
Figura 11.....	50
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> exposta ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, 24 horas após inóculo.	
Figura 12.....	51
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostos ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 13.....	52
Corte histológico da região céfalo podal de <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa sem células de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 14.....	55
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> albina inoculadas com hemolinfa total, hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> submetidas a infecção com <i>S. mansoni</i> anteriormente ou posteriormente ao inóculo. <b>30 minutos após tratamento.</b>	
Figura 15.....	56
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> albina inoculadas com hemolinfa total, hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> submetidas a infecção com <i>S. mansoni</i> anteriormente ou posteriormente ao inóculo. <b>12 horas após tratamento.</b>	
Figura 16.....	57
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> albina inoculadas com hemolinfa total, hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> submetidas a infecção com <i>S. mansoni</i> anteriormente ou posteriormente ao inóculo. <b>24 horas após tratamento.</b>	

Figura 17.....	58
Índice de fagocitose de amebócitos de <i>B. glabrata</i> albina inoculadas com hemolinfa total, hemolinfa sem células de moluscos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> submetidas a infecção com <i>S. mansoni</i> anteriormente ou posteriormente ao inóculo. <b>72 horas após tratamento.</b>	
Figura 18.....	67
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 19.....	68
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 20.....	69
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.	
Figura 21.....	70
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.	
Figura 22.....	71
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 23.....	72
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.	
Figura 24.....	73
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.	
Figura 25.....	74
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculada com hemolinfa total de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostos à <i>S. mansoni</i> .	
Figura 26.....	75
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	

Figura 27.....	76
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	
Figura 28.....	77
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 29.....	78
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	
Figura 30.....	79
Variação do número médio de amebócitos em <i>B. glabrata</i> inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> .	

## RESUMO

Este estudo teve a finalidade de avaliar a ação da inoculação de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, no desenvolvimento de *S. mansoni* da linhagem BH em *Biomphalaria glabrata* albina.

Foram avaliados a susceptibilidade da *B. glabrata* albina, as reações teciduais nos moluscos infectados, a atividade fagocitária das células da hemolinfa assim como a cinética dos amebócitos na hemolinfa circulante.

Os resultados mostraram a existência de uma correlação direta entre a inoculação de hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção com alta resistência ao *S. mansoni*, intensa reação celular ao redor das larvas de *S. mansoni*. e moderada atividade fagocitária.

A inoculação de hemolinfa total de moluscos livres de infecção provocou um desenvolvimento tardio do parasito e reações amebocitárias discretas em torno dos esporocistos de *S. mansoni*.

A inoculação de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados, produziu uma pequena resistência à infecção observando-se pouca ou nenhuma reação amebocitária ao redor dos esporocistos de *S. mansoni* e uma atividade fagocitária moderada.

A inoculação de hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção foi mais efetiva ao combate às larvas de *S. mansoni*.

## SUMMARY

The purpose of this studies is to evaluate the inoculation action of either total hemolymph or without snail cells infected or not by *S. mansoni*, in the BH strain of *S. mansoni* in albina *B. glabrata*.

The present investigation was under-taken to determine the susceptibility of albina *B. glabrata*, and the tissue reactions in the infected snail, the phagocytic activity of the hemolymph cells as well as the kinetics behavior of the amebocytes in the circulating hemolymph.

The results have shown a direct relationship between the inoculation of hemolymph without snail cells free of infection highly resistant to *S. mansoni*, severe cellular reaction around the larvae of *S. mansoni* and moderate phagocytic activity.

The inoculation of total hemolymph with infection free snail has caused a delay in the parasite development and slight amebocytic reaction around the *S. mansoni* sporocysts.

The inoculation of total hemolymph or without cells of infected snail has produced a slight infection resistance with very little or no amebocytic reaction around the *S. mansoni* and a moderate phagocytic activity.

The inoculation of hemolymph without infection free snail cells was more effective as to the combat of *S. mansoni* larvae.



## 1 - INTRODUÇÃO

Os moluscos possuem um eficiente sistema de defesa com características semelhantes ao sistema de defesa dos vertebrados. Neste processo estão envolvidos diversos mecanismos, como células de defesa, o reconhecimento de corpos estranhos, resposta encapsuladora, fagocitose, reações citotóxicas, assim como fatores humorais.

A destruição de organismos estranhos pode ocorrer com ou sem a presença de células da hemolinfa, sugerindo a participação de componentes humorais com liberação de substâncias citotóxicas (Cheng & Yoshino, 1976; Foley & Cheng, 1977)

A atividade dos hemócitos é influenciada por fatores químicos que podem estar presentes na hemolinfa, como, por exemplo, substâncias estranhas. A composição do meio ambiente onde estas células se encontram, também pode interferir na sua atividade. Entre os fatores do soro que provavelmente influenciam o comportamento dos amebócitos estão as lectinas (Renwranz & Cheng, 1977a; Schoenberg & Cheng, 1980; van der Knaap & Loker, 1990).

A atividade das lectinas fica bem evidente em linhagens de *Biomphalaria glabrata* resistentes ao *Schistosoma mansoni*, sendo que essa característica, está ausente em *B. glabrata* suscetível (Fryer et al., 1989).

As lectinas com capacidade aglutinante produzidas por *B. glabrata* podem ajudar a elucidar a associação caramujo-trematódeo.

Existem três hipóteses em relação a atuação dessas moléculas: 1) servem para o reconhecimento do parasita, iniciando o primeiro passo para sua destruição; 2) o parasita utiliza-se dessas moléculas para disfarçar-se, evitando o ataque do sistema de defesa do molusco (mimetismo molecular); 3) essas moléculas seriam utilizadas pelo parasita para promover a supressão do mecanismo de defesa do hospedeiro, (Stein & Basch, 1979).

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

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

Em trabalho anterior, Reis et al. (1995), constataram que *Biomphalaria tenagophila* submetida a inoculação de hemolinfa total de moluscos infectados por *S. mansoni* apresentou resistência a infecção quando exposta posteriormente ao *S. mansoni*, havendo, nesse caso, grande número de esporocistos degenerados envolvidos por intensa reação amebocitária. O número de amebócitos circulantes também apresentou significativa elevação, principalmente nos granulócitos. Ao contrário, quando os moluscos foram inoculados com hemolinfa de moluscos não infectados, observou-se um aumento da susceptibilidade à infecção esquistossomótica.

Estes resultados, estimularam a continuidade do estudo com uma população de moluscos sabidamente susceptível ao *S. mansoni*: *B. glabrata albina*.

## 2- OBJETIVOS:

Durante os últimos anos, muitos esforços tem sido feitos para entender alguns dos aspectos do mecanismo de defesa dos moluscos frente à infecção por *S. mansoni*.

Este trabalho tem como intenção observar exemplares de *B. glabrata* albina, molusco suscetível ao *S. mansoni*, inoculados com hemolinfa de moluscos infectados ou não, para verificar: 1) o papel de células na hemolinfa inoculada; 2) a fase efetiva das células no decorrer da infecção pelo *S. mansoni*; 3) e o efeito da procedência da hemolinfa na indução de resistência

Os parâmetros a serem analisados são: taxa de infecção dos moluscos; número de amebócitos na hemolinfa circulante, capacidade fagocitária dos amebócitos e reação tecidual nos moluscos infectados.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Considerações sobre às células da hemolinfa.

A hemolinfa nos caramujos circula em sistema aberto. Sua função é do transporte de substâncias que tomam parte no processo de respiração, a sustentação do corpo e filtragem do sangue. Os moluscos geralmente possuem movimentos lentos que influenciam o fluxo sanguíneo da hemolinfa.

Nas bionfalárias a hemoglobina esta dissolvida na hemolinfa. Este pigmento apresenta grande afinidade com o oxigênio, o que permite a utilização desse composto a baixa tensão. A hemolinfa é constiuida também por soro com grande quantidade de água, cloreto de sódio, bicarbonato e células (Fisher, 1950; Paraense, 1959)

As células sanguíneas circulantes, denominadas amebócitos ou hemócitos, estão classificadas em duas categorias: hialinócitos e granulócitos (Cheng, 1975). Estas células estão presentes na hemolinfa e fluídos do corpo dos moluscos e atuam como defensoras, sendo capazes de fagocitar e encapsular corpos estranhos; são também importantes no processo do reparo da concha, quando necessário, e o fazem através do transporte de cálcio. Podem ainda liberar substâncias citotóxicas que atuam no processo de coagulação da hemolinfa, onde desempenham o papel de “tampão”, característica semelhante a do fibronogênio, em casos de ferimentos dos moluscos, impedindo, assim, o extravasamento da hemolinfa (Wagge, 1955; Cheng & Butler, 1979; Bayne, 1980; Sminia & van der Knaap, 1987).

Os amebócitos possuem movimentação independente, o que facilita a fagocitose de materiais estranhos ( Abdul Salam & Michelson, 1980 a b).

Apesar dos amebócitos possuírem aspectos morfológicos muito variados devido à sua capacidade de movimentação e emissão de pseudópodes, pode-se descrever aspectos característicos para as duas categorias de células. Geralmente medem de 2.8  $\mu\text{m}$  a 14.0  $\mu\text{m}$ . Os hialinócitos possuem um contorno circular ou ovalado, tem grande núcleo em relação ao raio citoplasmático com poucas estruturas lisossomais, não emitem pseudópodes, não possuem função fagocitária e são encontrados na hemolinfa na proporção de 10 a 15%.

Sminia et al. (1981) sugerem que os moluscos mais jovens seriam mais susceptíveis à infecção por possuírem mais hialinócitos e conseqüentemente teriam menos enzimas e menos capacidade fagocítica.

Os granulócitos são células que possuem grânulos citoplasmáticos, apresentam-se com maior número de lisossomos quando comparado aos hialinócitos, emitem pseudópodes e fagocitam corpos estranhos. Por estas características, são muito parecidos com os macrófagos humanos (Cheng, 1975), e representam a maior subpopulação de células circulantes, perfazendo 85 a 90% do total.

Uma das primeiras classificações dos amebócitos foi a de (Wagge 1955). Porém até hoje não se chegou a um consenso sobre sua classificação. Provavelmente pela sua movimentação, estas células adquirem vários formatos, o que prejudica a observação dos aspectos morfológicos.

Wagge (1955), refere que George em 1941, classificou estas células em 3 categorias: células não diferenciadas que tem a capacidade de se diferenciarem em outros tipos de células; células que

possuem capacidade de fagocitar e células que possuem grânulos, vacúolos e parecem fazer o transporte de material nutritivo. De acordo com este mesmo autor outras classificações sucederam-se até 1953, quando Dudgeon preconizou um só tipo de célula e o denominou de granulócito.

Foi Pan, em 1958, quem primeiro chamou essas células de amebócitos. Sminia, em 1972, também reconheceu apenas um tipo de célula com diferentes funções.

Já mencionado anteriormente, Cheng 1975, observou que havia dois tipos de células, e Ottaviani (1983), verificou que em *Planorbarius corneus* havia um único tipo de célula, mas com estágios diferentes de maturação e que dependendo do estágio a célula exercia uma determinada função.

Em 1988, Ottaviani & Franchini constataram a existência de marcadores de superfície específicos nas células, sendo assim esses autores sugerem que há 2 tipos de células.

Noda & Loker (1989), admitiram quatro categorias de amebócitos: granulócitos que se espraiam muito; granulócitos com espraiamento parcial; hialinócitos e células redondas.

Mais recentemente van der Knaap & Loker (1990), sugeriram a existência de quatro tipos de células distintas na hemolinfa de exemplares de *B. glabrata*: três são consideradas fixas; células endoteliais, células reticulares e células porosas, que não circulam nos tecidos.

Por muito tempo, o órgão ou o tecido produtor de amebócitos, não foi localizado, isto talvez pelo fato dos moluscos possuírem um sistema circulatório aberto e portanto, as células não ficariam limitadas aos vasos sanguíneos. Segundo Wagge (1955), essas células teriam origem no epitélio do manto. Muller (1956), refere que os amebócitos

são fornecidos continuamente pelo tecido conjuntivo do pulmão. Pan, (1958), sugeriu que os amebócitos são originados dos fibroblastos, nas trabéculas do manto na parede do nefrídio perto do pericardio. Em 1975, Lie & Heyneman, descreveram uma região na parede pericardica como sendo o local onde eram produzidas essas células. Jeong et al. (1983), chamaram esta região de APO (Amebocyts Producing Organ ), constituído por uma variedade de tecido conjuntivo. Curiosamente neste órgão, nunca foram encontrados parasitos (Joky et al., 1985).

O órgão produtor de amebócitos (APO) de moluscos infectados pode sofrer ação de produtos produzidos pelo parasita, induzindo a multiplicação celular. Sullivan et al., (1984) e Joky et al., (1985), observaram que em moluscos que receberam material inerte particulado não ocorreu aumento mitótico da reprodução.

Os amebócitos podem aumentar quantitativamente na hemolinfa circulante através de vários estímulos, como uma injeção de bactérias, ou após a penetração de um trematódeo (Sullivan et al. 1984). Se o trematódeo é incompatível, o número de amebócitos cai rapidamente na hemolinfa circulante, sendo que estes não reconhecem o parasita como corpo estranho nos primeiros instantes. Após algumas horas os parasitas são reconhecidos e envolvidos por fibroblastos e células da hemolinfa, produzindo uma reação de encapsulamento do parasita pelos amebócitos.

Quando há compatibilidade do trematódeo com o molusco vetor, verifica-se aumento no número de amebócitos circulantes, observando-se o reconhecimento do parasita, porém não se observa a sua eliminação (Files & Cram, 1949; Newton, 1952; Pan, 1963; Abdul-Salam & Michelson, 1980b )

Durante o desenvolvimento do trematódeo no organismo do molusco, verifica-se também aumento do número de amebócitos, o

mesmo ocorrendo com relação a ferimentos (Files & Cram 1949; Newton, 1952; Pan 1963; Abdul-Salam & Michelson, 1980 b).

Sminia (1987), verificou que em moluscos que vivem em locais poluídos há um maior número de amebócitos circulantes na hemolinfa em relação aos que vivem em locais limpos.

Segundo Matricon-Gondran et al. (1986), o aumento drástico do número de amebócitos não é consequência apenas de mitoses, mas também da migração destas células dos tecidos para a hemolinfa, ou ao contrário, da hemolinfa para os tecidos dependendo das suas necessidades

De um modo geral, os moluscos possuem uma resistência inata bem desenvolvida, devido aos amebocitos circulantes, aos componentes do plasma, a presença da concha e do muco.



### 3.2 Fagocitose e Degranulação

A fagocitose é a primeira linha de defesa dos invertebrados, juntamente com os fatores humorais (Ratcliffe 1985).

Os fagócitos dos moluscos são capazes de ingerir vírus, bactérias, protozoários e fungos “in vitro”, bem como material inerte, grão de pólen e partículas de talco.

As células responsáveis pela fagocitose nos moluscos são os granulócitos que são encontrados em maior número na hemolinfa, (Foley & Cheng, 1975).

O primeiro passo para a ocorrência da fagocitose, é a identificação do material estranho sendo que o englobamento só ocorre após a partícula ser reconhecida como estranha. Tripp, (1961), demonstrou este processo de distinguir material “próprio” do “não próprio” em *B. glabrata*, utilizando implantes de tecidos homólogos e heterólogos, e verificou que os moluscos são capazes de rejeitar implantes de tecidos heterólogos, aceitando tecido homólogo.

Existem fatores no soro do molusco que são adsorvidos na superfície da partícula estranha, tornando-a suscetível à fagocitose, (Prowse & Tait 1969). Esses fatores de reconhecimento nos invertebrados são as transferases específicas, que estão presentes na hemolinfa dos moluscos. Se a ligação da transferase com os amebócitos falhar, pode haver o reconhecimento dos componentes do organismo do molusco como estranho, provocando necrose local (Loverde et al. 1982).

Após o processo de reconhecimento do material como estranho, ocorre uma infiltração celular, que é feita primeiramente pelos

amebócitos com total encapsulação do material estranho. Esta encapsulação foi observada ao redor de varios materiais como grão de polém, tecidos heterólogos transplantados, tecidos homólogos formolizados, miracídios, esporocistos e cercárias que não conseguiram sair dos tecidos do molusco.

As reações de encapsulação nos moluscos podem ser consideradas como análogas às que acontecem nos hospedeiros vertebrados, quando há formação de granulomas no fígado para isolar o parasita e impedir que haja danos mais extensos ao hospedeiro. A reação de encapsulação no molusco ajuda a manter a integridade interna dos tecidos do molusco, estratégia de defesa ao parasitismo. Provavelmente esta reação é devida à ação de produtos tóxicos provenientes do parasita, prolongando-se assim a vida do hospedeiro (Harris, 1975; Carter & Bogitsh 1975).

A destruição do material estranho provavelmente é feita pelas enzimas lisossomais que estão presentes nos granulócitos. Tais enzimas hidrolíticas consistem de fosfatases ácidas e alcalinas, lisosimas e esterases não específicas, que estão estocadas em grânulos citoplasmáticos nos lisossomos (Sminia & van der Knaap, 1987). A produção destas enzimas é aumentada com a presença do material estranho. Para a liberação destas enzimas não é necessário que as células entrem em contato direto com o material estranho. A morte e a lise pode ser feita à distância através de reações citotóxicas. O processo de degranulação é portanto a liberação das enzimas lisossomais que estão dentro do lisossomo através de estímulo. A taxa de síntese das enzimas pelos amebócitos aumentariam, os lisossomos se desestabilizariam e as enzimas seriam liberadas por degranulação (Cheng 1975; Cheng & Auld 1977; Cheng & Yoshino 1976, a b; Foley &

Cheng 1977). As funções dessas enzimas seriam provavelmente a morte e a lise dos materiais englobados.

Um outro aspecto relatado na literatura diz respeito ao mecanismo chamado "*burst respiratório*" (liberação de metabólitos de oxigênio), o qual produz ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio simples ( $O_2$ ) e radicais hidroxila (OH). Os radicais gerados no "*burst*" são altamente reativos e potencialmente tóxicos, podendo participar no processo de inflamação (Fridowich 1978; Nathan et al. 1980) e na destruição de parasitas, (Babior 1978; Dikkeboom et al. 1987, 1988; Sminia & van der Knaap 1987). Uma falha dos hemócitos em produzir metabólitos poderia ser um dos fatores que determinariam a susceptibilidade a um digenético. Entretanto, Dikkeboom et al. (1988), observaram não haver diferença significativa na produção de metabólitos de oxigênio entre moluscos *B. glabrata* susceptíveis e resistentes.

### 3.3 Fatores Humorais

Os moluscos além da citotoxicidade mediada por células também possuem resposta humoral a elementos não próprios.

A secreção e liberação de fatores plasmáticos por parte dos amebócitos não é um processo contínuo, dependendo da presença de material estranho, (Sminia & van der Knaap, 1987).

Há nos moluscos vários fatores humorais que estão presentes no soro como lectinas, aglutininas, linfoquinas, (Bird 1974; Sminia et al. 1979; Boswell & Bayne 1984; Mullainadhan & Renwranz 1986; van der Knaap & Loker 1990; Hertel et al. 1994).

As lectinas que estão presentes no soro da hemolinfa e na superfície dos amebócitos segundo Mullainadhan & Renwranz, (1986), são as responsáveis pela formação de pontes entre carboidratos da célula ou de partículas estranhas. Sabe-se que as lectinas podem unir-se a diferentes carboidratos com variação no grau de afinidade, havendo variações no grau de reconhecimento (van der Knaap & Loker 1990).

Diversos autores tem correlacionado o elevado título de aglutinação de eritrócitos de coelho em caramujos infectados com *Echinostoma paraensi* com o aumento significativo de carboidratos no soro e que estes ligariam-se a polipeptídeos de 150-220 Kda e de 75-130 Kda (Loker & Hertel, 1987; Couch et al., 1990; Monroy et al., 1992; Uchikawa & Loker, 1992).

As lectinas, além de serem moléculas de reconhecimento no soro, atuam como receptoras e também como opsoninas citofílicas, que aumentam a adesão de partículas estranhas para a fagocitose,

quando testada com relação a pequenas partículas como bactérias e leveduras (Renwranz & Stahmer 1983; van der Knaap & Loker, 1990).

Segundo Loker & Bayne (1982), esporocistos pré-incubados em plasma de caramujos susceptíveis perdem sua proteção contra a ação dos hemócitos de caramujos resistentes, sugerindo que antígenos adquiridos pelos esporocistos não impedem seu reconhecimento pelas células do hospedeiro. Parece que antígenos adquiridos do soro de moluscos susceptíveis são reconhecidos como “não próprios” pelos hemócitos de moluscos resistentes, devido às diferenças antigênicas entre moluscos susceptíveis e resistentes.

Bayne et al. (1986), confirmaram que a exposição ao plasma altera a antigenicidade dos esporocistos, e que a aquisição de antígeno é seletiva. Verificaram ainda que esta alteração é resultado específico da exposição ao soro. A aquisição de antígenos do soro pelos esporocistos ocasiona uma alteração mínima no plasma, muitos desses antígenos adquiridos são rapidamente perdidos do tegumento do esporocisto e dos sítios de interações metabólicas e imunológicas com o hospedeiro.

Em estudo comparativo da atividade hemaglutinante da hemolinfa de *B. glabrata* albina e pigmentada, Stanislawski et al. (1976), verificaram que os hemócitos reagem com substâncias dos eritrócitos dos grupos sanguíneos humano A, B e H em ambas populações de caramujos.

Estudando a especificidade hemaglutinante entre eritrócitos humanos e a hemolinfa de diferentes membros da família Planorbidae, Michelson & Dubois (1977), verificaram que essa atividade hemaglutinante específica não está presente em todos os membros da família. Esses autores concluíram que *B. glabrata* susceptíveis (linhagem Porto Rico, PR-B), exibem uma pronunciada especificidade

para eritrócitos A<sub>1</sub>. Essa evidência serviu de base para a sugestão de que a especificidade de aglutinação seja determinada pela linhagem do caramujo.

Com base nos estudos realizados até a presente data é possível traçar um quadro dos vários fatores sorológicos detectados na hemolinfa de diversos moluscos que possuem ação imunológica. Em *B. glabrata* foram descritos 4 fatores sorológicos: 1) Lectinas; 2) fatores líticos (enzimas); 3) substâncias imobilizadoras de miracídio (Lie et al. 1980); 4) ativador do sistema complemento de vertebrados, detectado também em *Helix pomatia* (Kock & Nielsen 1984). Além desses, foram detectados fatores inibidores da protease, em *H. pomatia* (Renwranz & Cheng 1977b), uma precipitina para albuminas e globulinas humanas em *Littorina irrorata* (Smith 1984) e fibronectina em *H. aspersa* (Bride et. al. 1986).

### 3.4 Fatores que influenciam a suscetibilidade ou resistência dos moluscos

A suscetibilidade dos moluscos à infecção por trematódeos é influenciada pela idade, dieta e fisiologia dos moluscos que influenciam o comportamento e o grau de infecção.

Os jovens são mais suscetíveis à infecção, possivelmente pelo menor número de células fagocíticas em sua hemolinfa, em relação aos mais velhos (Richards 1973; Niemann & Lewis 1990; Zanotti-Magalhães et alii. 1987). A dieta é importante para o estabelecimento da infecção, uma vez que o consumo de nutrientes do organismo do hospedeiro pelo parasita é grande, havendo grande consumo de glicogênio pelos esporocistos, (Carter & Bogisth 1975; Liebsch & Becker 1990).

Existe a necessidade da interação fisiológica dos moluscos com o trematódeo estar sempre presente. A procedência do parasita tem papel fundamental na suscetibilidade do hospedeiro à infecção parasitária, isto é, moluscos e parasitas pertencentes a diferentes áreas geográficas, necessitam de um período longo de adaptação, havendo necessidade de um ajuste fisiológico entre as espécies.

Os resultados de Files & Cram (1949), na avaliação de suscetibilidade de moluscos a diversas linhagens de *S. mansoni* utilizando caramujos provenientes da Libéria, Egito, Porto Rico e Brasil, ressaltar a complexidade das interrelações entre hospedeiro-parasita. Estes autores admitiram a existência de diferenças fisiológicas, intra e interespecífica, entre populações de verme de áreas endêmicas diferentes.

Paraense & Côrrea (1963), constataram que *S. mansoni*, adaptado à *B. glabrata* de Minas Gerais, apresentava resistência à

infecção quando colocada frente a *B. tenagophila* de São Paulo e vice-versa. Com isso, demonstraram a existência de duas linhagens de *S. mansoni*: uma de Belo Horizonte (BH) que requer *B. glabrata* de Belo Horizonte como hospedeira e outra de São José dos Campos (SJ) que requer *B. tenagophila* de São José dos Campos.

Moluscos *B. glabrata* são mais suscetíveis às linhagens simpátricas de *S. mansoni* (Newton 1953; Paraense & Corrêa 1963, 1978; Magalhães 1976; Santana et al. 1978; van der Knaap & Loker 1990).

As infecções com esquistossomos da linhagem alopátrica só são possíveis quando os moluscos são expostos a grande número de miracídios (Paraense & Corrêa 1963; Dias et al. 1987).

Em infecções concomitantes, por trematódeos há alterações na relação parasita-hospedeiro. Normalmente ocorre competição entre as larvas de espécies diferentes por nutrientes, luta por espaço dentro do corpo do hospedeiro.

Podem ocorrer também alterações fisiológicas e reações imunológicas que podem acarretar aumento ou diminuição da suscetibilidade do molusco à infecção por outro trematódeo. Ainda pode haver alterações no órgão produtor de amebócitos e nos próprios amebócitos (Lie et al. 1977; Reis et al. 1995).

A suscetibilidade e a resistência à infecção, dependem também da constituição genética; tanto do parasita quanto do hospedeiro. Richards (1973) e Richards & Merritt (1975), observaram que moluscos jovens suscetíveis tornaram-se resistentes quando adultos. Demonstraram que o caráter resistência, adquirido na maturidade, é determinado por um único gene dominante. A suscetibilidade é controlada por um complexo de quatro ou mais fatores, tendo sido



constatada a presença de genes, que condicionam a resistência também nos exemplares suscetíveis.

Granath e Yoshino, (1984), observaram que em moluscos albinos suscetíveis (PR), inoculados com hemolinfa de moluscos resistentes (10r-2), houve proteção à infecção por *S. mansoni* 24 horas após a inoculação de hemolinfa. Este estudo leva a crer que pode haver transferência passiva de resistência ao *S. mansoni*, através da inoculação de hemolinfa de moluscos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Planejamento experimental

Os experimentos deste estudo foram conduzidos em um esquema completamente aleatorizado, sem restrições e com replicações.

Avaliou-se o comportamento de moluscos *B. glabrata* albina BH frente a dois tipos de inóculos - quando inoculados com hemolinfa total ou sem células, provenientes de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* da linhagem BH.

Estudou-se a suscetibilidade à infecção (n=45), mortalidade (n=45 para cada grupo), o comportamento dos amebócitos circulantes (n=10 moluscos para cada horário, por grupo), a atividade fagocitária (n=10 para cada período avaliado por grupo).

### 4.2 Manutenção em laboratório de *B. glabrata* e do *S. mansoni*.

Utilizamos moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* albina, provenientes de uma população de Belo Horizonte, MG criado e mantido no moluscário do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Os moluscos foram mantidos em cristalizadores de vidro com capacidade aproximada de 2500 ml, em água declorada à temperatura

ambiente de 22-25 °C. A alimentação consistiu de folhas de alface fresca *ad libitum*.

A linhagem de *S. mansoni* utilizada para infecção dos planorbideos foi a BH (Belo Horizonte, MG), também mantida em laboratório em sucessivas passagens em camundongos Swiss, SPF provenientes do Centro de Bioterismo (Cemib)- UNICAMP e *B. glabrata* da colônia do Departamento de Parasitologia.

### 4.3 Grupos experimentais

Foram constituídos os seguintes grupos experimentais.

**GRUPO 1** - Exemplares de *B. glabrata* livres de infecção (grupo controle)

**GRUPO 2** - Exemplares de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* (grupo testemunho).

**GRUPO 3** - Exemplares de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e posteriormente expostos ao *S. mansoni*.

**GRUPO 4** - Exemplares de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.

**GRUPO 5** - Exemplares de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.

**GRUPO 6** - Exemplos de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni*.

**GRUPO 7** - Exemplos de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.

**GRUPO 8** - Exemplos de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.

**GRUPO 9** - Exemplos de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostos ao *S. mansoni*.

**GRUPO 10** - Exemplos de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*.

**GRUPO 11** - Exemplos de *B. aglabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*.

**GRUPO 12** - Exemplos de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*.

**GRUPO 13** - Exemplares de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*.

**GRUPO 14** - Exemplares de *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*.

## RESUMO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Origem da Hemolinfa	Tipo de inóculo		Infecção
	Hemolinfa total	Hemolinfa s/ célula	
Moluscos livres de infecção	Grupo 3		posterior
	Grupo 4		anterior
	Grupo 5		-
Moluscos Infectados		Grupo 6	posterior
		Grupo 7	anterior
		Grupo 8	-
Moluscos Infectados	Grupo 9		posterior
	Grupo 10		anterior
	Grupo 11		-
Moluscos Infectados		Grupo 12	posterior
		Grupo 13	anterior
		Grupo 14	-

#### **4.4 Obtenção de miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH.**

Miracídios de *S. mansoni* da linhagem Belo Horizonte, MG foram obtidos das fezes de camundongos fêmeos, Swiss, SPF infectados. O material fecal foi colhido aproximadamente aos 60 dias após a exposição às cercárias. As fezes foram homogeneizadas em água, filtradas em gaze e posteriormente deixadas sedimentar em geladeira (Hoffman et alii. 1934). Após o período de sedimentação, o sobrenadante foi descartado adicionando-se novamente água. Este processo foi repetido por 3 vezes para lavagem completa do sedimento. Em seguida, procedemos tratamento para eclosão dos miracídios por exposição à luz e calor de 28 °C fornecidos por lâmpadas incandescente de 60W colocadas a 40 cm de distância (Standen 1951).

#### **4.5 Infecção experimental de *B. glabrata* com miracídios da linhagem BH do *S. mansoni*.**

Nove grupos de 45 moluscos entre 7 a 10mm de diâmetro, foram expostos individualmente a 10 miracídios da linhagem BH de *S. mansoni*, em frascos contendo 2 ml de água deionizada e colocados sob luz e calor durante 2 horas para propiciar a penetração dos miracídios (Standen, 1951).

#### **4.6 Determinação da suscetibilidade e mortalidade de *B. glabrata*.**

Os moluscos foram examinados semanalmente por um período de 3 meses. Após 20 dias de infecção os moluscos foram expostos à luz e calor por duas horas, para induzir a liberação de cercárias (Pellegrino et al. 1955). Este procedimento foi adotado até 90 dias após a infecção. Ao final do experimento havíamos colecionado a taxa de mortalidade que foi observada diariamente e a taxa de infecção nos grupos.

A suscetibilidade dos moluscos foi determinada pela presença de esporocistos primários e secundários e pela eliminação de cercárias.

#### **4.7 Obtenção da Hemolinfa**

##### **4.7.1 Hemolinfa total de *B. glabrata***

Obtivemos a hemolinfa total de 10 *B. glabrata* de 7 a 10mm de diâmetro, mediante punção céfalo-podal com pipeta Pasteur devidamente esterilizada (Michelson 1966). A fonte de hemolinfa dos moluscos infectados foi no período de alta eliminação de cercárias. A hemolinfa coletada foi mantida em ependorff de plástico e logo em seguida inoculada.

##### **4.7.2 Hemolinfa sem células de *B. glabrata***

Após retirarmos a hemolinfa de 10 exemplares de *Biomphalaria glabrata*, centrifugamos durante 10 minutos a 1173g a 4° C, e



recolhemos o sobrenadante, que foi centrifugado por mais 2 vezes nas mesmas condições.

#### **4.8 Inoculação da hemolinfa total ou sem células em *B. glabrata***

Os moluscos foram previamente anestesiados com mentol 0.025% por 3 horas. A inoculação, de 0.3 mm<sup>3</sup> de hemolinfa em cada exemplar foi feita na região céfalo-podal com auxílio de uma seringa odontológica devidamente esterilizada em água fervente.

#### **4.9 Contagem de células circulantes na hemolinfa de *B. glabrata***

Após a coleta da hemolinfa, foi feita a contagem, em câmara de Neubauer em microscópio de contraste e fase com aumento de 400 vezes. Os amebócitos foram classificados em estrelados e não estrelados, frequentemente chamados na literatura respectivamente de granulócitos e hialinócitos.

Foi feita a contagem das células circulantes da hemolinfa isoladamente em 10 exemplares para cada período de : 30 minutos, 2, 4, 8, 12, 24 horas e 3, 7, 28, 42 dias após a infecção com *S. mansoni* ou após a inoculação de hemolinfa.

#### **4.10 Obtenção dos cortes Histológicos**

Para a obtenção de cortes histológicos foram submetidos à infecção individualmente 12 moluscos de cada grupo com 100 miracídios. Foram formados então em cada grupo de 12 moluscos, 4 subgrupos com 3 moluscos. Os moluscos de cada subgrupo foram sacrificados aos 30 minutos, 12, 24 e 72 horas após a infecção e mediante fixação em Bouin aquoso.

Após 48 horas de fixação, a concha dos moluscos foi removida para realização de cortes histológicos. As peças fixadas foram processadas para inclusão em parafina, e submetidas a cortes seriados de 7  $\mu$ m de espessura. As preparações foram coradas pela hematoxilina-eosina e Tricrômico de Gomori (Guaraldo et ali. 1981). Avaliamos e contamos os esporocistos primários de *S. mansoni* presentes nos referidos cortes, avaliando também as reações amebocitárias.

#### **4.11 Formolização de eritrócitos de carneiro para utilização na fagocitose**

Utilizamos a técnica de Czimas, 1960. Eritrócitos de carneiro suspensos em solução de Alsever, foram lavados cinco vezes em PBS 0,15M pH 7.4. Após este procedimento, adicionamos um volume de papa de eritrócitos a dez volumes de formol a 3%, sendo a mistura deixada 24 horas em geladeira (4° C). Adicionou-se 2 volumes de formol neutro e encubou-se por 24 horas utilizando-se leve agitação. Realizaram-se mais

8 lavagens com PBS pH 7.4. A suspensão de eritrócitos foi ajustada para uma concentração final de  $3 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> e estocadas a -20°C.

#### **4.12 Preparo de monocamadas de amebócitos para verificação da taxa de fagocitose.**

As monocamadas de amebócitos foram preparadas a partir de um “pool” de hemolinfa proveniente de 10 exemplares de *B. glabrata* de cada grupo experimental. Foram preparadas 2 lâminas com 50 µl de hemolinfa cada, e incubadas em estufa BOD a 25° C por 60 minutos.

Terminado o período de incubação, o excesso de hemolinfa foi removido por inclinação da lâmina, ficando uma camada de amebócitos firmemente aderidos. Colocamos 50 µl de eritrócitos de carneiro formolizados na concentração de  $3 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> sobre a monocamada e novamente incubou-se em iguais condições. Ao final do período de incubação, o excesso de eritrócitos foi removido por lavagens sucessivas com meio mínimo essencial (MME) pH 7.4. Foram fixados com metanol e posteriormente esta preparação foi corada pela solução de May-Grünwald 1:2 em PBS 2% durante 5 minutos, lavada varias vezes com PBS 2% e corada pela Giemsa 1:5 em PBS 2% durante 20 minutos. Lavamos bem em PBS 2%, secou ao ar e montamos em bálsamo de Canadá (Addul-Salam & Michelson 1980, Santana, 1990)

#### 4.13 Avaliação do índice de fagocitose

Para avaliarmos o índice de fagocitose contamos 200 células em duplicata para cada experimento. O valor final foi expresso pela média aritmética, conforme fórmula abaixo utilizada por Abdul-Salam & Michelson (1980a).

$$\frac{\text{Número de células fagocitando pelo menos um eritrócito}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

Os intervalos analisados foram: 30 minutos, 12, 24, 72 horas para cada grupo.

#### 4.14 Tratamento estatístico

A variação do número de células circulantes, taxa de mortalidade e taxa de infecção dos moluscos foram analisadas frente às condições fornecidas pela época de inoculação (anterior ou posterior à infecção), presença ou ausência de células na hemolinfa e procedência da hemolinfa (de moluscos infectados ou não infectados). O estudo foi feito mediante análise de variância para comparação de grupos e de efeitos de tempo entre os grupos.

Foi usado o método de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch e Quenouille para as comparações múltiplas das médias (Ryan 1959; Gabriel 1978, Welsch 1977). Para a análise de mortalidade e infecção utilizou-se a tabela de contingência dos resultados (morto, vivo) pelo teste de qui-quadrado (razão de verossimilhança), para testar a hipótese de que as taxas eram iguais nos grupos.

Para análise do índice de fagocitose foi utilizado teste Tukey para comparar as proporções dos grupos, hemolinfa, origem e infecção.

A análise dos dados obtidos nos cortes histológicos foram feitas através do teste Dunnett's.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 Suscetibilidade e mortalidade de *B. glabrata albina*.

#### 5.1.1 - Infecção

Sete dias após os moluscos terem sido submetidos aos tratamentos, iniciou-se a observação dos moluscos que se infectaram e que morreram no decorrer do experimento. Consideraram-se infectados, apenas os moluscos que eliminaram cercárias e ou aqueles que apresentaram esporocistos secundários no período de observação, 12 semanas (90 dias).

Os dados referentes à taxa de infecção dos moluscos estão na Tabela 1 e Figura 1.

Os moluscos que foram apenas expostos ao *S. mansoni* (Grupo 2), apresentaram a maior taxa de infecção, 72.4%. Neste grupo a infecção foi mais evidente a partir da terceira semana, quando constatamos, ao exame macroscópico dos moluscos, esporocistos que estavam aparentes na região céfalo podal. Os demais grupos levaram um período maior para apresentarem esporocistos, (6 semanas), indicando uma menor suscetibilidade à infecção, o que foi confirmado no decorrer de todo o experimento. Essa menor suscetibilidade observada em todos os grupos experimentais foi altamente significativa (Anexo estatístico I).

Os moluscos apenas submetidos à infecção pelo *S. mansoni* (Grupo 2, testemunho infectado) começaram a eliminar cercárias na quarta semana após a exposição aos miracídios de *S. mansoni*, enquanto os demais grupos começaram a eliminar cercárias após 8 semanas. Foi bastante reduzido o número de moluscos que eliminaram cercárias até o término do período de observação (Tabela 2).

Os grupos de moluscos que receberam hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção e que foram expostos ao *Schistosoma mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo (g3, g4, g6 e g7) apresentaram as menores taxas de infecção, sendo altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) (Figura 1, Anexo estatístico I).

Dos grupos de *B. glabrata* que receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g3,g4), O que apresentou menor taxa de infectividade foi o grupo exposto ao *S. mansoni* posteriormente ao inóculo (g4), com taxa de 11.8%. Este grupo não diferiu significativamente das *B. glabrata* que receberam hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção (g6,g7), mostrando-se altamente resistente à infecção, com taxas de infectividade extremamente baixas (11.1% e 11.4%) independente da época de exposição ao *S. mansoni* ter sido anteriormente ou posteriormente ao inóculo de hemolinfa. Estes dois ultimos grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

*B. glabrata* que recebeu hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados com *S. mansoni* e que foi exposta ao *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo (g9, g10 e g12), apresentou uma taxa de infecção moderada (Tabela1, Figura 1).

Os grupos experimentais que receberam hemolinfa total de moluscos infectados (g9 e g10), foram os que mostraram-se com maior taxas de infectividade (58.6% e 46.7%) respectivamente, não apresentando diferença significativa ( $p > 0.005$ ) com relação ao grupo testemunho infectado (g2).

*B. glabrata* que foi inoculada com hemolinfa sem células de moluscos infectados (g12 e g13) apresentou taxa de infectividade moderada (19.4% e 29.4%), sendo que o grupo exposto ao *S. mansoni* posteriormente ao inóculo de hemolinfa foi quem apresentou menor taxa

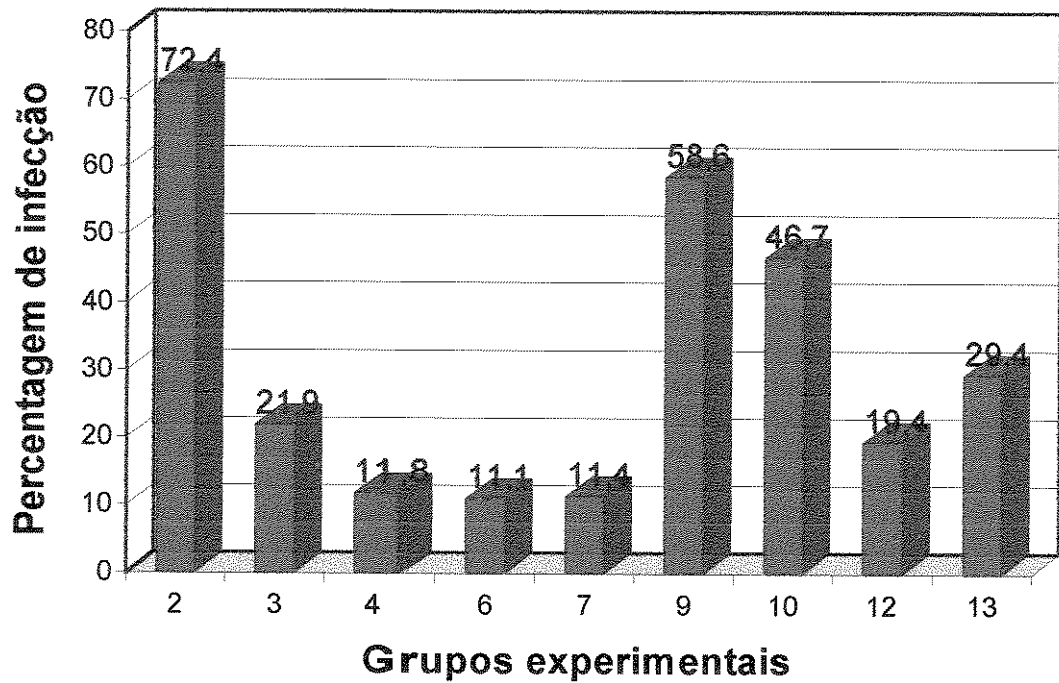
(19.4% ). Estes grupos (g12 e g13) mostraram diferenças significativas com relação ao grupo testemunho infectado (g2), ( $p < 0.0005$  e  $p < 0.007$ ).

A análise estatística da taxa de infecção mostrou que a origem do inóculo (moluscos livres de infecção, moluscos infectados) foi fator significativo ( $p < 0.0002$ ) A mesma análise considerou não significativa o tipo de inóculo (hemolinfa total, hemolinfa sem células )  $p > 0.0018$ .



**TABELA 1** - Taxa de infecção e mortalidade de *Biomphalaria glabrata*, submetidas aos diferentes tratamentos.

Grupos experimentais	Percentagem de sobreviventes	Percentagem de mortalidade	Percentagem de infecção
Grupo 1	77,7	22,2	-
Grupo 2	64,4	35,5	72,4
Grupo 3	71,1	28,9	21,9
Grupo 4	75,5	24,4	11,8
Grupo 5	80,0	20,0	-
Grupo 6	80,0	20,0	11,1
Grupo 7	77,7	22,2	11,4
Grupo 8	82,2	17,8	-
Grupo 9	64,4	35,6	58,6
Grupo 10	66,6	33,3	46,7
Grupo 11	77,7	22,2	-
Grupo 12	80,0	20,0	19,4
Grupo 13	75,5	24,4	29,4
Grupo 14	80,0	20,0	-



**FIGURA 1** - Taxa de infecção de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10), hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado, que não recebeu inóculo.

### 5.1.2 Mortalidade

Os resultados da mortalidade das *Biomphalaria glabrata* durante 13 semanas (90 dias) de observação estão expressos nas Tabelas 1 e 3 e Figura 2.

A percentagem de mortalidade não apresentou diferenças estatisticamente significativas (anexo estatístico I) entre os grupos experimentais e o grupo testemunho infectado. Todos os grupos apresentaram a característica comum de baixa mortalidade (Tabela 2).

Nos moluscos expostos ao *S. mansoni* (g2), observamos as primeiras mortes a partir da quarta semana subsequente a exposição, período correspondente ao início de eliminação de cercárias Tabelas 2 e 3, Figura 2.

Verificamos que o período de maior ocorrência de mortes de *Biomphalaria glabrata* inoculadas com hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção ou infectadas, independente da exposição ter sido anterior ou posterior a inoculação (g6, g7, g9, g10, g12 e g13), ocorreu simultaneamente com o período de eliminação de cercárias (Tabelas 2 e 3).

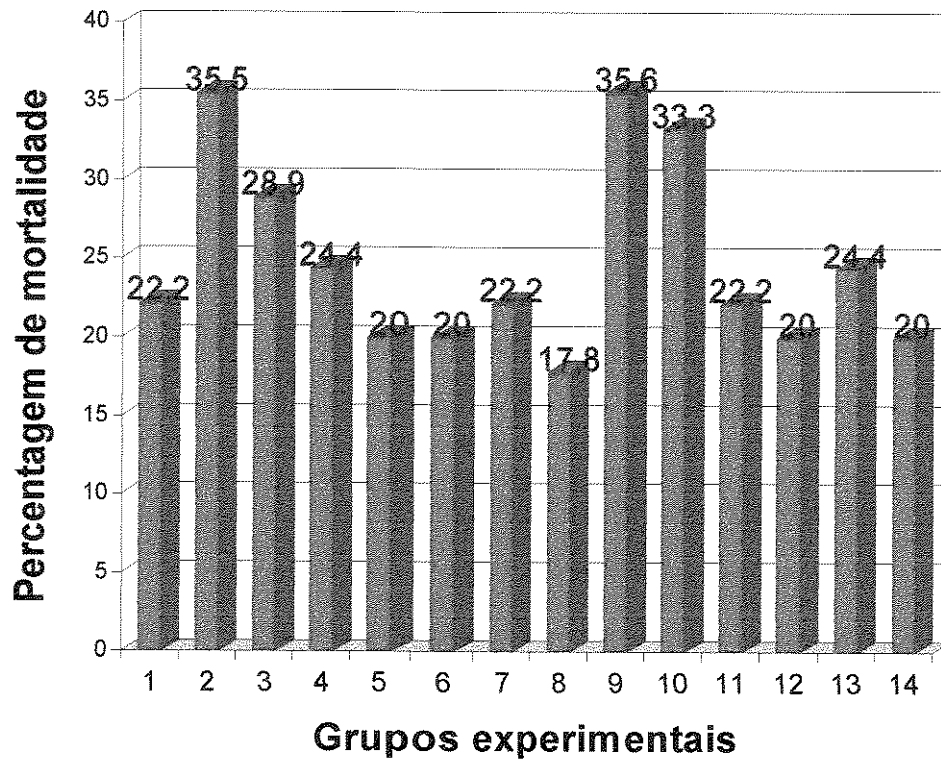
O período de maior ocorrência de mortes de *B. glabrata* não submetidas à exposição ao *S. mansoni* (g5,g8,g11 e g14), diferiu dos grupos expostos ao *S. mansoni* Tabela 3. A morte dos moluscos ocorreu ao longo do experimento, isto é, não ficou delimitado a um período.

**TABELA 2** - Infectividade em *B. glabrata* submetida aos diferentes tratamentos ao longo de 12 semanas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SEMANAS APÓS INFECCÃO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo 2				8	9	2	2					
Grupo 3										5	2	
Grupo 4										3	1	
Grupo 6										3	1	
Grupo 7										2	2	
Grupo 9								3	3	9	2	
Grupo 10								4	3	4	3	
Grupo 12									3	1	3	
Grupo 13									7	2	1	

**TABELA 3** -Número de *B. glabrata* mortas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo de 12 semanas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SEMANAS APÓS INFECCÃO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grupo 1		1	2		2	1		1	1	1	1	
Grupo 2				1	8	1	3	2		1		
Grupo 3										8	5	
Grupo 4										7	4	
Grupo 5	1		3		3		1		1			
Grupo 6										6	2	1
Grupo 7										4	4	2
Grupo 8		2				1	1	1	2			1
Grupo 9								1	4	10		1
Grupo 10								4	1	8	2	
Grupo 11	1	2			4		1			1	1	
Grupo 12									4	2	3	
Grupo 13									7	1	3	
Grupo 14	1		2		2		1		2			1



**FIGURA 2** - Taxa de mortalidade de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G5, G9, G10 e G11), hemolinfa sem células (G6, G7, G8, G12, G13 e G14) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G1 corresponde ao grupo controle não infectado e G2 ao grupo testemunho infectado.

## 5.2 - Viabilidade das larvas de *S. mansoni* e as reações teciduais em *B. glabrata albina*.

Os cortes histológicos foram realizados com o objetivo de quantificar os esporocistos primários e avaliar a viabilidade das larvas de *Schistosoma mansoni*, assim como avaliar a intensidade das reações amebocitárias presentes nos moluscos expostos aos diferentes tratamentos (Tabela 4, Figuras 3 à 14).

O maior número de larvas nos tecidos foi observado aos 30 minutos após o tratamento, independente do grupo experimental. Nos demais períodos observados, verificamos que o número de esporocistos foi decrescendo com o passar do tempo (Tabela 4).

Verificou-se que *B. glabrata* exposta ao *S. mansoni* (Grupo 2), constituiu o grupo que apresentou o maior número de larvas viáveis (Tabela 4, Figuras 3 a 6), sendo estatisticamente significativa em todos os períodos.

O número de esporocistos degenerados observado nos grupos submetidos a inoculação com hemolinfa se analisados comparativamente com relação as *B. glabrata* apenas submetidas a infecção por *S. mansoni* (Grupo 2), mostrou-se maior e altamente significativo ( $p < 0.005$ ) (Anexo estatístico II).

*B. glabrata* que foi inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção (g6 e g7) ou de moluscos infectados com *S. mansoni* (g12 e g13) não apresentou diferença estatística entre si em relação a esporocistos degenerados, independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior ao inóculo.

As *B. glabrata* que receberam inóculos de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados (g9, g10, g11 e g13) também não

apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao número de esporocistos degenerados. Entretanto é significativa a diferença entre os grupos 9 e 10 quando comparado ao grupo 2.

O maior número de esporocistos degenerados foi observado nas *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, não importando se a inoculação foi anterior ou posterior à exposição ao *S. mansoni*, apesar dessa variação ter ocorrido em intervalos diferentes nos grupos acima citados (12 horas para o grupo 6 e 24 horas para o grupo 7).

As *B. glabrata* pertencentes aos grupos experimentais, 6, 7, 12 e 13, as quais receberam hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção ou infectados, independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior ao inóculo apresentaram diferenças significativas em relação a percentagem de esporocistos degenerados, quando comparadas com as *B. glabrata* que receberam hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*, independente da época de exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior à inoculação (g9 e g10) e as *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e posteriormente expostos ao *S. mansoni* (g3).

Verificamos que a época de inoculação (anterior ou posterior a infecção) foi fator importante no grupo das *B. glabrata* que receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g3 e G4), pois foram os únicos grupos que apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao número de esporocistos degenerados (Anexo estatístico II).

Com relação às reações teciduais, observamos que nas *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* (grupo 2) as larvas apresentaram-se íntegras, sem reação amebocitária (Figura 8).

Nas *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção, expostas ao *S. mansoni*, anteriormente ou posteriormente

ao inóculo (g3 e g4) verificamos esporocistos primários com reação amebocitária discreta com pouco infiltrado amebocitário ao redor da larva, Figuras 8 e 9.

As *B.glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, expostas ao *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo (g6 e g7), apresentaram esporocistos na sua maioria, degenerados. Os amebócitos concentraram-se em grande número em torno da larva em degeneração (figura 11), com o fim aparente de isolar o tecido adjacente. O núcleo dos amebócitos, assim como o seu citoplasma era alongado, simulando o aspecto de uma fibra semelhante ao fibroblasto, (Figura 10, A).

Quando as larvas estavam em adiantado estágio degenerativo (figura 10, B), restavam apenas poucos amebócitos envolvendo uma região, que ficava preenchida por tecido amorfo, no local que, havia sido ocupado pela larva.

Em *B. glabrata* que foi exposta ao *S. mansoni* e posteriormente inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção (g7), verificou-se reação amebocitária intensa em torno das larvas, (Figura 11 A). A disposição assumida pelos amebócitos, (Figura 11 B) sugeria uma mobilização intensa em direção a larva em processo de desintegração.

Não verificou-se reação amebocitária em torno das larvas nos grupos que foram submetidos à inoculação de hemolinfa total de moluscos infectados, não importando se a inoculação foi anterior ou posterior à exposição ao *S. mansoni*, grupo 9 e 10, (Figuras 12 e 13). Estes grupos não apresentaram diferenças significativas entre si quanto aos esporocistos degenerados.

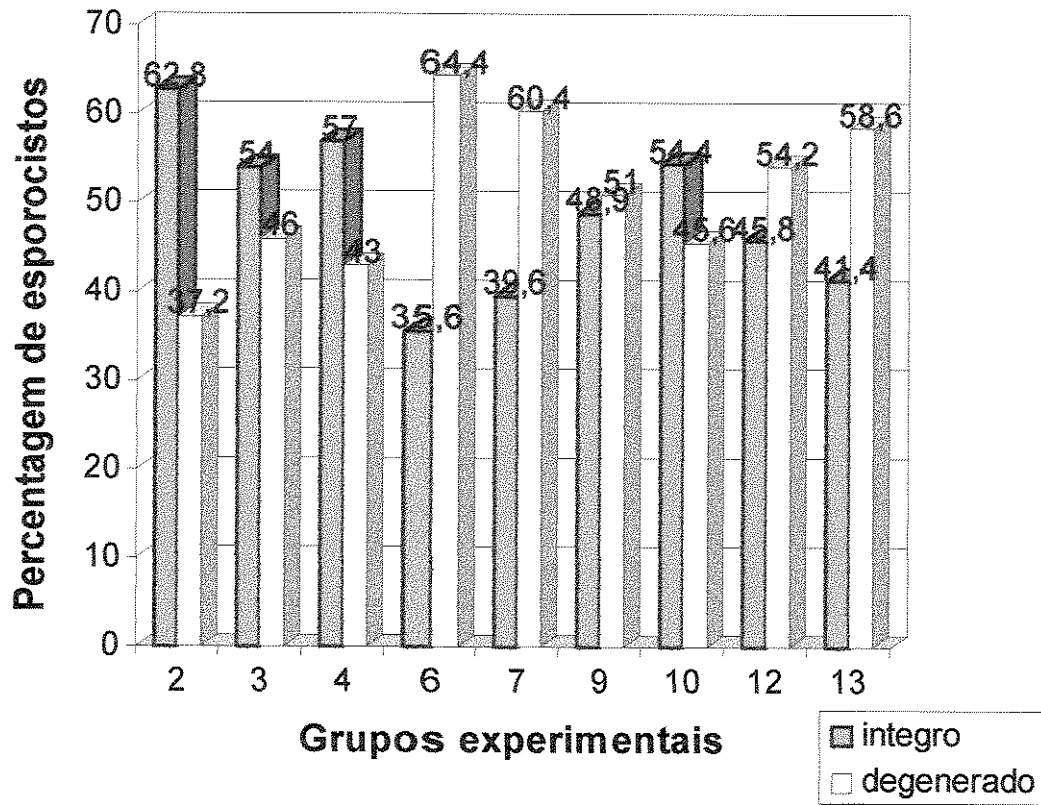


TABELA 4 - Número médio de larvas de *S. mansoni* observado em *B. glabrata* submetidas aos diferentes tratamentos.

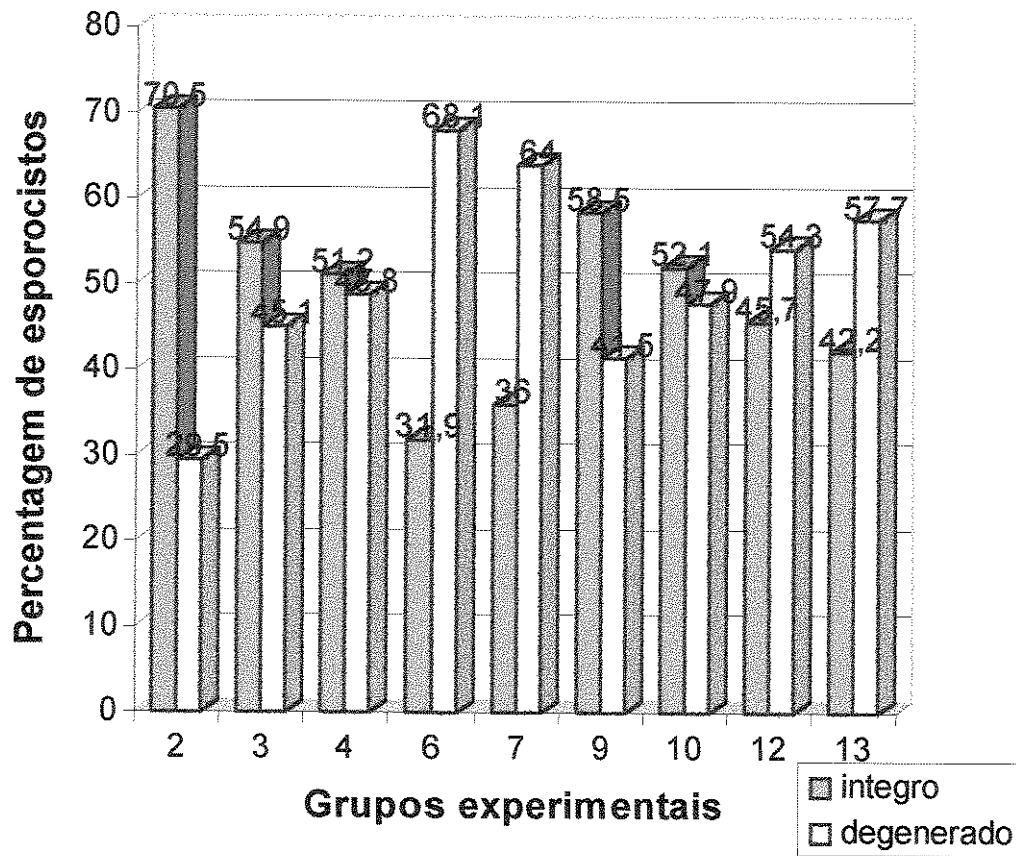
GRUPOS EXPERIMENTAIS	TEMPO DE INFECÇÃO	NÚMERO DE ESPOROCISTOS OBSERVADO EM 3 MOLUSCOS	PERCENTAGEM DE ESPOROCISTOS	
			INT.	DEG.*
GRUPO 2	30 min	86	62,8	37,2
	12 hs	44	70,5	29,5
	24 hs	31	71,0	29,0
	72 hs	23	69,6	30,4
GRUPO 3	30 min	89	54,0	46,0
	12 hs	51	54,9	45,1
	24 hs	34	64,7	35,3
	72 hs	26	46,2	53,8
GRUPO 4	30 min	86	57,0	43,0
	12 hs	43	51,2	48,8
	24 hs	32	43,8	56,2
	72 hs	21	42,9	57,1
GRUPO 6	30 min	87	35,6	64,4
	12 hs	47	31,9	68,1
	24 hs	33	36,4	63,6
	72 hs	27	33,3	66,7
GRUPO 7	30 min	91	39,6	60,4
	12 hs	50	36,0	64,0
	24 hs	39	33,3	66,7
	72 hs	22	36,4	63,6
GRUPO 9	30 min	92	48,9	51,0
	12 hs	53	58,5	41,5
	24 hs	34	47,1	52,9
	72 hs	21	52,4	47,6
GRUPO 10	30 min	90	54,4	45,6
	12 hs	48	52,1	47,9
	24 hs	34	55,9	44,1
	72 hs	23	56,5	43,5
GRUPO 12	30 min	83	45,8	54,2
	12 hs	46	45,7	54,3
	24 hs	33	45,5	54,5
	72 hs	23	47,8	52,2
GRUPO 13	30 min	87	41,4	58,6
	12 hs	45	42,2	57,7
	24 hs	32	46,9	53,1
	72 hs	22	45,5	54,5

\* INT - esporocistos integros

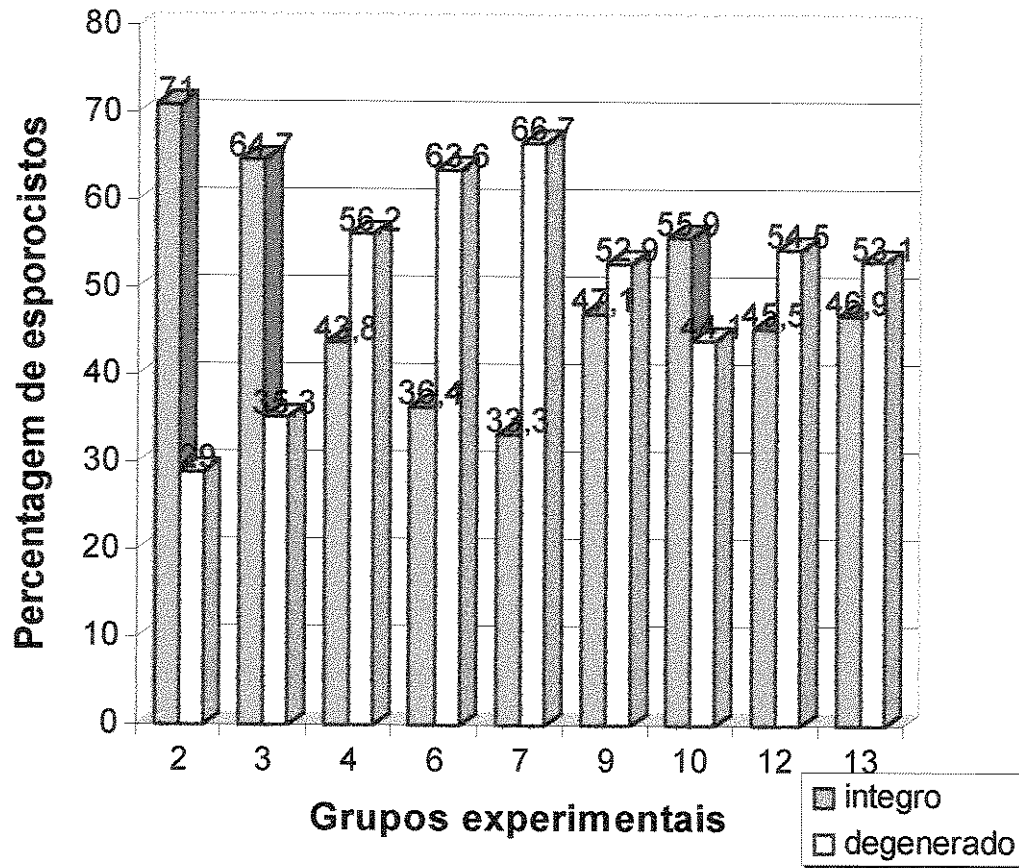
\* DEG - esporocistos degenerados



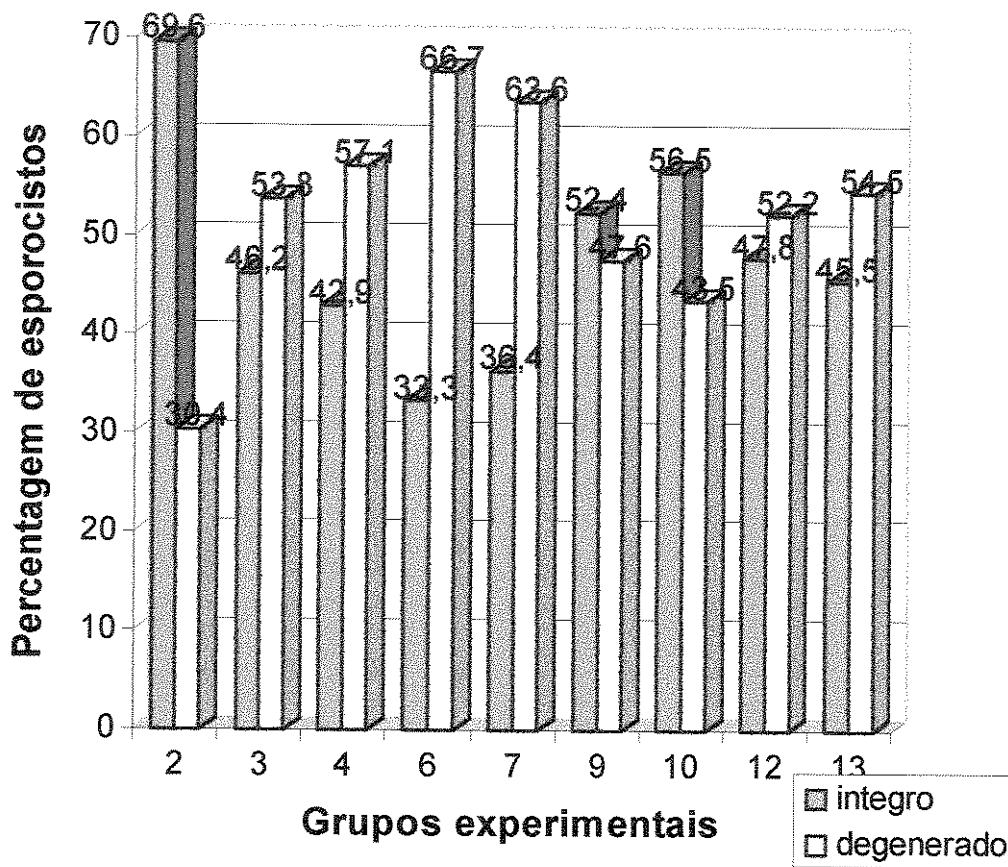
**FIGURA 3** - Número médio de esporocistos primários íntegros e degenerados observados em *B. glabrata albina* inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10) e hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado. **30 minutos após tratamento.**



**FIGURA 4** - Número médio de esporocistos primários íntegros e degenerados observados em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10) e hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado. **12 horas após tratamento.**

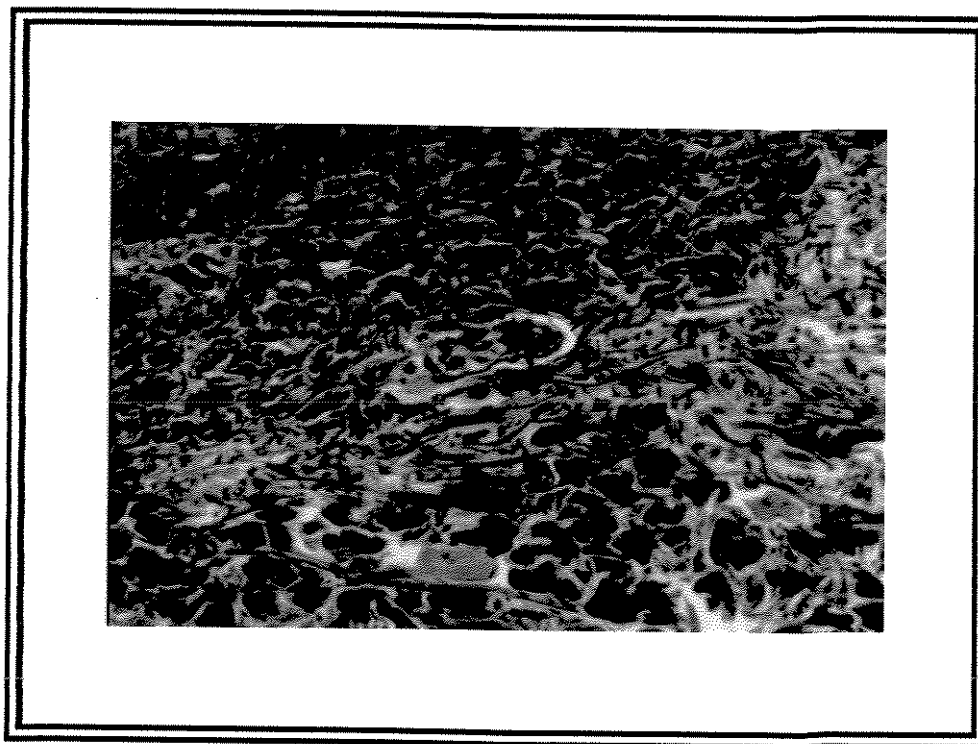


**FIGURA 5** - Número médio de esporocistos primários íntegros e degenerados observados em *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10) e hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidas a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado. 24 horas após tratamento.

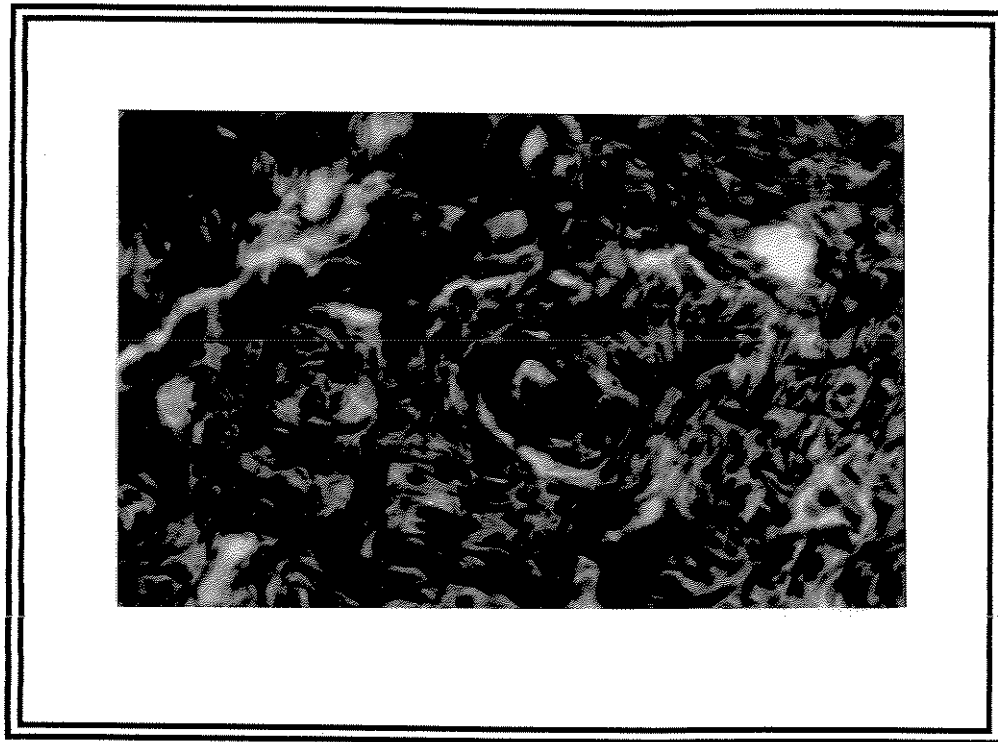


**FIGURA 6** - Número médio de esporocistos primários integros e degenerados observados em *B. glabrata albina* inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10) e hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidos a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado. 72 horas após tratamento.

**FIGURA 7** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* exposta ao *S. mansoni*, (Grupo 2).  
Observa-se larva íntegra, sem reação amebocitária, 12 horas após exposição.  
Tricrômico Gomori (X 370)



**FIGURA 8** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* inoculada com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e posteriormente exposta ao *S. mansoni*, (Grupo 3).  
Reação amebocitária discreta ao redor da larva, 24 horas após exposição.  
Tricrômico Gomori, (X 340).



**FIGURA 9** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos sadios, (Grupo 4) .

Observa-se reação amebocitária discreta ao redor da larva.  
Tricrômico Gomori, (X 340).



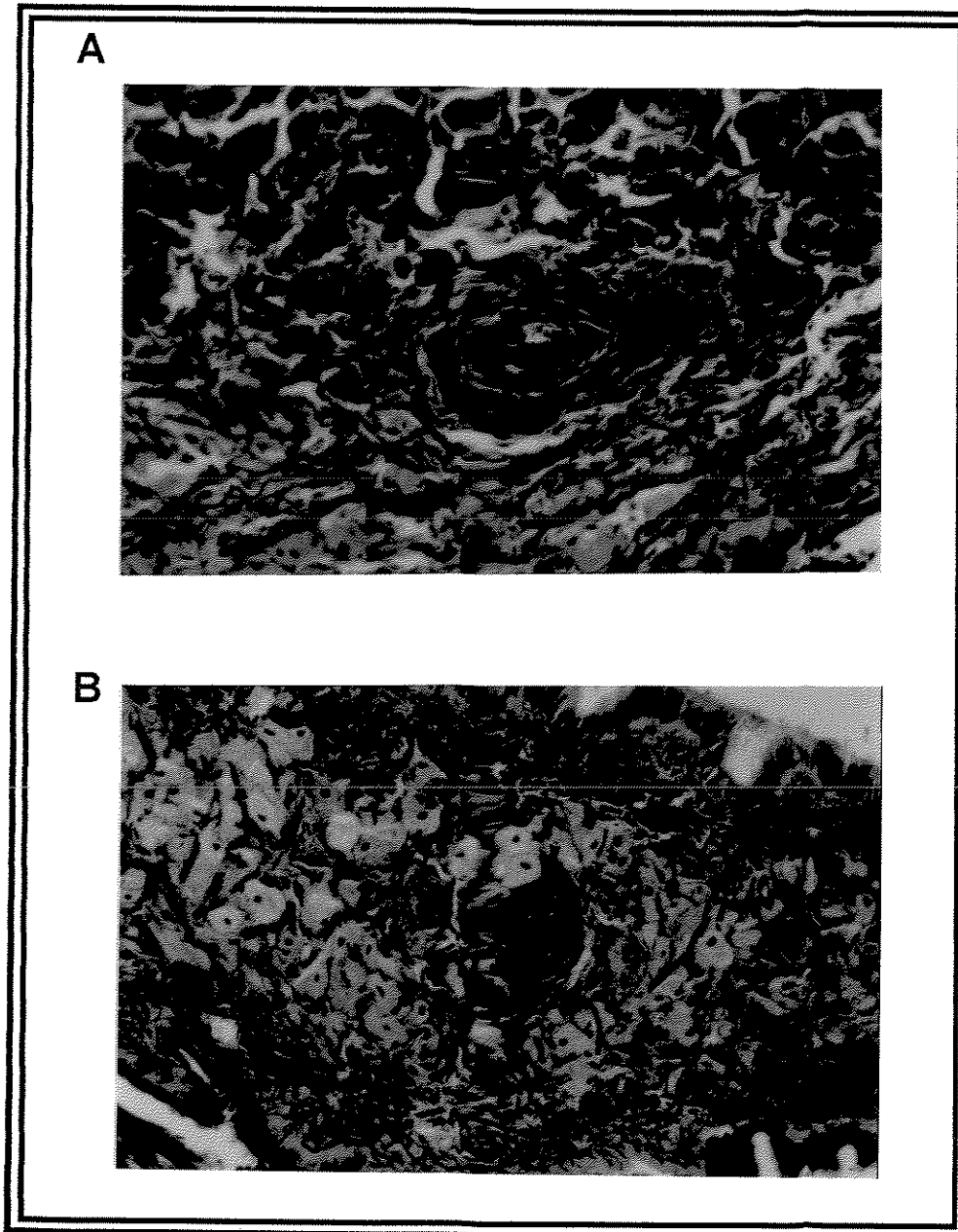


**FIGURA 10** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostos ao *S. mansoni*, (Grupo 6).

**A** - Larva em processo de degeneração com reação amebocitária intensa, 24 horas após exposição. Tricrômico Gomori (X 370)

**B** - Observa-se larva em início de degeneração com discreta reação amebocitária e esporocistos degenerados sem reação amebocitária, 24 horas após exposição.

Tricrômico Gomori, (X 340).

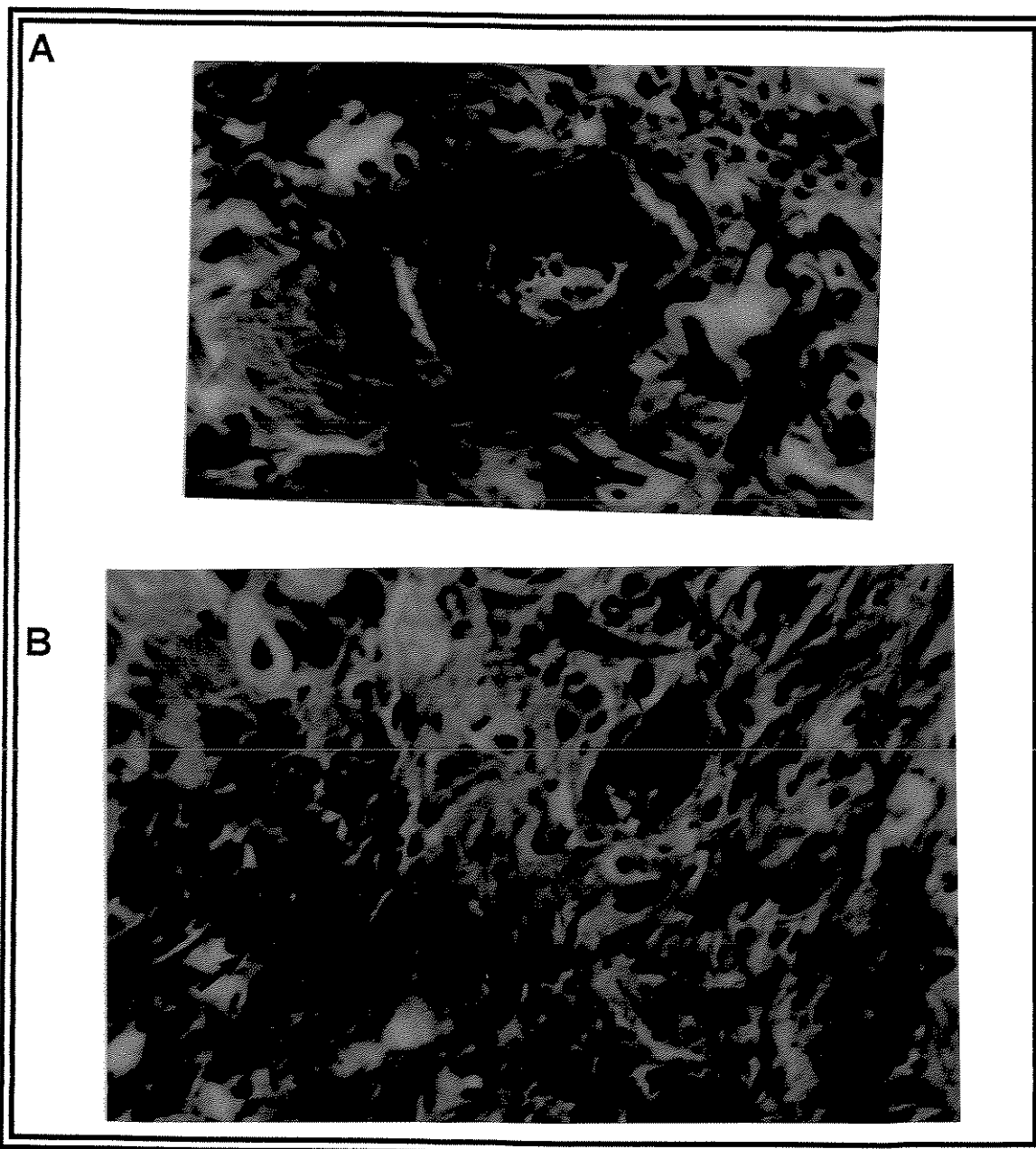


**FIGURA 11** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem célula de moluscos livres de infecção (Grupo 7).

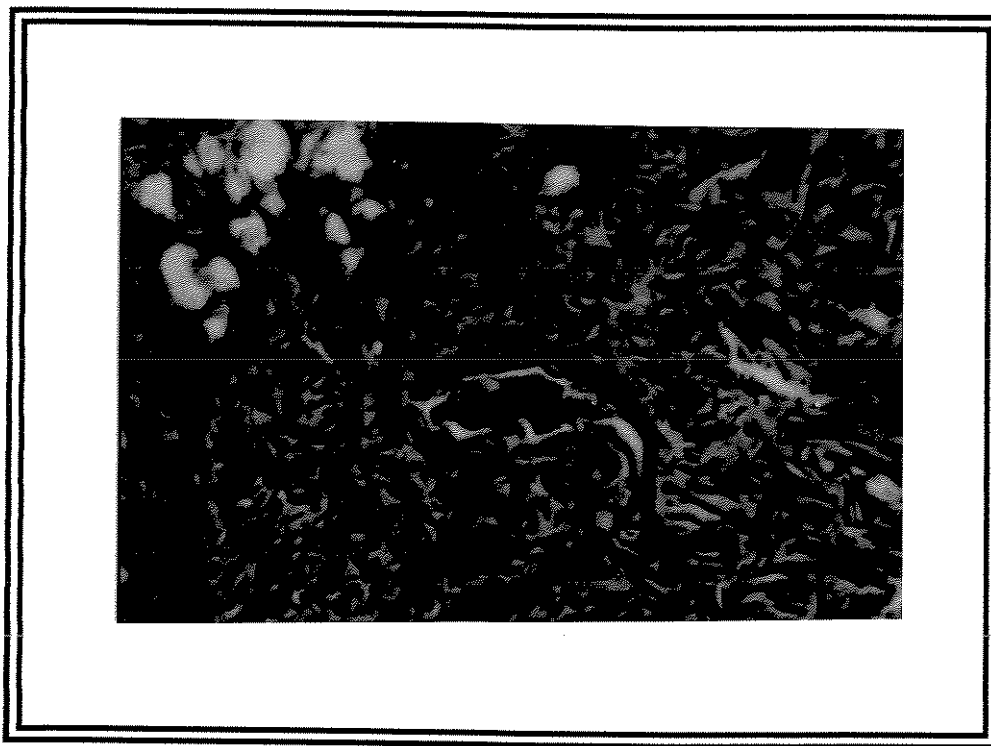
**A** - Larva em processo de degeneração com reação amebocitária intensa, 24 horas após exposição. Tricrômico Gomori, (X 370)

**B** - Amebócitos concentrados próximo a larva, ("fluxo intenso"), 24 horas após o inóculo.

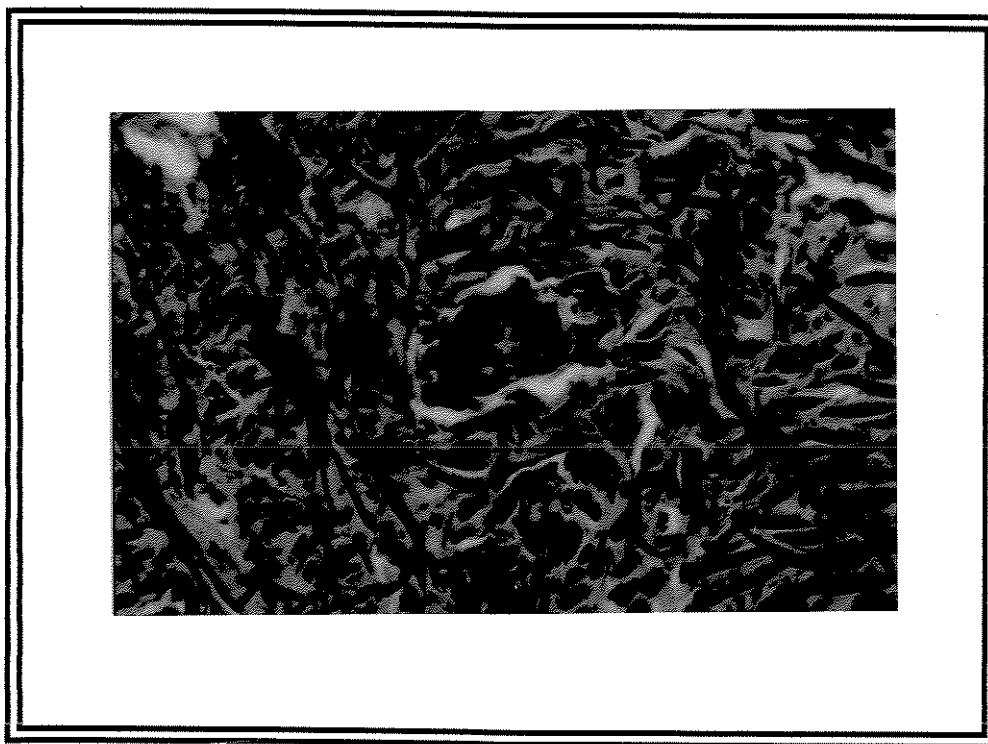
Tricrômico Gomori, (X. 370)



**FIGURA 12** - Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* inoculada com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostos à *S. mansoni*, (Grupo 9). Observa-se larva íntegra, isolada do tecido, sem reação amebocitária, 12 horas após exposição.  
Tricrômico Gomori, (X 370)



**FIGURA 13** -Corte histológico da região céfalo podal de *B. glabrata* inoculada com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente exposta ao *S. mansoni*, (Grupo 12). Observa-se larva com início de degeneração, isolada do tecido sem reação amebocitária, 24 horas após exposição. Tricrômico Gomori, (X 340).



### 5.3 - Avaliação da atividade fagocítica em *B. glabrata albina*.

Em moluscos expostos ao *S. mansoni* (g2) verificamos que o índice de fagocitose foi baixo em todos os períodos observados, e nos demais grupos experimentais o índice de fagocitose apresentou-se superior em relação ao grupo testemunho (g2), sendo altamente significativo, ( $p < 0.001$ ), (Tabela 5).

As *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e expostas ao *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo (g6 e g7) apresentaram índices de fagocitose bastante altos aos 30 minutos após o tratamento em relação aos demais grupos experimentais, sendo esta diferença significativa, (Anexo III, Figura 14). Estes demais grupos não apresentaram diferenças entre si.

O índice de fagocitose 12 horas após o tratamento apresentado pelas *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (g6), foi mais elevado que os demais, entretanto essa elevação não mostrou-se significativa (Figura 15).

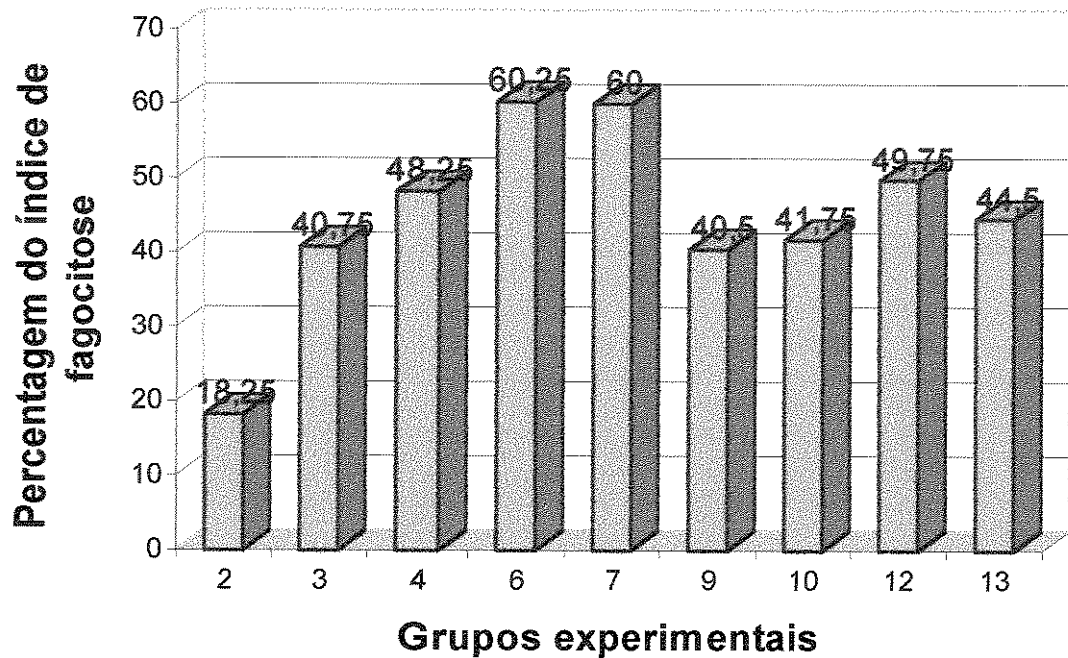
*B. glabrata* inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e infectados (g6 e g12), apresentou os maiores índices de fagocitose 24 horas após o tratamento. Contudo não houve diferença significativa entre eles e com os demais grupos (Figura 16).

O índice de fagocitose às 72 horas após o tratamento mostrou-se mais elevado nas *B. glabrata* que receberam hemolinfa sem célula de moluscos livres de infecção (g6 e g7) e nas que receberam hemolinfa sem células de moluscos infectados (g12) (Figura 17); contudo essa elevação não mostrou diferenças significativas com os grupos acima referidos e nem com os demais.

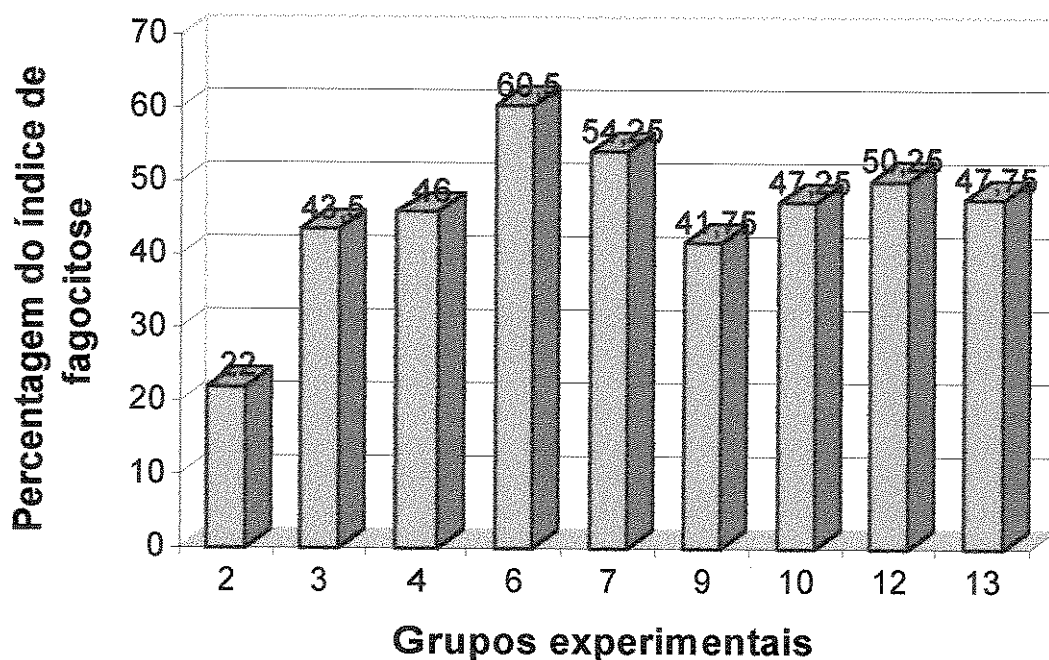
**TABELA 5** - Índice de fagocitose de amebócitos estrelados de *B. glabrata* albina, frente a eritrócitos de carneiro nos respectivos grupos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TEMPO DE INFECÇÃO	ÍNDICE DE FAGOCITOSE	
		MÉDIA	DP
GRUPO 2	30 min	18,25	0,25
	12 hs	22	1,0
	24 hs	22,75	0,75
	72 hs	21,75	0,25
GRUPO 3	30 min	40,75	0,75
	12 hs	43,50	1,0
	24 hs	45,25	0,75
	72 hs	40,25	1,25
GRUPO 4	30 min	48,25	1,75
	12 hs	46,0	1,50
	24 hs	44,25	0,25
	72 hs	41,50	1,50
GRUPO 6	30 min	60,25	1,75
	12 hs	60,50	7,75
	24 hs	63,25	1,50
	72 hs	59,50	1,50
GRUPO 7	30 min	60,0	0,50
	12 hs	54,25	0,75
	24 hs	53,50	0
	72 hs	58,0	1,5
GRUPO 9	30 min	40,5	1,0
	12 hs	41,75	3,50
	24 hs	43,0	8,0
	72 hs	41,25	0,75
GRUPO 10	30 min	41,75	0,75
	12 hs	47,25	0,75
	24 hs	44,75	0,75
	72 hs	42,25	2,75
GRUPO 12	30 min	49,75	0,75
	12 hs	50,25	1,25
	24 hs	56,50	1,50
	72 hs	57,50	5,75
GRUPO 13	30 min	44,50	1,0
	12 hs	47,75	4,25
	24 hs	46,75	1,25
	72 hs	46,25	2,25

DP - Desvio padrão

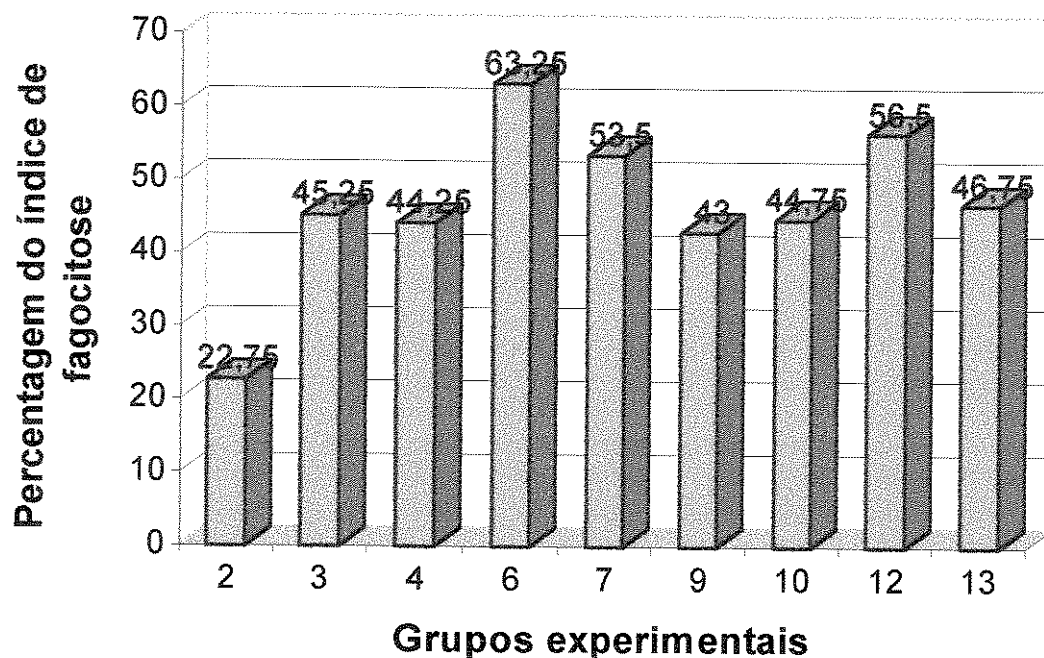


**FIGURA 14** - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10), hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidas a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado, que não recebeu inóculo. **30 minutos após tratamento.**

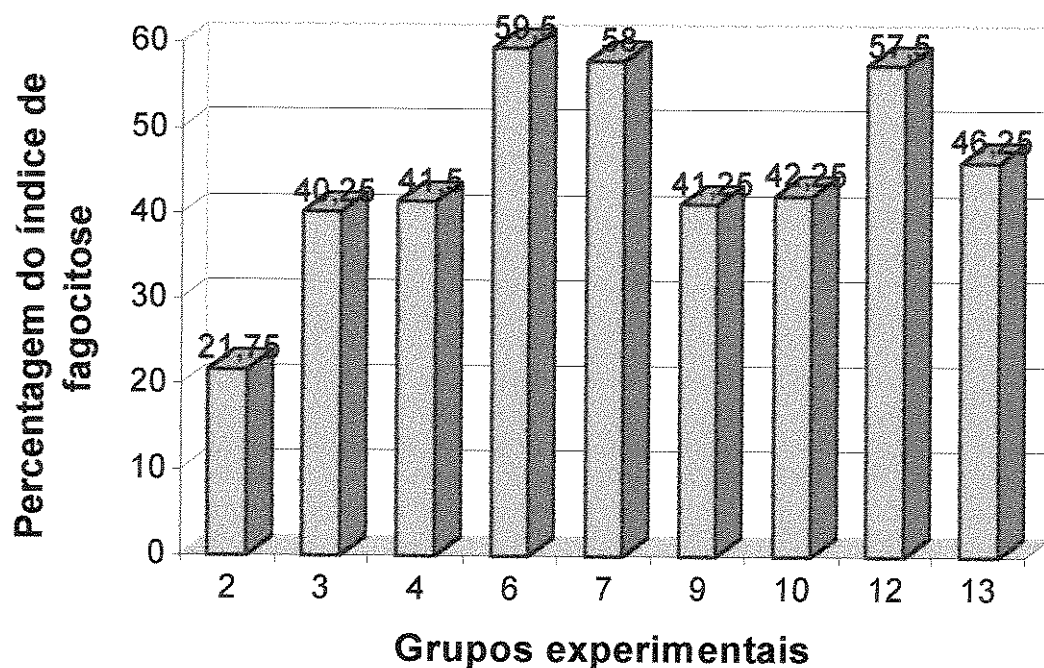


**FIGURA 15** - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10), hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidas a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado, que não recebeu inóculo. **12 horas após tratamento.**





**FIGURA 16** - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10), hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidas a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado, que não recebeu inóculo. **24 horas após tratamento.**



**FIGURA 17** - Índice de fagocitose de amebócitos de *B. glabrata* albina inoculadas com hemolinfa total (G3, G4, G9 e G10), hemolinfa sem células (G6, G7, G12 e G13) de moluscos infectados ou não por *S. mansoni* submetidas a infecção por *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo. G2 corresponde ao grupo testemunho infectado, que não recebeu inóculo. **72 horas após tratamento.**

#### 5.4 - Avaliação do número de células circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*.

Classificamos as células circulantes da hemolinfa como amebócitos estrelados (granulócitos) e amebócitos não estrelados (hialinócitos)..

A quantidade de amebócitos não estrelados foi significativamente superior em relação aos amebócitos estrelados em todos os grupos estudados, exceto em alguns períodos. Nestes, a diferença não foi considerada significativa, (Tabelas 6 a 6.4 e Figuras 18 a 30).

As *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* (grupo 2), apresentaram uma elevação do número de amebócitos não estrelados e estrelados, 24 horas após a exposição e aos 3 dias os amebócitos estrelados elevaram-se em um pico maior (a diferença dos 2 picos não foi considerada significativa), enquanto os amebócitos não estrelados tiveram uma queda e aos 42 dias tornaram a aumentar (Figura 18, Tabela 6).

No grupo 3, onde as *B. glabrata* foram inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e submetidas à exposição pelo *S. mansoni* observou-se que o número de amebócitos não estrelados foi superior ao estrelado, permanecendo até aos 7 dias após exposição ao parasita. Após esse período apresentou uma queda brusca, quando o número de amebócitos estrelados então aumentou, (Figura 19, Tabela 6.1).

O comportamento das células circulantes nas *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g4), apresentou uma característica interessante: enquanto o número de amebócitos não estrelados estava elevado o número de amebócitos estrelados apresentava-se baixo, e

vice-versa, (Figura 20). Este fato ocorreu ao longo de todo o experimento. Às 24 horas após ao inóculo de hemolinfa os amebócitos estrelados elevaram-se em um pico maior, e este foi significativamente diferente dos demais horários observados neste referido grupo.

Moluscos que apenas receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g5), apresentaram uma elevação precoce do número de amebócitos não estrelados às 2 horas após inoculação, sendo que os amebócitos estrelados nos dois primeiros períodos de observação mostraram-se também elevados (Figura 21).

Nas *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior, grupo 6 e 7, os amebócitos não estrelados apresentaram-se em maior número na circulação hemolinfática no transcorrer do experimento, (Tabela 6.2), sendo esta variação semelhante nos dois grupos (Figuras 22 e 23). Nestes grupos os amebócitos estrelados foram encontrados em menor número na circulação, não tendo havido diferenças significativas entre si.

Com relação as *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, grupo 8, observamos que os amebócitos não estrelados apresentaram uma elevação na circulação às 8, 12 horas e 3 dias após a inoculação (Figura 23). Apesar desta constatação não houve diferença significativa entre si (Tabela 6.2 e Figura 24).

Analisando os resultados referentes as *B. glabrata* que receberam hemolinfa total de moluscos infectados, (grupos 9 e 10), independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior, observamos que nestes grupos o perfil da variação de amebócitos não estrelados e estrelados foi muito semelhante não havendo diferenças significativas (Tabela 6.3, Figuras 25 e 26).

O número de amebócitos não estrelados nas *B. glabrata* apenas inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados, grupo 11, apresentou-se significativamente elevado com relação aos grupos 9 e 10, (Tabela 6.3, Figura 27).

Nas *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados, grupos 12 e 13, independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior a inoculação, verificamos que o perfil dos amebócitos estrelados na circulação não variou muito, (Figuras 28 e 29, Tabela 6.4). Os amebócitos não estrelados no grupo 12 apresentaram uma elevação tardia na circulação após as 24 horas, (Figura 28). No grupo 13 os amebócitos não estrelados tiveram uma elevação precoce aos 30 minutos e 12 horas após a exposição ao *S. mansoni*, (figura 29).

Os números de amebócitos não estrelados e estrelados nas *B. glabrata* apenas inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*, (grupo 14) apresentaram um comportamento semelhante: os amebócitos não estrelados e estrelados elevaram-se e diminuíram na circulação concomitantemente (Figura 30).

Os grupos de *B. glabrata* que receberam inoculação de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados com *S. mansoni* (g9, g10, g11, g12, g13 e g14) apresentaram uma característica comum, que foi o fato dos amebócitos não estrelados mostrarem-se na circulação em um número superior aos estrelados, (Figuras 25, 26, 27, 28, 29 e 30). Os amebócitos estrelados em nenhum momento ultrapassaram o número de amebócitos não estrelados.

A análise estatística do número de células circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*, mostrou que o efeito, época de inoculação (anterior ou posterior a exposição ao *S. mansoni* foi fator significativo para

os amebócitos estrelados do grupo 4 com relação ao grupo 3. Já os não estrelados não apresentaram diferenças, (Anexo IV).

Constatou-se que o número de amebócitos estrelados também apresentou-se diferente comparando-se os grupos 6 e 7, sendo, que o mesmo não ocorreu em relação aos amebócitos não estrelados, (Anexo IV).

Com relação aos grupos 9 e 10, verificou-se não haver diferenças significativas para os dois tipos de células.

No grupo 12 o número de amebócitos estrelados mostrou-se significativamente diferente em relação ao grupo 13, o mesmo não ocorrendo com os não estrelados.

Com relação ao efeito tipo de hemolinfa (infectada ou não) a análise estatística mostrou diferenças entre os grupos que receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g3 e g4) e os grupos que receberam hemolinfa total de moluscos infectados (g9 e g10), sendo esta diferença para os dois tipos de células. Os grupos que receberam hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção (g6 e g7) e os grupos que receberam hemolinfa sem células de moluscos infectados (g12 e g13) apresentaram um resultado inverso: o número de amebócitos não estrelados foi significativamente diferente em relação ao grupo que recebeu hemolinfa sem célula de moluscos infectado; e o número de amebócitos estrelados mostrou-se diferente em relação ao grupo que recebeu hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção (Anexo IV)

Com relação ao efeito das célula presentes na hemolinfa a análise estatística mostrou que para o número de amebócitos não estrelados e estrelados houve diferenças significativas para os grupos que receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção (g3 e g4) com relação aos que receberam hemolinfa sem células (g6 e g7). O grupo que recebeu

hemolinfa sem células de moluscos infectados (g12) mostrou-se diferente para o grupo receptor de hemolinfa total de moluscos infectados (g9) para os dois tipos de células. O grupo 13 que recebeu hemolinfa sem células de moluscos infectados mostrou-se diferente para com o grupo 10 que foi receptor de hemolinfa total de moluscos infectados com relação aos amebócitos não estrelados, não ocorrendo o mesmo com os amebócitos estrelados (Anexo IV).

**TABELA 6** - Número médio de amebócitos em  $0.1 \text{ mm}^3$  de hemolinfa circulante em *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni*.

GRUPO 2				
TEMPO APÓS TRATAMENTO	Amebocitos não estrelados		Amebócitos estrelados	
	Média	DP	Média	DP
30 min	14,5	6,8	6,1	4,4
4 hs	11,4	6,9	3,5	2,9
2 hs	7,8	3,5	3,1	2,7
8 hs	10,6	3,9	5,3	3,3
12 hs	9,0	5,0	4,7	2,0
24 hs	28,9	20,7	14,8	14,8
3 dias	21,4	20,7	20,3	16,4
7 dias	11,4	9,0	11,1	6,6
28 dias	8,8	4,9	21,9	11,0
42 dias	16,4	9,7	7,3	7,0

DP - Desvio Padrão

**TABELA 6.1** - Número médio de amebócitos em  $0.1 \text{ mm}^3$  de hemolinfa circulante em *B. glabrata* inoculados com hemolinfa total de moluscos livres de infecção.

Tempo após tratamento	GRUPO 3				GRUPO 4				GRUPO 5			
	Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
30 min	13,0	6,8	9,2	8,3	18,1	9,6	3,8	2,9	14,3	5,5	16,5	14,3
2 hs	13,8	2,5	6,5	4,2	10,1	5,0	9,5	8,6	24,0	21,6	15,1	7,8
4 hs	16,5	8,5	8,5	5,9	14,9	11,1	9,6	4,2	10,9	3,2	6,4	2,4
8 hs	13,8	4,9	5,9	2,7	13,9	6,2	14,2	3,8	9,1	2,1	4,1	2,3
12 hs	11,8	4,1	4,8	2,7	23,3	13,8	16,0	7,4	10,8	3,7	4,5	3,5
24 hs	17,6	9,3	5,3	3,0	9,2	5,5	37,2	25,9	13,7	8,7	5,1	3,0
3 dias	22,7	10,1	8,0	6,2	16,4	11,4	7,5	4,9	14,2	3,4	5,3	3,5
7 dias	21,8	12,5	9,6	5,4	22,7	7,4	8,8	6,4	17,8	8,8	6,4	4,3
28 dias	15,6	10,5	8,9	5,7	12,5	6,4	14,5	9,1	6,7	2,3	3,6	2,5
42 dias	10,8	3,4	17,1	13,1	10,9	3,5	17,8	12,5	10,9	2,6	12,1	5,8

DP - Desvio Padrão



**TABELA 6.2** - Número médio de amebócitos em  $0.1 \text{ mm}^3$  de hemolinfa circulante em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção.

Tempo após tratamento	GRUPO 6				GRUPO 7				GRUPO 8			
	Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
30 min	3,5	1,8	5,6	3,0	6,7	4,0	4,7	3,5	7,6	4,7	10,9	5,5
2 hs	7,3	3,0	3,0	1,4	4,2	2,7	6,4	5,7	4,5	1,4	2,8	1,9
4 hs	8,0	3,8	3,0	1,9	6,1	4,1	7,9	7,7	5,4	2,2	8,0	4,8
8 hs	8,0	3,1	3,6	1,6	13,6	5,3	3,3	2,5	12,4	5,9	3,1	1,3
12 hs	8,2	3,9	4,0	2,1	14,2	5,4	6,9	3,5	14,6	11,8	2,6	2,2
24 hs	9,7	4,4	4,0	3,5	13,7	3,4	5,1	1,7	3,6	1,3	6,2	1,9
3 dias	9,6	1,8	5,0	2,7	12,1	2,7	6,3	1,6	13,6	12,1	3,7	3,7
7 dias	13,9	7,5	4,2	4,0	10,5	3,0	3,8	1,5	4,4	1,8	1,7	1,5
28 dias	8,3	6,0	4,8	4,4	20,0	4,2	5,3	3,6	3,0	1,3	1,1	1,0
42 dias	7,9	4,3	4,9	2,3	9,0	2,4	2,4	1,7	3,0	1,4	1,1	0,8

DP - Desvio Padrão

**TABELA 6.3** - Número médio de amebócitos em  $0.1 \text{ mm}^3$  de hemolinfa circulante em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*.

Tempo após tratamento	GRUPO 9				GRUPO 10				GRUPO 11			
	Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
30 min	5,6	1,7	1,9	1,4	5,3	1,6	1,4	0,8	7,7	2,3	4,4	3,0
2 hs	6,4	2,0	1,5	1,3	5,9	2,5	1,6	1,3	10,0	1,9	2,7	1,7
4 hs	7,0	2,8	3,1	1,5	5,1	2,0	1,5	1,4	7,0	4,0	1,8	1,3
8 hs	6,3	2,5	1,6	1,0	5,4	1,5	4,7	3,5	6,4	1,3	2,0	1,3
12 hs	5,1	1,8	1,4	1,0	10,2	4,0	5,3	3,3	9,5	3,9	2,3	1,3
24 hs	5,4	1,9	1,8	1,0	5,6	3,0	2,1	1,4	12,4	1,6	2,9	1,6
3 dias	6,1	2,0	1,9	1,2	4,7	1,4	1,5	0,9	19,1	3,2	1,9	0,8
7 dias	6,0	2,2	2,3	1,2	4,1	1,5	1,4	1,0	13,1	3,9	2,3	1,5
28 dias	5,6	2,1	2,0	1,2	5,4	1,8	2,0	0,9	11,0	3,3	1,1	1,0
42 dias	6,5	1,7	1,9	1,6	3,6	1,3	1,5	1,0	10,4	3,3	2,1	1,7

DP - Desvio Padrão

**TABELA 6.4** - Número médio de amebócitos em 0.1 mm<sup>3</sup> de hemolinfa circulante em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*.

Tempo após tratamento	GRUPO 12				GRUPO 13				GRUPO 14			
	Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados		Amebócitos não estrelados		Amebócitos estrelados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
30 min	9,1	2,2	3,1	1,1	12,2	2,6	3,3	1,9	6,2	2,0	2,7	1,2
2 hs	10,3	2,0	3,4	1,7	6,9	2,7	2,6	1,6	3,9	1,8	1,7	0,9
4 hs	9,4	1,5	4,0	2,6	4,2	2,0	2,0	1,4	6,9	2,7	2,3	1,0
8 hs	8,1	1,8	3,3	1,4	5,1	1,5	1,9	1,1	6,8	2,3	3,0	1,9
12 hs	12,7	5,6	3,3	2,3	14,4	5,7	3,3	1,9	14,6	4,7	6,8	2,4
24 hs	9,2	3,3	3,0	1,8	11,4	2,6	2,3	1,3	6,3	2,3	3,0	1,2
3 dias	21,5	9,9	6,5	5,2	9,4	1,4	4,7	1,6	12,7	3,4	5,4	2,1
7 dias	24,5	8,2	4,1	1,7	9,2	2,1	3,8	2,0	18,3	3,2	8,3	2,7
28 dias	27,2	7,9	6,4	3,5	9,1	3,1	2,0	1,2	7,4	2,3	3,0	1,5
42 dias	18,8	1,8	8,4	2,7	8,5	3,0	3,4	1,9	7,6	2,7	3,8	1,9

DP - Desvio Padrão

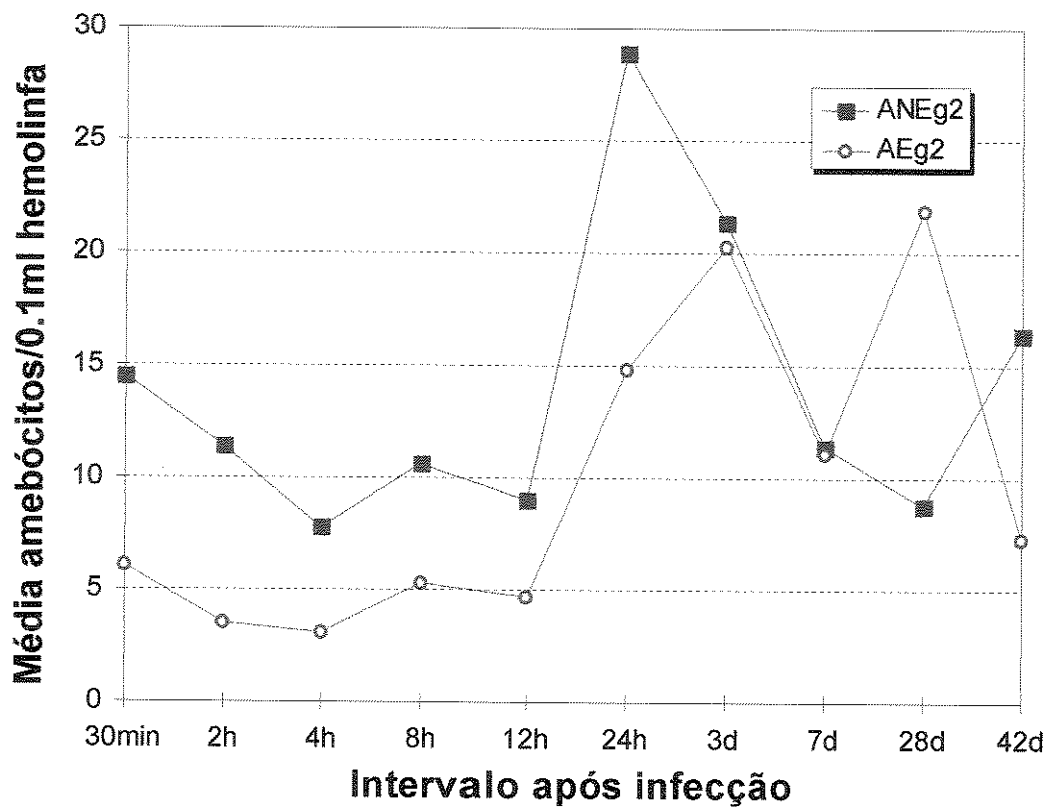
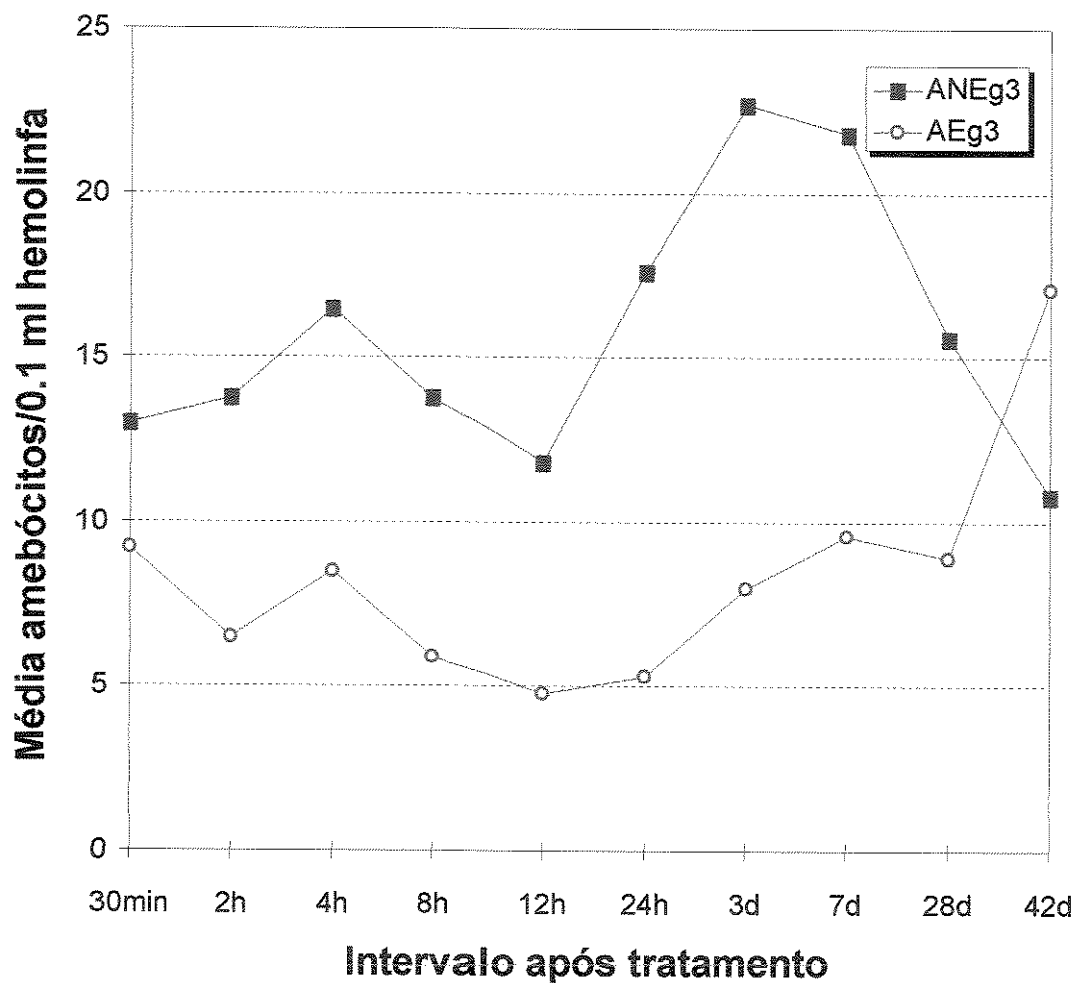


FIGURA 18 - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata albina* expostas ao *S. mansoni*, (Grupo 2).

ANE - amebócitos não estrelados

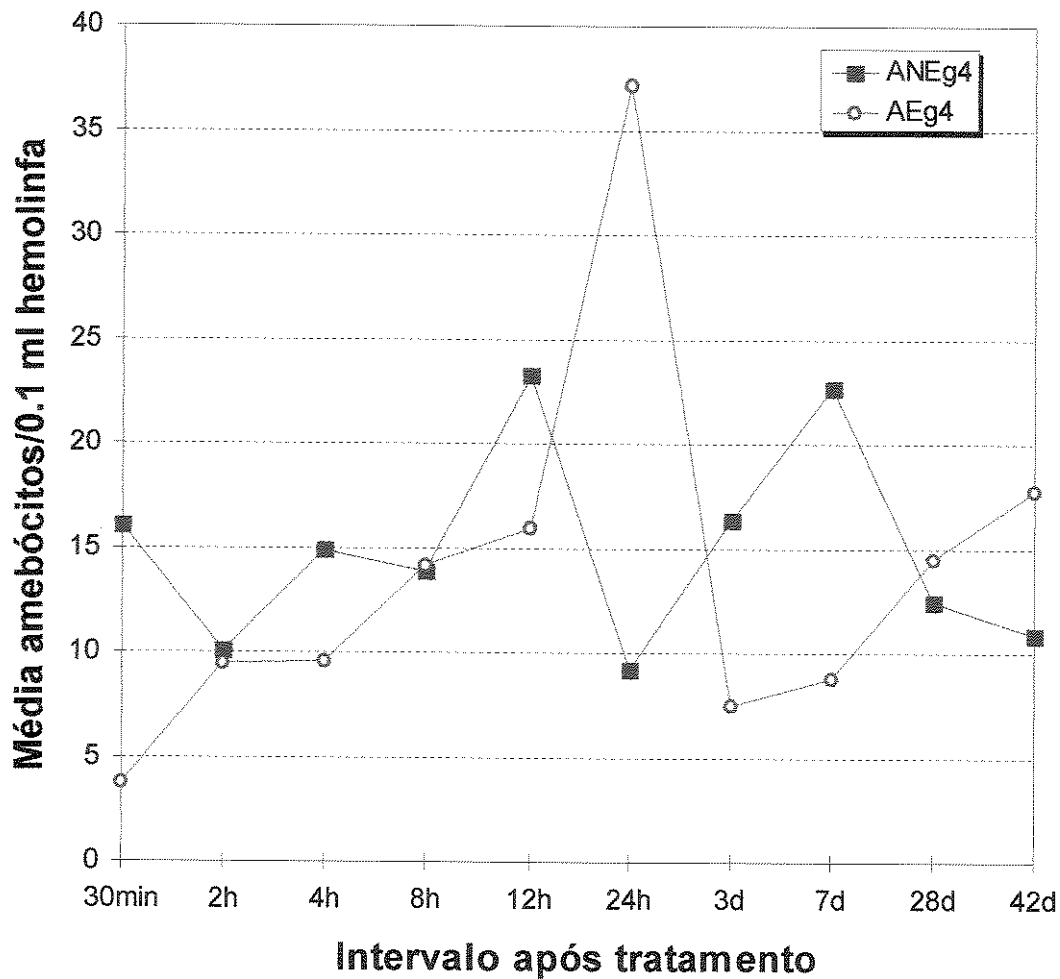
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 19** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção e expostos ao *S. mansoni*, (Grupo 3).

ANE - amebócitos não estrelados

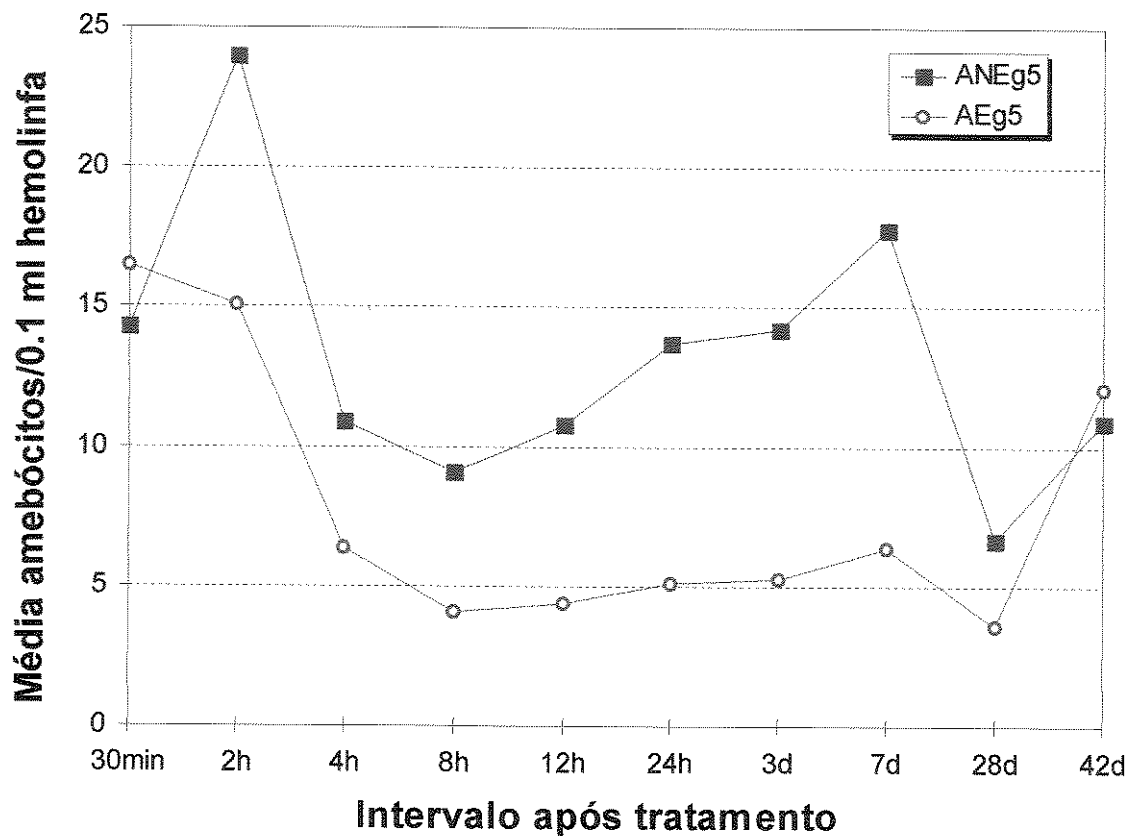
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 20** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção, (Grupo 4).

ANE - amebócitos não estrelados

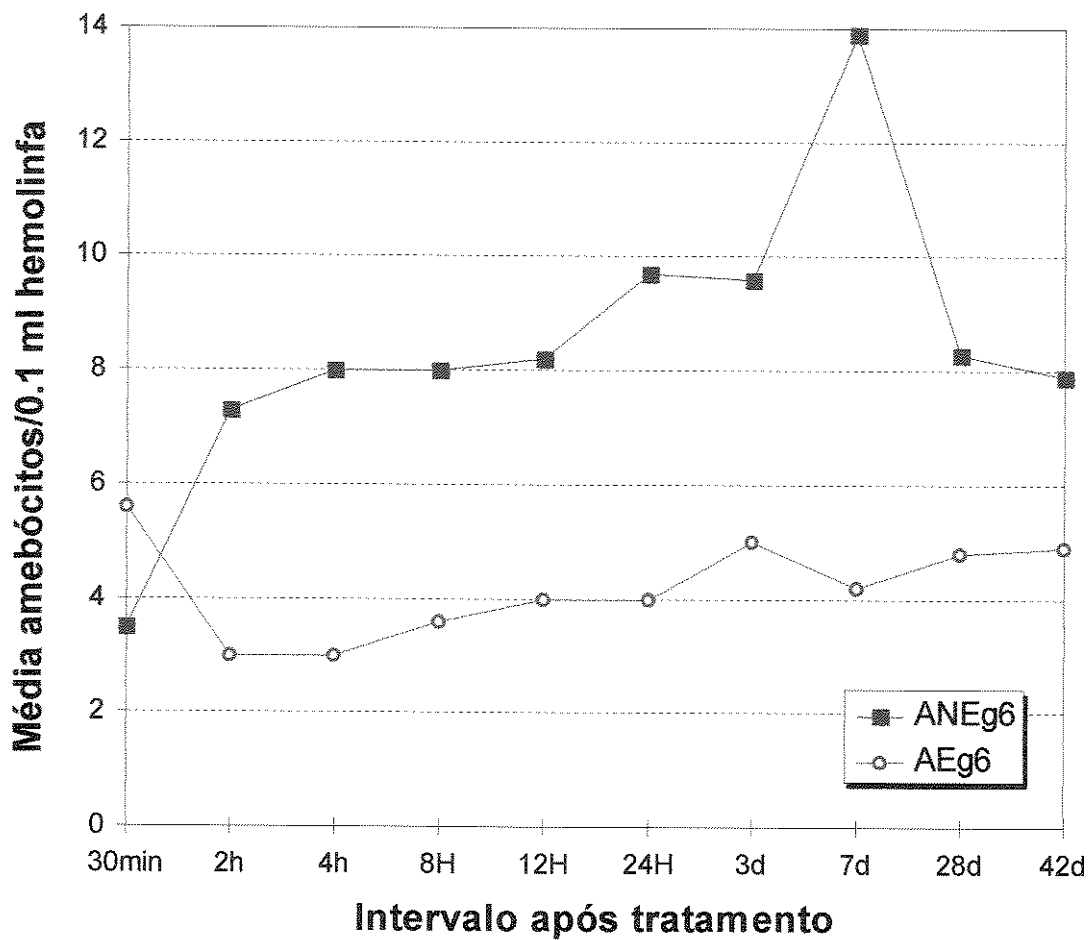
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 21** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos livres de infecção (Grupo 5).

ANE - amebócitos não estrelados

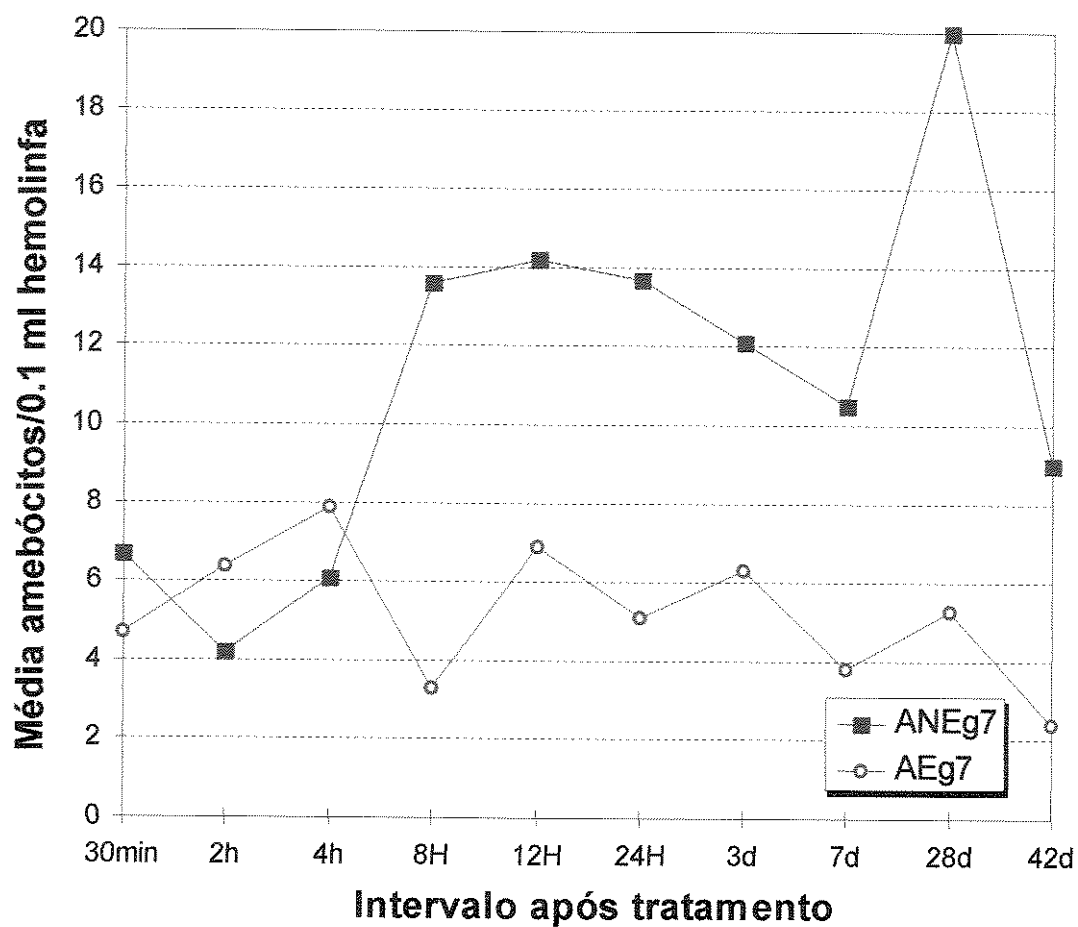
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 22** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, (Grupo 6).

ANE - amebócitos não estrelados

AE - amebócitos estrelados

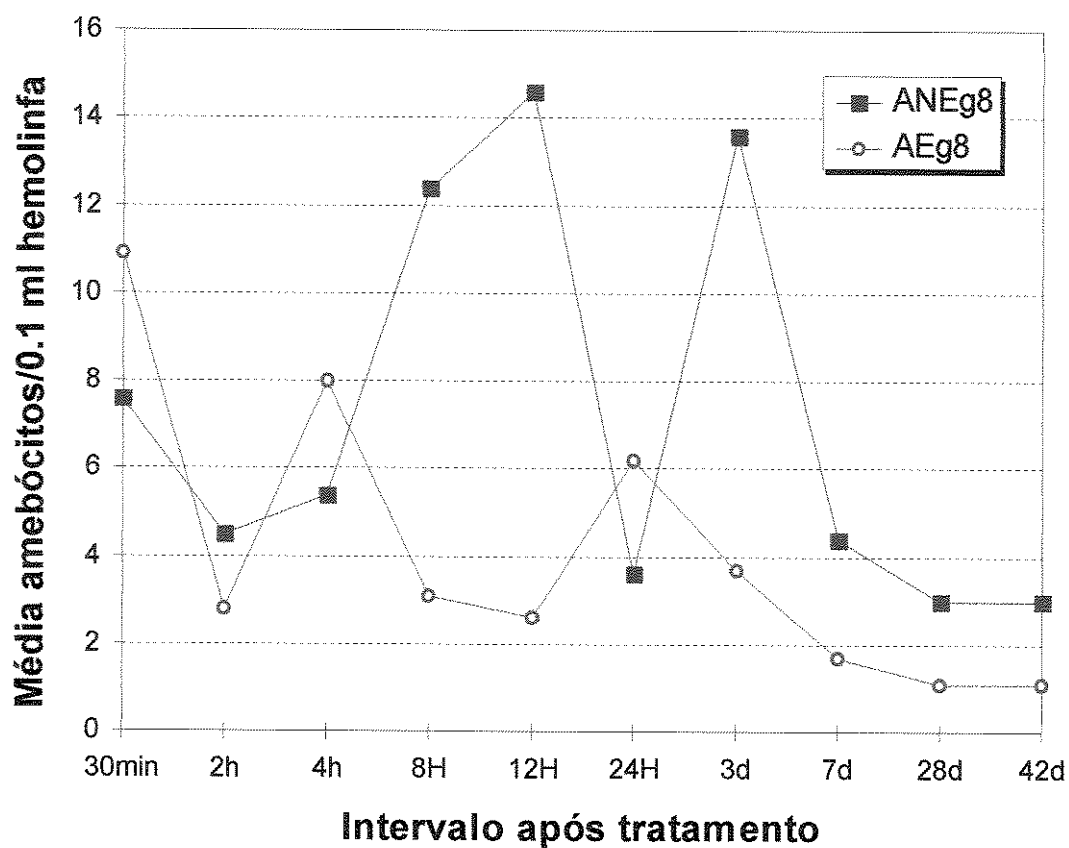


**FIGURA 23** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* exposta ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, (Grupo 7).

ANE - amebócitos não estrelados

AE - amebócitos estrelados

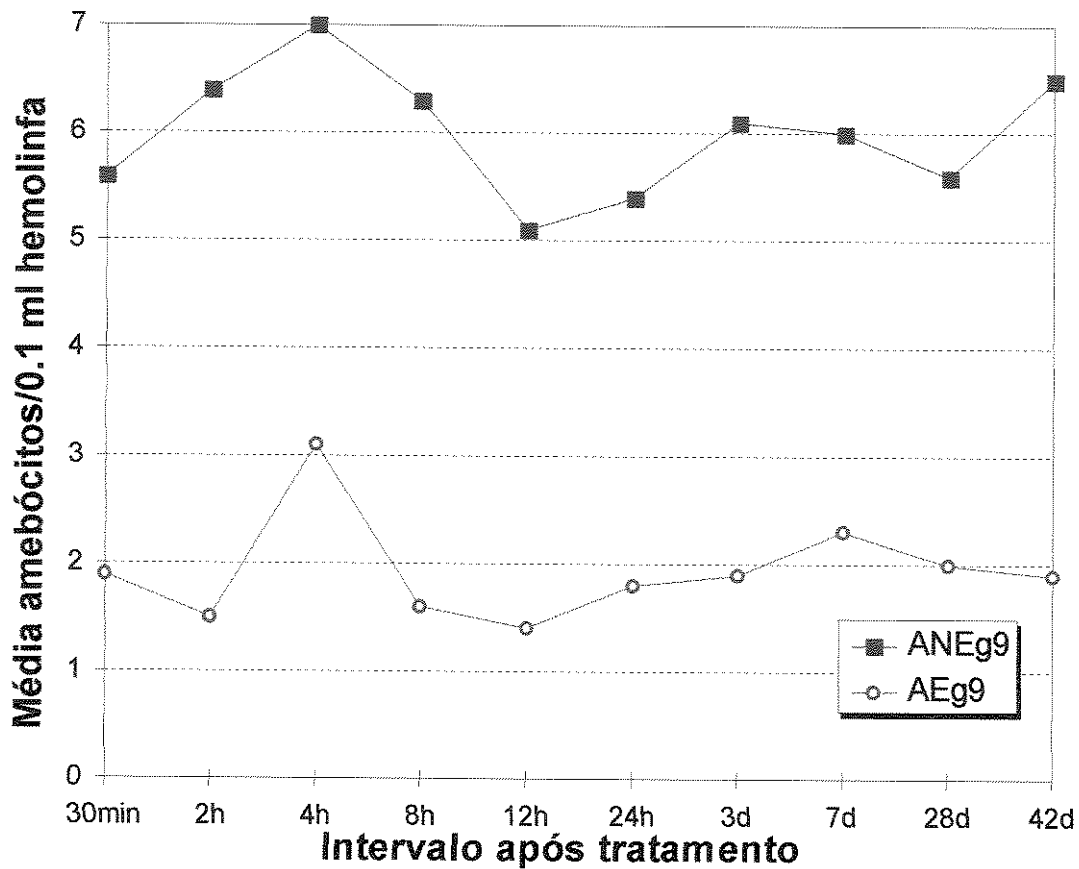




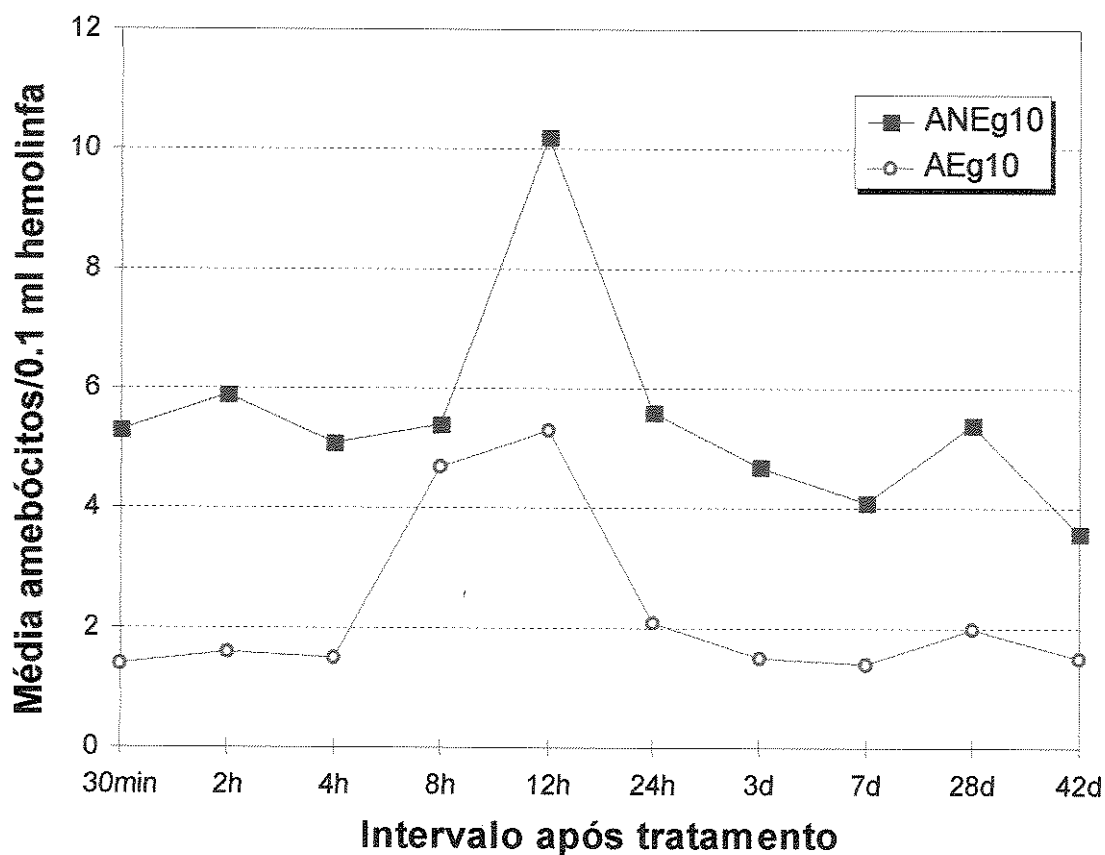
**FIGURA 24** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculada com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, (Grupo 8).

ANE - amebócitos não estrelados

AE - amebócitos estrelados



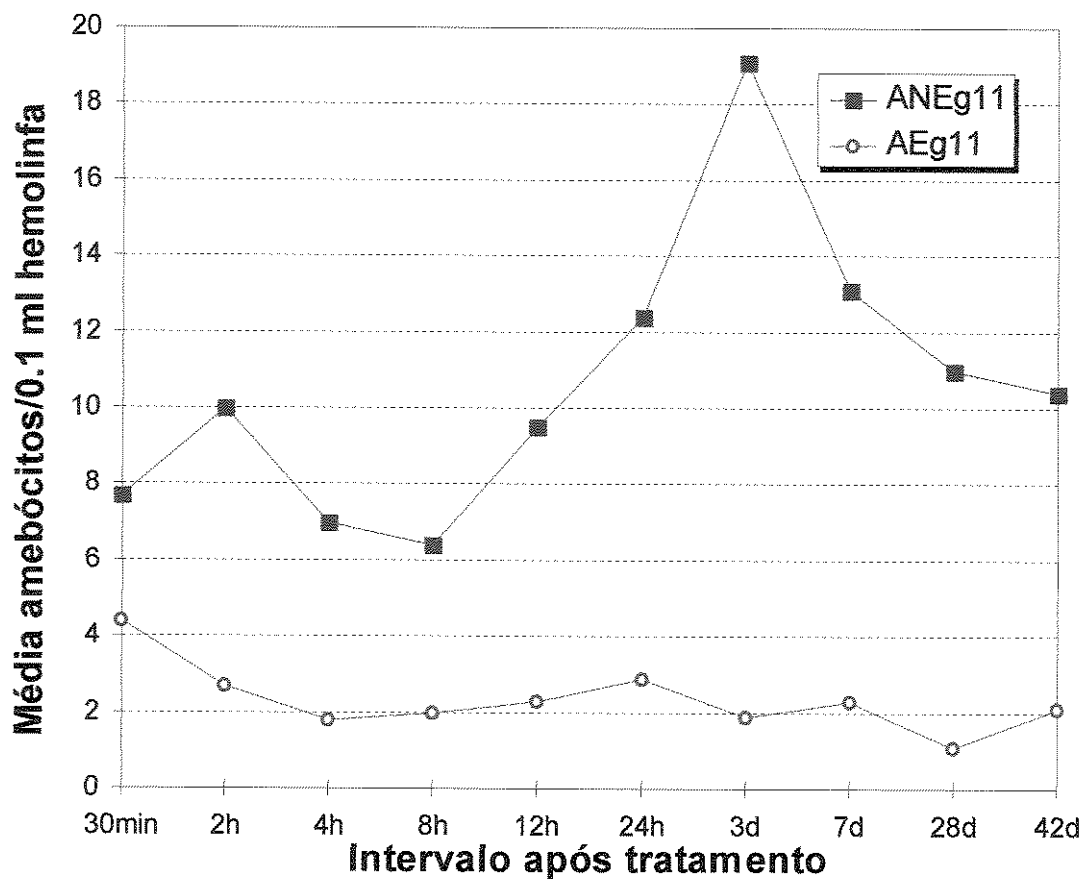
**FIGURA 25** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculada com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostos ao *S. mansoni*, (Grupo 9).  
ANE - amebócitos não estrelados  
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 26** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*, (Grupo 10).

ANE - amebócitos não estrelados

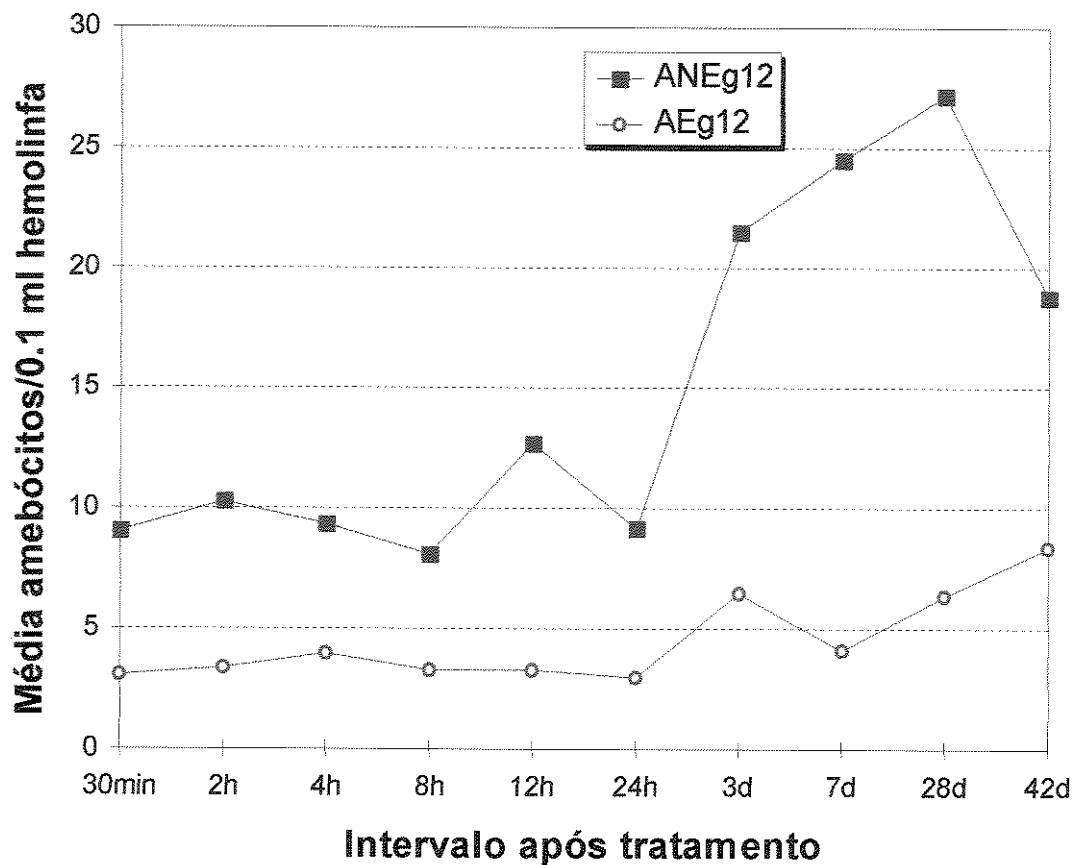
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 27** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados com *S. mansoni*, (Grupo 11).

ANE - amebócitos não estrelados

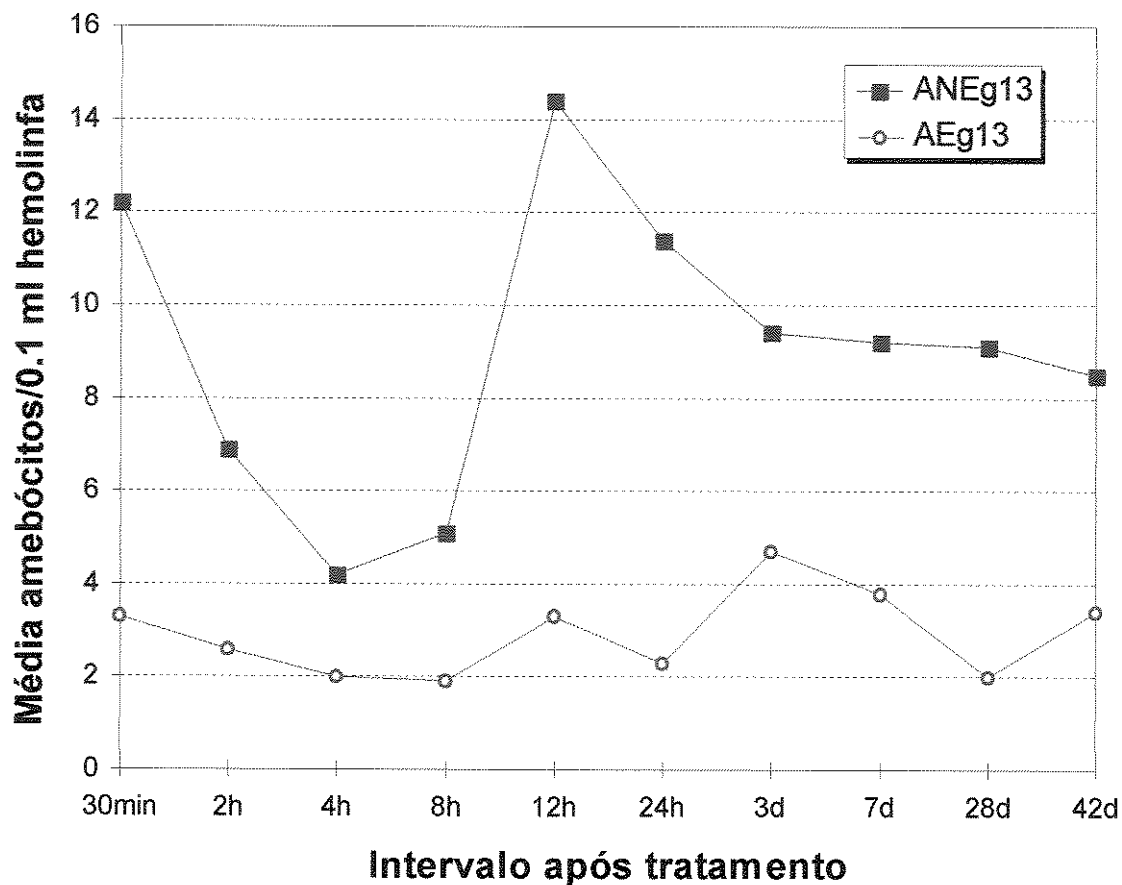
AE - amebócitos estrelados



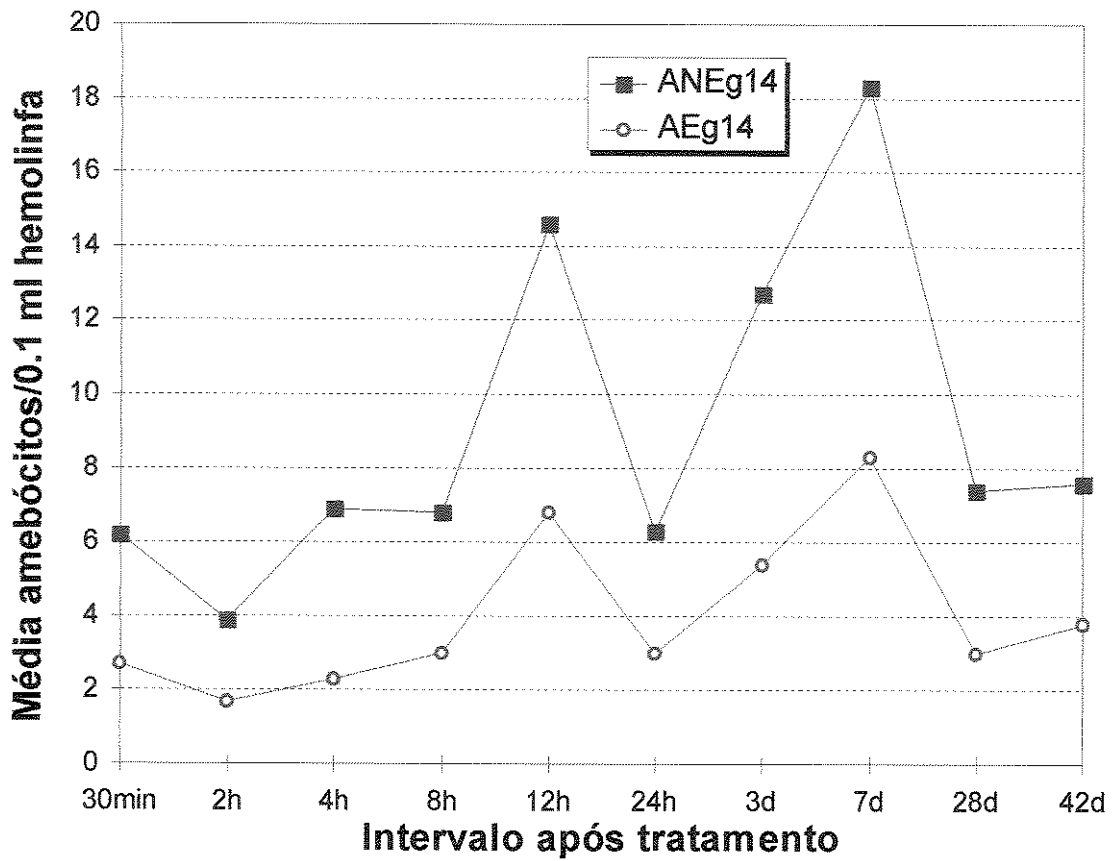
**FIGURA 28** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *Schistosoma mansoni* (Grupo 12).

ANE - amebócitos não estrelados

AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 29** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*, (Grupo 13).  
ANE - amebócitos não estrelados  
AE - amebócitos estrelados



**FIGURA 30** - Variação do número médio de amebócitos em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni*, (Grupo 14).

ANE - amebócitos não estrelados

AE - amebócitos estrelados

## 6 - DISCUSSÃO

Nosso trabalho consistiu na análise da ação da hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados ou não com *S. mansoni*, nos mecanismos de defesa de *B. glabrata* albina que foram receptoras dessa hemolinfa e expostas ao *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente ao inóculo.

Inicialmente, avaliamos o índice de infecção e mortalidade dos moluscos após terem sido inoculados com hemolinfa total, hemolinfa livre de células, tendo sido infectados antes ou após a inoculação. Observamos a evolução da infecção pelo *S. mansoni* nos tecidos dos moluscos *B. glabrata* até 72 horas após infecção. Quantificamos a atividade fagocitária das células da hemolinfa frente à hemáceas de carneiro. Finalmente, quantificamos os amebócitos presentes na hemolinfa circulante desses planorbídeos.

A percentagem de infecção, se analisada isoladamente em relação ao grupo testemunho infectado (g2), mostra que: as taxas de infecção dos moluscos pertencentes aos grupos que receberam inóculo de hemolinfa anterior ou posterior a infecção revelaram diferenças. A suscetibilidade foi significativamente mais elevada nos moluscos do grupo testemunho, em relação aos grupos que receberam hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção, independente da exposição ao *S. mansoni* ter sido anterior ou posterior a inoculação, assim como das *B. glabrata* que receberam hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* anteriormente ou posteriormente a exposição ao *S. mansoni*.



Resultados esperados, pois, não alteramos nenhum fator que pudesse interferir na suscetibilidade dos moluscos utilizados no grupo testemunho. Os fatores que poderiam aumentar ou diminuir a suscetibilidade do molusco, são os fatores genéticos (Richards, (1973), Richards & Merritt 1975), os ajustes fisiológicos, a idade, a linhagem, a carga parasitária, a temperatura e as condições alimentares. Neste trabalho utilizamos moluscos da mesma espécie, linhagem simpátrica de parasita, moluscos com mesmo tamanho, a mesma carga parasitária, e condições ambientes semelhantes.

Os moluscos testemunhas não foram submetidos a nenhum tratamento prévio ou subsequente a exposição ao *S. mansoni*, o que nos leva a afirmar que a alta taxa de infecção foi devida à suscetibilidade do molusco à linhagem BH do parasita.

As *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção (g3, g4, g6 e g7), apresentaram elevada resistência à infecção ao *S. mansoni* independente do período de inóculo da hemolinfa. A hemolinfa inoculada auxiliou o “ajuste” parasita-hospedeiro, proporcionando uma relação mais equilibrada, pois determinou baixa infectividade e não provocou aumento de mortalidade. O fato da hemolinfa ser procedente de moluscos livres de infecção e ser íntegra (total) ou sem células, não alterou os fatores do soro que provavelmente influenciariam o combate ao parasita.

Segundo Renwranz & Cheng (1977a); Schoenberg & Cheng (1980), van der Knaap & Loker (1990), os fatores do soro que provavelmente influenciam o mecanismo de defesa dos moluscos são as lectinas e os polipeptídeos livres. As lectinas que estão presentes no soro da hemolinfa e na superfície dos amebócitos, segundo Mullainadhan & Renwranz (1986), são as responsáveis pela formação

de pontes entre carboidratos da célula ou de partículas estranhas. Essas moléculas, além de serem de reconhecimento no soro, atuam como receptoras e também como opsoninas citofílicas, que aumentam a adesão de partículas estranhas (Renwrantz & Stahmer 1983; van de Knaap & Loker 1990). Os componentes do soro fizeram com que houvesse um combate mais efetivo à infecção. Este combate pode ter sido ampliado pelas lectinas.

No presente estudo, utilizamos apenas moluscos da mesma linhagem suscetível, fato este que, provavelmente, impede o reconhecimento do soro e dos amebócitos inoculados como células “não próprias” pelos amebócitos dos moluscos receptores, por não haver diferenças antigênicas entre os moluscos. Portanto, a hemolinfa inoculada age como um pré-estímulo ou como um estímulo de reforço ao sistema de defesa do molusco receptor.

Em *B. glabrata* inoculada com hemolinfa livre de células de moluscos infectados (g12 e g13), evidenciou-se resistência moderada à infecção por *S. mansoni*. Provavelmente, fatores solúveis presentes na hemolinfa transferida atuaram coadjuvamente com as células do molusco hospedeiro provocando a morte das larvas nos moluscos. Loker et al. (1986), utilizando hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *Echinostoma paraensei*, verificaram “*in vitro*” destruição de esporocistos de *S. mansoni*. Por outro lado, *B. glabrata* que recebeu inóculo de hemolinfa total de moluscos infectados (g9 e g10), não apresentou resistência completa ao parasita. Não provocando resistência, a transferência de hemolinfa total, não alterou a suscetibilidade dos moluscos, o que poderia ter acontecido uma vez que amebócitos presentes na hemolinfa total, foram também transferidos, representando para os moluscos hospedeiros duplo estímulo:

responder às células transferidas e as larvas de *S. mansoni*. Contudo devemos considerar as observações realizadas por Tripp (1961), que evidenciou a capacidade de moluscos rejeitarem tecido heterólogo. A hemolinfa transferida já apresentava-se sensibilizada, anteriormente por *S. mansoni*, o que provavelmente conferiu o caráter “*não próprio*”. Em um trabalho anterior, Reis et al. (1995), onde foram utilizadas *B. tenagophila* submetidas à inoculação de hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni*, foi observada elevada resistência à infecção posterior por *S. mansoni*. Não foi observado este fato em *Biomphalaria glabrata* albina. Estes dados estão de acordo com Allegretti (1994), que utilizando *B. glabrata* melânica, também não verificou resistência à infecção por *S. mansoni*.

Se aliarmos à taxa de infecção a taxa de mortalidade, verificamos que, a transferência de hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção, provoca um menor número de moluscos eliminando cercárias (mecanismo de resistência), e baixa taxa de mortalidade ao longo do período de observação. Nestes casos parece ter havido um melhor ajuste entre parasita e hospedeiro, o que levou a uma relação mais equilibrada.

A taxa de mortalidade das *B. glabrata* que foram apenas receptoras de hemolinfa (controle de inoculação) tiveram o mesmo ritmo, isto é, a mortalidade ocorreu ao longo do período de observação, sem grandes variações indicando que o papel da inoculação não foi o fator causador das mortes. Nos diversos grupos que receberam inóculo de hemolinfa e que foram expostos ao *S. mansoni*, as taxas de mortalidade revelaram-se semelhantes ao grupo controle infectado. As mortes ocorreram no período de eliminação de cercárias, período este que provoca maiores danos no caramujo. Estes danos poderiam ser

consequência da produção de toxinas pelo parasita, da ação mecânica, ou da ação espoliadora.

A avaliação das reações amebocitárias em torno das larvas do parasita estão correlacionadas com o número de esporocistos degenerados e com a taxa de infecção. Verificamos que houve grandes reações teciduais em volta das larvas de *S. mansoni* nas *B. glabrata* que receberam hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção independente da época de inoculação. Houve grande número de esporocistos degenerados assim como alta resistência à infecção. Nas *B. glabrata* que receberam hemolinfa total de moluscos livres de infecção não houve essa mesma correlação.

Segundo Guaraldo et al. (1981), os moluscos *B. glabrata* de BH são considerados muito suscetíveis ao *S.a mansoni*, portanto não se observam intensas reações teciduais em volta da larva. Em nossos estudos, obtivemos resultados semelhantes com relação ao nosso grupo controle infectado, que apresentou alta susceptibilidade e larvas sem reações amebocitárias. Entretanto, quando submetemos *B. glabrata* a inoculação de hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção, mesmo sendo proveniente de *B. glabrata* albina, que é espécie altamente suscetível, ao *S. mansoni*, houve uma resposta imune-celular, mobilizando os amebócitos para os tecidos em torno da larva de *S. mansoni*.

As reações amebocitárias nas *B. glabrata* que receberam inóculo de hemolinfa total de moluscos livres de infecção foram discretas. Apesar dessas reações terem sido discretas em torno das larvas, foram suficientes para impedir o desenvolvimento do trematódeo, originando a alta taxa de resistência observada. Podemos dizer que os mecanismos de combate às larvas de *S. mansoni* ocorreu

principalmente nas primeiras horas pós-infecção pois o número de larvas nos tecidos foi declinando com o passar do tempo. Isto nos leva a pensar que o número de larvas encontradas após 72 horas de infecção seria decorrente da destruição e eliminação destas pelos mecanismos de defesa do molusco.

Estudos vem sendo realizados na tentativa de elucidar quais seriam os caminhos e os mediadores que levariam a degeneração e/ou à eliminação de um corpo estranho, seja um parasita ou qualquer material reconhecido como "*non self*".

Os amebócitos dos moluscos possuem um extenso sistema lisossomal que cliva o material ingerido (Cheng 1975). Segundo Cheng & Mohandas (1985), os amebócitos, principalmente os granulócitos, chamados em nosso trabalho de "estrelados", representam o maior sítio de enzimas lisossomais. Tais enzimas hidrolíticas consistem de fosfatases ácidas e alcalinas, lisosimas e esterases não específicas, que são estocadas em grânulos citoplasmáticos, nos lisossomos (Sminia & van der Knaap 1987). As funções dessas enzimas seriam provavelmente a morte e a lise dos materiais estranhos; embora até então não tenha havido uma evidência experimental, alguns resultados, tais como os que demonstram a liberação do conteúdo dos grânulos nos fagossomos após a endocitose, sugerem fortemente essa possibilidade (Foley & Cheng 1977; Monroy & Loker 1993). Além disso, foi verificado que o pH nos fagossomos de *Mytillus edulis* e correspondente ao pH ótimo para a ativação das enzimas lisossomais (Dageford et al., 1986).

Segundo Cheng (1983a, b), o processo de degranulação ocorreria através de uma sinalização via membrana, e existiriam pelo menos 3 sítios nos quais os antígenos poderiam ser reconhecidos: a membrana celular; a membrana nuclear e as membranas lisossomais.

O processo teria seu início quando um sinal químico, tal como uma molécula associada à superfície de uma bactéria, se ligar com o sítio de reconhecimento da membrana celular, enviando um mensageiro para transmissão no citoplasma. Começariam então os eventos intranucleares, que levariam a síntese de enzimas lisossomais nos ribossomos na sequência DNA-mRnA-tRnA. Ativação das membranas lisossomais levariam à migração dos lisossomos à superfície celular e posterior a extrusão de grânulos.

Muitos trabalhos relatam a produção das formas reativas de oxigênio pelas células sanguíneas dos moluscos. Segundo Dikkeboon et al. (1988), a liberação de metabólitos de oxigênio pode ser um mecanismo pelo qual às células sanguíneas de caramujos matam parasitas. Uma falha dos amebócitos em produzir metabólitos poderia ser um dos fatores, que determinam a suscetibilidade a um digenético. Schozawa (1986), demonstrou a produção de superóxido por amebócitos de moluscos *Biomphalaria glabrata*. O mesmo foi verificado no caramujo *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboon et al. 1987). Fica claro com trabalhos já realizados com *L. stagnalis*, *B. glabrata*, *Planorbarius corneus* e *Helix aspersa* que as células produzem formas reativas de oxigênio após estímulo com material estranho (Dikkeboom et al. 1987; Schozawa 1986; Nakamura et al. 1985).

As *B. glabrata* que receberam inóculo de hemolinfa total e sem células de moluscos infectados por *S. mansoni*, apresentaram um número moderado de esporocistos degenerados (média de 50%). Contudo nestes moluscos observamos esporocistos integros ou em início de degeneração com pequena ou nenhuma reação amebocitária. Neste caso os amebócitos podem ter combatido o parasita a distância. A mobilização dos amebócitos não foi totalmente eficiente para impedir o desenvolvimento do parasita pois a taxa de infecção foi moderada.

Sabe-se que além da citotoxicidade mediada por células, os moluscos possuem resposta humoral à elementos não próprios. Os amebócitos produzem fatores plasmáticos, sua secreção e liberação não é um processo contínuo, e dependente da presença do material estranho (Sminia & van der Knaap, 1987). Balan et al. (1993), observaram que a destruição de organismos estranhos pode ocorrer com ou sem a presença de reação amebocitária em torno da larva de *S. mansoni*, sugerindo a participação de componentes humorais possivelmente liberação de substâncias citotóxicas. Bayne et al. (1980), verificaram que os esporocistos em contato com o plasma de caramujos resistentes e suscetíveis permanecem vivos durante o tempo em que os amebócitos estão ausentes. Podemos evidenciar então que o mecanismo celular-humoral são dependentes, isto é, só a presença de células não é o suficiente para eliminar o parasita (Allegretti 1994), assim como só o plasma (soro) também não o elimina.

O índice de fagocitose a eritrócitos de carneiro nas *B. glabrata* albinas mostrou-se praticamente igual em todos os grupos experimentais, com exceção das *B. glabrata* que foram inoculadas com hemolinfa sem células, que aos 30 minutos após a infecção apresentaram uma elevação significativa.

Os mecanismos de destruição por fagocitose ou por agregados de células ainda não estão bem esclarecidos. Bayne (1990), demonstrou haver diferença na atividade de fagocitose quando os esporocistos foram incubados com amebócitos de linhagem resistente e de linhagem suscetível. Quando a linhagem foi de molusco suscetível, a atividade de fagocitose diminuía, e quando foi de cepa resistente a atividade de fagocitose aumentava. Quando se colocava hemolinfa livre de células (independente de ser de molusco resistente

ou suscetível) para ser incubada com amebócitos, nenhuma alteração acontecia na atividade fagocitária em *B. glabrata*.

A atividade de fagocitose dos amebócitos pode ser influenciada pela temperatura e pH (Foley & Cheng 1975) pela presença de cálcio (Zelck & Becker 1992), mas em nossos experimentos estas condições foram mantidas constantes.

Apesar do índice de fagocitose ser relativamente baixo, os amebócitos de *B. glabrata* albina receptora de hemolinfa total ou sem célula de moluscos infectados ou não por *S. mansoni*, apresentaram índices suficientes para impedir o desenvolvimetro do trematódeo, uma vez que nestes grupos experimentais a taxa de infecção foi baixa. A inoculação somente dos componentes do soro poderia ter inibido o combate efetivo à infecção. Tal fato parece não ter ocorrido, pois substâncias solúveis (lectinas e polipeptídeos) na hemolinfa livre de células parecem ter auxiliado o processo de opsonização feito pelas células. Segundo Loker & Bayne (1982), esporocistos pré-incubados com hemolinfa de caramujos suscetíveis perdem sua proteção contra a ação dos amebócitos de caramujos resistentes, sugerindo que antígenos adquiridos pelos esporocistos não impedem o reconhecimento pelas células do hospedeiro. Couch et al. (1990), sugerem que as linhagens suscetíveis são provavelmente heterogênicas, e que essas linhagens suscetíveis mantidas em laboratório podem ao longo do tempo sofrerem diferenciação genéticas. Por isso, achamos que a linhagem utilizada por nós tenha sofrido alguma alteração genética, uma vez que (Allegretti 1991), verificou que *B. glabrata* albina mantida em laboratório, apresentou-se menos suscetível que a *B. glabrata* melânica também mantida em laboratório, a menos tempo que a albina. Entretanto os resultados obtidos neste estudo são relevantes uma vez que o grupo controle



utilizado apresentou resultados altamente significativos em relação ao demais grupos experimentais.

O comportamento cinético das células circulantes nas *B. glabrata* albinas inoculadas com hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção, apresentaram um comportamento distinto para amebócitos não estrelados e estrelados, com relação a época de inoculação, pois nos grupos que receberam hemolinfa total (g3 e g4) os amebócitos estrelados mostraram -se em maior número quando a inoculação foi posterior a exposição ao *S. mansoni* (g4). Esta ocorrência está correlacionada ao fato dos moluscos terem sido primeiramente sensibilizados pelo parasita. Entretanto nas *B. glabrata* que foram receptoras de hemolinfa sem células (g6 e g7) os amebócitos estrelados mostraram-se em maior número no grupo em que a inoculação antecedeu a exposição ao parasita (g6). Neste caso podemos dizer que a elevação deveu-se à inoculação de hemolinfa e não à infecção pelo parasita, pois ao compararmos com o grupo apenas inoculado com hemolinfa (g5), a variação cinética dos amebócitos foi semelhante.

Os grupos que apresentaram maior número de amebócitos estrelados (g4 e g6), possuíam em comum o tipo de hemolinfa inoculada (de moluscos livres de infecção). Entretanto, quando analisamos o efeito células da hemolinfa (com ou sem célula) constatamos que são os amebócitos não estrelados que apresentaram modificações significativas quanto a sua frequência no grupo que recebeu hemolinfa total (g4). Se aliarmos a baixa taxa de infecção, o elevado número de esporocistos degenerados e as intensas reações teciduais, podemos entender as alterações ocorridas no comportamento cinético dos amebócitos estrelados (número reduzido

na circulação). Estas células podem ter migrado para os tecidos, onde teriam ido combater as larvas de *S. mansoni*, que apresentavam-se envolvidas por intensas reações amebocitárias, que teria originado um elevado número de esporocistos degenerados e conseqüentemente uma taxa de infecção extremamente baixa.

As *B. glabrata* que receberam o inóculo de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados (g9, g10, g11, g12 e g13), apresentaram um comportamento cinético bastante peculiar. Observamos que em nenhum intervalo os amebócitos estrelados superaram em número os amebócitos não estrelados. Estes grupos acima referidos tiveram em comum o tipo de inóculo (hemolinfa de moluscos parasitados). Ao analisarmos as reações teciduais, estas mostraram-se discretas em torno das larvas do parasita, conseqüentemente o número de esporocistos degenerados foi moderado e as taxas de infecção também mostraram-se relativamente altas. Esperávamos que a transferência passiva da hemolinfa de moluscos sucetíveis sensibilizados pela infecção por *S. mansoni* fosse proteger as *B. glabrata* da infecção, pois em estudo anterior com *B. tenagophila* tal fato ocorreu (Reis et al. 1995). Loker et al. (1986), utilizando hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *E. paraensi*, verificaram "in vitro" a destruição de esporocistos de *S. mansoni*. Granath & Yoshino (1984), observaram "in vivo" que moluscos albinos suscetíveis, inoculados com hemolinfa de moluscos resistentes, propiciou proteção de 60% à infecção por *S. mansoni*.

Verificamos que a hemolinfa total de moluscos livres de infecção sensibilizou mais do que a hemolinfa total de moluscos infectados, tendo em vista que as taxas de infecção dos grupos 3 e 4 foram menores do que as dos grupos 9 e 10. As reações teciduais também apresentaram-se mais intensas, indicando um melhor

reconhecimento do parasita. Este resultado sugere que a inoculação de hemolinfa total de moluscos infectados não tenha realmente sensibilizado as *B. glabrata*, pois nessa hemolinfa inoculada poderia haver resíduos de substâncias provenientes da infecção sofrida anteriormente pelos moluscos doadores. Estas substâncias (antígenos) poderiam inibir o sistema de defesa do moluscos receptor. A hemolinfa sem células, proveniente de moluscos livres de infecção parece possuir algum fator que ocasiona uma maior sensibilização nas *B. glabrata*, fazendo com que ocorra uma variação significativa do número de amebócitos não estrelados. O fato da hemolinfa inoculada ser proveniente de moluscos livres de infecção parece ser um caráter determinante para manter a integridade dos tecidos dos moluscos, impedindo a difusão de produtos tóxicos oriundo do parasita, prolongando assim a vida do hospedeiro.

A variação do comportamento cinético dos amebócitos em moluscos pode ser influenciado por vários estímulos, como presença de parasitas ou de material estranho (Cheng 1987, van der Knaap et al. 1987; Sminia & van der Knaap 1987; Moukassa & Jourdane 1990). Nossos resultados estão em conformidade com os obtidos por esses autores.

Quando o trematódeo e o molusco são incompatíveis a variação do número de amebócitos cai na circulação. O trematódeo é reconhecido como estranho e eliminado. Entretanto, quando o parasita e o molusco são compatíveis, verifica-se um aumento dos amebócitos circulantes, observa-se o reconhecimento do parasita como estranho, porém não ocorre sua eliminação (Files & Cram 1949; Newton, 1952; Pan 1963; Abdul-Salam & Michelson 1980 b).

Em nosso estudo, verificou-se elevação do número de células circulantes, tendo havido o reconhecimento do parasita como estranho,

e o seu envolvimento pelas células da hemolinfa, havendo reação de encapsulamento pelos amebócitos. A eliminação não foi total, mas se mostrou bastante eficiente.

Nossos resultados mostram que os diferentes inóculos (hemolinfa total, hemolinfa sem células), assim como a procedência da hemolinfa (moluscos infectados ou não), conferiram graus de resistência diferentes para os moluscos: as *B. glabrata* albinas inoculadas com hemolinfa total de moluscos infectados apresentaram uma resistência baixa à infecção e esporocistos com pouca ou nenhuma reação amebocitária; as *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa sem células de moluscos infectados apresentaram uma resistência média e as reações amebocitárias e a fagocitose foram discretas. Podemos dizer que a inoculação de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados, não conferiu proteção total ao *S. mansoni*, mas atuou retardando seu desenvolvimento.

As *B. glabrata* que receberam inóculo de hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção, conferiram um alto grau de resistência ao desenvolvimento do *S. mansoni*. Pudemos constatar neste trabalho que as células foram a principal linha de defesa das *B. glabrata* albinas no combate às larvas de *S. mansoni*.

Nos moluscos inoculados com hemolinfa de moluscos livres de infecção parece ter havido ação de componentes do soro inoculado.

## 7- CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os ensaios experimentais, podemos concluir:

1) Moluscos *B. glabrata* albinos que receberam hemolinfa total ou sem células de moluscos livres de infecção, anterior ou posterior à exposição ao *S. mansoni*, apresentaram elevada resistência à infecção por *S. mansoni*.

2) Moluscos *B. glabrata* albinos inoculados com hemolinfa sem células de moluscos livres de infecção independente da inoculação anterior ou posteriormente à exposição ao *S. mansoni*, apresentaram um número elevado de esporocistos degenerados com intensa reação amebocitária.

3) Moluscos *B. glabrata* albinos que receberam hemolinfa sem células de moluscos infectados com *S. mansoni* independente da inoculação anterior ou posterior a exposição ao *S. mansoni*, apresentaram moderada resistência ao *S. mansoni*.

4) As reações amebocitárias foram discretas em *B. glabrata* inoculadas com hemolinfa total ou sem células proveniente de moluscos infectados, independente da época da inoculação.

5) A inoculação de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados ou não, determinou uma atividade fagocitária moderada em *B. glabrata* albina.

6) Em *B. glabrata* albina que receberam inóculo de hemolinfa total ou sem células de moluscos infectados, o número de amebócitos não estrelados foi superior aos dos amebócitos estrelados.

7) A mortalidade dos moluscos deu-se na época de eliminação de cercárias.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Salam, J.M. & Michelson, E.H. Biomphalaria glabrata assay of factors influencing in vitro phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.** **36**:52-9, 1980a.
- Abdul-Salam, J.M & Michelson, E.H. Biomphalaria glabrata amoebocytes: Effect of Schistosoma mansoni infection on in vitro phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.** **35**:241-47, 1980b.
- Allegretti, S.M. Comportamento de Biomphalaria glabrata variantes albina e Melânica frente à infecção por Schistosoma mansoni. Campinas. Tese (mestrado).- Unicamp. Instituto de Biologia, 1991.
- Allegretti, S.M. Estudo da ação dos componentes celulares e não celulares da hemolinfa de Biomphalaria glabrata melânica na infecção por Schistosoma mansoni. Campinas Tese (Doutoramento) - Unicamp. Instituto de Biologia, 1994.
- Babior, B. M. Oxygen-dependent killing by phagocytes. **New England J. Med.** **298**(12):659-68, 1978.
- Balan, D.S.L. Aspectos imunológicos e parasitológicos em Biomphalaria tengophila (Orbigny, 1835) infectadas por Schistosoma mansoni. **Rev. Saúde Publ. São Paulo.** **27**(6):421-29, 1993.
- Bayne, C.J. Phagocytosis and non self recognition in invertebrates. **BioScience** **40**(10):723-31, 1990.
- Bayne, C.J.; Loker, E.S. & Yui, M.A.. Interactions between the plasma proteins of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) and the sporocyst tegment of Schistosoma mansoni (Trematode). **Parasitology.** **92**:653-64, 1986.
- Bayne, C. J.; Buckley, P.M. & Dewan. Schistosoma mansoni: Citotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant Biomphalaria glabrata. **Exp./ Parasitol.** **50**:409-16, 1980.

- Bird, G.W.G. Invertebrate agglutinins in general. **Ann. NY Acad Sci.** **234**(19):51-54, 1974.
- Boswell, C.A. & Bayne, C.J. Isolation, characterization and functional assessment of a hemagglutinin from the plasma of Biomphalaria glabrata intermediate host of Schistosoma mansoni. **Dev. Comp. Immunol.** **8**:559-68, 1984.
- Bride, M.; Barre, P. & Griffond, B. Fibronectin and ovotests development in the snail Helix aspersa: comparative immunology. **Dev. Comp. Immunol.** **10**:177-122, 1986.
- Carter, O.S.; Bogitsh, B.J. Histologic and cytochemical observations of the effects of Schistosoma mansoni on Biomphalaria glabrata. **Ann. NY Acad. Sci.** **266**:380-93, 1975.
- Cheng, T. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. **Ann. NY Acad. Sci.** **266**:343-79, 1975.
- Cheng, T.C. Internal defence mechanisms of mollusca against invading microorganisms. **Trans. Amer. Microsc. Soc.** **102**:185-93, 1983a.
- Cheng, T.C. The role of lysosomes in molluscan inflammation. **Amer. Zool.** **23**:129-44, 1983b.
- Cheng, T.C. Some cellular mechanism governing self and nonself recognition and pathogenicity in vertebrates and invertebrates relative to protistan parasites. **Aquaculture** **67**:1-14, 1987.
- Cheng, T. & Yoshino, T.P. Lipase activity in the hemolymph of biomphalaria glabrata (mollusca) challenged with bacterial lipids. **J. Invertebr. Pathol.** **28**:143-46, 1976a.
- Cheng, T.C. & Yoshino, T.P. Lipase activity in the hemolymph of Biomphalaria glabrata (Mollusca) challenged with bacterial lipids. **J. Invert. Pathol.** **28**:143-46, 1976b.
- Cheng, T. & Auld, K.R. Hemocytes on the pulmonate Gastropod Biomphalaria glabrata. **J. Invertebr. Pathol.** **30**:119-22, 1977.



- Cheng, T.C. & Butler, M.S. Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in the hemolymph of Biomphalaria glabrata (Mollusca). **J. Invertebr. Pathol.**, **34**:119-29, 1979.
- Cheng, T.C. & Mohandas, A. Effect of high dosages of bacterial challenge on acid phosphatase release from Biomphalaria glabrata hemocytes. **J. Invertebr. Pathol.** **45**:236-41, 1985.
- Couch, L.; Hertel, L.A. & Loker, E.S. Humoral responses of the snail Biomphalaria glabrata to trematode infection: Observation on a circulations hemagglutinin. **J. of Exp. Zoo.** **255**:340-49, 1990.
- Csizmas, L. Preparation of formalinized eritrocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **103**:17, 1960.
- Dageford, S.; Kroschinsky, J. & Renwranz, L. Enzymes of Mytillus edulis hemocytes and pH inside the digestive vacuoles. **Dev. Comp. Immunol.** 1986.
- Dias, L.C.S.; Ueta, M.T. & Guaraldo, A.M.A. Suscetibilidade de Biomphalaria glabrata, Biomphalaria straminea e Biomphalaria tengophila a diferentes cepas de Schistosoma mansoni. **Rev. Inst. Med Trop. São Paulo.** **29**(4):205-12, 1987.
- Dikkeboom, R.; Bayne, C.J.; van der Knaap, W.P.W. & Tijnagel, J.M.G.H. Possible role of reactive forms of oxygen *in vitro* killing of Schistosoma mansoni sporocysts by hemocyte of Lymnaea stagnalis. **Parasitol. Res.** **75**:148-54, 1988.
- Dikkeboom, R.; Tijnagel, J.m.G.H.; Mulder, E.C. & van der Knaap, W.P.W. Hemocytes of the pond sanil Lymnaea stagnalis generate reactive forms of oxygen. **J. Invertebr. Pathol.** **49**:321-31, 1987.
- Files, V.S. & Cram, E.B. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of Schistosoma mansoni. **J. Parasitol.** **35**:55-60, 1949.
- Fisher, P.H. Vie et morts des mollusques. **Parist. Payot.** **312**, 1950.
- Foley, D.A. & Cheng, T.C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the Pelecypods Crassostrea virginica and Mercenaria mercenaria. **J. Invertebr. Pathol.** **25**, 189-97, 1975.

- Foley, D.A. & Cheng, T.C. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.** **29**:321-5, 1977.
- Fridowick, I. The biology of oxygen radicals. **Science** **169**:875-79, 1978.
- Fryer, S.E.; Hull, C.J. & Bayne, C. J. Phagocytosis of yeast by Biomphalaria glabrata: Carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. **Dev. Comp. Immunol.** **13**:9-16, 1989.
- Fryer, S. E. & Bayne, C.J. Schistosoma mansoni modulation of phagocytosis in Biomphalaria glabrata. **J. Parasitol.** **76**:45-52, 1990.
- Gabriel, K.R. A sample method of multiple comparisons of means. **J. Am. Statist. Assoc.** **73**:364, 1978.
- Granath, W.O. & Yoshino, T.S. Schistosoma mansoni: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, Biomphalaria glabrata. **Exp. Parasitol.** **58**:188-193, 1984.
- Guaraldo, A.M.A.; Magalhães, L.A.; Rangel, H.A. & Pareja, G. Evolução dos esporocistos de Schistosoma mansoni Sambon, 1907 em Biomphalaria glabrata (Say, 1818) e Biomphalaria tengophila (B'Orbigny, 1835). **Rev. Saúde Publ. São Paulo.** **15**:436-48, 1981.
- Harris, K.R. The fine structure of encapsulation in Biomphalaria glabrata. **Ann. Acad. NY. Scien.** **266**:437-63, 1975.
- Hertel, L.A.; Stricker, S.A.; Monroy, F.P.; Wilson, W.D & Loker, E.S. Biomphalaria glabrata hemolymph lectins: binding to bacteria mammalian erythrocytes, and sporocysts and rediae of Echinostoma paraensei. **J. Invertebr. Pathol.** **64**:52-61, 1994.
- Hoffman, W.Q.; Pons, J.A. & Janer, J.L. The sedimentation concentration method in Schistosoma mansoni. **P.R.J. Publ. Health Trop. Med.** **9**(3): 281-91, 1934.
- Jeong, K.H.; Lie, K.J. & Heyneman, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in Biomphalaria glabrata. **Dev. Comp. Immunol.** **7**:217-28, 1983.

- Joky, A. & Matricon-Gondran, M. Response to the amebocyte-producing organ of sensitized Biomphalaria glabrata after exposure to E. caproni miracidia. **J. Invertebr. Pathol.** **45**(28):28-33, 1985.
- Joky, A.; Matricon-Gondran, M. & Benex, J. response to the amoebocyte-production organ of sensitized Biomphalaria glabrata after exposure to Echinostoma caproni miracidia. **J. Invertebr. Pathol.** **45**:28-33, 1985.
- Kock, C. & Nielsen, H.E. Activation of vertebrate complement by Helix pomatia hemolymph. **Dev. Comp. Immunol.** **8**:15-19, 1984.
- Lie, K.J. & Heyneman, D. Studies on resistance in snail: A specific tissue reaction to Echinostoma lindoense in Biomphalaria glabrata snails. **J. Parasitol.** **5**:621-26, 1975.
- Lie, K.L. ; Heyneman, D. & Richards, C. S. Studies on resistance in snail: Interference by nonirradiated Echinostoma larvae with natural resistance to Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. **J. Invertebr. Pathol.** **29**:118-25, 1977.
- Lie, K.J.; Jeong, K.H. & Heyneman, D. Tissue reactions induced by Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **74**:157-66, 1980.
- Liebsch, M.G. & Becker, W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail Biomphalaria glabrata influence of starvation and infection with trematode Schistosoma mansoni. **J. Comp. Physiol.** **166**:41-50, 1990.
- Loker, E.S. & Bayne, C.J. *In vitro* encounters between Schistosoma mansoni primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of Biomphalaria glabrata. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **35**(5), 1982.
- Loker, E.S.; Bayne, C.J. & Yui, M. A. Echinostoma paraensei: Hemocytes of Biomphalaria glabrata as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to Schistosoma mansoni. **Exp. Parasitol.** **62**:149-154, 1986.

- Loker, E.S. & Hertel, L.A. Alterations in Biomphalaria glabrata plasma induced by infection with the digenetic trematode Echinostoma paraensei. **J. Parasitol.** **73**(3):503-13, 1987.
- Loverd, P.T.; Gherson, J. & Richards, C.S. Reaction against self in an invertebrate? **J. Invertebr. Pathol.** **39**:247-49, 1982.
- Magalhães, L.A. & Carvalho, J.F. Sobre o comportamento de duas linhagens de Schistosoma mansoni (Sambon) de estudo quantitativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **10**:169, 1976.
- Matricon-Gondran, M.; Joky, A. & Benex, J. Responses of the amebocytes producing organ (APO) in Biomphalaria glabrata susceptible or resistant to trematode invasion: an ultrastructural study. **Dev. Comp. Immunol.** **12**:509-520, 1986.
- Michelson, E.H. Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically important snails. **J. Parasitol.** **52**(3):466-72, 1966.
- Michelson, E. H. & Dubois, L. Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae: A survey of Hemolymph egg-masses and albumen-gland extracts. **Biol. Bull.** **153**:219-17, 1977.
- Monroy, F.G.; Hertel, L.A. & Loker, E.S. Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod Biomphalaria glabrata: effects of strain and trematode infection. **Dev. Comp. Immunol.** **16**:355-66, 1992.
- Monroy, F.P. & Loker, E.S. Production of heterogeneous carbohydrate-binding proteins by the host snail Biomphalaria glabrata following exposure to Echinostoma paraensei and Schistosoma mansoni. **J. Parasitol.** **79**(3):416-23, 1993.
- Moukassa, J.B. & Jourdane, J. Dynamic of the leucocytic response of Biomphalaria glabrata during the laval development of Schistosoma mansoni and Echinostoma liei. **J. Invertebr. Pathol.** **55**:306-11, 1990.
- Mullainadhan, P. & Renwanz, L. Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel Mytilus edulis. **Immunobiol.** **171**:263-73, 1986.

- Muller, W.E.G. Int. Rev. Cytol., 1956 *apud* Ratchiffe, N.A.; Rowley, A.F.; Fitzgrald, S.W. & Rhodes, C.P. Invertebrate Immunity: Basic concepts and recent advances. **International review of Cytology**. **97**:183-351, 1985.
- Nakamura, M.; Mori, K.; Inooka, S. & Nomura, T. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop Patinopctin yessoensis (Jay). **Dev. Comp. Immunol.** **9**:407-17, 1985.
- Nathan, C.F.; Murray, H.W. & Cohn, Z. A. The macrophage as an effector cell. **The New England J. Med.** **303**(11):622-26, 1980.
- Newton, W.L. The comparative tissue reaction of two strain of Australorbis glabratus to infection with Schistosoma mansoni. **J. Parasitol.** **38**:362-6, 1952.
- Newton, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus. **Exp. Parasitol.** **2**:242-57, 1953.
- Niemann, G.H. & Lewis, F. A. Schistosoma mansoni: Influence of Biomphalaria glabrata size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. **Exp. Parasitol.** **70**:286-92, 1990.
- Noda, S. & Loker, E.S. Effects of infection with Echinostoma paraensei on the circulating haemocyte population of the host snail Biomphalaria glabrata. **Parasitology** **98**:35-41, 1989.
- Ottaviani, E. The blood cells of the freshwater snail Planorbis corneus ((L.) (Gastropoda, Pulmonata)) **Dev. Comp. Immunol.** **7**:209-16, 1983.
- Ottaviani, E. & Franchini, A. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail Planorbis corneus (L.) (Gastropoda, Pulmonata) **Acta Zoo.** **69**(3):157-62, 1988.
- Pan, C.T. The general histology and topographic microanatomy of Australorbis glabratus. **Bull. Mus. Comp. Zoo.** **199**:237-99, 1958.
- Pan, C.T. Generalized and focal tissue responses in the snail Australorbis glabratus, infected with Schistosoma mansoni. **Ann. NY. Acad. Sci.** **133**:475-76, 1963.

- Paraense, W.L. Histórico. **Rev. Bras. Malario. Doenças Trop.** II(2-3):105-17, 1959.
- Paraense, W.L. & Corrêa, L.R. Variation in susceptibility of populations of Australorbis glabratus to a strain of Schistosoma mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 5:15-22, 1963.
- Paraense, W.L. & Corrêa, L.R. Differential susceptibility of Biomphalaria tenagophila populations to infection with a strain of Schistosoma mansoni. **J. Parasitol.** 64:822, 1978.
- Pellegrino, J. & Macedo, D.G. A simplified method for the concentration of cercárias. **J. Parasit.**, 41:329, 1955.
- Prowse, R.H. & Tait, N.N. *In vitro* phagocytosis by amebocytes from the haemolymph of Helix aspersa (Muller). **Immunology.** 17:437-43, 1969.
- Ratcliffe, N.A. Invertebrate Immunity - A Primer for the non-specialist (review). **Immunology lett.** 10:253-70, 1985.
- Reis, S.M.P.M, Magalhães, L.A. & Carvalho, J.F. Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835). **Rev. Saúde Publ. São Paulo** 29(4):259-64, 1995.
- Renwranz, L & Cheng, T.C. Agglutinin receptors attachment of erythrocytes to hemocytes of Helix pomatia. **J. Invertebr. Pathol.** 29:88-96, 1977a.
- Renwranz, L.R. & Cheng, T.C. Identification of agglutinin receptors on hemocytes of Helix pomatia. **J. Invertebr. Pathol.** 29:97-100 1977b.
- Renwranz, L. & Stahmer, A. Opsonizing properties of isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from Mytilus edulis. **J. Comp. Physiol.** 149:535-46, 1983.
- Richards, C. S. Susceptibility of adult Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 22(6): 748-56, 1973.

- Richards, C.S. & Merritt, J.W.Jr. Genetic in the susceptibility of juvenile Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. **American J. Tropical Med Hyg.** **21**(4):425-34, 1975.
- Ryan, T.A. Multiple comparisons in psychological research. **Psychol. Buul.** **56**:26, 1959.
- Santana, J.V. Mecanismo de defesa em Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria glabrata frente ao Schistosoma mansoni. Campinas Tese (Doutoramento) Unicamp - Instituto de Biologia, 1990.
- Santana, J.V.; Magalhães, L.A. & Rangel, H.A. Selação de linhagens de Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria glabrata visando maior suscetibilidade ao Schistosoma mansoni. **Rev. Saúde Publ. São Paulo.** **12**:67-77, 1978.
- Schoenberg, D.A. & Cheng, T.C. Lectin biding specificities of hemocytes from two strains of Biomphalaria glabrata as determined by microhemadorption assays. **Dev. Comp. Immunol.** **9**:497-509, 1980.
- Schozawa, A. C.; Suto, & Kumada, N. Superoxide production by haemocytes of the fresh-water snail, Biomphalaria glabrata, stimulated by miracidia of Schistosoma mansoni. **Zool. Scien.** **6**:1019-22, 1986.
- Sminia, T. Structure and function of bloode and conective tissue cells of the fresh-water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by the electrons micoscopy and enzyme histochemistry. **Z. Zellforch.** **134**97-526, 1972.
- Sminia, T.; van der Knaap, W.P.W. & Edelen-Bosch, P. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail, Lymnaea stagnalis. **Dev. Comp. Immunol.** **3**:37-44, 1979.
- Sminia, T. & van der Knaap, W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology. **Dev. Comp. Immunol.** **11**:17-28, 1987.
- Sminia, T.; Winsemius, A. & vander Knaap, W.P.W. Recognition of foreignness by blood cells of the freshwater snail Lymnaea stagnalis with special refence to the role and structure of the cell coat. **J. Invertebr. Pathol.** **38**:175-83, 1981.

- Smith, A.C. A precipitin for human serum proteins as released under stress by a marine invertebrate the marsh snail Littorina irrorata. **Dev. Comp. Immunol.** 8:273-276, 1984.
- Standen, O.D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of Schistosoma mansoni. **Trans. Royal Soc. Trop. Med Hyg.** 45(2):221-41, 1951.
- Stanislawski, E.; Renwanz, L. & Becker, W. Soluble blood group reactive substance in the hemolymph of Biomphalaria glabrata (Mollusca). **J. Invertebr. Pathol.** 28:301-08, 1976.
- Stein, P.C. & Bach, P.F. Purification and Binding properties of hemagglutinin from Biomphalaria glabrata. **J. Invertebr. Pathol.** 33:10-18, 1979.
- Sullivan, J.T.; Cheng, T.C. & Howland, K.H. Mitotic responses of the anterior pericardial wall of Biomphalaria glabrata (Mollusca) subjected to challenge. **J. Invertebr. Pathol.** 44:144-116, 1984.
- Tripp, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail Australorbis glabratus. **J. Parasitol.** 47:747-51, 1961.
- Uchikawa, R. & Loker, E.S. Echinostoma paraensei and Schistosoma mansoni: adherence of unaltered or modified latex beads to hemocytes of the host snail Biomphalaria glabrata. **Exp. Parasitol.** 75:223-32, 1992.
- van der Knaap, W.P.W.; Meuleman, E.A & Sminia, T. Alterations in the internal defence system of the pond snail Lymnaea stagnalis induced by infection with the schistosome Trichobilharzia ocellata. **Parasitol. Res.** 73:57-65, 1987.
- van der Knaap, W.P.W. & Loker, E.S. Immune Mechanism in trematode-snail interactions. **Parasitol. Today.** 6(6):175-82, 1990.
- Zanotti-Magalhães, E.M.; Magalhães, L.A.; Carvalho, J.F. & Rangel, H.A. Relação entre a susceptibilidade de planorbídeos à infecção por Schistosoma mansoni e a nocividade produzida pelo trematódeo em camundongos. Resumo do "International Symposium on Schistosomiasis". Rio de Janeiro, pag. 118, 1987.



Wagge, L.E. Amoebocytes. **Cytology**. **IV**:31-78, 1955.

Welsch, R.E. Stepwise multiple comparisons procedure. **J. Am. Statist. Assoc.** **72**:359, 1977.

Zelck, U. & Becker, W. Biomphalaria glabrata: influence of calcium, lectins, and plasma factors *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or Schistosoma mansoni infected snails. **Exp. Parasitol.** **75**:126-36, 1992.

**Anexo Estatístico**  
**TABELAS-RESUMO DO SAS**

## ANEXO I

### a) Análise de mortalidade e infecção

Grupos	Mortalidade		Infecção	
		P		P
2	0,29	p>0.05	0,18	p<0,0001
2 X 3	0,32	p>0.05	0,31	p<0,0001
2 X 4	0,30	p>0.05	0,28	p<0,0001
2 X 5	0,28	p>.0.05	-	
2 X 6	0,28	p>0.05	0,28	p<0,0001
2 X 7	0,29	p>0.05	0,29	p<0,0001
2 X 8	0,27	p>0.05	-	
2 X 9	0,36	p>0.05	0,42	p>0,05
2 X 10	0,34	p>0.05	0,39	p>0,05
2 X 11	0,30	p>0.05	-	
2 X 12	0,28	p>0.05	0,31	p<0,0005
2 X 13	0,30	P>0.05	0,34	p<0,007
2 X 14	0,28	p>0.05		

### b) Tabela de análise variância

	DF	Qi-quadrado	Probabilidade
Intercept	1	0.43	0.5122
Hemolinfa	2	13.03	0.0018
Origem	1	0.42	0.5157
Hemolinfa X Origem	2	17.11	0.0002

## ANEXO II

Teste Dunnett's para as variáveis esporocistos degenerados.

Comparação de Grupos	Limite de confiança inferior	Diferença entre médias	Limite de confiança superior
6-2	0,2301	0,3540	0,4778 ***
7-2	0,2150	0,3387	0,4628 ***
13-2	0,1348	0,2587	0,3825 ***
12-2	0,1013	0,2252	0,3490 ***
4-2	0,0979	0,2218	0,3456 ***
9-2	0,0655	0,1893	0,3132 **
10-2	0,0247	0,1485	0,2724 ***
3-2	0,0143	0,1382	0,2682 **

\*\*\* indica comparação significativa para 0,05

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	0,9457	12	6
A			
A	0,9306	12	7
A			
B A	0,8504	12	13
B A			
B A	0,8168	12	12
B A			
B A	0,8134	12	4
B			
B	0,7810	12	9
B			
B	0,7402	12	10
B			
B	0,7299	12	3
B			
C	0,5917	12	2

Médias com mesma letra não diferem significativamente.

## ANEXO III

Teste Tukey para índice de fagocitose.

30 minutos após tratamento

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	60.25	2	6
A			
A	60.00	2	7
B			
B	49.75	2	12
B			
B	48.25	2	4
C			
C	44.50	2	13
C			
D C	41.75	2	10
D			
D	40.75	2	3
D			
D	40.50	2	9
E			
E	18.25	2	2

## 12 horas após tratamento

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	60.50	2	6
A			
B A	54.25	2	7
B			
C B	56.50	2	12
C			
D C	47.75	2	13
D C			
D C	47.25	2	10
E D C			
E D C	46.00	2	4
E D			
E D	43.50	2	3
E			
E	43.00	2	9
F			
F	22.00	2	2

## 24 horas após tratamento

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	60.50	2	6
B			
B	53.50	2	7
B			
B	56.50	2	12
C			
C	46.75	2	13
C			
D C	45.25	2	3
D C			
D C	44.75	2	10
D C			
D C	44.25	2	4
D			
D	43.00	2	9
E			
E	22.75	2	2

## 72 horas após tratamento

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	59.50	2	6
A			
A	58.00	2	7
C B			
C B	46.25	2	13
D C			
D C	42.25	2	10
D C			
D C	41.50	2	4
D C			
D C	41.25	2	9
E			
E	21.75	2	2

## ANEXO IV

“General Linear Models Procedure”  
The SAS System

Contagem de amebócitos

a) Análise estatística do efeito, época da inoculação (anterior ou posterior)

Grupos 3, 4 e 5		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	8468,841340	1693,768268	19,87	0,0001
Erro	139	11849,296591	85,246738		
Total corrigido	144	20318,137931			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	2362,468539	1181,234269	13,86	0,0001
Intervalo (grupo)	3	6031,777180	2010,592393	23,59	0,0001

Grupos 3, 4 e 5		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	265,8511212	53,1702242	0,64	0,6659
Erro	139	11460,7971546	82,4517781		
Total corrigido	144	11726,6482759			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	96,2129550	48,1064775	0,58	0,5593
Intervalo (grupo)	3	230,4328897	76,8109632	0,93	0,4273

Variável amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	15,940	50	4
B	8,327	49	5
B	6,522	46	3

Variável amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	14,680	50	4
A	14,630	46	3
A	13,612	49	5



Grupos 6, 7 e 8		Amebócito estrelado			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	257,8811154	51,5762231	3,20	0,0090
Erro	148	2386,8786249	16,1275583		
Total corrigido	153	2644,7597403			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	101,6304661	50,8152330	3,15	0,0457
Intervalo(Grupo)	3	139,5917455	46,5305818	2,89	0,0377

Grupo 6, 7 e 8		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	993,0794348	198,6158870	7,24	0,0001
Erro	148	4061,0309548	27,4393983		
Total corrigido	153	5054,1103896			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	73,2808276	36,64044138	1,34	0,2662
Intervalo(Grupo)	3	850,5623786	283,5207929	10,33	0,0001

#### Variável amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	5,880	50	7
A	5,741	54	8
B	3,940	50	6

#### Variável amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	9,580	50	7
A	7,889	54	8
A	7,280	50	6

Grupos 9, 10 e 11		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	74,68438121	14,93687624	3,82	0,0027
Erro	158	617,57781391	3,90872034		
Total corrigido	163	692,26219512			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	34,29091978	17,14545989	4,39	0,0140
Intervalo(Grupo)	3	49,36098529	16,45366176	4,21	0,0068

Grupos 9, 10 e 11		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	370,4306185	74,0861237	9,59	0,0001
Erro	158	1220,4169425	7,7241579		
Total corrigido	163	1590,8475610			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	22,93653349	11,46826675	1,48	0,2297
Intervalo(Grupo)	3	92,00482889	30,66827630	3,97	0,0092

## Variável amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	2,732	56	10
A	2,706	51	11
A	1,895	57	9

## Variável amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	8,902	51	11
B	6,232	56	10
B	5,965	57	9

Grupos 12, 13 e 14		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	117,0568845	23,4113769	3,11	0,0104
Erro	160	1203,6961275	7,5231008		
Total corrigido	165	1320,7530120			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	83,30151141	41,65075570	5,54	0,0047
Intervalo(Grupo)	3	73,16653479	24,38884493	3,24	0,0236

Grupos 12, 13 e 14		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	403,3541518	80,6708304	4,75	0,0004
Erro	160	2717,7301856	16,9858137		
Total corrigido	165	3121,0843373			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	2	128,0044507	64,0022254	3,77	0,0252
Intervalo(Grupo)	3	214,3802040	71,4600680	4,21	0,0068

#### Variável amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	3,839	56	12
A	3,236	55	14
B	2,582	55	13

#### Variável amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	10,036	56	12
A	9,091	55	13
B	7,455	55	14

## b) Análise estatística do efeito, tipo de hemolinfa (infectada ou não)

Grupos 3 e 9		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	624,0710917	208,0236972	20,81	0,0001
Erro	99	989,77356858	9,99771288		
Total corrigido	102	1613,8446602			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	248,8014310	248,8014310	24,89	0,0001
Intervalo(Grupo)	2	79,07311334	39,5365567	3,95	0,0223

Grupos 3 e 9		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	1943,0747750	647,691583	28,16	0,0001
Erro	99	2277,119425	23,0012061		
Total corrigido	102	4220,194175			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	188,5523939	188,5523939	8,20	0,0051
Intervalo(Grupo)	2	31,5277910	15,7638955	0,69	0,5063

## Variável amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	6,522	46	3
B	1,895	57	9

## Variável amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	14,630	46	3
B	5,965	57	9

Grupos 4 e 10		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	9647,350815	3215,783605	36,75	0,0001
Erro	102	8926,498242	87,514689		
Total corrigido	105	18573,849057			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	170,109151	170,1091551	1,94	0,1663
Intervalo(Grupo)	2	5039,303901	2519,61950	28,79	0,0001

Grupos 4 e 10		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	1930,012972	643,337657	12,68	0,0001
Erro	102	5173,996462	50725456		
Total corrigido	105	7104,009434			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	628,8363334	628,8363334	12,40	0,0006
Intervalo(Grupo)	2	44,8656811	22,4328406	0,44	0,6438

Variável amebócitos estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	15,940	50	4
B	2,732	56	10

Variável amebócitos não estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	14,680	50	4
B	6,232	56	10

Grupos 6 e 12		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	37,87705616	12,62568539	1,14	0,3379
Erro	102	1132,7644532	11,10553386		
Total corrigido	105	1170,64150943			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	3,54168958	3,554168958	0,32	0,5735
Intervalo(Grupo)	2	37,60911816	18,80455908	1,69	0,1890

Grupos 6 e 12		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	368,5577661	122,8525887	10,84	0,0001
Erro	102	1200,0460075	11,7651569		
Total corrigido	105	1568,6037736			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	141,4415099	141,4415099	12,02	0,0008
Intervalo(Grupo)	2	167,9625639	83,9812820	7,14	0,0013

Amebócitos estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	3,940	50	6
A	3,839	56	12

Amebócitos não estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	10,036	56	12
B	7,280	50	6

Grupos 7 e 13		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	286,5595618	95,5198539	7,59	0,0001
Erro	101	1271,0023430	12,5841816		
Total corrigido	104	1557,5619048			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	48,74794911	48,74579491	3,87	0,05518
Intervalo(Grupo)	2	1,65947519	0,82973759	0,07	0,9362

Grupos 7 e 13		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	5	698,9803433	232,9934478	10,31	0,0001
Erro	101	2282,0101329	22,5941597		
Total corrigido	104	2980,9904762			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	127,8008451	127,8008451	5,66	0,0193
Intervalo(Grupo)	2	692,7153217	346,3576608	15,33	0,0001

Amebócitos estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	5,880	50	7
B	2,582	55	13

Amebócitos não estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	9,806	50	7
A	9,091	55	13

c) Análise estatística do efeito, células da hemolinfa (com células ou sem células)

Grupos 3 e 6		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	243,1968850	81,066283	6,34	0,0006
Erro	92	1176,7926983	12,7912250		
Total corrigido	95	1419,9895833			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	102,7090324	103,7090324	8,11	0,0045
Intervalo(Grupo)	2	83,5055625	41,7527813	3,26	0,0427

Grupos 3 e 6		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	1474,907825	491,635942	17,56	0,0001
Erro	92	2576,331759	28,003606		
Total corrigido	95	4051,239583			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	360,8384927	360,8384927	12,89	0,0005
Intervalo(Grupo)	2	180,4656327	90,2328164	3,22	0,0444

#### Amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	6,522	46	3
B	3,940	50	6

#### Amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	14,630	46	3
B	7,280	50	6



Grupos 4 e 7		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	7530,704499	2510,234833	24,77	0,0001
Erro	96	9727,485501	101,327974		
Total corrigido	99	17258,190000			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	535,817872	535,817872	5,29	0,0236
Intervalo(Grupo)	2	5000,614499	2500,307250	24,68	0,0001

Grupos 4 e 7		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	1307,864078	435,954693	7,29	0,0002
Erro	96	5743,445922	59,827562		
Total corrigido	99	7051,310000			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	902,9191308	902,9191398	15,09	0,0002
Intervalo(Grupo)	2	657,6140777	328,8077388	5,50	0,0055

Amebócitos estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	15,940	50	4
B	5,882	50	7

Amebócitos não estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	14,680	50	4
B	9,580	50	7

Grupos 9 e 12		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	139,9891899	46,6630633	5,38	0,0017
Erro	109	945,7453234	8,6765626		
Total corrigido	112	1085,7345133			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	61,19184221	61,19184221	7,05	0,0091
Intervalo(Grupo)	2	33,17666906	16.58833453	1.91	0,1527

Grupos 9 e 12		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	487,1309280	162,3769760	19,65	0,0001
Erro	109	900,8336738	8,264291		
Total corrigido	112	1387,9646018			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	34,8864624	348864624	4,22	0,0423
Intervalo(Grupo)	2	19,0247222	9,51236111	1,15	0,3201

## Amebócitos estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	3,839	56	12
B	1,895	57	9

## Amebócitos não estrelados

Agrupamento	Média	N	Grupo
A	10,036	56	12
B	5,965	57	9

Grupos 10 e 13		Amebócitos estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	40,97590696	13,65863565	3,11	0,0295
Erro	107	470,01508403	4,39266435		
Total corrigido	110	510,99099099			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	18,32474782	18,32474782	4,17	0,0436
Intervalo(Grupo)	2	40,34887701	20,17443850	4,59	0,0122

Grupos 10 e 13		Amebócitos não estrelados			
Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Pr>F
Modelo	3	306,7366250	102,2455417	6,39	0,0005
Erro	107	1712,5606723	16,0052399		
Total corrigido	110	2019,2972973			
Fonte	GL:	Tipo III	QM	Valor F	Pr>F
Grupo	1	26,83401076	26,83401076	1,68	0,1982
Intervalo(Grupo)	2	79,96692513	39,98346257	2,50	0,0870

Amebócitos estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	2,732	56	10
A	2,582	55	13

Amebócitos não estrelados			
Agrupamento	Média	N	Grupo
A	9,091	55	13
B	6,232	56	10