

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MINERAL, LIPÍDICO E  
OXIDATIVO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (MOLLUSCA,  
GASTROPODA) INFECTADA EXPERIMENTALMENTE POR  
*ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS*, (NEMATODA,  
METASTRONGYLIDAE).**

**Vinícius Menezes Tunholi Alves**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MINERAL, LIPÍDICO E  
OXIDATIVO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (MOLLUSCA,  
GASTROPODA) INFECTADA EXPERIMENTALMENTE POR  
*ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS*, (NEMATODA,  
META-STRONGYLIDAE).**

**VINÍCIUS MENEZES TUNHOLI ALVES**

*Sob a Orientação do Professor Doutor*

**Jairo Pinheiro da Silva**

*e Co-orientação do Doutor*

**Arnaldo Maldonado Júnior**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências Veterinárias**, no curso de  
Pós-graduação em Ciências  
Veterinárias, Área de Concentração em  
Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

636.089696

Alves, Vinícius Menezes Tunholi, 1985-

A474c

T

Caracterização do perfil mineral, lipídico e oxidativo de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis*, (Nematoda, Metastrongylidae) / Vinícius Menezes Tunholi Alves. - 2015.

121 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 101-121.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Molusco - Parasito - Teses. 3. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 4. *Biomphalaria glabrata* - Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VINÍCIUS MENEZES TUNHOLI ALVES**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia VETERINÁRIA, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, em Ciências Veterinárias.

---

Prof.º Dr. Jairo Pinheiro da Silva, UFRRJ (Orientador).

---

Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, UFRRJ.

---

Claudia Portes Santos Silva, IOC/FIOCRUZ.

---

Isabela da Costa Angelo, UFRRJ.

---

Eduardo José Lopes Torres, UERJ.

---

Clélia Christina Corrêa de Melo Silva, IOC/FIOCRUZ.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por me proporcionar saúde e sabedoria nesta longa caminhada de aprendizado e vitórias. Por se fazer presente nos momentos de derrota e fraqueza, por nos confiar à vida e por ser o único a conhecer todo o nosso ser, ajudando-nos a superar mágoas e desencantos, fazendo de nós pessoas mais fortes e verdadeiras.
  
- Aos meus pais, José Nilo e Sueli, pelos ensinamentos, carinho, compreensão, por se fazer presente nos momentos mais difíceis, incentivando a sempre prosseguir, me fortalecendo, ensinando que os caminhos devem ser percorridos sem medo, e os obstáculos vencidos. A vocês, o meu amor eterno.
  
- A minha irmã, Livia e minha avó, Eunice, pelo incentivo, carinho e pelos momentos de alegria.
  
- O meu co-orientador, Dr Arnaldo Maldonado Júnior, pela confiança e incentivo, fornecendo todas as condições necessárias para a realização dos experimentos.
  
- Toda a equipe do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fiocruz, pela ajuda prestada na realização dos experimentos.
  
- Ao amor da minha vida Ludimila Santos Amaral por todo carinho, incentivo, apoio e por toda ajuda emocional e científica. Sem dúvida, você fez tudo ficar mais fácil.
  
- Ao meu irmão Victor, pela ajuda, incentivo, dedicação e por seu companheirismo. Muitos dos seus conselhos e dicas jamais serão esquecidos e com certeza fortaleceram minha formação.
  
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, CPGCV/UFRRJ, pelos ensinamentos contribuindo diretamente para minha formação profissional.
  
- Todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela convivência, pelos momentos de alegria e ensinamentos

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Jairo Pinheiro, Área de Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ, pelos ensinamentos concedidos e fundamentais para a conclusão deste estudo. Pela dedicação, orientação constante, pelas lições de saber, por repartir suas experiências profissionais e de vida. Hoje, tenho certeza que construímos algo que transcende a relação entre professor e aluno, mas sim de verdadeiros amigos. Muito obrigado!

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Ciclo de vida.....	5
2.3 Aspectos epidemiológicos da Angiostrongilíase no mundo.....	8
2.4 Aspectos morfológicos.....	11
2.5 Hospedeiros de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e seu papel como reservatório e propagação da doença.....	15
2.6 Importâncias do filo mollusca no desenvolvimento de estágios larvais de trematódeos e nematóides.....	18
2.7 Relação molusco-nematóide.....	20
2.7.1 Aspectos relacionados aos conteúdos de carboidratos e ao metabolismo oxidativo de Moluscos expostos à condição de infecção.....	23
2.7.2 Aspectos relacionados às alterações no perfil lipídico de moluscos infectados experimentalmente.....	26
2.7.3 Aspectos do metabolismo de cálcio em moluscos experimentalmente infectados por larvas de helmintos.....	27
3.0 Objetivos.....	30
3.1 Objetivo geral.....	
3.2 Objetivo específico.....	30
4 CAPÍTULO I Alterações no metabolismo de cálcio de <i>Biomphalaria glabrata</i> (mollusca, gastropada) experimentalmente infectada com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (nematoda, metastrongylidae.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.2.1 Manutenção dos moluscos.....	35
4.2.2 Procedimento parasitológico.....	36
4.2.3 Determinação de cálcio e análises histoquímicas.....	36

4.2.4 Análise estatística.....	37
4.3 RESULTADOS.....	37
4.4 DISCUSSÃO.....	40
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
5 CAPÍTULO II Efeito da infecção por larvas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (nematoda: metastrongylidae) sobre o metabolismo lipídico de seu hospedeiro intermediário experimental <i>Biomphalaria glabrata</i> (mollusca:gastropoda).....	47
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
5.1 INTRODUÇÃO.....	50
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.2.1 Parasitos.....	51
5.2.2 Infecção dos moluscos .....	51
5.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos experimentais.....	51
5.2.4 Determinações das concentrações de triacilglicerol e colesterol na hemolinfa.....	52
5.2.5 Cromatografia em camada fina monodimensional e análise de imagem .....	52
5.2.6 Preparação da enzima e determinação da atividade lipásica.....	53
5.2.8 Análises estatísticas.....	53
5.3 RESULTADOS.....	53
5.4 DISCUSSÃO.....	57
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6 CAPÍTULO 3 Ativação do metabolismo anaeróbico em <i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusca: Gastropoda) experimentalmente infectada por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Nematoda: Metastrongylidae) por cromatografia líquida de alta eficiência.....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
6.1 INTRODUÇÃO.....	67
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
6.2.1 Parasitos.....	68
6.2.2 Infecção dos moluscos.....	68
6.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos.....	69



6.2.4 Análises das alterações bioquímicas em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	69
6.2.5 Determinação dos conteúdos de ácidos carboxílicos hemolinfáticos.....	69
6.2.5.1 Preparo das soluções padrão.....	70
6.2.5.2 Análises por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).....	70
6.2.5 Análises estatísticas.....	70
6.3 RESULTADOS.....	71
6.4 DISCUSSÃO.....	74
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
7 CAPÍTULO IV Alterações na fisiologia mitocondrial de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusca:Gastropoda) após infecção experimental de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Nematoda: Metastrongylidae).....	82
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
7.1 INTRODUÇÃO.....	85
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
7.2.1 Parasitos.....	86
7.2.2 Infecção dos moluscos.....	86
7.2.3 Manutenção dos moluscos e formações dos grupos.....	87
7.2.4 Dissecção dos moluscos e coleta dos tecidos.....	87
7.2.5 Consumo de oxigênio pelo tecido permeabilizado utilizando respirômetria de alta resolução.....	88
7.2.6 Análises estatísticas.....	88
7.3 RESULTADOS.....	88
7.4 DISCUSSÃO.....	91
7.5 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
9 CONCLUSÕES.....	98
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do nematóide *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: (WANG et al., 2008)..... 6
- Figura 2-** Mapa de distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* e casos de angiostrongilíase no Brasil. AL: Alagoas; AM: Amazonas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo (MORASSUTTI et al., 2014)..... 11
- Figura 3.** Microscopia de luz de formas adultas de *Angiostrongylus cantonensis*. Extremidade anterior de machos (a). Barra de escala = 100µm. Vista lateral da extremidade posterior dos machos, onde a bolsa copuladora pode ser observada (b). Barra de escala = 200 µm. Detalhe da bolsa copuladora, em uma visão lateral, demonstrando a disposição dos raios (c). Barra de escala = 100µm. Gubernáculo (d). Barra de escala = 30µm. Espículo esquerdo (e). Barra de escala = 300µm. Espículo direito (f). Barra de escala = 300µm. Extremidade anterior da fêmea (g). Barra de escala = 100µm. Extremidade posterior da fêmea (h). Barra de escala = 100µm. Fonte: MOREIRA et al., 2013.)..... 8
- Figura 4.** Microscopia de luz de formas adultas de *Angiostrongylus cantonensis*. Vista lateral da bolsa copuladora de machos, com os raios ventro-ventral (vv), latero-ventral (lv) originando a partir de um mesmo tronco. Os raios laterais são divididos em antero-lateral (al), médio-lateral (ml) e postero-lateral; e o raio externo-dorsal (ed) (a). Barra de escala = 50 µm. Vista ventral da bolsa copuladora, demonstrando o raio dorsal (d). Barra de escala = 50 µm. Detalhe da extremidade posterior dos espículos cobertos por uma bainha estriada (c). Barra de escala = 50 µm. Detalhe da extremidade anterior dos espículos (d). Barra de escala = 50 µm. Detalhe do corpo da fêmea demonstrando o útero (U), com ovos (E) e ovijector (seta) (e). Barra de escala = 50 µm. Fonte: MOREIRA et al., 2013..... 7

**Figura. 5.** Glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* infecta por *Angiostrongylus cantonensis* demonstrando reações granulomatosas, de aspecto nodular esférico, caracterizadas por concentração gradativa de hemócitos. Figuras C e D: Glândula digestiva de moluscos não infectados demonstrando ausência de estágios larvais..... 10

## CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Relação entre as concentrações de cálcio na hemolinfa em (mg/dl) (A) e na concha em (mg de CaCO<sub>3</sub>/g de concha) (B) de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectada com *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes tempos de infecção (em semanas). Tempo zero (0) representa o valor das médias dos grupos controles após três semanas de observação. a,b,c = Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente da media dos grupos controles de cada semana experimental,  $P < 0.05$ . A análise de regressão linear demonstrou a seguinte relação: Hemolinfa (A) ( $y = 0.7250 - 9.161x$ ;  $r^2 = 0.05$ ) e concha (B) ( $y = 305 - 102.9x + 34.48x^2$ ;  $r^2 = 0.99$ ) ..... 43

**Figura 2.** Glândula digestive de *Biomphalaria glabrata* (A, B, C) infectada por *Angiostrongylus cantonensis* (ac) demonstrando reações granulomatosas (Gr) com deposição concêntrica de hemócitos ao redor das larvas de *A. cantonensis* (ac) de aspecto nodular esférico e deposição de ions cálcio; (EF) Grupo controle de *B. glabrata* demonstrando glândula digestive intacta e ausência de granulomas. Figuras A e B barra de escala = 40 µm. Figuras C-F barra de escala = 70 µm..... 76

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Níveis de colesterol e triacilglicerol na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos pós-infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média dos moluscos do grupo controle obtidos durante as três semanas de análises (1, 2, and 3 semanas), uma vez que não existiu diferenças significativas entre elas. a, b = Médias diferem significativamente entre si  $P < 0.05$ , (média±desvio-padrão)..... 45

**Figura 2.** Concentração de lipídios neutros no complexo glândula digestiva-gônada de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis* em função do tempo de infecção, expressado em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análises. (A) nível de ácidos graxos (AG); (B) níveis de colesterol (CHO); (C) níveis de triacilglicerol (TAG) e (D) níveis de colesterol esterificado (CHOE). Todos os valores são expressos como média ± desvio-padrão. a, b = Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si  $P < 0.05$  ..... 40

**Figura 3.** Atividade lipásica no complexo glândula-digestiva gônada (DGG) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis* em função do tempo de infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de infecção. Absorbância foi lida em 405 nm. Barra de erro representa o desvio-padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. mAbs – mili-absorbância..... 79

## CAPÍTULO 4

**Figura 1.** Relação estabelecida entre o consumo de oxigênio mitocondrial de *B. glabrata*, expressado por pmol  $O_2$ /mg proteína e adições seqüenciais de Malato (M) (5 mM), Piruvato (P) (5 mM), ADP (0,5 mM), Oligomicina (Oligo) (1ug/ml), FCCP (0,4 uM), Rotenona (Rot) (1 uM) e Antimicina A (Ant) (5 uM), após primeira (A), segunda (B) e terceira (C) semana de infecção por *Angiostrongylus cantonensis*. \* = Médias diferem significativamente entre si (média±EP). Grupo controle (N=7 moluscos); grupo infectado (N=7 moluscos)..... 90

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Valores médios dos conteúdos de cálcio na hemolinfa (mg/dl) e concha (mg of  $\text{CaCO}_3/\text{g}$  de cinzas) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, durante três semanas de infecção . <sup>a, b</sup>= Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente de seu respectivo grupo controle em cada semana experimental ( $P < 0,05$ )..... 42

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Níveis de colesterol e triacilglicerol na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de infecção, uma vez que não existiu diferença significativa entre as semanas <sup>a, b</sup> = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ( $\alpha = 5\%$ ). Média  $\pm$  DP = média  $\pm$  desvio padrão..... 60

## RESUMO

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes. **Caracterização Do Perfil Mineral, Lipídico E Oxidativo De *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) Infectada Experimentalmente Por *Angiostrongylus cantonensis*, (Nematoda, Metastrongylidae).** 2015. 120p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O nematóide *Angiostrongylus cantonensis* foi primeiramente descrito como parasito de artéria pulmonar de *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* em Canton, China. Este helminto tem sido mencionado como principal agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana, uma metazoonose endêmica no continente asiático e que recentemente, tem-se disseminado para África, Norte e Sul da América e Ilhas do Caribe. Atualmente, o Brasil é considerado área de alto risco ao estabelecimento da angiostrongilíase humana, justificado não somente pela presença de moluscos, mas também roedores naturalmente infectados, que atuam respectivamente como hospedeiros intermediários e definitivos desse parasito, fatores que favorecem diretamente a dinâmica de transmissão da angiostrongilíase neural. Em seu ciclo de vida moluscos atuam como hospedeiros intermediários, possibilitando a partir de sua infecção, o desenvolvimento de formas larvais infectantes ao hospedeiro definitivo. Nos últimos anos, a caracterização de padrões metabólicos de moluscos infectados experimentalmente, tem sido estudada como base para o desenvolvimento de medidas focadas principalmente no controle de patologias transmitidas por estes organismos. Porém, quando nos referimos a modelos experimentais utilizando *A. cantonensis* e *Biomphalaria glabrata*, os dados ainda são escassos, o que preocupa, não apenas pela importância do parasito, mas também pela ampla distribuição da espécie *B. glabrata* no Brasil. Neste estudo, foram observadas alterações no metabolismo mineral, lipídico e oxidativo de *B. glabrata*, decorrentes da infecção experimental por *A. cantonensis*. Para isso, foram utilizados moluscos da linhagem pigmentada criados desde a oviposição e mantidos em condições laboratoriais. Foram formados dois grupos: controle (C1, C2, C3) com animais não infectados e infectados (I1, I2 e I3). Os grupos eram compostos por 10 moluscos. Todo experimento foi feito em duplicata, utilizando um total de 120 moluscos. Após 1, 2 e 3 semanas de infecção, 20 moluscos de cada grupo eram dissecados para a coleta da hemolinfa e tecidos. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a partir de kits comerciais da marca Doles. As dosagens

bioquímicas demonstraram que a infecção por *A. cantonensis* induziu uma diminuição significativa nos conteúdos hemolinfáticos de cálcio após primeira semana de infecção, seguido por um aumento nas concentrações desse íon na segunda semana de estudo. Este cenário foi acompanhado por uma intensa mobilização de  $\text{CaCO}_3$  na concha de moluscos infectados, possivelmente como tentativa em restabelecer o equilíbrio ácido-base alterado durante o desenvolvimento do parasito. Resultados histopatológicos demonstraram ainda alterações morfológicas na glândula digestiva de moluscos infectados, caracterizadas principalmente na forma de reações granulomatosas e áreas de calcificação metastática. Variações nas reservas de lipídios neutros estocados no complexo glândula digestiva-gônada foram também demonstradas. A infecção resultou em um decréscimo significativo nos conteúdos de colesterol e no aumento dos níveis de ácido graxo e triacilglicerol após as duas primeiras semanas de infecção. O aumento nos conteúdos de ácido graxo foi associado ao aumento da atividade lipásica, indicando que *A. cantonensis* induz de fato a ativação de um processo lipolítico durante etapa de desenvolvimento em seu hospedeiro intermediário. Por fim, a infecção de *A. cantonensis* resultou em mudanças no metabolismo oxidativo de *B. glabrata*. Além da depleção de reservas polissacarídicas estocadas na glândula digestiva e massa cefalopodal, o parasitismo por *A. cantonensis* induziu a ativação do metabolismo anaeróbio de seu hospedeiro, resultando não apenas no aumento da atividade da lactato desidrogenase hemolinfática, mas também na redução dos níveis de ácido pirúvico e acúmulo de lactato. Isso representa uma interessante resposta adaptativa do hospedeiro frente à infecção, possibilitando o hospedeiro a partir do metabolismo anaeróbio, gerar energia e ao mesmo tempo mantém seu balanço redox. Adicionalmente, a redução nas concentrações de ácido oxálico observado nos períodos finais do desenvolvimento parasitário, sugere o seu desvio para a gliconeogênese, destacando o envolvimento dessa molécula como precursora na síntese de glicose-6-fosfato. Este cenário metabólico foi acompanhado por uma supressão na fosforilação oxidativa de moluscos infectados (1 e 2 semanas) de infecção, sugerindo uma diminuição na quantidade de mitocôndrias no tecido analisado, ou ainda, na inibição de centros enzimáticos relacionados às reações oxidativas.

Palavras chaves: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, alterações bioquímicas, relação parasito-hospedeiro

## ABSTRACT

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes. **Characterization of the mineral, lipid and oxidative profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*, (Nematoda, Metastrongylidae).** 2015. 120 p. Doctoral Thesis in Veterinary Sciences and Animal Parasitology. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

*Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935 was first described as a parasite of the pulmonary artery of *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* in Canton, China. This helminth is an etiological agent of eosinophilic meningoencephalitis, a zoonotic disease endemic to certain Asian countries, which has recently dispersed to Africa, North and South America, and Caribbean islands. Currently Brazil is considered an area of high risk for the establishment of human angiostrongyliasis, due mainly to the occurrence of naturally infected snails and rodents, acting respectively as definitive and intermediate hosts of this parasite, directly favoring the transmission dynamics of neural angiostrongyliasis. In its life cycle, snails act as intermediate hosts, allowing the development of infective larval forms in the definitive host. In recent years, the metabolic characteristics of experimentally infected snails have been studied in an effort to develop measures to control the pathologies transmitted by these organisms. However, there is little information on the relationship between *A. cantonensis* and the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, which is cause for concern, not only because of the importance of this parasite, but also due to the widespread distribution of this snail in Brazil. In this study, the metabolic alterations of *B. glabrata* resulting from experimental infection by *A. cantonensis* were evaluated. For this purpose, snails of the pigmented strain were used, reared in the laboratory since oviposition. Two overall groups were formed: control (C1, C2 and C3), with uninfected animals, and treated (I1, I2 and I3), with infected snails. Each subgroup was composed of 10 snails. The entire experiment was performed in duplicate, utilizing a total of 120 snails. After one, two and three weeks of infection, 20 snails from each group were dissected to collect the hemolymph and tissues. The spectrophotometric readings were performed with Doles commercial reagent kits. The biochemical measurement demonstrated that infection by *A. cantonensis* induced a significant



reduction in the hemolymph concentrations of calcium after one week of infection, followed by an increase in the concentrations of this ion in the second week of infection. This situation was accompanied by intense mobilization of  $\text{CaCO}_3$  in the shell of the infected snails, possibly as an attempt to reestablish the acid-base equilibrium after its alteration during the parasites' development. The histopathology results also demonstrated morphological changes in the digestive gland of infected snails, mainly in the form of granulomatous reactions and areas of metastatic calcification. Variations in the reserves of neutral lipids stored in the digestive gland-gonad complex were also observed. Infection resulted in a significant decrease in the concentrations of cholesterol and an increase in the levels of fatty acid and triacylglycerol after the first two weeks of infection. The increase in the concentration of fatty acid was associated with an increase in lipase activity, indicating that *A. cantonensis* induces activation of a lipolytic process during development in its intermediate host. Finally, infection by *A. cantonensis* resulted in changes in the oxidative metabolism of *B. glabrata*. Besides depletion of the polysaccharide reserves stored in the digestive gland and cephalopodal mass, parasitism by *A. cantonensis* induced activation of the host's anaerobic metabolism, resulting not only in an increase in activity of lactate dehydrogenase in the hemolymph, but also reduction of the levels of pyruvic acid and accumulation of lactate. This is an interesting adaptive response of the host to infection, enabling the host, through anaerobic metabolism, to generate energy while still maintaining its redox balance. Additionally, the reduction in the concentrations of oxalic acid in the final parasite development periods suggests its diversion to gluconeogenesis, indicating the involvement of this molecule as a precursor in the synthesis of glucose-6-phosphate. This metabolic condition was accompanied by a deletion in oxidative phosphorylation infected snails (1 and 2 weeks) after infection, suggesting a decrease in the number of mitochondria in the examined tissue, or suppression of enzymatic centers related to oxidative reactions.

Key Words: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, biochemical change, host-parasite relationship

## 1 INTRODUÇÃO

Angiostrongilíase Neural é uma doença causada pela migração da larva de *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935. Tal patologia é caracterizada por uma disfunção do sistema nervoso central, frequentemente associada a uma infiltração eosinofílica na região. O processo patológico decorrente a migração das larvas de *A. cantonensis* mostra-se bastante agressiva ao hospedeiro, resultando em reações que potencializam os sinais clínicos colocando em risco sua vida (ALICATA, 1991). De acordo com estudos de autópsia, a superfície externa do cérebro e o cordão espinhal mostram-se envolvidos por uma infiltração linfocítica, células plasmáticas e eosinófilos (EAMSOBHANA; TUNGTRONGCHIRT, 1978). A infiltração celular ao redor de larvas vivas é proeminente, evoluindo para a morte parasitária como consequência ao desenvolvimento de reações granulomatosas envolvidas no processo de encapsulamento parasitário. Como consequência as lesões espoliativas causadas durante o comportamento migratório das larvas, a presença de microporos são observadas, localizadas principalmente no cérebro e cordão espinhal (CHOTMONGKOL; SAWANYAWISUTH, 2002). As larvas podem por vezes direcionar-se para os olhos de humanos, desenvolvendo um caso de angiostrongilíase ocular, com distúrbios oculares tais como diplopias e estrabismos em muitos pacientes.

Essa espécie de metastrongilídeo é encontrada principalmente nos países do sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico, regiões consideradas endêmicas ao parasito. No entanto, este cenário começou a mudar nas últimas décadas, com a primeira ocorrência relatada nas Américas em 1981, quando ratos e moluscos infectados foram encontrados em Cuba (AGUIAR et al., 1981). A partir de então, a ocorrência de *A. cantonensis* tem sido reportada nos Estados Unidos, Jamaica, Equador (KIM et al. 2002, SLOM et al. 2002, WANG et al. 2008) e mais recentemente no Brasil (CALDEIRA et al., 2007, GRAEF-TEIXEIRA et al., 2009, ESPÍRITO-SANTO et al., 2013), com quadros de infecções em humanos já confirmados (MORASSUTTI et al., 2014).

A infecção humana se dá através da ingestão de alimentos crus contendo as larvas infectantes ou por ingestão dos hospedeiros intermediários. Outra via de infecção não completamente esclarecida é através de água contaminada com as larvas que se evadem de moluscos mortos. A penetração de larvas presentes no solo através da pele lesada, também é considerada uma possível via de entrada (ALICATA; BROWN,1962). No entanto, estudos epidemiológicos tem demonstrado que a rota de infecção em casos humanos varia

geograficamente (ALICATA, 1965, KLIKS; PALUMBO., 1992) . Em toda Ásia, a maioria dos casos são adquiridos pela ingestão de moluscos crus ou mal cozidos, enquanto que no Taiti e em outras ilhas do Pacífico, camarões de água doce e caragueijos configuram como a principal fonte de infecção (WALLACE; ROSEN, 1956). Casos esporádicos são por vezes difíceis de ser explicados, e pode resultar da ingestão acidental de pequenos hospedeiros intermediários e paratênicos, ou através de larvas infectantes presentes em seu muco depositados sobre os vegetais consumidos em saladas (MORASSUTTI et al., 2014).

Em seu ciclo biológico, envolvem obrigatoriamente a participação de dois hospedeiros, sendo os moluscos, os hospedeiros intermediários, e roedores os hospedeiros definitivos, caracterizando, portanto, um ciclo heteroxênico. Estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos (*Bradybaena similaris*, *Subulina octona* e *Sarasinula marginata*) como hospedeiros naturais deste helminto, destacando a participação do caramujo africano, *Achatina fulica*, em razão a sua maior susceptibilidade e capacidade de albergar elevadas parasitemias, contribuindo para a expansão dessa endemia (CALDEIRA et al., 2007, HARRIS; CHENG, 1975). Tais estudos destacam a grande plasticidade do parasito, fator este que favorece o processo de disseminação da meningoencefalite eosinofílica no mundo.

*Biomphalaria glabrata* Say, 1818, encontra-se amplamente distribuída no território brasileiro, com ocorrência assinalada em 16 estados brasileiros (CARVALHO et al., 2005). Esta espécie possui grande importância para a saúde pública por atuar como o principal hospedeiro intermediário do trematódeo digenético *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agente etiológico da esquistossomose humana, sem dúvida uma séria endemia ainda hoje no país, devido à alta morbidade e ampla distribuição. Em adição, estudos também têm confirmado a participação de *B. glabrata* como hospedeiro intermediário potencial de *A. cantonensis* (YOUSIF; LAMMLER, 1977, HARRIS; CHENG, 1975). Este fato, acrescido de sua importância epidemiológica, faz da espécie *B. glabrata* um dos principais agentes hospedeiros de parasitos, portanto, de grande relevância tanto em medicina humana quanto em veterinária.

Atualmente, recomenda-se que o controle de tais enfermidades seja baseado em medidas integradas, nas quais o controle do molusco torna-se indispensável. Deste modo, além do conhecimento epidemiológico da doença, aspectos ambientais, ecológicos, parasitológicos e fisiológicos são importantes. Alterações metabólicas no molusco hospedeiro, decorrentes da infecção, podem predizer seu *status* fisiológico, e deste modo ajudar a responder questões relacionadas à sua sobrevivência, dispersão e reprodução,

aspectos fundamentais ao sucesso de programas de controle de moluscos hospedeiros. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi determinar as características metabólicas do molusco *B. glabrata* em resposta à experimental pelo nematoide *A. cantonensis*, durante o período pré-patente de desenvolvimento deste helminto no hospedeiro intermediário.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

*Angiostrongylus cantonensis* foi primeiramente identificado como parasito de roedores em Canton, (HUNG; CHENG, 1988; PROCIV et al., 2000). Em 1954 o parasito foi registrado em Brisbane, Austrália (MACKERRAS, 1955). Porém, somente na década de 60 uma relação foi proposta entre *A. cantonensis* e o tipo não usual de meningite encontrada no Pacífico, caracterizado principalmente por uma inflamação eosinofílica. Em retrospectiva, a doença foi inicialmente considerada em 1944 quando o registro de uma nova síndrome foi feito (NOMURA; LIN, 1945). Neste estudo, confirmaram a presença de larvas de metastrongylídeo associado a uma intensa reação inflamatória especialmente das meninges de um paciente na Tailândia, sendo denominado inicialmente de *Haemastrongylus ratti*. Mais tarde, os parasitos identificados por Nomura e Lin foram reclassificados como *A. cantonensis* por (DOUGHERTY, 1946).

Em 1961, o patologista, Joseph Alicata, postulou que um parasito pulmonar de roedores poderia ser o agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica registrada anteriormente (ALICATA, 1991). Alicata registrou que um trabalhador japonês tinha ingerido propositadamente lesmas e nove dias depois desenvolveu um quadro de paralisia principalmente de ombros e braços. Exemplos do fluido cérebro-espinhal revelou uma moderada pleocitose eosinofílica. Posteriormente, lesmas foram coletadas na mesma área onde vivia o trabalhador, e após exames, foi confirmada a presença de estágios larvais de *A. cantonensis* nas mesmas (ALICATA, 1991). Mais tarde, a teoria postulada por Alicata foi confirmada por Leon Rosen, médico de um hospital psiquiátrico no Havaí, que identificou larvas de nematoides de um paciente portador de síndrome neurológica (ROSEN et al., 1962). O paciente apresentava em seu histórico constantes crises de esquizofrenia, sendo a causa real da morte uma meningite aguda. A partir de registros, identificou que se tratava de um quadro de meningite parasitária causadas por *A. cantonensis*, já que o paciente incluía em sua alimentação lesmas. Para validar a teoria de Alicata, vários experimentos foram realizados

posteriormente, infectando primatas com larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* demonstrando que esses animais de fato desenvolveram síndromes patológicas similares, demonstrando também a ocorrência de meningoencefalite eosinofílica (ALICATA, 1991).

Durante os anos 60 a doença foi identificada primeiramente na China e desde então tem sido diagnosticada em todo o Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, Micronésia, Austrália, Japão, Ilhas Fiji, América Central, os EUA (Louisiana e no Havaí), Costa do Marfim, Índia e Egito (HUNG; CHEN, 1988; KLIKS; PALUMBO, 1992; CAMPBELL; LITTLE, 1988; LIMAYE et al., 1990). Registros apontam à ocorrência de pacientes humanos diagnosticados na Nova Zelândia, Suíça e Brasil, sendo considerada uma doença emergente (BOWDEN, 1981; CALDEIRA et al., 2007).

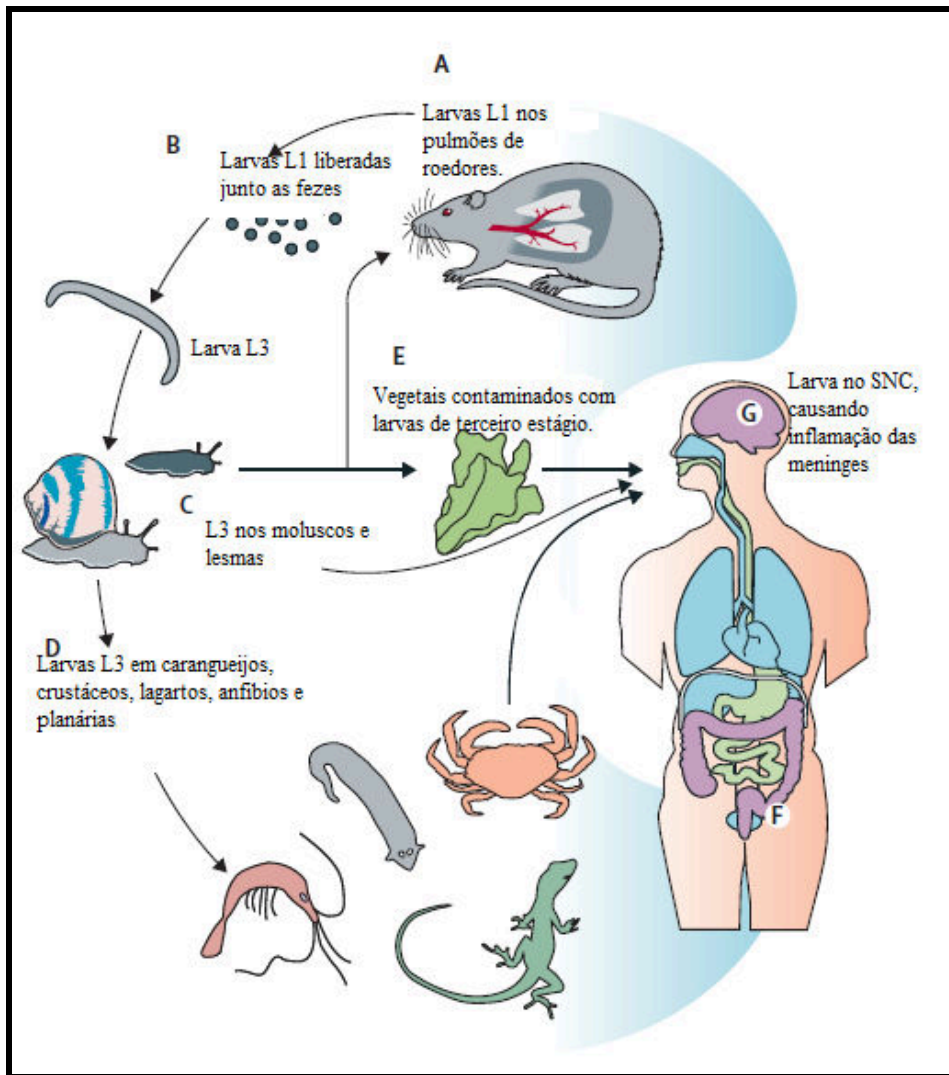
Para explicar esta rápida e contínua disseminação geográfica de *A. cantonensis*, Alicata (1966), postulou algumas hipóteses sugerindo uma co-evolução entre o parasito e o hospedeiro. Dentre elas, Alicata defende que o parasito evoluiu de um ancestral comum em roedores de Moçambique, *A. sandarsae* (Alicata, 1968), sendo encontrado principalmente na África e Madagascar, e que apresentava como hospedeiro intermediário o molusco gigante Africano *A. fulica*. A partir dessa evolução, surge a espécie *A. cantonensis* que se difundiu a partir do Pacífico junto à rápida disseminação do molusco. Drozd et al.(1975) defenderam que a rápida disseminação da doença iniciou-se mediante a íntima associação de algumas espécies de nematoides, dentre elas *A. cantonensis*, e espécies de roedores principalmente na Malásia e Austrália, indicando uma associação duradoura entre parasito e hospedeiro. Para eles, esta associação duradoura do helminto com ratos domiciliados como *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) e *R. rattus* (Linnaeus, 1758) , deve-se principalmente ao fato desses animais suportarem elevadas doses infectantes sem manifestar distúrbios, relacionado ao sistema nervoso central, sugerindo uma adaptação improvável com o hospedeiro.

Maldonado et al. (2010), após a constatação de espécimes de *A. fulica* infectadas por *A. cantonensis*, defenderam a ampla distribuição do parasito no Brasil como resultado de introduções múltiplas de ratos infectados, especialmente durante período colonial do país, período este caracterizado por uma intensa atividade comercial, especialmente com África e Ásia. Adicionalmente, Thiengo et al. (2010), alertaram para a rápida disseminação do molusco *A. fulica* no Brasil, havendo registro oficial de sua presença em 24 dos 26 estados brasileiros incluindo o Distrito Federal, como fator provável na dispersão do parasito.

## 2.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *A. cantonensis* é um ciclo indireto necessitando de um hospedeiro intermediário fundamental para o desenvolvimento dos estágios larvais iniciais do parasito (BHAIBULAYA, 1975; FERNANDO, 2001). O período pré-patente é de 42 a 46 dias (BHAIBULAYA, 1975). Os parasitos adultos (machos e fêmeas) residem na artéria pulmonar do hospedeiro definitivo. Após a cópula, os ovos são liberados pelas fêmeas e passam a se alojar nos capilares pulmonares. Posteriormente, no interior dos ovos, ocorre o desenvolvimento larval, alcançando o primeiro estágio (L<sub>1</sub>), que após eclosão inicia uma migração ascendente pelo conduto bronquiolar até alcançar faringe, onde são deglutidas. Em seguida, após alcançar o trato gastrointestinal são liberadas junto às fezes (JINDRAK; ALICATA, 1968).

A infecção do molusco ocorre mediante ingestão ou penetração direta da L<sub>1</sub>, a qual pode permanecer viável no ambiente por aproximadamente 12 dias (MACKERRAS, 1955). No molusco, observa-se a ocorrência de duas mudas, num período de aproximadamente três semanas (TUNHOLI-ALVES et al., 2011), até a formação de larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), consideradas as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. A transmissão ocorre pela ingestão dessas larvas que são liberadas com o muco do molusco e contaminam alimentos, mãos e objetos. O homem pode se infectar acidentalmente ao consumir vegetais, água ou mesmo moluscos crus ou mal cozidos, infectados com a larva L<sub>3</sub>. Os roedores adquirem o parasito quando ingerem moluscos infectados ou, no caso dos herbívoros, vegetais contaminados. Crustáceos, peixes, anfíbios e répteis, utilizados como hospedeiros paratênicos, também podem atuar como transmissores, amplificando a ocorrência da doença (THIENGO, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo ilustrativo de vida do nematóide *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: WANG et al., 2008.

A literatura tem apontado diferentes espécies de moluscos participando como hospedeiros intermediários deste parasito, enquadrando tanto espécies aquáticas quanto terrestres, inclusive o gigante africano, *A. fulica*. A dispersão de *A. fulica* tem sido indicada na literatura como a principal causa da dispersão da meningoencefalite, o que é preocupante, pois o Brasil atualmente vive uma fase explosiva da invasão desse molusco (THIENGO, 2010).

No hospedeiro intermediário, Brockelman et al. (1976), estudando a interface *A. fulica/A. cantonensis*, observaram um período de aproximadamente três semanas para a formação do terceiro estágio larval do parasito, e que a maioria das larvas (85%) se localizavam principalmente no manto e tecido muscular, sendo poucas encontradas nos

órgãos viscerais. He-xiang et al. (2009) observaram o desenvolvimento do ciclo de *A. cantonensis* em condições laboratoriais, e constataram um período pré-patente de aproximadamente 19 dias em espécies de moluscos aquáticos, estando a L<sub>3</sub> distribuída principalmente no manto, músculo (massa cefalopediosa) e glândula digestiva dos moluscos infectados. Formações granulares também foram observadas, sobretudo na cavidade paleal e tecido muscular, indicando ativação de uma resposta inflamatória durante o processo de desenvolvimento das larvas de diferentes estágios no molusco.

Sauerlander (1976) estudou a via migratória dos nematoides *A. cantonensis/A. vasorum* em infecções experimentais em *A. fulica*. Em exame de cortes histológicos, foram observadas larvas no pulmão, manto, glândula digestiva, pé e trato gastrintestinal. Além disso, a cronologia da migração larval neste caramujo foi descrita da seguinte forma: 1 – uma hora após a infecção, as larvas estavam presentes na região do pé do molusco; 2- duas horas após a infecção, as larvas foram observadas no trato gastrintestinal; 3 – 12h após, as larvas foram encontradas no pulmão, em um número próximo a metade do total de larvas do sistema hemolinfático; 4 – 24h após a infecção, cerca de 80 a 90% do total da população de larvas podia ser observado no pé e no pulmão. Neste mesmo estudo, o período de formação da L<sub>3</sub> foi similar aos estudos anteriores, com as larvas se localizando principalmente no tecido muscular, próximo aos ductos das glândulas produtoras de muco.

No hospedeiro definitivo, as larvas de terceiro estágio alcançam o sistema nervoso central através do sistema circulatório, embora evidências recentes sugiram uma rota alternativa envolvendo penetração direta nos nervos periféricos e subsequente migração para o sistema nervoso. Infecções experimentais em coelhos, ratos e cachorros têm demonstrado danos significativos em nervos periféricos, especialmente o nervo ciático, associado à migração larval. Mackerras (1955) postulou que o parasito acaba utilizando anastomoses para alcançar o cordão espinhal. Adicionalmente, estudos registram que em ratos experimentalmente infectados, as larvas são frequentemente encontradas nos nódulos linfáticos mesentéricos e dutos torácicos admitindo, portanto, a hipótese de que algumas larvas podem migrar por via linfática (BHAIBULAYA, 1975). Esta hipótese também foi demonstrada por Jindrak e Alicata (1968) que em estudo patológico comparativo envolvendo infecção experimental por *A. cantonensis* em suínos e ruminantes, observaram um grande número de larvas infiltradas nos nódulos linfáticos mesentéricos.

No sistema nervoso central, o principal sítio de localização das larvas é no interior da massa cinzenta, embora algumas possam também ser observadas nas meninges. Neste sítio as



larvas perdem a bainha, iniciando-se em seguida a migração para o espaço subaracnóide. Nesta região, o parasito permanece por 10 dias aproximadamente, período necessário para se desenvolver até (L<sub>5</sub>), cursando com uma intensa reação inflamatória caracterizada principalmente por uma reação eosinofílica (MACKERRAS, 1955). Posteriormente, utilizando plexos venosos localizados no próprio espaço, os estágios larvais migram para os pulmões localizando-se na artéria pulmonar para finalizar o seu desenvolvimento (BHAIBULAYA, 1975).

### **2.3 Aspectos epidemiológicos da Angiostrongilíase neural no mundo.**

Desde o primeiro caso da angiostrongilíase humana confirmada em 1945, mais do que 2800 casos tem sido registrado em pelo menos 30 países. No entanto, muitos casos podem não ter sido notificados ou diagnosticados corretamente (KLIKS; PALUMBO, 1992). De acordo com autores, a angiostrongilíase frequentemente ocorre em surtos com números de casos variando entre 10 a 100. Nestes surtos, pessoas tornam-se usualmente infectadas mediante a ingestão de hospedeiros intermediários e paratênicos contendo estágios L<sub>3</sub> do parasito encistados em seus tecidos (WANG et al., 2008)..

Desde a confirmação inicial de dois casos de meningite eosinofílica causada por *A. cantonensis* no Havaí em 1962 (WU, 2006), o parasito tem sido mencionado como agente causal em muitos outros casos na Ilha do Pacífico e sul da Ásia. *Angiostrongylus cantonensis* é principalmente endêmico nestas regiões, entretanto, regiões endêmicas tem agora se expandido para além dos limites do Pacífico e Sul da Ásia. De acordo com autores, a disseminação da angiostrongilíase neural estaria principalmente associada com a importação não intencional de roedores infectados dessas regiões por navios e aviões, chamando a atenção aos órgãos públicos para a necessidade de desenvolver políticas públicas direcionadas para um maior controle e fiscalização sanitária, especialmente em regiões portuárias. Nas ilhas do Caribe, onde o primeiro caso da angiostrongilíase humana foi registrado em Cuba, em 1973 (PASCUAL et al., 1981), tem-se registrado o aumento crescente no número de infecções por *A. cantonensis*, com vários casos na Costa Rica e Jamaica (VAZQUEZ et al., 1993; LINDO et al., 2004).

Na Tailândia, região de alta endemicidade para a doença, pelo menos 1337 casos de angiostrongilíase neural humana tem sido confirmada. Esta elevada prevalência está associada

à cultura local, especialmente no costume de se alimentar de moluscos crus ou indevidamente preparados, prática essa muito observada em todo Sul Asiático (CROSS; CHEN, 2007).

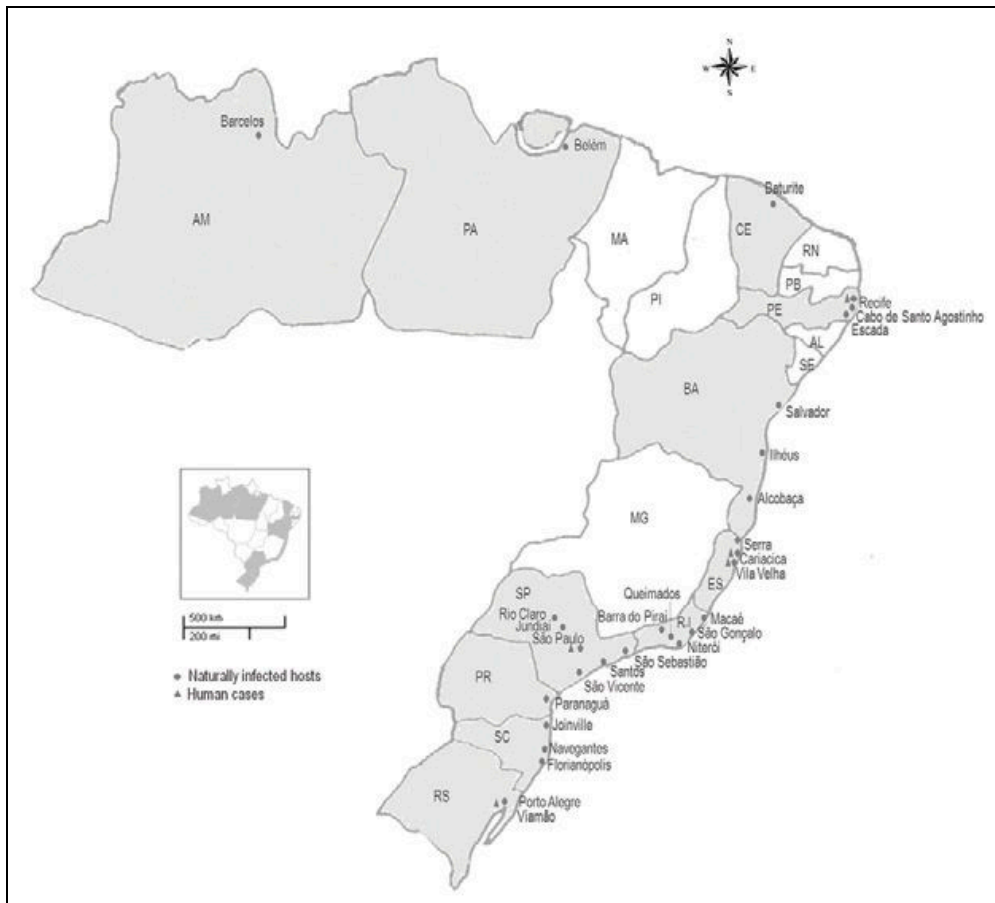
Na China, o primeiro caso de meningoencefalite eosinofílica causado pela infecção de *A. cantonensis* foi registrado em 1984 na província de Guangdong. Atualmente, surtos de infecção humana por *A. cantonensis* tem aumentado significativamente na China, possivelmente como resultado da popularização de comidas exóticas, como a prática em utilizar moluscos como alimento. Um surto de angiostrongilíase neural foi documentado em 1997 na província de Zhejiang na China (ZHENG et al., 2001). De acordo com registros, os 65 casos confirmados de meningite eosinofílica foram associados à infecção por *A. cantonensis* (ZHENG et al., 2001). Um surto menor, com cinco casos humanos, ocorreu na província de Lioining em 1999 (81), e em 2002 três surtos com um total de 30 casos foram diagnosticados na província de Fujian (YANG et al., 2004; WU; YAN, 2004). Infelizmente, apesar desses surtos, poucas ações públicas foram realizadas com o objetivo de controlar o parasitismo na China, situação esta que contribuiu diretamente para a ocorrência de um surto ainda maior em Beijing em 2006, com mais do que 160 casos confirmados (HE et al., 2007). Atualmente, estima-se que mais do que 650 milhões de pessoas encontram-se em áreas de alto risco para aquisição da angiostrongilíase neural humana na China, condição esta justificada, pela alta prevalência de infecção em roedores e moluscos nativos. Levantamento epidemiológico indica que a maioria dos casos de infecção humana por *A. cantonensis* no continente Asiático, estaria relacionada com a ingestão de moluscos crus, especialmente da espécie *Pomacea canaliculata* (TSAI et al., 2001). Esta espécie de molusco, nativo da América do Sul, foi introduzida em Taiwan em 1981 como fonte alimentar, e posteriormente na China e tem sido considerado como o principal hospedeiro intermediário desse nematoide na região (WANG et al., 2007).

Na América do Sul, os primeiros casos de infecção em humanos foram registrados no Brasil, dois no município de Cariacica no Estado do Espírito Santo e dois na região nordeste do Brasil no Estado de Pernambuco (Município de Escada e Olinda). Todos os quatro casos foram associados com a ingestão de moluscos crus infectados com larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* (CALDEIRA et al., 2007; LIMA et al., 2009; THIENGO et al., 2010). No Brasil, moluscos terrestres de diferentes espécies, *B. similis*, *A. fulica*, *S. octona* e *S. marginata*, têm sido encontrados naturalmente infectados na região Sudeste (CALDEIRA et al., 2007) e na região Nordeste (THIENGO et al., 2010), contribuindo diretamente para o aparecimento de infecções em humanos. Dentre as espécies, o gigante africano *A. fulica* tem

sido mencionado como o principal hospedeiro intermediário do parasito, sendo frequentemente encontrado com elevado grau de parasitismo (TOMA et al., 2002), enquanto que *R. norvegicus* mostra-se responsável pela manutenção do parasitismo na região sudeste do Brasil (SIMÕES et al., 2011). Recentemente, Moreira et al. (2013) registraram a ocorrência de *A. cantonensis* em roedores sinantrópicos (*R. rattus* e *R. norvegicus*) na região Norte do Brasil, bem como, presença de larvas desse nematoide no gastrópode *A. fulica*. Os resultados apontaram um grau de positividade de aproximadamente 10% dos roedores capturados, confirmando que *A. cantonensis* é agora endêmico também na região Norte do Brasil, no qual as espécies *R. rattus* e *R. norvegicus* configuram como os principais hospedeiros definitivos do parasito na região, enquanto que *A. fulica* atua como a principal espécie vetora na transmissão desta metazoose.

Em 2010, cinco casos de angiostrongilíase neural foram confirmados no estado de São Paulo. Desses, quatro ocorreram no litoral sudeste do estado, em Mongaguá, e o outro na cidade de São Paulo (CIARAVOLO et al., 2010). Estudos epidemiológicos confirmaram a presença de moluscos naturalmente infectados por larvas de *A. cantonensis*, sugerindo que a infecção possivelmente ocorreu mediante a ingestão do hospedeiro intermediário, ou ainda a partir da ingestão de vegetais contaminados com o muco desses organismos. Tal fato é de grande importância epidemiológica, uma vez que, nos últimos anos surtos de angiostrongilíase tem sido associado a esta conduta, destacando a necessidade de higienizar corretamente estes alimentos especialmente em áreas consideradas endêmicas. Em 2013 Espirito-Santo et al., confirmaram a ocorrência de mais um caso de meningite eosinofílica humana causado por *A. cantonensis* na cidade de São Paulo. Os resultados demonstraram que a soroconversão entre anticorpos para IgG anti-*A. cantonensis* ocorreu nas amostras coletadas somente após 135 dias do início da manifestação clínica. Em 2014, Morassutti et al., (2014) publicaram dados atualizados quanto a ocorrência da meningoencefalite eosinofílica no Brasil causados pela infecção de *A. cantonensis*. De acordo com os resultados, dos 84 casos suspeitos 34 foram confirmados positivos para *A. cantonensis*, demonstrando a expansão da doença no Brasil. Abaixo, demonstra-se a situação atualizada sobre os casos já notificados da angiostrongilíase no Brasil, bem como, a presença de hospedeiros naturais infectados por este metastrostrongilídeo (MORASSUTTI et al., 2014). Esta distribuição litorânea ressalta a importância das regiões portuárias na introdução da angiostrongilíase no Brasil e em várias regiões do mundo. Segundo autores, como consequência a falhas relacionadas a políticas públicas e gestão nessas regiões, roedores infectados provenientes de áreas endêmicas são

facilmente introduzidos no território nacional, favorecendo não somente a disseminação do parasito, mais também, a ocorrência de novos focos autóctones de transmissão. (MALDONADO et al., 2010).

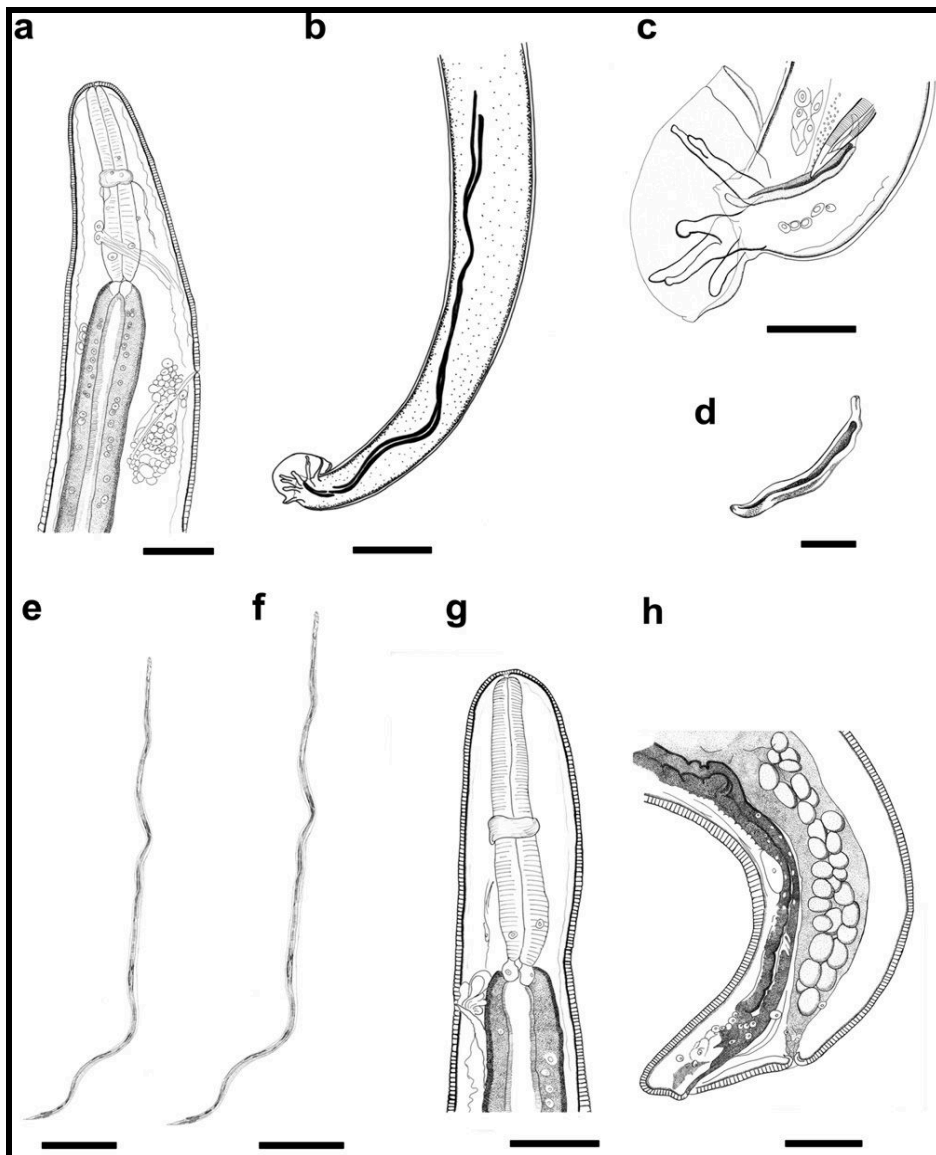


**Figura 2-** Mapa de distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* e casos de angiostrongilíase no Brasil. AL: Alagoas; AM: Amazonas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo. Fonte: MORASSUTTI et al., 2014.

#### 2.4. Aspectos morfológicos

Moreira et al. (2013) após constatarem a presença de roedores (*R. rattus* e *R. norvegicus*) naturalmente infectados por *A. cantonensis* na região Norte do Brasil, realizaram um estudo morfológico de formas adultas do parasito, coletos do lúmen da artéria pulmonar.

Resultados das análises morfológicas e morfométricas de formas adultas a partir da microscopia de luz e eletrônica de varredura revelaram a presença de uma extremidade anterior simples de aspecto cônico, com abertura oral simples, ausência de lábios, esôfago curto do tipo claviforme, presença de um anel nervoso localizado no terço posterior do esôfago e poro excretório perpendicular em relação ao eixo longitudinal do corpo situado abaixo da junção do esôfago com o intestino (Figura 3a). Os machos são menores e menos robustos do que as fêmeas. Na extremidade posterior observamos a presença de projeções cuticulares formando uma pequena bolsa copuladora (Figuras 3b, c e 4a, b). Presença de gubernáculo bem desenvolvido (Figura 2d), espículos longos e finos de tamanhos subiguais, guarnecidos por uma delicada bainha com estrias transversais também foram observados (Figuras 3c, d).



**Figura 3.** Microscopia de luz de formas adultas de *Angiostrongylus cantonensis*. Extremidade anterior de machos (a). Barra de escala = 100 $\mu$ m. Vista lateral da extremidade posterior dos machos, onde a bolsa copuladora pode ser observada (b). Barra de escala = 200  $\mu$ m. Detalhe da bolsa copuladora, em uma visão lateral, demonstrando a disposição dos raios (c). Barra de escala = 100 $\mu$ m. Gubernáculo (d). Barra de escala = 30 $\mu$ m. Espículo esquerdo (e). Barra de escala = 300 $\mu$ m. Espículo direito (f). Barra de escala = 300 $\mu$ m. Extremidade anterior da fêmea (g). Barra de escala = 100 $\mu$ m. Extremidade posterior da fêmea (h). Barra de escala = 100 $\mu$ m. Fonte: MOREIRA et al., 2013.

A bolsa copuladora mostra-se bilobada, levemente assimétrica e com uma pequena reentrância em sua extremidade posterior (Figuras 4a, b). Os raios da bolsa mostram-se bem definidos, robustos e com estrutura papiliforme em sua extremidade. São organizados em raios ventro-ventrais e ventro-laterais, nos quais se mostram maiores e mais robustos quando comparado com os ventrais. Três raios laterais originam a partir de um mesmo tronco. O raio antero-lateral é o menor e o mais robusto entre eles, enquanto que o raio médio-lateral é o mais longo, frequentemente alcançando a borda da bolsa copuladora (Figura 4a, b). O raio externo-dorsal é separado a partir dos raios laterais, porém é similar em comprimento ao raio latero-posterior. O raio dorsal é o mais reduzido em comprimento, bifurcando-se em sua extremidade de forma a originar três curtos troncos. Na extremidade posterior das fêmeas é possível observar a presença de alças uterinas sinuosas repletas de ovos e presença de um ovijector (Figura 4e).

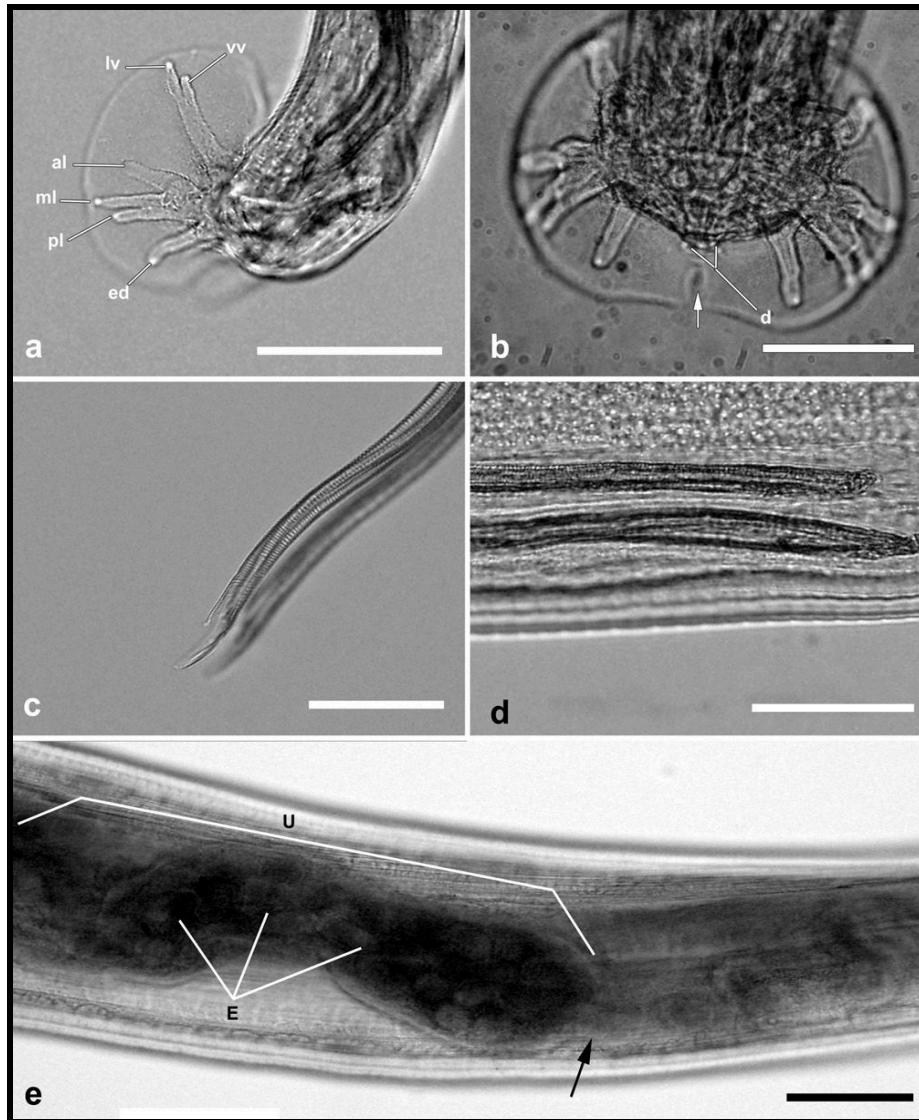


Figura 4. Microscopia de luz de formas adultas de *Angiostrongylus cantonensis*. Vista lateral da bolsa copuladora de machos, com os raios ventro-ventral (vv), latero-ventral (lv) originando a partir de um mesmo tronco. Os raios laterais são divididos em antero-lateral (al), médio-lateral (ml) e postero-lateral; e o raio externo-dorsal (ed) (a). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Vista ventral da bolsa copuladora, demonstrando o raio dorsal (d). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Detalhe da extremidade posterior dos espículos cobertos por uma bainha estriada (c). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Detalhe da extremidade anterior dos espículos (d). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Detalhe do corpo da fêmea demonstrando o útero (U), com ovos (E) e ovijector (seta) (e). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Fonte: MOREIRA et al. (2013).

## 2.5 Hospedeiros de *Angiostrongylus cantonensis* e seu papel como reservatório e propagação da doença.

Alguns autores têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos no ciclo biológico de *A. cantonensis*. Moluscos terrestres e algumas espécies aquáticas são considerados os primeiros hospedeiros intermediários. Contudo, em certas regiões observa-se que determinadas espécies de molusco apresentam maior susceptibilidade a infecção. Neste contexto, *A. fulica* é considerado a maior fonte de infecção em todo mundo. Segundo Kliks e Palumbo (1992) a dispersão de *A. cantonensis* está diretamente associada à intensa propagação deste molusco iniciado a partir do continente Africano em direção as ilhas do Pacífico e sul Asiático.

A espécie *P. canaliculata* por sua vez, apresenta uma ampla distribuição no continente Asiático causando grandes danos ao sistema agrícola local. Além disso, este molusco é também muito suscetível à infecção por *A. cantonensis* e tem se tornado um importante hospedeiro intermediário nestas regiões (WANG et al., 2007). A taxa de infecção em *P. canaliculata* é considerada alta especialmente na Tailândia, China e Japão. Na Tailândia, moluscos do gênero *Pila* spp. são frequentemente utilizados como fonte alimentar humana, e deste modo podem também induzir quadros de infecção. Contudo, por apresentar menor susceptibilidade à infecção por este helminto, a carga parasitária normalmente observada é considerada baixa o que explica uma sintomatologia mais moderada em humanos em comparação aos casos em que o molusco hospedeiro é *P. canaliculata* (YII, 1976). Porém, Tesana et al. (2008), após compararem experimentalmente a suscetibilidade entre *P. canaliculata* e *Pila polita* (Deshayes, 1830) a infecção por *A. cantonensis*, observaram variações significativas entre elas, sugerindo maior suscetibilidade da espécie *P. polita*, a infecção, concluindo que a dose do inóculo infectante atua como um importante fator extrínseco nesta manifestação.

No Brasil, em um estudo realizado por Caldeira et al. (2007), foram encontrados pela primeira vez moluscos naturalmente infectados por *A. cantonensis*. Neste estudo, 270 espécimes de moluscos foram coletados, e após identificação, foram classificados dentro de quatro diferentes gêneros: *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), *Subulina octona* (Bruguière, 1792), *A. fulica* e *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). Todas as espécies foram positivas para *A. cantonensis*, porém *B. similaris* e *A. fulica* foram as que apresentaram maior parasitemia demonstrando maior suscetibilidade à infecção. Mais tarde, Maldonado et al.



(2010), identificaram os primeiros exemplares de *A. fulica* naturalmente infectadas por *A. cantonensis* no Sul do Brasil. Recentemente, Omar et al. (2012) em um estudo longitudinal realizado em 30 diferentes localidades no território nacional, demonstraram dados atualizados quanto a dispersão do parasito, a partir da identificação de populações de moluscos naturalmente infectados. Após a captura, os espécimes foram individualmente identificados e submetidos ao processo de digestão química para a recuperação das larvas. Os resultados moleculares confirmaram positividade em quatro espécies de gastrópodes (*S. octana*, *S. marginata*, *B. similaris* e *A. fulica*) em 11 localidades (Belém - PA, Recife, Salvador - BA, Ilhéus - BA, Vila Velha – ES, Niterói – RJ, Angra dos Reis – RJ, São Sebastião – SP, Santos - SP, Paranaguá – PR, Navegantes – SC). Os resultados indicam uma ampla distribuição do parasito no território nacional, estando presente em 36,6% das localidades estudadas.

Estudo realizado por Ibrahim (2009) no Egito constatou variações na prevalência e intensidade de *A. cantonensis* em diferentes espécies de moluscos aquáticos. Neste trabalho, das trinta espécies coletadas, seis foram confirmados como hospedeiros intermediários deste nematóide (*Melanoides tuberculata*, *Cleopatra bilimoides*, *C. cyclostomoides*, *Lanistes carinatus*, *B. alexandrina* e *Lymnaea natalensis*). Como principais resultados, fatores ecológicos foram confirmados exercer forte influência na taxa de infecção dos moluscos, já que uma correlação negativa foi estabelecida entre a salinidade e o coeficiente de prevalência. Adicionalmente, estudos relatam padrões sazonais como determinantes na prevalência e intensidade da infecção por este parasito, especialmente no verão e primavera, justificados pelo maior número de L<sub>1</sub> liberadas junto às fezes de roedores infectados e por uma maior atividade de moluscos gastrópodes (KUTZ et al., 2002; EL-SHAZLY et al., 2002).

Existem poucas informações considerando a prevalência de *A. cantonensis* em hospedeiros paratênicos (RADOMYOS et al., 1994; PANACKEL et al., 2006; HIDELARATCHI et al., 2005). Pequenas planárias poderiam representar uma importante, porém negligenciada fonte de infecção em humanos, quando acidentalmente consumidas juntas com vegetais crus e contaminados (SLOM et al., 2002; BOWDEN, 1981). Quatro surtos de angiostrongilíase humana têm sido considerados mediante consumo de vegetais contaminados. Adicionalmente, um surto com cinco casos na Tailândia foi associado à ingestão de sucos de vegetais em 2001 (TSAI et al., 2004).

Segundo resultados apresentados por Ash (1968), determinadas espécies de anfíbios foram encontrados naturalmente infectados por larvas de *A. cantonensis*. O consumo de anfíbios indevidamente preparados tem sido implicado como fontes de infecções em

humanos, principalmente na Tailândia, China e Estados Unidos. Na Tailândia lagartos monitorados em estudos foram encontrados infectados com *A. cantonensis* e mais do que 18 casos de angiostrongilíase humana na Tailândia e Índia foram atribuídos ao consumo de lagartos (RADOMYOS et al., 1994; PANACKEL et al., 2006; HIDEARATCHI et al., 2005).

*Rattus rattus* e *R. norvegicus* tem sido considerado os hospedeiros definitivos mais comuns de *A. cantonensis*, porém outras espécies de ratos encontrados em áreas naturais e florestais foram também registradas como hospedeiros naturais para este helminto (CROSS; CHEN, 2007). Segundo Wang et al. (2007), uma vez observados ratos infectados em condições naturais, a região passa a ser considerada de risco, já que apenas roedores apresentam a capacidade de albergar a infecção até sua fase final, possibilitando a diferenciação e maturação dos parasitos. Deste modo, por se mostrar indispensável ao completo desenvolvimento do parasito, os roedores são organismos fundamentais para o estabelecimento de *A. cantonensis* em uma determinada região.

Seres humanos e primatas podem ser considerados hospedeiros acidentais para *A. cantonensis*, onde o parasito não é capaz de completar o seu desenvolvimento e usualmente morre no sistema nervo central, causando um quadro inflamatório denominado meningoencefalite eosinofílica podendo mesmo levar a morte do hospedeiro. O parasito tem sido incriminado como a causa de mortes em primatas capturados na Austrália e Estados Unidos (NEW et al., 1995; PROCIV et al., 2000).

Em medicina veterinária, trabalhos vêm notificando o envolvimento direto deste helminto em episódios de síndromes neurológicas. Estudos realizados por Wright et al., (1991), identificaram após necropsia, a ocorrência de larvas de nematoides localizadas principalmente na região cefálica em dois potros. Entre os principais aspectos clínicos observados, a ocorrência de tetraparesia e paralisia foi registrada em ambos os animais, e após histologia do cordão espinhal e do cérebro, cortes revelaram secções que se mostraram consistentes a larvas de *A. cantonensis*. Jindrak e Alicata, (1970), demonstraram experimentalmente que cães também são susceptíveis a infecção com larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis*. Neste estudo, cinco animais foram expostos à infecção e dois morreram logo no terceiro dia após infecção sem demonstrar qualquer sinal clínico. Estudos anatomo-patológicos demonstraram uma intensa reação inflamatória, além da presença de larvas localizadas tanto no cérebro quanto no cordão espinhal. Os demais desenvolveram sintomatologia neurológica, manifestada principalmente na forma de uma intensa depressão,

marcha instável e hipersensibilidade da pele, vindo a óbito 21-90 dias após infecção. Nenhuma lesão foi observada nos pulmões, concluindo que neste modelo *A. cantonensis* não alcança a maturidade sexual.

## **2.6 Importância do Filo Mollusca no desenvolvimento de larvas de trematódeos e nematóides.**

Dentre as principais helmintoses de interesse médico e veterinário transmitidas por moluscos no Brasil a esquistosomose, a fasciolose e a angiostrongilíase que assumem grande importância (MODENA et al., 1993; SERRA-FREIRE, 1995; THIENGO, 2007).

A esquistosomose encontra-se efetivamente entre as mais importantes endemias do País em termos de saúde pública. Coura e Amaral (2004) após estudo epidemiológico no Brasil registraram que a infecção ocorria em uma extensa área compreendida pelo estado do Maranhão até o Espírito Santo, enquadrando ainda o estado de Minas Gerais e focos isolados notificados do Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Adicionalmente, estudos vêm ressaltando a importância desta parasitose também em medicina veterinária, já que bovinos tem sido encontrados naturalmente infectados (BARBOSA, 1972) pelo trematódeo, induzindo complicações que acabam afetam diretamente seu estado nutricional.

A fasciolose é outro exemplo de parasitose causada por trematódeo, sendo encontrados principalmente em bovinos, caprinos, ovinos, equinos e outros mamíferos herbívoros, além de ser registrada também no homem (AMARAL; Busetti, 1979; THIENGO, 2007). Para o Brasil, historicamente, os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais são relatados como incidentes de fasciolose bovina (SERRA-FREIRE, 1995) o que é extremamente preocupante, já que, a mesma acarreta sérios prejuízos a pecuária, comprometendo diretamente o desenvolvimento econômico nestes estados. Nos últimos anos, casos envolvendo infecção em humanos têm aumentado significativamente, chamando a atenção dos profissionais de saúde para a necessidade de desenvolver medidas voltadas principalmente no controle e prevenção desta doença (MAS-COMA et al., 1999).

As angiostrongilíases são agora exemplos de doença causada por nematóides pertencentes ao gênero *Angiostrongylus*. Dentre as diversas espécies, duas assumem maior relevância, *A. costaricensis*, agente etiológico da angiostrongilíase abdominal e *A.*

*cantonensis* responsável por um tipo de meningoencefalite eosinofílica, ambas de potencial zoonótico (STEWART et al., 1985).

Em todos os casos citados, a participação do molusco é considerada vital ao desenvolvimento do parasito, possibilitando desenvolver estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011). Atualmente, de acordo com Cribb et al (2001), aproximadamente 40.000 espécies de trematódeos requerem moluscos para completar seu ciclo. Tais dados remetem a importância de animais deste filo como hospedeiros intermediários de parasitos para animais silvestres e domésticos, assim como para o homem.

Registros sobre a helmintofauna associada aos gastrópodes límnicos foram realizados em 12 estados brasileiros. Neste, o gênero *Biomphalaria* tem sido associado a diferentes tipos cercarianos (BOAVENTURA et al., 2007). Na região Nordeste, *Biomphalaria* foi o gênero em que mais se verificou a presença de parasitos principalmente no estado do Piauí (PARAENSE; ARAÚJO, 1984). Adicionalmente, estudos realizados por Thiengo et al (2001, 2002a), tem documentado e caracterizado diferentes associações parasito-hospedeiro, destacando especialmente o envolvimento de espécimes do gênero *Biomphalaria*.

Em Minas Gerais, pesquisas registraram a espécie *B. glabrata* com maior variedade de tipos cercarianos sendo “Echinostome cercaria” presentes na maioria das espécies encontradas naturalmente infectadas (SOUZA et al., 1998; SILVA, 1992). Além disso, trabalhos vêm demonstrando o envolvimento de um grande número de espécies de moluscos como hospedeiros potenciais no ciclo de alguns nematóides, confirmando a capacidade desses parasitos infectarem diferentes hospedeiros intermediários (BANEVICIUS et al., 2006; MORERA, 1988;). Neste contexto, estudos têm comprovado a susceptibilidade do gênero *Biomphalaria*, especialmente das espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) na infecção experimental por *A. costaricensis* e *A. cantonensis* (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989; LIMA et al., 1992; YOUSIF; LAMMLER, 1977). No Brasil, três espécies do gênero *Biomphalaria* têm sido reconhecidas como de maior importância epidemiológica: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* fato este justificado pelo envolvimento direto de tais espécies na manutenção do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.

Morfológicamente, moluscos pertencentes ao gênero *Biomphalaria* apresentam concha discoidal (planoespiral), podendo chegar a mais de 40 mm de diâmetro. Apresentam a hemolinfa vermelha devido à presença de um pigmento análogo a hemoglobina, o tubo renal é

em forma de “J”. A espécie *B. glabrata*, possui a concha com giros arredondados, o lado direito é mais escavado que o esquerdo. É a maior espécie da família, entretanto apenas as características da concha não podem ser utilizadas para confirmação da espécie, visto que, em função das condições ambientais e pressões seletivas as conchas podem sofrer alterações, fazendo com que haja confusão para identificação correta da espécie. Por isso, deve-se também considerar características de morfologia interna, como a presença da crista renal pigmentada ao longo da superfície ventral do tubo renal em indivíduos adultos e a linha pigmentada em indivíduos jovens. Além destas características, o ovoteste possui mais de 350 divertículos, presença de bolsa vaginal, porção média da bainha do pênis aproximadamente do mesmo tamanho que a porção mais larga do canal deferente (SOUZA; LIMA, 1990).

A distribuição geográfica revela que *B. glabrata* e *B. straminea* são as espécies melhores adaptadas às condições naturais do Brasil. Segundo Paraense (1975), a espécie *B. glabrata* é encontrada ao longo da faixa costeira do Nordeste, algumas regiões do Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país. Dados atualizados registram a presença desta espécie em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal ocupando toda a linha costeira (CARVALHO et al., 2005). Este fato acrescido de sua importância epidemiológica faz da espécie *B. glabrata* um dos principais hospedeiros parasitos e, portanto de grande relevância tanto em medicina humana quanto em veterinária.

## **2.7 Relação molusco-nematoide com ênfase na relação *B. glabrata*/A. cantonensis**

De maneira geral, nematoides estabelecem diversos tipos de associações com moluscos, variando desde uma relação paratênica, sem cursar com alterações significativas no estado metabólico do hospedeiro, a uma condição de parasitismo, no qual frequentemente conduz a quadros patológicos resultantes do processo de desenvolvimento das larvas. A maioria dos Strongylídeos utiliza moluscos como hospedeiros intermediários, possibilitando o desenvolvimento de larvas infectantes aos hospedeiros definitivos. Por outro lado, os Rhabditidas acabam utilizando tais organismos como hospedeiros definitivos, permitindo o desenvolvimento completo do ciclo biológico dos nematoides. Atualmente, mais do que 108 espécies de nematoides tem sido confirmado estabelecer algum grau de associação com moluscos, sugerindo um processo co-evolutivo estabelecidos entre ambos os organismos (GREWAL et al., 2003).

Anderson (2000) definiu hospedeiro paratênico como o organismo capaz de se infectar, mantendo viável a forma infectante para o hospedeiro definitivo, sem, contudo oferecer condições intrínsecas favoráveis ao processo evolutivo do parasito, funcionando como uma espécie de refúgio temporário até a infecção final. Este tipo de associação é observado em algumas espécies de nematoides que acabam utilizando moluscos como hospedeiros paratênicos, fazendo deste mecanismo uma estratégia, que frequentemente aumenta as possibilidades de sobrevivência e de transmissão. Como exemplo, moluscos aquáticos pertencentes à espécie *Galba corvus* (Gmelin, 1778) atua como hospedeiro paratênico para larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) do nematoide *Anguillicola crassus* (Kuwahara, Niimi e Hagaki, 1974), agente patogênico para uma determinada espécie de enguia européia *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758).

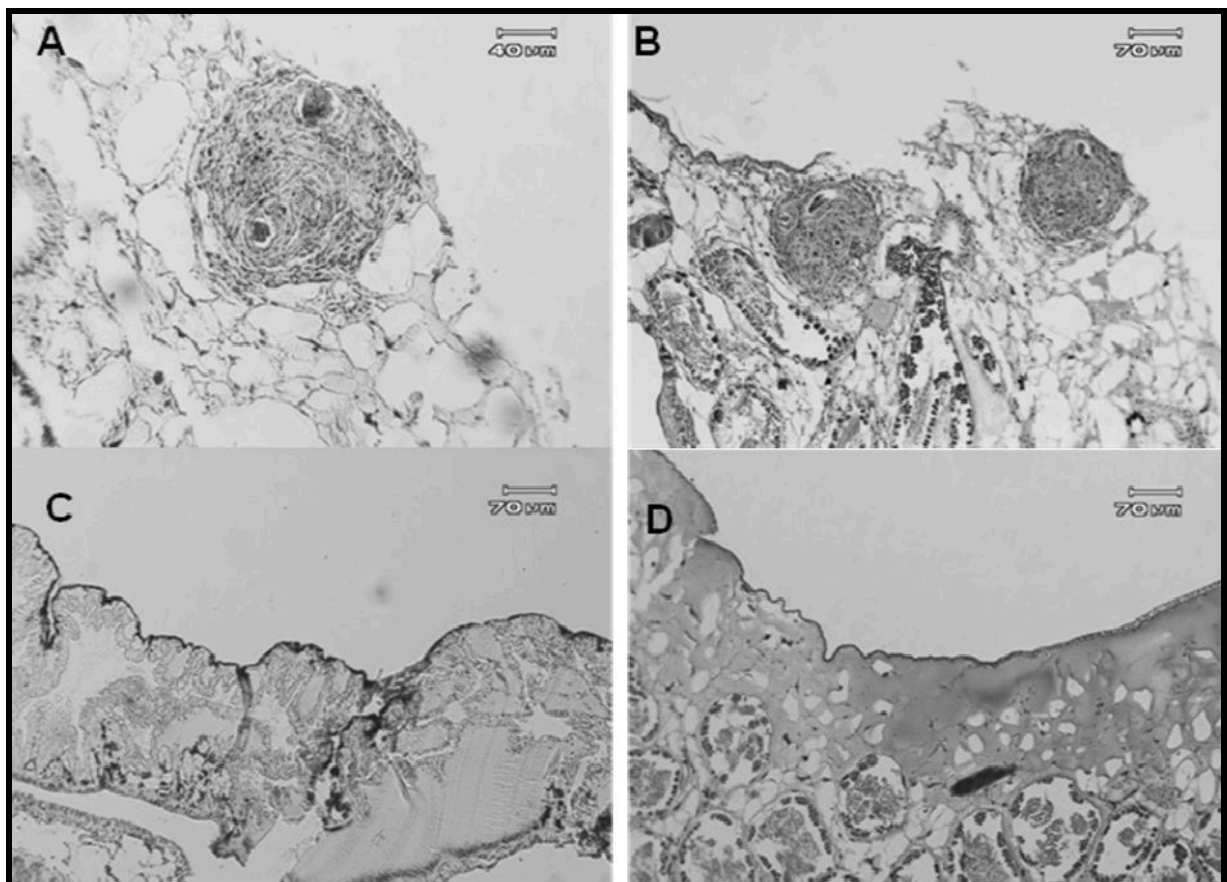
Diferentemente, existem espécies de nematoides que requerem obrigatoriamente moluscos como hospedeiros intermediários no seu ciclo, e, portanto, essenciais ao seu completo desenvolvimento. Esse tipo de associação é geralmente observado na maioria dos Metastrongilídeos, no qual larvas de primeiro estágio infectam moluscos e se desenvolvem até estágios que serão adquiridos pelo hospedeiro definitivo (vertebrado) (KUTZ et al., 2001). Como exemplo, parasitos de ruminantes *Mullerius capillaris*, (Mueller, 1889) utilizam diferentes espécies de moluscos terrestres *Limax cinereus* (Lister, 1678) e *Arion hortensis* (Férussac, 1819) como hospedeiros intermediários. Condição similar pode ser observada na associação entre larvas de *Protostrongylus tauricus* (Schulz e Kadenazii, 1949) e o molusco *Helicella derbentina* (Krynicky, 1836), onde estágios infectantes são formados no final do trigésimo dia, se localizando junto ao tecido muscular do hospedeiro intermediário (RODONAYA, 1977). Este tipo de relação é também observado para a espécie *A. cantonensis*, no qual acaba utilizando diferentes espécies de moluscos terrestres como hospedeiros intermediários, fazendo desses organismos, fator prioritário para o desenvolvimento de larvas infectantes ao hospedeiro definitivo, e, conseqüentemente, para a transmissão da angiostrongilíse neural humana. Durante essa associação, alterações morfológicas e bioquímicas são observadas, como consequência ao desenvolvimento e migração das larvas intra-molusco (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Neste contexto, alguns trabalhos têm demonstrado alterações bioquímicas em moluscos expostos à condição de infecção experimental por nematoides. Stewart et al. (1985) foram os primeiros a constatar alterações fisiológicas em *B. glabrata* infectada experimentalmente por *A. costaricensis*. Neste estudo, a atividade da fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e

creatina fosfoquinase mostraram-se significativamente maiores nos grupos infectados em relação ao controle. Variações nos conteúdos de glicose e cálcio hemolinfático também foram registradas, com os animais infectados demonstrando uma hiperglicemia associado a um decréscimo de cálcio hemolinfático.

Brockelman e Sithithavorn (1980) observaram mudanças relacionadas com o perfil glicêmico do molusco *A. fulica* após infecção por *A. cantonensis*. Como principais resultados, um decréscimo significativo nos conteúdos de glicose após a primeira semana de infecção foi registrado, sendo o organismo hospedeiro capaz de restabelecer o estado normoglicêmico em seguida. Em 2011, Tunholi-Alves et al. (2011) demonstraram uma série de alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* após período pré-patente de desenvolvimento intramolusco de *A. cantonensis*. Os resultados apresentados demonstraram a ocorrência do fenômeno da “castração parasitária”, justificado pela diminuição significativa do desempenho reprodutivo do molusco. Concomitantemente a estas alterações, um decréscimo significativo nos conteúdos de galactogênio também foi observado, demonstrando que o desenvolvimento larval de *A. cantonensis* causa significativas variações no metabolismo energético de *B. glabrata*. Tais resultados indicam que a diminuição do rendimento reprodutivo de moluscos infectados foi provavelmente relacionada com o decréscimo nos conteúdos de galactogênio estocados na glândula de albúmen, comprometendo não somente o número de ovos postos mas principalmente sua viabilidade, uma vez que, esta reserva atua como constituinte integrante do fluido perivitelínico, utilizado como substrato na fase inicial de desenvolvimento do embrião. No ano seguinte, Tunholi-Alves et al. (2012) demonstraram que a infecção de *A. cantonensis* também induz alterações no metabolismo protéico de *B. glabrata*. Como principais resultados, uma redução nos conteúdos de proteínas hemolinfáticas foi observada nos grupos infectados, denotando que a infecção por esta espécie de nematóide estimula a mobilização de reservas não glicídicas do hospedeiro, possivelmente como tentativa de assegurar funções vitais próprias. Em paralelo a hipoproteinemia observada nos grupos infectados, *A. cantonensis* também induziu um acúmulo nas concentrações de ureia e redução nos níveis de ácido úrico na hemolinfa. Estes achados apontam para uma maior taxa de desaminação de aminoácidos e outros compostos nitrogenados, que passam a ser utilizados como substrato alternativo a formação de uma nova glicose. Nesse mesmo estudo, alterações morfológicas foram demonstradas, como consequência ao comportamento migratório e desenvolvimento apresentado pelas larvas do nematóide. Essas alterações foram manifestadas principalmente na forma de reações inflamatórias reacionais, caracterizada histologicamente

por um infiltrado hemocitário de aspecto nodular esférico, circundando as formas larvais (Figura 4a, b). Estes resultados contribuem diretamente para o aumento da atividade hemolinfática das aminotransferases (ALT e AST) nos grupos infectados, confirmando a importância desses grupamentos enzimáticos como biomarcadores de injúrias teciduais em modelos de infecção.



**Figura. 5.** Glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* infecta por *Angiostrongylus cantonensis* demonstrando reações granulomatosas, de aspecto nodular esférico, caracterizadas por concentração gradativa de hemócitos. Figuras C e D: Glândula digestiva de moluscos não infectados demonstrando ausência de larvas (FONTE: TUNHOLI-ALVES et al., 2012).

### **2.7.2 Aspectos relacionados aos conteúdos de carboidratos e ao metabolismo oxidativo de moluscos expostos à condição de infecção.**

Segundo Becker (1980), ao invadir seu hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos induzem mudanças significativas em seu padrão metabólico induzindo-o frequentemente a um estado de balanço energético negativo, já que passam a competir diretamente pelos nutrientes



e utilizá-los em benefício próprio, causando ao hospedeiro um estado nutricional semelhante àquele gerado durante período de jejum severo.

Dentre as principais mudanças, as alterações no metabolismo de carboidratos são frequentemente observadas, especialmente nos gastrópodes pulmonados, onde o metabolismo energético é mantido principalmente mediante consumo de glicose (JOOSSE, 1988). Assim, o glicogênio assume grande importância, sendo fundamental no restabelecimento da normoglicemia e conseqüentemente na manutenção do estado energético nestes organismos. Esta reserva é encontrada em células especiais que o armazenam na região anterior do manto e entre os ácinos da glândula digestiva (DE JONG-BRINK, 1973), bem como no tecido muscular (PINHEIRO; AMATO, 1994).

Muitos autores têm registrado alterações nos conteúdos de glicose e glicogênio em diferentes modelos parasito/hospedeiro (PINHEIRO; AMATO, 1994; CREWS; YOSHINO, 1990; ISHAK et al., 1975). Em todos os casos, uma diminuição significativa dos conteúdos de glicose foi observada. Entretanto, Thompson e Lee (1986), afirmaram que os conteúdos de glicose na hemolinfa de moluscos são precisamente regulados a partir de mecanismos fisiológicos integrados, garantindo desta forma variações compatíveis a sua sobrevivência mesmo em situações de infecção.

Ishak et al. (1975) observaram variações expressivas no conteúdo de glicogênio da glândula digestiva em *B. alexandrina* e *Bulinus truncatus* infectados com *S. mansoni*. Esses autores foram os primeiros a sugerir o possível envolvimento das larvas intramolusco de trematódeos no bloqueio de centros enzimáticos ligados a gliconeogênese, comprometendo conseqüentemente a formação de reservas neste sítio. Mais tarde, Mohamed e Ishak (1982) vêm completar estas observações mediante constatação da redução na atividade dos complexos que compõem a cadeia respiratória de moluscos infectados por *S. mansoni*, além da ativação de enzimas glicolíticas, principalmente da lactato desidrogenase, sugerindo a ativação de uma via fermentativa para obtenção de energia.

No sistema *F. hepatica* L./ *L. truncatula*, Iavorskii (1989) observou uma redução no conteúdo de glicogênio nos tecidos do hospedeiro infectado, concomitantemente ao aumento nos depósitos de lipídeos neutros. Tais resultados reforçam o envolvimento de vias bioquímicas relacionadas na manutenção do estado energético do hospedeiro, mediante a utilização de substratos não-glicídicos para a síntese de glicose.

Brockelman e Sithithavorn (1980) verificaram que a infecção de *A. cantonensis* em *A. fulica* promoveu um decréscimo dos conteúdos de glicose circulante após a primeira semana

de infecção, sendo o organismo hospedeiro capaz de restabelecer seu nível glicêmico logo em seguida. Adicionalmente, os resultados demonstraram que a infecção em nenhum momento afetou as reservas de carboidratos na glândula digestiva do molusco, sugerindo que a relação parasito/hospedeiro envolvendo a infecção com nematoides diferem amplamente daquelas registradas previamente para larvas de trematódeos e que provavelmente tais diferenças resultariam das particularidades observadas durante a etapa de desenvolvimento no hospedeiro intermediário, já que nematoides não se multiplicam assexuadamente. Stewart et al. (1985), após investigarem alterações patofisiológicas em *B. glabrata* infectada experimentalmente por *A. costaricensis*, observaram mudanças no conteúdo de glicose nos moluscos infectados, caracterizado principalmente pelo aumento nos níveis hemolinfáticos deste açúcar. Este aumento ocorreu mediante a diminuição significativa dos conteúdos de glicogênio da massa cefalopédica e de um aumento desse polissacarídeo na glândula digestiva dos animais infectados.

Resultados apresentados por Pinheiro et al. (2009) indicam uma diminuição significativa nos conteúdos de glicogênio em sítios específicos de *Lymnaea columela* Say, 1817 principalmente na glândula digestiva, após infecção experimental por *E. paraensei*. Esta redução nos conteúdos de reserva segundo alguns autores é decorrente da ativação de enzimas, resultando na ativação da glicogenólise nestes moluscos (READER, 1971; MOORE; HALTON, 1973). Mello-Silva et al. (2010), estudando o metabolismo de carboidrato de *B. glabrata* em função da infecção por larvas de *S. mansoni* e exposição ao látex de *Euphorbia splendens*, registraram um decréscimo nos conteúdos de glicogênio, sendo o menor valor apresentado nos animais simultaneamente infectados e expostos a ação do látex. Os resultados apresentados ajudam a melhor entender o gasto energético imposto a organismos em situações de estresse fisiológico, induzindo um maior consumo de ATP, maior aceleração da glicólise, além de alterar todo o sistema endócrino do molusco hospedeiro.

Estas alterações são frequentemente acompanhadas por mudanças no metabolismo oxidativo do molusco hospedeiro, especialmente nos conteúdos de alguns ácidos carboxílicos. Tal fato tem sido recentemente apresentado por Tunholi et al. (2013) no qual demonstram a transição do metabolismo aeróbico para anaeróbico de *B. glabrata* infectada experimentalmente por diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*. Como principais resultados, uma sobreposição da atividade da lactato desidrogenase nos grupos infectados foi observada, seguido por uma diminuição nas concentrações de ácido pirúvico e aumento nos níveis de ácido láctico hemolinfático, diferindo-se significativamente das médias apresentadas

pelo grupo controle. Adicionalmente, o acúmulo de ácido oxálico apresentado por ambos os grupos infectados (5 e 50 miracídeos) sugere a desaceleração de centros enzimáticos que integram as reações de óxido- redução do ciclo de Krebs e conseqüentemente do metabolismo aeróbico do hospedeiro. Padrão similar tem sido descrito para outros modelos de infecção (*B.glabrata/S.mansoni*), destacando a participação de vias fermentativas na manutenção do balanço redox do hospedeiro (BEZERRA et al., 1997).

### **2.7.3 Aspectos relacionados às alterações no perfil lipídico de moluscos infectados experimentalmente.**

De acordo com Tunholi et al. (2011), ao invadir o molusco hospedeiro, as larvas de parasitos induziriam uma série de alterações metabólicas, causados principalmente pela competição direta de nutrientes, que passam a ser drenados pelas larvas como substrato ao seu desenvolvimento e multiplicação. Entre as alterações, a depleção de reservas polissacarídicas (glicogênio e galactogênio) são frequentemente observadas, levando o molusco a utilizar outros substratos, tais como proteínas (TUNHOLI-ALVES et al., 2012) e lipídios (TUNHOLI-ALVES et al., 2011a), necessários não somente para atender funções vitais próprias, mas também assegurar o completo desenvolvimento parasitário.

Nos últimos anos, autores têm se dedicado a analisar pontualmente possíveis alterações no perfil lipídico de moluscos durante associação com larvas de parasitos (TUNHOLI-ALVES et al., 2013; BANDSTRA et al., 2006). Tal fato decorre em função da importância biológica direcionados a estas moléculas, atuando não somente como substrato energético, mas também como precursor na síntese de membranas. Além disso, as poucas informações disponíveis na interface moluscos/helmintos são contraditórias, indicando que o perfil lipídico de moluscos é amplamente variável (FRIED et al., 1989; FRIED; SHERMA, 1990).

Recentemente, Tunholi-Alves et al (2011a) investigaram o efeito da exposição experimental de diferentes doses miracidiais (5 e 50) de *Echinostoma paraensei* sobre os níveis totais de colesterol e triacilglicerol circulantes na hemolinfa e das frações de lipídios neutros estocados no complexo glândula-digestiva-gônada de *B. glabrata* durante a infecção pré-patente do trematódeo. Os resultados hemolinfáticos demonstraram uma ordem de variação similar para ambos os substratos testados na primeira semana após a infecção, indicando um decréscimo em seus conteúdos quando comparados com o grupo controle. Variações nos conteúdos de lipídios neutros estocados no complexo glândula digestiva-gônada foram também demonstrados, com as maiores alterações observadas na terceira e

quarta semana de infecção, caracterizados por um decréscimo em ambas as frações de colesterol, livre e esterificado (CHO e CHOE, respectivamente), e por um acúmulo de triacilglicerol (TAG) e ácidos graxos (AG). Tais resultados correlacionam-se com o período de desenvolvimento parasitário, e fortemente sugere a utilização de lipídios, principalmente na forma de (FA), como substrato ao processo de oxidação mitocondrial, além do envolvimento de determinadas frações, CHO e CHOE, como precursores na biossíntese de membranas, importantes para subsidiar as etapas de desenvolvimento e multiplicação do parasito.

A habilidade de larvas de helmintos em utilizar lipídios como substrato energético tem sido mencionada. Erasmus (1972), identificou a presença de enzimas em trematódeos relacionadas ao metabolismo lipídico, especialmente esterases e lipases não específicas. Resultados similares foram obtidos por Humiczewska e Rajski (2005) que identificaram a expressão de lipases em *Fasciola hepatica* em todos os estágios.

Hunsberger et al. (2013) observaram variações no metabolismo lipídico de *B. glabrata* após infecção por diferentes doses miracidiais (5 e 25) de *E. caproni*. Os resultados indicaram uma variação dose dependente, registrado apenas para a fração de (AG), com os menores conteúdos observado no grupo exposto a 25 miracidios. As diferenças observadas nos dados desse estudo com aqueles apresentados por Tunholi-Alves et al. (2011), indica que a resposta do hospedeiro a infecção é amplamente variável, sendo influenciado não somente por fatores extrínsecos, mas também, por fatores intrínsecos, incluindo variações genótípicas existentes entre diferentes espécies do mesmo gênero.

#### **2.7.4 Aspectos do metabolismo de cálcio em moluscos infectados experimentalmente por larvas de helmintos.**

O cálcio é um metal considerado essencial na biologia de moluscos e um dos principais componentes inorgânicos que compõem as conchas desses animais. Tal íon é descrito na literatura como importante elemento limitador na distribuição e adaptação de moluscos adultos, em sua atividade ovipositora e no desenvolvimento de ovos embriões (THOMAS et al., 1974). De Witt e Sminia (1980) relatam ainda que o cálcio está envolvido no processo metabólico do equilíbrio ácido-base na hemolinfa destes organismos sendo este mobilizado da concha na forma de carbonato de cálcio para a formação do tampão bicarbonato, além de atuar como importante co-fator enzimático para inúmeras reações bioquímicas, especialmente

aquelas relacionadas com as reações de oxido-redução que integram o ciclo do ácido tricarbóxico.

Paschoal e Amato (1996), estudando a interface *B. similaris*/*Eurytrema coelomaticum*, observaram maior deposição de cálcio na concha e glândula digestiva de moluscos infectados quando comparado com grupos não parasitados. De acordo com os autores, esta calcificação decorre principalmente da aceleração da via glicolítica, possibilitando atender as exigências energéticas requeridas pelo hospedeiro durante a infecção. Condição similar tem sido documentada por Brandolini et al (1997) durante a interface *Subulina octona*/*Tanaisia bragai*.

Recentemente, Tunholi et al. (2011) demonstraram significativas alterações no metabolismo inorgânico de *B. glabrata* durante a infecção pré-patente de *E. paraensei*. Como principais resultados, variações expressivas na calcemia foram observadas, com o pico hemolinfático de cálcio coincidindo-se com maior decréscimo de suas reservas na concha. Tais resultados elucidam o estabelecimento de mecanismos fisiológicos precisamente estabelecidos entre concha e hemolinfa, possibilitando que as concentrações desse íon no meio oscilem em função da infecção. Adicionalmente, as maiores alterações foram observadas nos grupos expostos a uma maior dose miracidial (50), indicando que nesse modelo, o metabolismo de cálcio é diretamente influenciado pela carga parasitária.

Adicionalmente, trabalhos ressaltam a importância desse elemento na resposta imunológica de moluscos, uma vez que, a atividade fagocitária de hemócito e demais células de defesa são dependentes deste íon na hemolinfa (ZELCK et al., 1995). Segundo Couto (2001), a atividade de lectinas plasmáticas de *Perna perna* é cálcio dependente, sendo, portanto, fundamental no processo de reconhecimento de substratos antigênicos e na resposta imune destes animais, capazes de aumentar a fagocitose pelos hemócitos, funcionando como opsoninas (OLAFSEN et al., 1992).

Ong et al. (2004) demonstraram que a infecção por *S.mansoni* altera significativamente as concentrações de cálcio na glândula digestiva de *B. glabrata*, com moluscos infectados apresentando duas vezes mais conteúdo de cálcio quando comparados a moluscos não infectados. A calcificação da glândula digestiva segundo os autores decorre de um processo inflamatório desencadeado a partir da presença e migração das larvas do parasito neste tecido.

Magalhães et al (2011) demonstraram que a mobilização de cálcio em *B. glabrata* varia em função as diferentes quantidades de carbonato de cálcio disponível no ambiente. De acordo com os autores, quanto maior for a quantidade de carbonato de cálcio no ambiente, maior será sua mobilização para a hemolinfa, aumentando a disponibilidade desse íon no

meio hemolinfático. Essa hipercalcemia permite que o excesso de cálcio seja direcionado na formação de reservas, os quais seriam armazenados em células específicas, especialmente aquelas dispostas nos espaços intracelulares do epitélio, células de produção de muco e manto. Para Magalhães et al. (2009), a disponibilidade de cálcio pode desencadear a formação de pérolas em *B. glabrata* expostas a diferentes quantidades de cálcio, sendo por isso considerada outro importante sítio de armazenamento desse íon.

Assim, o melhor entendimento sobre o metabolismo de cálcio em moluscos infectados torna-se relevante, devido suas inúmeras funções biológicas consideradas vitais tanto para a sobrevivência do molusco, quanto para o desenvolvimento do parasito, possibilitando com isto, o desenvolvimento de estudos voltados para o controle de organismos hospedeiros e, por conseguinte, dos agentes por eles transmitidos.

## OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações bioquímicas de *B. glabrata* durante a infecção pré-patente de *A. cantonensis*.

### 3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o efeito da infecção experimental de *A. cantonensis* sobre o metabolismo de cálcio em *B. glabrata*.
- Identificar alterações no metabolismo lipídico de *B. glabrata* durante infecção pré-patente de *A. cantonensis*.
- Descrever alterações no metabolismo oxidativo de *B. glabrata*, infectadas experimentalmente por *A. cantonensis*.
- Determinar as alterações na fisiologia mitocondrial de *B. glabrata* durante o desenvolvimento pré-patente de *A. cantonensis*.

## 4 CAPÍTULO I

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CÁLCIO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (MOLLUSCA: GASTROPODA) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA COM *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (NEMATODA: METASTRONGYLIDEA).**



Alterações no metabolismo de cálcio de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentalmente infectada com *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae)

**RESUMO**

Níveis de cálcio na hemolinfa e de suas reservas na concha de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis* foram determinados pela primeira vez. Concomitantemente, análises histoquímicas da glândula digestiva de moluscos infectados e não infectados foram realizadas para melhor entender as possíveis alterações no metabolismo de cálcio nestes organismos. Após 1, 2 e 3 semanas de infecção, moluscos foram dissecados para coleta da hemolinfa e separação dos tecidos. As maiores concentrações de cálcio na hemolinfa foram encontradas na segunda semana após infecção, com um aumento de 39,61% em relação ao valor médio de seu respectivo grupo controle. Entretanto, existiu uma redução significativa nas concentrações desse íon na hemolinfa de moluscos infectados após uma semana de infecção em relação aos organismos não infectados. Em paralelo, intensa hipocalcificação foi demonstrada na concha de moluscos infectados uma e duas semanas após a infecção, diferindo significativamente em relação aos respectivos grupos controles. Alterações morfológicas na glândula digestiva de moluscos infectados foram também observadas, confirmando o papel desse íon como um importante elemento no processo de encapsulação parasitária.

Palavras chaves: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, relação parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

Levels of calcium in the haemolymph and reserves in the shell of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* were determined for the first time. At the same time, histochemical analyses of the digestive gland of infected and uninfected snails were performed to better understand the possible changes in metabolism of calcium in these organisms. After 1, 2 and 3 weeks of infection, the snails were dissected for collection of haemolymph and separation of tissues. The highest calcium concentrations in the haemolymph were found 2 weeks after infection, with a 39.61% increase in relation to the respective control group. However, there was a significant reduction in the concentration of this ion in the haemolymph of infected snails after 1 week of infection in relation to the uninfected specimens. In parallel, intense hypocalcification was shown in the shell of infected snails 1 and 2 weeks after infection, differing significantly in relation to the respective control groups. Morphological changes in the digestive gland of infected snails were also observed, confirming the role of this ion as an important element in the parasite encapsulation process.

Key words: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, relationship host-parasite

## 4.1 INTRODUÇÃO

Cálcio é um mineral essencial para a sobrevivência de moluscos, atuando como principal constituinte inorgânico de suas conchas, conferindo resistência necessária e proteção contra ataques de possíveis predadores. Este íon também tem sido descrito como importante fator limitante na distribuição e adaptação de moluscos adultos, bem como em sua capacidade de oviposição, atuando como importante elemento no desenvolvimento dos ovos e embriões (TUNHOLI et al., 2011a). Portanto, este elemento é fundamental para a colonização desses organismos no ambiente. Outros estudos tem também indicado a importância do cálcio como um co-fator enzimático em reações de oxido-redução, em processos relacionados com o equilíbrio ácido-base e na resposta imune de moluscos contra parasitos e outros agentes patogênicos (SMINIA et al., 1977; DE WITT; SMINIA, 1980).

O cálcio não é apenas essencial à sobrevivência do molusco, ele também é um importante elemento manipulado pelos parasitos durante seu desenvolvimento em seu hospedeiro intermediário. Vários estudos tem investigado a influência da infecção parasitária sobre os níveis de cálcio no hospedeiro molusco. Um aumento significativo nos conteúdos de cálcio na concha de *Lymnaea stagnalis* infectadas com *Trichobilharzia ocellata* foi demonstrado por McClelland e Bourns (1969). Contudo, Tunholi et al. (2011c) observaram um significativo aumento nas concentrações de cálcio hemolinfático acompanhados por uma redução de suas reservas nas conchas de *Biomphalaria glabrata* quando infectados por diferentes doses miracidiais de *Echinostoma paraensei*. O mesmo efeito foi registrado por Stewart et al. (1985) para o níveis de cálcio hemolinfático de *B. glabrata* infectada por *Angiostrongylus costaricensis*. Esses estudos revelam, portanto, que o padrão do metabolismo de cálcio de moluscos infectados por estágios larvais de helmintos é amplamente variável, sendo diretamente influenciado por fatores intrínsecos, incluindo variações de espécies de níveis individuais de ambos, parasito e hospedeiro (ZBIKOWSKA, 2003; PINHEIRO et al., 2009) e também por fatores extrínsecos tais como as concentrações de  $\text{CaCO}_3$  disponíveis na água (MAGALHÃES et al., 2011).

Entre as diferentes espécies de Metastrongilídeos, *Angiostrongylus cantonensis* se destaca devido sua importância zoonótica, podendo acidentalmente infectar seres humanos, sendo enquadrado como principal agente causal da meningoencefalite eosinofílica (THIENGO et al., 2010). Estudos indicam que diferentes espécies de moluscos terrestres podem atuar como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis*, enquanto que o planorbídeo *B. glabrata* tem sido mencionados como hospedeiro potencial (CALDEIRA et al., 2007.;

TUNHOLI-ALVES et al., 2011, 2012). Esta dependência faz do molusco um elemento essencial para o completo desenvolvimento e dispersão do parasito, possibilitando alcançar estágios larvais infectantes ao seu hospedeiro definitivo. Recentemente nosso grupo tem caracterizado alterações na biologia reprodutiva e no perfil metabólico de *B. glabrata* infectada experimentalmente por *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011, 2012). Contudo, nenhuma informação é disponível sobre as alterações no metabolismo mineral durante esta interação.

Portanto, pela importância desse íon no sucesso adaptativo de moluscos e a carência de informações sobre sua participação na interação molusco/nematóide, o presente estudo avaliou pela primeira vez, os efeitos da infecção experimental de *A. cantonensis* sobre os conteúdos de cálcio na hemolinfa e de suas reservas na concha de *B. glabrata* durante três semanas de infecção, período este que corresponde etapa pré-patente de desenvolvimento larval intra-molusco desse helminto (TUNHOLI-ALVES et al., 2011, 2012). Adicionalmente, análises histoquímicas foram realizadas para determinar possíveis alterações teciduais resultantes da infecção.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Manutenção dos moluscos

Os moluscos foram mantidos em aquários contendo 1500 ml de água desclorada, no qual 0,5g de CaCO<sub>3</sub> foi adicionado, no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (TUNHOLI et al., 2011a, b). A água dos aquários foi substituída uma vez por semana. Seis grupos foram formados: três grupos controle (formado por moluscos não infectados) e três grupos infectados. Cada aquário era formado 10 moluscos, criados em laboratório após eclosão, para certificar sua idade e que o mesmo encontrava-se livre de infecções por outros parasitos. Todo o experimento foi conduzido em duplicata, utilizando um total de 90 moluscos, 45 moluscos formando o grupo controle (não infectados) e 45 formando os grupos infectados. Os aquários eram mantidos em sala com temperatura controlada (25°C) durante todo o experimento. O estudo foi conduzido por três semanas, período que corresponde o desenvolvimento pré-patente de *A. cantonensis* em *B. glabrata* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011). Moluscos foram alimentados com alface desidratados (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum*. As folhas eram trocadas todos os dias a fim de evitar sua fermentação, onde o número de moluscos mortos foi também contabilizado.

#### **4.2.2 Procedimento Parasitológico**

Larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) de *A. cantonensis* foram obtidas de *Achatina fulica* coletadas no município de Olinda, Pernambuco, Brasil em 2008 no peridomicílio de uma paciente diagnosticada com meningoencefalite eosinofílica, inoculadas em *R. norvegicus* no Laboratório Nacional de Referência em Malacologia Médica e no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, onde o ciclo desde então vem sendo mantido. Larvas L<sub>1</sub> utilizadas neste estudo foram obtidas a partir desse ciclo experimental mantido nesse mesmo laboratório. Moluscos jovens (8-12 mm) com 90 dias de idade, em média, foram expostos individualmente a aproximadamente 1200 L<sub>1</sub> em placas de 24 furos. Após 48 horas, os moluscos foram removidos e transferidos para aquários para a formação dos grupos experimentais.

Semanalmente, durante três semanas após a exposição, a hemolinfa foi coletada por punção cardíaca de moluscos de cada grupo (n=10), sendo em seguida dissecados para a coleta dos tecidos. As conchas foram então removidas, lavadas e estocadas até seu processamento. A hemolinfa foi mantida em banho de gelo durante sua coleta e em sequência estocadas a uma temperatura de -80°C.

#### **4.2.3 Determinação de cálcio e análises histoquímicas**

Conteúdo de cálcio na hemolinfa de *B. glabrata* foi determinada por de kits comerciais (Doles, Brasil) e os resultados foram expressos como mg de cálcio/dl de hemolinfa. Os conteúdos de cálcio na concha foi determinado de acordo com Pinheiro e Amato (1995) e Soido et al. (2009). A massa de carbonato de cálcio foi calculada e expressas como mg CaCO<sub>3</sub>/g de cinzas.

Moluscos de cada período de infecção foram dissecados e transferidos para o fixador Duboscq-Brasil (FERNANDES, 1949). Os tecidos moles foram processados de acordo com as técnicas de rotina histológica (HUMASON, 1979). Secções de (5µm) foram corados usando o método de Von Kossa (HUMASON, 1979) e observadas ao microscópio de luz Zeiss Axioplan; as imagens foram capturadas com uma câmara digital MRc5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

#### **4.2.4 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão da média e submetidos ANOVA one-way com pós-teste de Tukey-Kramer ( $\alpha=5\%$ ) para comparação das médias. A regressão polinomial foi calculada para analisar a relação existente entre os valores obtidos e o tempo de infecção (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

### 4.3 RESULTADOS

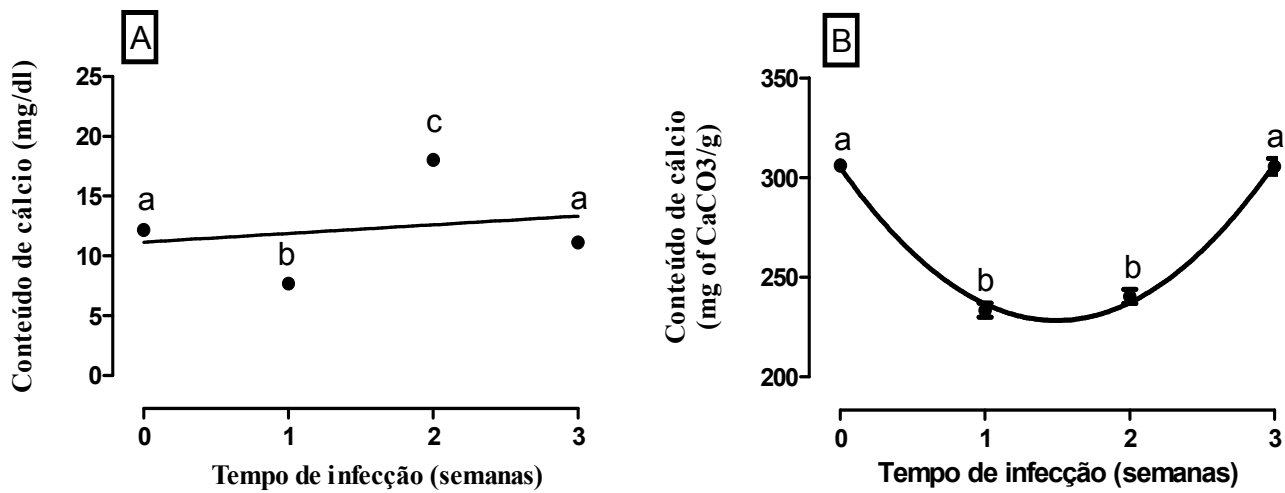
Alterações significativas nas concentrações de cálcio na hemolinfa e de suas reservas na concha de *B. glabrata* infectada experimentalmente por larvas de *A. cantonensis* foram observadas durante o período desse estudo, onde o hospedeiro intermediário foi capaz de normalizar as concentrações desse mineral em ambos os sítios estudados.

Os maiores níveis de cálcio hemolinfáticos foram detectados após a segunda semana de infecção ( $18,01 \pm 1,10$  mg/dl), representando um aumento de aproximadamente 39% em comparação com o respectivo grupo controle ( $12,29 \pm 0,36$  mg/dl) (Tabela 1). Contudo, uma diminuição significativa na concentração deste íon foi observada uma semana após infecção em relação ao grupo controle ( $7,67 \pm 0,47$  versus  $12,20 \pm 0,35$  mg/dl, um declínio de aproximadamente 37,13 % (Tabela 1). Embora em ambos os casos esses valores diferem significativamente em relação a média dos grupos controle, a análise de regressão linear não revelou um padrão durante o período de estudo (Figura 1a).

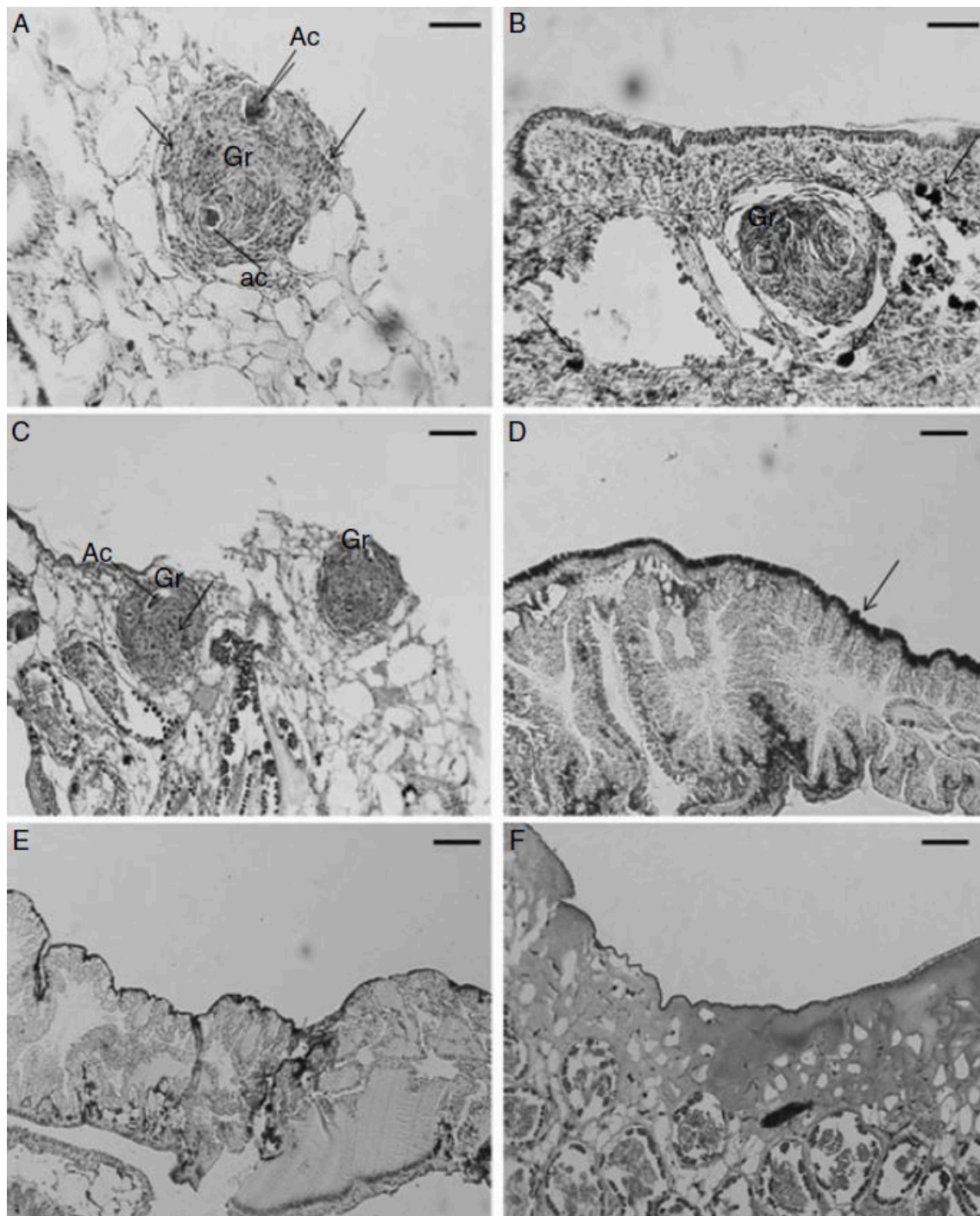
Existiu intensa hipocalcificação da concha após uma e duas semanas de exposição ( $233,45 \pm 3,56$  e  $241,32 \pm 3,45$  mg de  $\text{CaCO}_3/\text{g}$  de cinzas), diferindo significativamente em relação aos respectivos grupos controle ( $305,27 \pm 2,42$  e  $307,38 \pm 2,17$  mg de  $\text{CaCO}_3/\text{g}$  de cinzas, respectivamente), representando reduções de 23,53 e 21,81% respectivamente (Tabela 1). Em contraste, não houve variações significativas na terceira semana de exposição, com as concentrações de cálcio na concha de moluscos infectados flutuando próximo ao valor médio de seus respectivos grupos controle ( $306,08$  mg de  $\text{CaCO}_3/\text{g}$  de concha). A regressão polinomial de segunda ordem revelou um padrão de variação negativo, com redução nos períodos intermediário de análises e uma tendência a normalização no final do período pré-patente (Figura 1b).

Resultados histoquímicos revelaram a presença de larvas de *A. cantonensis* na glândula digestiva de moluscos infectados, bem como, a ocorrência de áreas de calcificação como uma reação complementar ao processo de encapsulamento parasitário (Figura 2a, b). No molusco

controle não foram observadas larvas do parasito nas secções da glândula digestiva, com sua integridade e funcionalidade preservada (Figuras 2e, f).



**Figura 1.** Relação entre as concentrações de cálcio na hemolinfa em (mg/dl) (A) e na concha em (mg de CaCO<sub>3</sub>/g de concha) (B) de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectada com *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes tempos de infecção (em semanas). Tempo zero (0) representa o valor das médias dos grupos controles após três semanas de observação. a,b,c = Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente da media dos grupos controles de cada semana experimental,  $P < 0.05$ . A análise de regressão linear demonstrou a seguinte relação: Hemolinfa (A) ( $y = 0.7250 - 9.161x$ ;  $r^2 = 0.05$ ) e concha (B) ( $y = 305 - 102.9x + 34.48x^2$ ;  $r^2 = 0.99$ )



**Figura 2.** Glândula digestive de *Biomphalaria glabrata* (A, B, C) infectada por *Angiostrongylus cantonensis* (ac) demonstrando reações granulomatosas (Gr) com deposição concêntrica de hemócitos ao redor das larvas de *A. cantonensis* (ac) de aspecto nodular esférico e deposição de ions cálcio; (EF) Grupo controle de *B. glabrata* demonstrando glândula digestive intacta e ausência de granulomas. Figuras A e B barra de escala = 40  $\mu$ m. Figuras C-F barra de escala = 70  $\mu$ m.



**Tabela 1.** Valores médios dos conteúdos de cálcio na hemolinfa (mg/dl) e concha (mg of CaCO<sub>3</sub>/g de cinzas) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, durante três semanas de infecção. <sup>a, b</sup>= Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente de seu respectivo grupo controle em cada semana experimental (P <0,05).

Semanas	Conteúdos de cálcio			
	Hemolinfa (mg/dl)		Concha (mg of CaCO <sub>3</sub> /g de cinzas)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
1	12.20±0.35 <sup>a</sup>	7.67±0.47 <sup>b</sup>	305.27±2.42 <sup>a</sup>	233.45±3.56 <sup>b</sup>
2	12.29±0.36 <sup>a</sup>	18.01±1.10 <sup>b</sup>	307.38±2.17 <sup>a</sup>	240.32±3.45 <sup>b</sup>
3	11.99±0.48 <sup>a</sup>	11.13±1.58 <sup>a</sup>	305.60±2.43 <sup>a</sup>	305.60±3.87 <sup>a</sup>

#### 4.4 DISCUSSÃO

Brockelman e Sithithavorn (1980), estudando a relação *A.fulica/ A.cantonensis*, encontraram um decréscimo nos conteúdos de carboidratos circulantes na hemolinfa e de suas reservas nos tecidos na fase inicial da infecção. De acordo com esses autores, este período é caracterizado por um intenso processo de desenvolvimento larval, resultando em uma maior competição por nutrientes entre o parasito e o hospedeiro, conduzindo o molusco a um balanço energético negativo. Nossos resultados indicam que a infecção por *A. cantonensis* induziu uma significativa redução nas concentrações de cálcio na hemolinfa de *B. glabrata* na primeira semana de infecção, após o qual estas concentrações retornaram aos valores normais com o progresso da infecção. Estes resultados podem ser em parte explicados por uma maior necessidade desse íon, por ambos, parasito e hospedeiro, confirmando ser este o período de maior demanda e necessidade energética, que passa ser obtida predominantemente a partir de reações oxidativas catalisadas por enzimas que utilizam o cálcio como cofator enzimático. Paschoal e Amato (1996), estudando a interface *B. similaris/E. coelomaticum*, observaram aumento na deposição de cálcio na concha e glândula digestiva de moluscos infectados. De acordo com esses autores, esta hipercalcificação é principalmente devida a uma aceleração na via glicolítica, via esta responsável pela oxidação parcial da glicose, resultando em uma maior

produção de ATP (TUNHOLI et al., 2011b). Tal envolvimento do íon cálcio tem também sido observado em outras espécies de moluscos, indicando a participação desse elemento como importante cofator enzimático em células de *Pomacea* sp., *Lanistes libycus* e *B. glabrata* (ABEBAYO-TAYO et al., 2011; TUNHOLI et al., 2011c). Em adição, no presente estudo a significativa redução dos níveis de cálcio em ambos os sítios analisados durante este período pode ser consequência de danos causados durante a penetração de larvas infectantes de *A. cantonensis*, resultando no desenvolvimento de reações inflamatórias em *B. glabrata*. Tal fato tem sido observado por Mostafa (2007), estudando os efeitos da infecção de *Schistosoma mansoni* sobre os conteúdos de cálcio em *B. glabrata*. De acordo com os autores, a redução nos conteúdos de cálcio hemolinfático ocorreu concomitantemente com a maior deposição desse mineral nos tecidos do hospedeiro, possivelmente como consequência de reações inflamatórias causadas pelo parasito. Este mecanismo pode comprometer a movimentação do molusco hospedeiro, reduzindo a ingestão de alimento e consequentemente dos níveis de cálcio.

Em contraste, na segunda semana de infecção existiu um aumento nas concentrações de cálcio na hemolinfa e uma redução desse íon na concha. Esta situação tem sido confirmada em outras associações parasito/molusco (TUNHOLI et al., 2011c). Infecções induzidas por estágios larvais de helmintos é frequentemente associada com depleção de reservas de carboidratos em seu hospedeiro intermediário. Portanto, moluscos começam a utilizar proteínas com substrato alternativo para produção de energia, alterando o pH hemolinfático como consequência ao intenso processo de desaminação de aminoácidos (PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011b). Nestas circunstâncias, carbonato de cálcio é mobilizado da concha para a hemolinfa, ajudando a manter o balanço ácido-base por meio da liberação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um importante componente do sistema de tampão bicarbonato. Este processo pode explicar a hipocalcificação observada nesse estudo (DE WITT; SMINIA, 1980; PINHEIRO; AMATO, 1995).

Outros estudos tem demonstrado que a resposta imune de moluscos é cálcio dependente. De acordo com Couto (2001), as atividades das lectinas na hemolinfa de moluscos durante processo de reconhecimento de substratos antigênicos estão diretamente relacionadas com as concentrações de cálcio na hemolinfa. Portanto, a hipercalcemia observada na segunda semana de infecção elucidada a participação do cálcio no fortalecimento do sistema imunológico de moluscos quando infectados, contribuindo para um maior recrutamento celular, especialmente de lectinas, durante este período. Adicionalmente, o aumento dos

níveis de cálcio observado no presente estudo estabelece condição bioquímica favorável para o sequestro hemolinfático desse íon e sua subsequente deposição tecidual, em resposta as injúrias causadas pela presença de larvas de *A. cantonensis* em *B. glabrata*, auxiliando o encapsulamento parasitário.

O processo de encapsulamento em *B. glabrata* durante infecção experimental por *A. cantonensis* foi reportado por Harris e Cheng (1975). Segundo esses autores, este processo envolve inicialmente a participação de células hemolinfáticas basofílicas, seguido pela formação de agregados nodulares fibróticos. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram em parte com aqueles publicados por Harris e Cheng (1975), indicando a ocorrência de áreas de calcificação metastática situadas localmente em órgãos viscerais, como uma reação complementar durante a encapsulação de *A. cantonensis*. Harris e Cheng (1975) também observaram a ocorrência de processos de encapsulação parasitária em vários tecidos, incluindo a massa cefalopediosa, na oitava semana de infecção. Esta discrepância pode ser parcialmente explicada pelos diferentes isolados utilizados (parasito e hospedeiro) e o tempo de exposição do hospedeiro ao parasito, uma vez que, no presente estudo nós somente analisamos as alterações no período pré-patente, enquanto que Harris e Cheng (1975) também investigaram as alterações no período patente de infecção.

A calcemia retornou ao valor basal na terceira semana de infecção, com os níveis de cálcio oscilando próximo daqueles registrados para o grupo controle. De acordo com alguns autores, este período é caracterizado pela formação de estágios larvais L<sub>3</sub>, no qual estão localizados principalmente no tecido muscular do hospedeiro, ao invés de órgãos viscerais, tais como, a glândula digestiva (TUNHOLI-ALVES et al., 2012). Portanto, apesar das alterações morfológicas encontradas na glândula digestiva de moluscos infectados, estas mostraram-se restritas a pontos específicos do órgão não comprometendo sua funcionalidade, permitindo o hospedeiro responder a infecção, uma vez que, a glândula digestiva é considerada o principal sítio metabólico e local de estocagem de importantes reservas energéticas. Além disso, como *A. cantonensis* apresenta período pré-patente relativamente curto em *B. glabrata*, no início da terceira semana de infecção as larvas desse nematóide não necessita mais de grandes quantidades de cálcio para o seu desenvolvimento e manutenção de suas atividades metabólicas, muitas já terão migrado através do tecido do hospedeiro, desenvolvendo até o estágio L<sub>3</sub> na massa cefalopediosa.

Finalmente, embora muitos estudos tivessem sido conduzidos sobre aspectos metabólicos de moluscos infectados por trematódeos, pouco é conhecido sobre este aspecto

considerando a relação com nematoides. Assim, este é o primeiro estudo que demonstra os efeitos da infecção por *A. cantonensis* sobre o metabolismo de cálcio em *B. glabrata*. Nossos resultados indicam a existência de precisos mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelo hospedeiro, possibilitando-o restabelecer o balanço ácido-base, bem como, fortalecer seu sistema imunológico, minimizando os efeitos deletérios causados pela infecção. Em adição, as alterações histológicas e histoquímicas observadas, confirmam a participação de íons cálcio como importante elemento no processo de encapsulação parasitária, resultando na formação de áreas calcificação, especialmente na glândula digestiva. Estas informações podem ser utilizadas no desenvolvimento de medidas de controle do molusco hospedeiro e conseqüentemente da angiostrongilíase neural humana.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO-TAYO, B.C.; ONILUDE, A.A.; ETUK, F.I. Studies on Microbiological, Proximate Mineral and Heavy Metal Composition of Freshwater Snails from Niger Delta Creek in Nigeria. **AU Journal of Technology**, v.14, p. 290-298, 2011.

BROCKELMAN, C.R.; SITHITHAVORN, P. Carbohydrate reserves and hemolymph sugars of the African giant snail, *Achatina fulica* in relation to parasitic infection and starvation. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.62, p.285-291, 1980.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CARVALHO, O.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.887-889, 2007.

COUTO, M.S.R. Caracterização da atividade aglutinante da hemolinfa de mexilhões *Perna perna*. Trabalho de conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2011.

DE WITT, N.D.; SMINIA, T. The effects of the nutritional state and the external concentration of the ionic composition of the haemolymph and on calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v.83, p.213-227, 1980.

FERNANDES, M.C. Métodos escolhidos de técnicas microscópicas, 2 nd edn. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ, 1949.

HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: enzyme histochemistry. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, p.367-374, 1975.

HUMASON, G.L. Animal Tissue Techniques, 4th edn. W.H. Freeman, San Francisco, USA, 1979.

MCCLELAND, G.; BOURNS, T.K.R. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on growth, reproduction and survival of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.24, p.137-146, 1969.

MAGALHAES, A.C.M.; PINHEIRO, J.; MELLO-SILVA, C.C. A mobilização do cálcio em *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes quantidades de carbonato de cálcio. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, 46-55, 2011.

MOSTAFA, O.M.S. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. **Parasitology Research**, v.101, p.963-966, 2007.

PASCHOAL, S.V.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) em *Bradybaena Similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): Alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p.411-418, 1996.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. Calcium determination in the shell of *Lymnaea collumela* (Mollusca, Gastropoda) infected with *Fasciola hepática* (Plathelminthes, Digenea). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, p.761-767, 1995.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, JR. A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea collumela* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55-59, 2009.

SMINIA, T.; DE WITH, N.D.; BOS, J.L.; VAN NIEUWMEGEN, M.E.; WITTER, M.P.; WONDERGEM, J. Structure and function of the calcium cells of freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. **Netherlands Journal of Zoology**, v.27, p.195-208, 1977.

SOIDO, C.; VASCONCELLOS, M.C.; DINIZ, A.G.; PINHEIRO, J. An improvement of calcium determination technique in the shell of mollusks. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.93- 98, 2009.

STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45, p.152-157, 1985.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta tropica**, v.115, p.194-199, 2010.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v,108, p.220-223, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the

metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143-147, 2012.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, JR. A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraense* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, p.192-195, 2011a.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, JR. A.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraense* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.109, p.885-891, 2011b.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; GARCIA, J.S.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, JR. A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Influence of *Echinostoma paraense* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v.129, p.266-269, 2011c.

ZBIKOWSKA, E. The effect of digenea larvae on calcium content in the shells of *Lymnaea stagnalis* (L.) individuals. **Journal Parasitology**, v.89, p.76-79, 2003.

## **5 CAPÍTULO II**

**EFEITOS DA INFECÇÃO POR LARVAS DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS*  
(NEMATODA, METASTRONGYLIDAE) SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DO  
SEU HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO EXPERIMENTAL *BIOMPHALARIA*  
*GLABRATA* (MOLLUSCA:GASTROPODA)**



Efeitos da infecção por larvas de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) sobre o metabolismo lipídico do seu hospedeiro intermediário experimental *Biomphalaria glabrata* (Mollusca:Gastropoda)

## RESUMO

A infecção experimental de *Biomphalaria glabrata* por *Angiostrongylus cantonensis* induz significativas alterações nas concentrações de triacilglicerol e colesterol na hemolinfa e de lipídios neutros no complexo glândula-digestiva-gônada (DGG). Neste estudo, moluscos foram dissecados após 1, 2 e 3 semanas de infecção para a coleta da hemolinfa e CGG para a determinação nos conteúdos de colesterol e triacilglicerol na hemolinfa e das frações de lipídios neutros nos tecidos. Os resultados demonstram que a infecção por este nematóide resultou em significativa redução nos conteúdos de ambos, colesterol e triacilglicerol na hemolinfa de *B. glabrata* durante período inicial de desenvolvimento ontogênico do parasito. Esta redução indica a possível utilização dessas moléculas pelo parasito e hospedeiro não somente como substrato energético, mas também como fatores estruturais requeridos durante o desenvolvimento das larvas do parasito. Em paralelo, as alterações no perfil de lipídios neutros no DGG e na atividade de lípases de moluscos infectados foram observadas, indicando a importância dessas moléculas para o sucesso da infecção.

Palavras chaves: Lipídios, relação parasito-hospedeiro, *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*,

## ABSTRACT

Experimental infection of *Biomphalaria glabrata* by *Angiostrongylus cantonensis* induces significant changes in the concentrations of triacylglycerol and cholesterol in the hemolymph and of neutral lipids in the digestive-gonad gland (DGG) complex of the host snail. In this study, snails were dissected after one, two and three weeks of infection to collect the hemolymph and DGG, to measure the levels of cholesterol and triacylglycerol in the hemolymph and neutral lipid fractions in the tissues. The results show that infection by this nematode resulted in a significant decrease in the concentrations of both cholesterol and triacylglycerol in the hemolymph of *B. glabrata* during the parasite's initial ontogenic development period. This reduction indicates the possible use of these molecules by both parasite and host, not only as energy substrates, but also as structural factors required during development of the parasite's larval stages. In parallel, changes in the neutral lipids profile in the DGG and lipase activity of the infected snails were observed, indicating the importance of these molecules for successful infection.

Keywords: Lipids, Host-parasite relationship, *Biomphalaria glabrata*, *Angiostrongylus cantonensis*

## 5.1 INTRODUÇÃO

O sucesso da infecção por nematoides em seu hospedeiro depende não somente de ajustamentos comportamentais e fisiológicos, mas também de adaptações bioquímicas do hospedeiro. Esta situação tem sido recentemente demonstrada por Tunholi-Alves et al. (2011b, 2012) na interface *Angiostrongylus cantonensis*/*Biomphalaria glabrata*. De acordo com os autores, a infecção experimental de *A. cantonensis* resultou em alterações na biologia reprodutiva e no perfil bioquímico do seu hospedeiro, caracterizando processos de coadaptações fundamentais a sobrevivência do hospedeiro, garantindo assim o completo desenvolvimento do parasito (GREWAL et al., 2003).

O efeito patofisiológico da infecção por larvas de helmintos sobre o metabolismo lipídico de moluscos tem sido investigado. Entretanto, até o momento, as informações disponíveis são contraditórias, indicando que o perfil lipídico de moluscos é amplamente variável. Fried et al. (1989) e Bandstra et al. (2006) observou uma significativa redução nos níveis de triacilglicerol no complexo glândula-digestiva-gônada (DGG) de *B. glabrata* infectada por *Echinostoma caproni*. Em contraste, um aumento nas concentrações dessa mesma fração de lipídios no DGG de *Helisoma trivolvis* patentemente infectada por *Echinostoma trivolvis* tem sido demonstrado (FRIED; SHERMA, 1990). Apesar desses estudos, dados sobre alterações no metabolismo de lipídios em moluscos infectados por nematoides não tem ainda sido estudado.

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematoide parasito de artérias pulmonares de roedores silvestres (*Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*) sendo classificado como o principal agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana. Em seu ciclo biológico, moluscos atuam obrigatoriamente como hospedeiros intermediários, assegurando o desenvolvimento de formas larvais que infectam o hospedeiro definitivo (STEWART et al., 1985). Estudos epidemiológicos tem confirmado a ocorrência dessa metazoose em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil, destacando a rápida disseminação dessa doença (WANG et al., 2007).

Portanto, pela importância de *B. glabrata* no ciclo biológico de *A. cantonensis*, a determinação das concentrações de lipídios neutros no (DGG) e suas frações hemolinfáticas livres torna-se necessária, a fim de possibilitar um melhor entendimento acerca da relação estudada, além de contribuir diretamente para o desenvolvimento de novos protocolos de controle desse molusco e das doenças por ele transmitidas, incluindo a angiostrongilíase neural, atendendo assim, as recomendações da Organização Mundial as Saúde (OMS, 1983).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Parasitos

Larvas L<sub>3</sub> de *A. cantonensis* provenientes de *A. fulica* coletadas em Olinda, Pernambuco, Brasil em 2008 no peridomicílio de uma paciente diagnosticada com meningoencefalite eosinofílica foram inoculadas em *Rattus norvegicus* no Laboratório Nacional de Referência em Malacologia Médica e no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, aonde o ciclo desde então vem sendo mantido. As larvas L<sub>1</sub> utilizadas para a infecção experimental do hospedeiro intermediário foram obtidas a partir desse ciclo que vem sendo mantido nos laboratório citados.

### 5.2.2 Infecção dos moluscos

As fezes de *R. norvegicus* infectados foram coletadas e a técnica de Baermann posteriormente empregada para separar e decantar as larvas L<sub>1</sub> (WILLCOX; COURA, 1989). Após processamento das amostras fecais, moluscos *B. glabrata* de linhagem pigmentada (8–12 mm) com 90 dias em média foram colocados individualmente em placas de cultivo celular, contendo aproximadamente 1200 L<sub>1</sub>. Após 48 horas, os moluscos foram removidos e transferidos para aquários para a formação dos grupos experimentais, sendo mantidos em sala com temperatura controlada a 26°C.

### 5.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos experimentais

Foram formados seis grupos, sendo três grupos (controle) constituídos por organismos não infectados e três grupos onde os moluscos foram infectados com larvas L<sub>1</sub> de *A. cantonensis*. Cada aquário era composto por 10 moluscos sendo todo o experimento realizado em duplicata, utilizando um total de 120 moluscos, criados em laboratório desde a postura, para saber a idade e assegurar que não foram infectados por outros parasitos. A alimentação dos moluscos foi realizada com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) frescas e desidratadas *ad libitum*, sendo as folhas lavadas em água de torneira antes de serem oferecidas aos moluscos.

A manutenção dos aquários foi realizada em dias alternados e durante o processo de manutenção, as folhas oferecidas aos animais foram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários.

Os aquários foram cobertos com tampas acrílicas com um pequeno furo, permitindo uma boa aeração e impedindo a saída dos moluscos, assim como, a entrada de insetos. Depois de 1, 2 e 3 semanas após a infecção, dez moluscos de cada grupo foram dissecados e os tecidos e hemolinfa coletados e armazenados em  $-10^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### **5.2.4 Determinações das concentrações de triacilglicerol e colesterol na hemolinfa**

Análises espectrofotométricas foram utilizadas para determinar quantitativamente os conteúdos hemolinfáticos de triacilglicerol (TAG) e colesterol (CHO), uma vez que esse método é prático e tem sido validado na quantificação destas e de outras moléculas (LUSTRINO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2009).

Para a determinação do TAG, 10 $\mu\text{l}$  de hemolinfa foram misturados em 1ml da solução contendo 50mmol/L de piperasina-*N,N*-bis (2-etanosulfônico ácido) (PIPES) [pH 7,4], 1,25 mmol de 4-clorofenol, 4600U de lípase, 40U glicerolquinase, 12U de glicerolfosfato oxidase, 60U de peroxidase, 0,024mmol de ATP e 0,18mmol de 4-aminoantipirina. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$  em banho Maria por 10 min. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetros em 510nm (KAPLAN; PEASCE, 1987). Os resultados foram expressos como mg/dl.

Para a dosagem de CHO, 10 $\mu\text{l}$  de hemolinfa foram misturados em 1ml do reagente de cor (tampão de PIPES 35mmol/L [7,0] contendo (0,5mmol/L de colato de sódio, 0,5mmol/L de 4-aminoantipirina, colesterol esterase  $\geq 300\text{U}$ , colesterol oxidase  $\geq 2014\text{U}$  e peroxidase  $\geq 828\text{U}$ ). A solução resultante foi então homogeneizada e incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$  por 10 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 500nm (KAPLAN; PEASCE, 1987). Os resultados foram expressos como mg/dl.

#### **5.2.5 Cromatografia em camada fina monodimensional e análise de imagem (TLC)**

Para a análise dos diferentes lipídios neutros nos tecidos dos moluscos, TLC foi utilizado como metodologia padrão, devido sua habilidade de verificar vários tipos de lipídios concomitantemente. Além disto, esta metodologia tem sido usada em outros estudos relacionados com alterações de lipídios neutros do DGG de moluscos, como discutidas aqui (BANDSTRA et al., 2006; FRIED et al., 1998, 2001).

Cinquenta miligramas dos tecidos (DGG) de cada grupo foram macerados em 100 $\mu\text{l}$  de tampão de lise (TRIS 50 mM; Nonidet P-40 1%; TLCK 0,1 mM; PMSF 2 mM). Após a maceração, os homogeneizados foram centrifugados a 2520xg por min. O conteúdo de

proteínas nas frações sobrenadantes foi determinado de acordo com Lowry com modificação (MARKWELL et al., 1978), usando albumina bovina como padrão. As amostras contendo 300µg de proteína total foram submetidas a extração de lipídios, conforme descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios extraídos foram analisados por cromatografia em camada fina monodimensional (TLC) para lipídios neutros utilizando hexano, éter etílico e ácido acético (60:40:1 por volume) como eluentes (KAWOOYA; LAW, 1998). Os lipídios neutros utilizados como padrão foram CHO, colesterol esterificado (CHOE), TAG e ácidos graxos (AG). Ambos os padrões (20µg) e os extratos das amostras foram aplicados em placa de sílica. Lipídios na placa foram carbonizados por imersão da chapa em de sulfato de cobre 10% e de ácido fosfórico 8%. Depois de seca, a chapa foi aquecida a 150°C por 10 min (RUIZ; OCHOA, 1997). A imagem foi analisada pelo software Image Quant.

Os tecidos (DGG) de moluscos não infectados coletados no final de cada semana foram agrupados formando um poll. Assim, a média do resultado obtido poderia melhor expressar a variação observada nos grupos infectados durante as três semanas de infecção.

### **5.2.6 Preparação da enzima e determinação da atividade lipásica**

A glândula digestiva foi homogeneizada em tampão Tris pH 7,4 em um frasco homogeneizador de Potter-Elvehjen. O homogenado foi centrifugado a 5040xg por 10 min e o sobrenadante foi analisado. As concentrações de proteínas foram medidas usando a metodologia de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978), e em seguida, a atividade enzimática foi determinada através do método descrito por Choi et al., (2003). As absorbâncias de cada amostra foram lidas em triplicata através do leitor de ELISA (Bio-Rad iMark<sup>tm</sup>) a 405 nm.

### **5.2.7 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos dos ensaios para a determinação das concentrações de CHO e TAG na hemolinfa foram expressos como média±desvio padrão e o teste de Tukey/ANOVA foram utilizados para a comparação das médias.

## **5.3 RESULTADOS**

Após o período pré-patente do desenvolvimento parasitário, espécimes de *B. glabrata* foram aleatoriamente selecionadas e submetidas ao processo de digestão química por meio da

adição de pepsina-HCl para a recuperação de estágios larvais L<sub>3</sub>. Os resultados demonstraram taxa de infectividade acima de 95%.

A infecção em *B. glabrata* por *A. cantonensis* causou alterações nos níveis hemolinfáticos de CHO nos moluscos. Existiu uma relação positiva estabelecida entre o tempo de infecção e as concentrações de CHO na hemolinfa de espécimes infectadas ( $r^2=0,84$ ) (Figura 2a). As menores concentrações de CHO na hemolinfa de moluscos infectados foram observadas na primeira semana ( $0,74\pm 0,082$ ) e segunda semana após a infecção ( $0,72\pm 0,069$ ), representando um decréscimo de 29,23 e 30,76%, respectivamente, em relação à média do grupo controle ( $1,05\pm 0,09$ ) (Tabela 1).

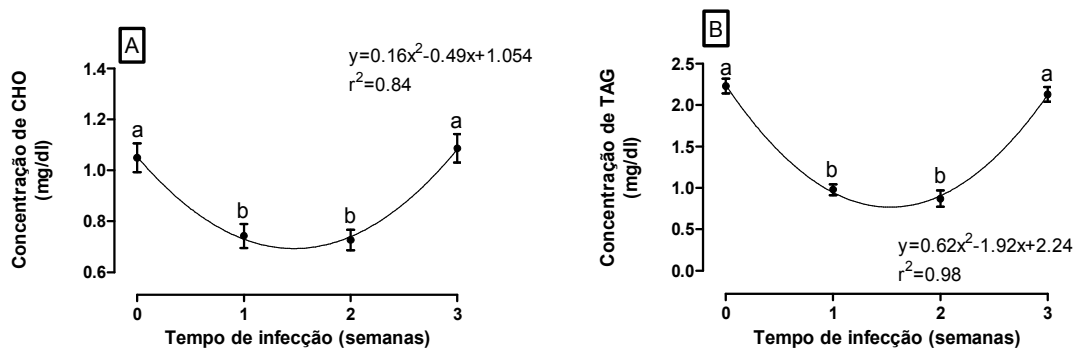
Alterações nas concentrações de TAG na hemolinfa de *B. glabrata* infectada foram também observadas. O menor e maior valor foram obtidos, respectivamente, na primeira ( $0,87\pm 0,098$ mg/dl) e terceira ( $2,13\pm 0,088$ mg/dl) semana após a infecção diferindo significativa da média apresentada pelo grupo controle ( $2,23\pm 0,089$  mg/dl). O teste da regressão polinomial indicou uma relação positiva entre os níveis de TAG e o tempo de infecção ( $r^2=0,98$ ) (Figura 2).

Após a detecção na variação do perfil lipídico hemolinfático, direcionamos nossas análises para determinar o possível efeito da infecção sobre as concentrações de lipídios neutros estocados no DGG de *B. glabrata*. Os níveis de CHO nos grupos tratados foram menores do que aqueles observados no grupo controle durante todo o experimento, exceto na terceira semana de infecção. Os níveis de CHO no complexo DGG de moluscos infectados por *A. cantonensis* diminuiu em comparação com o grupo controle ( $0,024\pm 0,0028$ ), com as menores concentrações observada na primeira ( $0,011\pm 0,0014$ ) e segunda ( $0,010\pm 0,0007$ ) semanas após a infecção. Contudo, nenhuma variação significativa foi observada nos níveis de colesterol esterificado (CHOE) de moluscos infectados, com um decréscimo nas concentrações registrado na primeira semana ( $0,009\pm 0,0021$ ) e aumento na terceira semana ( $0,011\pm 0,0007$ ) após a infecção, não diferindo significativamente a partir do grupo controle ( $0,010\pm 0,0007$ ) (Figura 3d).

Os níveis de TAG no grupo infectado foram significativamente maiores do que aqueles no grupo controle durante todo o período de observação. Os níveis de TAG no complexo DGG aumento expressivamente a partir da primeira semana após a infecção ( $0,067\pm 0,0035$ ), correspondendo um aumento de 48,88% em relação ao grupo controle ( $0,045\pm 0,0055$ ) (Figura 3c). Mesma ordem de variação foi observada em relação aos níveis de ácidos graxos (FA) nos grupos infectados, com aumento nas concentrações de 57,57 e 66,66% após primeira e

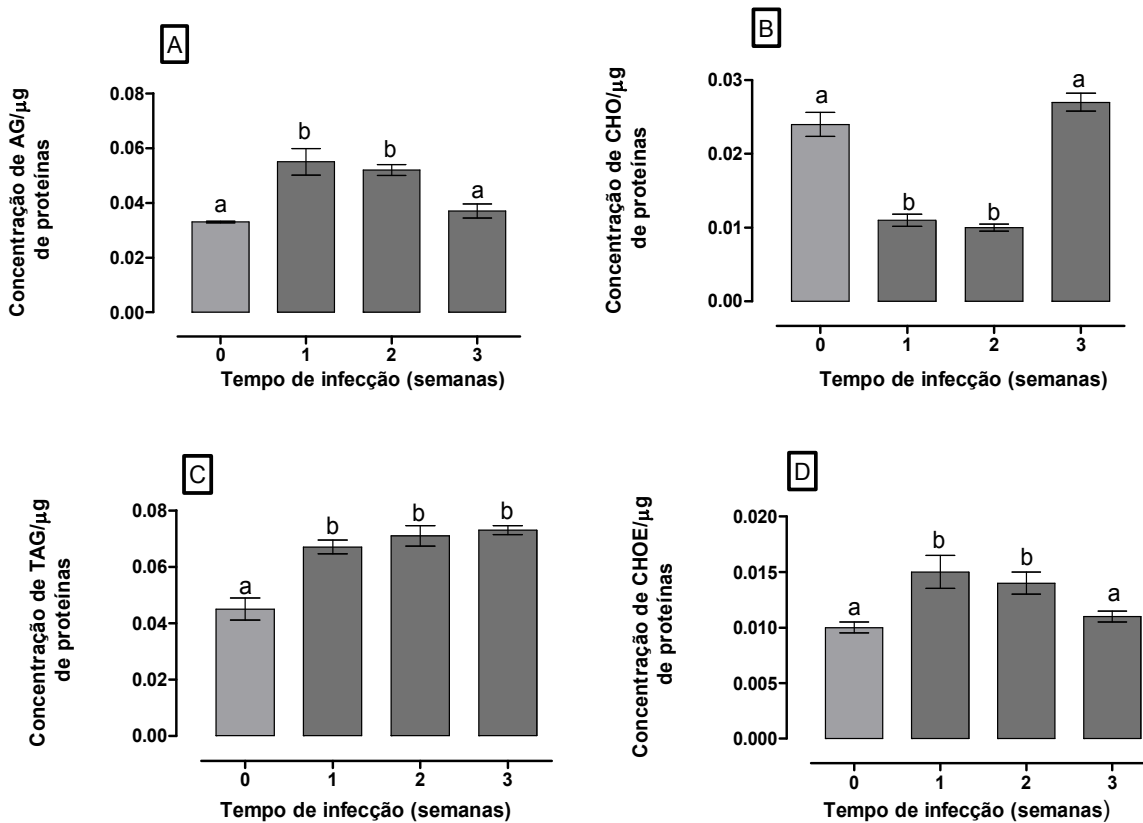
segunda semana de infecção, respectivamente, em relação ao grupo controle ( $0,033\pm 0,0005$ ) (Figura 3a).

Para melhor entender o aumento nas concentrações de FA no DGG de *B. glabrata* infectada, determinamos a atividade de lipases neste órgão utilizando como substrato sintético 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB). Interessantemente, o aumento na atividade enzimática da lipase no DGG de moluscos infectados foi observado na primeira ( $0,149\pm 0,02$ ) e na segunda ( $0,225\pm 0,019$ ) semana de infecção, representando um aumento de 69,31 e 155,68%, respectivamente, em relação ao grupo controle ( $0,088\pm 0,017$ ), coincidindo com o acúmulo de AG no órgão.

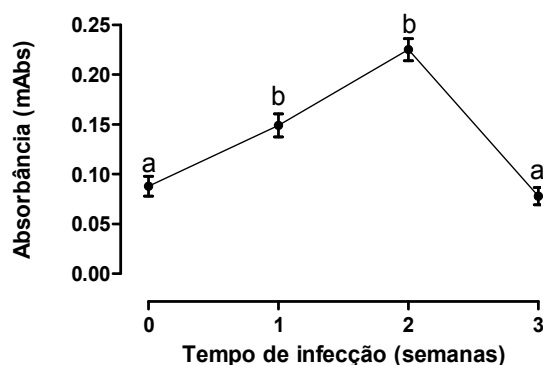


**Figura 1.** Níveis de colesterol e triacilglicerol na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos pós-infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média dos moluscos do grupo controle obtidos durante as três semanas de análises (1, 2, and 3 semanas), uma vez que não existiu diferenças significativas entre elas. a, b = Médias diferem significativamente entre si  $P < 0.05$ , (média±desvio-padrão).





**Figura 2.** Concentração de lipídios neutros no complexo glândula digestiva-gônada de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis* em função do tempo de infecção, expressado em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análises. (A) nível de ácidos graxos (AG); (B) níveis de colesterol (CHO); (C) níveis de triacilglicerol (TAG) e (D) níveis de colesterol esterificado (CHOE). Todos os valores são expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. a, b = Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si  $P < 0,05$ .



**Figura 3-** Atividade lipásica no complexo glândula-digestiva gônoda (DGG) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis* em função do tempo de infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de infecção. Absorbância foi lida em 405 nm. Barra de erro representa o desvio-padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. mAbs – mili-absorbância

**Tabela 1.** Níveis de colesterol e triacilglicerol na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressados em semanas. Semana zero (0) representa a média do grupo controle durante as três semanas de infecção, uma vez que não existiu diferença significativa entre as semanas <sup>a, b</sup> = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ( $\alpha = 5\%$ ). Média  $\pm$  DP = média  $\pm$  desvio padrão.

Semanas	Colesterol (mg/dl)	Triacilglicerol (mg/dl)
0	1,050 $\pm$ 0,097 <sup>a</sup>	2,23 $\pm$ 0,089 <sup>a</sup>
1	0,743 $\pm$ 0,082 <sup>b</sup>	0,98 $\pm$ 0,066 <sup>b</sup>
2	0,727 $\pm$ 0,069 <sup>b</sup>	0,87 $\pm$ 0,098 <sup>b</sup>
3	1,087 $\pm$ 0,098 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,088 <sup>a</sup>

## 5.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a infecção por *A. cantonensis* resultou em significativa redução nas concentrações hemolinfáticas de TAG em *B. glabrata* na primeira e segunda semana de infecção, confirmando ser este o período de maior competição de nutrientes entre o parasito e o seu hospedeiro intermediário. Esta redução sugere que larvas são capazes de utilizar este

substrato como fonte de energia. Tang e Wang (2011) demonstraram através de testes enzimáticos a presença de enzimas relacionadas à  $\beta$ -oxidação em estágios larvais de *A. cantonensis*, confirmando a capacidade desse metastrongylídeo em utilizar lipídios obtidos a partir de seu hospedeiro como substrato energético.

Ao mesmo tempo, o aumento nas concentrações de FA livres no DGG de *B. glabrata* após a infecção é parcialmente explicado pela intensa mobilização de lipídios neutros estocados principalmente na forma de TAG. Condição similar tem sido observada em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos, consistindo de uma importante estratégia metabólica do hospedeiro para minimizar os efeitos deletérios causados pela infecção (HUMICZEWSKA; RAJSKI, 2005). Tal fato é mais bem caracterizado pelo aumento na atividade de lipases presentes no DGG de moluscos infectados (primeira e segunda semanas), sugerindo a aceleração do processo lipolítico, necessário para a formação de FA, que uma vez oxidado na matriz mitocondrial resulta na formação de energia bioquímica livre (ATP) requerido para a manutenção das atividades celulares do molusco hospedeiro (TRIPATHI; SINGH, 2002). Resultados similares foram registrados por Choubisa (1988) estudando a interface *Melanoides tuberculatus/Cercaria diglandulata* e *M. tuberculatus/Cercaria martini*.

Como observado para as frações de FA, a infecção por *A. cantonensis* resultou em um acentuado aumento nas concentrações de TAG no DGG de *B. glabrata* durante todo o experimento. Nossos resultados estão em acordo com estudos previamente realizados no qual indicam a capacidade de parasitos helmintos em secretarem lipídios (FIRED; SHAPIRO, 1975). Esta possibilidade foi também documentada por Muller et al. (2000), trabalhando com *B. glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*, bem como por Tunholi-Alves et al. (2011), estudando a relação entre *B. glabrata* e *Echinostoma paraensei*. Assim, o aumento nas concentrações dessa fração de lipídio neutro (TAG) no DGG de *B. glabrata* aqui demonstrado pode ser explicado tanto pela secreção de lipídios pelo parasito (KWONG, 1989) quanto pela alteração no metabolismo do hospedeiro como consequência a infecção (FRIED et al., 1998).

A redução nos conteúdos de colesterol hemolinfático observado no início da infecção indica a habilidade de larvas de *A. cantonensis* em assimilar diretamente esse substrato da hemolinfa do hospedeiro, necessário para manter a fluidez de suas membranas, fundamental ao seu estabelecimento no hospedeiro (YAMOKA et al., 1978). Além disso, a utilização dessas moléculas por larvas de helmintos como precursores para a síntese de novas membranas celulares durante etapa de desenvolvimento em seu hospedeiro pode contribuir

para as alterações observadas aqui (BARRETT et al., 1970). A normalização dos níveis de CHO na hemolinfa após a terceira semana de infecção indica a participação de mecanismos homeostáticos em *B. glabrata*, possibilitando o molusco sintetizar endogenamente colesterol a partir de precursores já identificados, tais como o latosterol e o demosterol (LUSTRINO et al., 2020; ZHU et al., 1994).

O desenvolvimento ontogênico de *A. cantonensis* em *B. glabrata* resulta em uma intensa desorganização celular justificada pela ação espoliativas das larvas no tecido do hospedeiro, especialmente no DGG, durante etapa de migração e desenvolvimento parasitário (TUNHOLI-ALVES et al., 2012). Na luz desses achados, a diminuição dos níveis de CHO no DGG de *B. glabrata* observado nas primeiras semanas de infecção pode ser parcialmente explicada pelo extravazamento dessa molécula através da membrana celular para o sistema circulatório hemolinfático devido à ocorrência de lesões causadas pela infecção. Mesma situação tem sido demonstrada por Tunholi-Alves et al. (2011a) na interface *B. glabrata/E. paraensei*.

Este estudo contém a primeira descrição dos efeitos patofisiológicos da infecção por *A. cantonensis* sobre o metabolismo lipídico de *B. glabrata*. Nossos resultados indicam que ambos, hospedeiro e parasito, são capazes de utilizar TAG como substrato energético e que o parasito pode usar CHO como precursor para sintetizar novos componentes de membrana requeridos durante seu desenvolvimento. Adicionalmente, as maiores alterações nas concentrações de lipídios observadas aqui ocorreram no estágio inicial do desenvolvimento parasitário, confirmando ser este é o período de maior competição por nutriente, e consequentemente, a etapa mais importante para o sucesso desta associação.

## 5.6 REFERÊNCIAS

BANDSTRA, S.R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414–418, 2006.

BARRETT, J.; CAIN, G.D.; FAIRBAIRN, D. Sterols in *Ascaris lumbricoides* (Nematoda), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala) and *Echinostoma revolutum* (Trematoda). **Journal for Parasitology**, v.56, p.1004–1008, 1970.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.37, p.911–913, 1959.

CHOI, S.; HWANG, J.M.; KIM, S. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. **The Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics**, v.36, p.417–420, 2003.

CHOUBISA, S.L. Histological and histochemical observations on the digestive gland of *Melanoides tuberculatus* (Gastropoda) infected with certain larval trematodes and focus on their mode of nutrition. **Indian Academy Sciences (Anim Sci)**, v.97, p.251–262, 1988.

FRIED, B.; SHAPIRO, I.L. Accumulation and excretion of neutral lipids in the metacercaria of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda), maintained in vitro. **Journal for Parasitology**, v.61, p.906–909, 1975.

FRIED, B.; SHERMA, J. Thin layer chromatography of lipids found in snails (Gastropoda: Mollusca). **Journal of Planar Chromatography**, v.3, p.290–299, 1990.

FRIED, B.; SCHAFER, S.; KIM, S. Effects of *Echinostoma caproni* infection on the lipid-composition of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.353–354, 1989.

FRIED, B.; FRAZER, B.A.; LEE, M.S.; SHERMA, J. Thin layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in *Helisoma trivolvis* infected with four species of larval trematodes. **Parasitology Reserach**, v.84, p.369–373, 1988.

GREWAL, P.S.; GREWAL, S.K.; TAN, L.; ADAMS, B.J. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. **Journal of Nematology**, v.35, p.146–156, 2003.

GUILHON, J.; GAALON, A. Évolution larvaire d' un nematode parasite de pappariel circulatoire du chien dans l' organisme de mollusques dulçaquicoles. **Comp Rend Acad Sci**, v.268, p.612–615, 1969.

HUMICZEWSKA, M.; RAJSKI, K. Lipids in the host–parasite system: digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected the developmental stages of *Fasciola hepatica*. **Acta Parasitologica**, v.50, p.235–239, 2005.

KWONG, A.Y.H. Lipid composition and lipases of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea). Thesis, University of Hong Kong, 1989.

LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; MARASSI, M.P.; PINHEIRO, J. Lipids analysis in hemolymph of *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) exposed to different photoperiods. **Brazilian Journal for Biology**, v.70, p.631–637, 2010.

MARKWELL, M.A.K.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal Biochem**, v.87, p.206–210, 1978.

MULLER, E.E.; FRIED, B.; SHERMA, J. HPTLC analysis of neutral lipids in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Journal of Planar Chromatography**, v.13, p.228–231, 2000.

STEWART G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45, p.152–157, 1985.

TANG, P.; WANG, L.C. Uptake and utilization of arachidonic acid in infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Helminthology**, v.85, p.395–400, 2011.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v.115, p.194–199, 2010.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, v.6, p.24–27, 1969.

TRIPATHI, P.K.; SINGH, A. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on carbohydrate metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p.606–611, 2002.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO, A. JR.; BITTENCOURT, V.R.P.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.112–116, 2011a.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.S.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.220–223, 2011b.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143–147, 2012.

WANG, Q.P.; DE-HUA, L.; XING-QUAN, Z.; XIAO-GUANG, C.; ZHAO-RONG L. Human angiostrongyliasis. **Lancet Infect Dis**, v.8, p.621–630, 2007.

WHO—World Health Organization (1983) Report of a Scientific Working Group on Plant Molluscicide and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide. Geneva: World Health Organization (TDR/SCH-SWE (4)/83.3).

WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Nova concepção para o método de Baermann–Moraes–Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.539–565, 1989.

YAMOKA, T.; SATOH, K.; KATOH, S. Preparation of thylakoid membranes active in oxygen evolution at high temperature from a thermophilic blue green alga. In: Metzner H (ed) Photosynthetic oxygen evolution. **Academic Press**, New York, pp 104–116, 1978.

ZHU, N.; DAÍ, X.; LIN, D.S.; CONNOR, W.E. The lipids of slugs and snails: evolution, feed and biosynthesis. **Lipids**, v.29, p.869–887, 1994.



## 6 CAPÍTULO III

**ATIVACÃO DO METABOLISMO ANAERÓBICO EM *BIOMPHALARIA GLABRATA*  
(MOLLUSCA: GASTROPODA) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA POR  
*ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE)  
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.**

Ativação do metabolismo anaeróbico de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) por cromatografia líquida de alta eficiência.

## RESUMO

A atividade da lactato desidrogenase e as concentrações de glicose na hemolinfa e de suas reservas (glicogênio) na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* foram avaliadas. Adicionalmente, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi também realizada para determinar as concentrações hemolinfáticas de alguns ácidos carboxílicos (ácido láctico, succínico, pirúvico e oxálico). Após uma, duas e três semanas de infecção, moluscos foram dissecados para coleta da hemolinfa e separação dos tecidos. Uma redução significativa nos conteúdos de glicose hemolinfáticas foi observada após a primeira semana de infecção, diferindo significativamente do grupo controle. A atividade da lactato desidrogenase do grupo infectado foi significativamente maior do que a média do grupo controle. Este aumento foi acompanhado por uma redução dos níveis de ácido pirúvico e aumento dos níveis de ácido láctico na hemolinfa de moluscos parasitados, confirmando que a infecção por *A. cantonensis* resulta de fato na ativação do metabolismo anaeróbico de moluscos, necessário ao hospedeiro para obter energia e manter seu balaço redox. Em paralelo, existiu uma diminuição nos conteúdos de glicogênio estocados nos tecidos, sendo esta redução significativamente maior na massa cefalopediosa do que na glândula digestiva, demonstrando que neste sistema de interação, a mobilização de glicogênio não foi suficiente e manter e restabelecer a normoglicemia dos moluscos infectados.

Palavras-chaves: Carboidratos, relação parasito-hospedeiro, nematoides.

## ABSTRACT

The activity of lactate dehydrogenase and the concentrations of glucose in the hemolymph and of glycogen in the digestive gland and cephalopedal mass of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* were evaluated. Additionally, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the hemolymph concentrations of some carboxylic acids (oxalic, piruvic, lactic and succinic). After one, two and three weeks of infection, the snails were dissected to collect the hemolymph and separate the tissues. A significant reduction of the levels of glucose in the hemolymph was observed as of the first week of infection in relation to the control group. The lactate dehydrogenase activity of the infected group was significantly higher than the average of the control group. This increase was accompanied by a reduction of the levels of piruvic acid and an increase in the levels of lactic acid in the hemolymph of the parasited snails, confirming the acceleration of the anaerobic metabolism, necessary for the host to obtain energy and maintain its redox balance. In parallel, there was a decrease in the glycogen content of the storage tissues, with that reduction being significantly greater in the cephalopedal mass than the digestive gland, demonstrating that in this interaction system, the mobilization of glycogen was not sufficient to maintain and reestablish the normal glycemia of the infected snails.

Keywords: Carbohydrates, host-parasite relationship, larval nematodes.

## 6.1 INTRODUÇÃO

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematóide que infecta artéria pulmonar de roedores domésticos sendo enquadrado como o principal agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana. Estudos epidemiológicos tem confirmado a ocorrência desta metazoonose em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil, chamando a atenção para a sua rápida disseminação (WANG et al., 2008).

Parasitas pertencentes à família Metastrongilidae são caracterizados por seu ciclo de vida heteroxeno, onde moluscos atuam como os principais hospedeiros intermediários e roedores das espécies *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* como hospedeiros definitivos. Sob condições naturais, roedores tornam-se usualmente infectados com *A. cantonensis* pela ingestão de moluscos infectados. Embora moluscos terrestres sejam mais importantes no ciclo de transmissão desta zoonose, a participação de *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro potencial deste metastrongilídeo tem sido reportada (HARRIS; CHEN, 1975; YOUSIF; LAMMLER, 1977).

Em seu ciclo biológico, a infecção do molusco hospedeiro pode ocorrer tanto ativamente pela penetração de estágios larvais L<sub>1</sub> na região da massa cefalopediosa, quanto passivamente pela ingestão de estágios larvais (TUNHOLI-ALVES et al., 2012; CALDEIRA et al., 2007). Vários autores têm demonstrado alterações histopatológicas em diferentes tecidos do hospedeiro intermediário como consequência ao desenvolvimento ontogênico deste metastrongilídeo, especialmente na glândula digestiva e massa cefalopediosa (HARRIS;CHEN, 1975), possibilitando a formação de estágios larvais subsequentes (L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>), no qual infectará o hospedeiro vertebrado.

Estudos recentes têm verificado alterações no balanço energético de moluscos infectados, com significativa redução nos conteúdos de proteínas totais hemolinfáticas e reservas de galactogênio na glândula de albúmen sendo demonstrado. Estas alterações foram acompanhadas pelo aumento nas atividades das aminotransferases (AST e ALT) em *B. glabrata* experimentalmente infectada por *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011; TUNHOLI-ALVES et al., 2012). Como consequência, uma significativa redução na atividade reprodutiva foi demonstrada, porém estes autores não reportaram alterações histológicas no ovotestes. Tais resultados revelaram a ocorrência do fenômeno da “castração parasitária” causada por uma resposta fisiológica do hospedeiro ao parasitismo, resultando em alterações nutricionais no hospedeiro como consequência da competição de nutrientes com as larvas em

desenvolvimento (SULLIVAN et al., 1985). Apesar desses estudos, poucas informações são disponíveis considerando o metabolismo oxidativo em moluscos, e até agora, nenhum resultado tem sido demonstrado relacionando alterações no metabolismo de carboidratos e oxidativo em moluscos infectados por *A. cantonensis*.

Um dos poucos trabalhos que relaciona alterações no metabolismo oxidativo em moluscos foi desenvolvido por Massa et al. (2007), que observaram uma significativa redução nos conteúdos de alguns ácidos carboxílicos (oxálico, pirúvico e succínico) no complexo glândula digestiva-gônada de *B. glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*. De acordo com os autores, esta redução resultou a partir da incorporação dessas moléculas pelas larvas do parasito, necessária ao seu desenvolvimento. Surpreendentemente, apesar desse estudo, nenhum trabalho tem sido realizado para investigar as variações desses ácidos na hemolinfa de moluscos infectados por nematoides, impossibilitando qualquer tipo de extrapolação dos resultados acima mencionado, uma vez que, o desenvolvimento intra-molusco de larvas de trematódeos diferem amplamente do observado para nematoides.

Assim, com o objetivo de suportar a hipótese de Tunholi-Alves (2011a,b), no qual relacionaram a ocorrência da castração parasitária como causa principal do balanço energético negativo gerado pela infecção, no presente estudo avaliamos o metabolismo de carboidratos no mesmo modelo *B. glabrata/A. cantonensis*, uma vez que, a depleção de carboidratos e alterações no metabolismo oxidativo tem sido correlacionada como causa principal na diminuição da atividade reprodutiva em outros modelos de infecção. Adicionalmente, as concentrações de alguns ácidos orgânicos (oxálico, pirúvico, succínico e láctico) e atividades da D e L-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27 e EC 1.1.1.28) na hemolinfa de moluscos infectados e não infectados foram analisados, para melhor caracterizar as possíveis alterações no metabolismo de glicose desses organismos e comparar com os resultados reportados na literatura.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Parasitos**

Larvas L<sub>3</sub> de *A. cantonensis* provenientes de *A. fulica* coletadas em Olinda, Pernambuco, Brasil em 2008 no peridomicílio de uma paciente diagnosticada com meningoencefalite eosinofílica foram inoculadas em *Rattus norvegicus* no Laboratório

Nacional de Referência em Malacologia Médica e no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, onde o ciclo desde então vem sendo mantido. As larvas L<sub>1</sub> utilizadas para a infecção experimental do hospedeiro intermediário foram obtidas a partir desse ciclo que vem sendo mantido nos laboratório citados.

### **6.2.2 Infecção dos moluscos**

As fezes de *R. norvegicus* infectados foram coletadas e a técnica de Baermann posteriormente empregada para separar e decantar as larvas L<sub>1</sub> (WILLCOX; COURA, 1989). Após processamento das amostras fecais, moluscos de linhagem pigmentada (8–12 mm) com 90 dias em média foram colocados individualmente em placas de cultivo celular, contendo aproximadamente 1200 L<sub>1</sub>. Após 48 horas, os moluscos foram removidos e transferidos para aquários para a formação dos grupos experimentais, sendo mantidos em sala com temperatura controlada a 26 °C.

### **6.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos**

Foram formados seis grupos, sendo três grupos (controle) constituídos por organismos não infectados e três grupos onde os moluscos foram infectados com larvas L<sub>1</sub> de *A. cantonensis*. Cada aquário era composto por 10 moluscos sendo todo o experimento realizado em duplicata, utilizando um total de 120 moluscos, criados em laboratório desde a postura, para se saber a idade e assegurar que não foram infectados por outros parasitos. A alimentação dos moluscos foi realizada com folhas de alface (*Lactuca sativa L.*) frescas e desidratadas *ad libitum*, sendo as folhas lavadas em água de torneira antes de serem oferecidas aos moluscos.

A manutenção dos aquários foi realizada em dias alternados e durante o processo de manutenção, as folhas oferecidas aos animais foram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários.

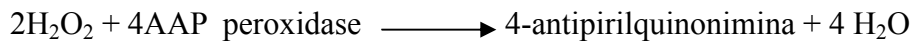
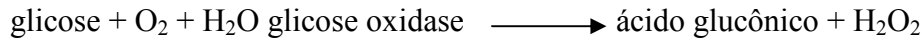
Os aquários foram cobertos com tampas acrílicas com um pequeno furo, permitindo uma boa aeração e impedindo a saída dos moluscos, assim como, a entrada de insetos. Depois de 1, 2 e 3 semanas após a infecção, dez moluscos de cada grupo foram dissecados e os tecidos e hemolinfa coletados e armazenados em –10°C para posterior análise.

### **6.2.4 Análises das alterações bioquímicas em *Biomphalaria glabrata* infectados com**

### *Angiostrongylus cantonensis*.

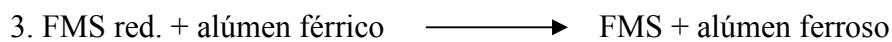
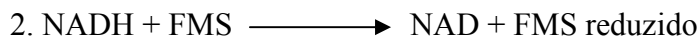
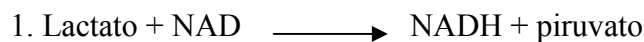
As determinações bioquímicas de glicose e atividade da LDH foram feitas na hemolinfa total dos moluscos utilizando *kits* para diagnóstico laboratorial (Doles<sup>®</sup>).

Para a determinação de glicose 10 µl de amostra foram adicionados a 1 ml do reagente de cor (solução tampão de fosfatos 0,05M, pH 7,45 ± 0,1; aminoantipirina 0,03mM e 15mM de p-hidroxibenzoato de sódio; um mínimo de 12kU de glicose oxidase; e, 0,8 kU de peroxidase por litro). Neste meio ocorre a seguinte reação:



O produto formado pela oxidação de 4-aminoantipirina (4-antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro, com absorção máxima em 510nm, utilizando solução aquosa de glicose 100mg/dl.

Para a determinação da atividade da lactato desidrogenase foram misturados 1ml da solução de substrato (solução 0,1M de lactato, 0,005M de o-fenantrolina em Tris 0,2M pH 8,8), uma gota de solução 0,012M de Sulfato de Ferro amoniacal (alúmen férrico) e 25µl de amostra, sendo a mistura incubada a 37 °C por 2 minutos. A seguir foi acrescentada uma gota de solução contendo solução 15,82mmolar de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e 3,73mmolar de fenazina metassulfato (FMS), sendo a mistura incubada a 37° por 5 minutos. A reação final foi estabilizada pela adição de 1 ml de solução de ácido clorídrico 0,5M. Neste meio ocorre a sequência de reações seguinte:



Após homogeneização, a absorbância foi lida em espectrofotômetro em 510nm, contra o branco de reação e usando uma solução de lactato desidrogenase 350U.I/l como padrão.

Os conteúdos de glicogênio nos tecidos da glândula digestiva e massa cefalopediosa foram determinados segundo o método 3,5 DNS (PINHEIRO; GOMES, 1994) sendo expressos em mg de glicose/g de tecido peso fresco.

## **6.2.5 Determinação dos conteúdos de ácidos carboxílicos hemolinfáticos**

### **6.2.5.1 Preparo das soluções padrão**

Padrões dos ácidos (oxálico, succínico, láctico e pirúvico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), no maior grau de pureza disponível. Acetonitrila, dihidrogenofosfato de sódio e ácido fosfórico utilizado no presente estudo foram de grau analítico para uso cromatográfico. Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Milli-Qwater (Millipore, Bedford, MA, EUA). As soluções (padrão) foram dissolvidas em fase móvel e o tampão fosfato foi ajustado para pH 2,2 com ácido fosfórico, e armazenadas a 4 °C.

### **6.2.5.2 Análises por CLAE**

Todo experimento de CLAE foram realizados no sistema Shimadzu LC-20AT equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japão), acoplados a um sistema de processamento de dados ChemStation LCSolution. As separações foram realizadas com coluna de fase reversa C18 (150 × 4.5 mm I.D., 5 µm, Allure® Organic Acids, Restek) em condições isocráticas. A fase móvel consistiu em 1% de acetonitrila em 20 mol.L<sup>-1</sup> e solução aquosa de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado para pH 2.2 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A temperatura foi fixada a 36 °C e a taxa de fluxo usada foi de 0,8 ml / min. Os cromatogramas foram monitorizados a 210 nm e o volume de injeção foi de 20 µl. A identificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras foi baseada numa comparação dos espectros UV e os tempos de retenção das soluções padrão. A quantificação foi efetuada com base nas parcelas de calibração lineares de área de pico em relação à concentração. Linhas de calibragem foram construídas com base em cinco níveis de concentração de soluções padrão. Os gráficos de calibração para ácidos (oxálico, succínico, pirúvico e láctico) foram lineares (r = 0,99), em todos os casos. Todo o experimento foi realizado em triplicado. A hemolinfa foi submetida ao vórtice e centrifugada durante 10 min a 2520 g. O sobrenadante foi separado e as partículas não dissolvidas foram removidas por filtração utilizando filtros de membrana de 45 µl. Alíquotas de 20 µl foram utilizadas para a análise cromatográfica (TUNHOLI et al., 2013).

## **6.2.6 Análise estatística**



Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão da média e submetidos ANOVA one-way com pós-teste de Tukey-Kramer ( $\alpha=5\%$ ) para comparação das médias. A regressão polinomial foi calculada para analisar a relação existente entre os valores obtidos e o tempo de infecção (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

### 6.3 RESULTADOS

Os valores das variáveis de interesse observadas no grupo controle não diferiram significativamente nas três semanas de experimento, portanto, agrupamos os valores em um dado único, obtido pela média aritmética referente às três semanas de estudo, chamado tempo zero ou semana zero de infecção.

O resultado da digestão química demonstrou taxa de infectividade acima de 95% para os grupos expostos.

Existiu uma relação significativa e negativa entre o tempo de infecção e as concentrações de glicose na hemolinfa dos grupos estudados ( $r^2 = 0,94$ ). Os valores médios dos grupos infectados diferiram significativamente do grupo controle, com o menor valor registrado na segunda semana de infecção ( $74,01 \pm 2,30$  mg/dl) ( $P < 0,05$ ), correspondendo um decréscimo de aproximadamente 33,61% em relação ao valor médio do grupo controle ( $111,48 \pm 3,95$  mg/dl,  $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

As concentrações de glicogênio na glândula digestiva dos grupos infectados foram significativamente menores em relação à média do grupo (não infectado). Existiu um decréscimo de 49,82% nas concentrações de glicogênio após uma semana de infecção ( $13,24 \pm 0,40$  mg de glicose/g de tecido), com o menor valor sendo observado na terceira semana de infecção ( $11,79 \pm 0,51$  mg de glicose/g de tecido), indicando uma redução de aproximadamente 55,32%.

Igualmente, a infecção por *A. cantonensis* resultou em severas alterações nos níveis de glicogênio na massa cefalopodia dos grupos infectados. Existiu uma redução gradativa desse polissacarídeo com o avanço da infecção. Os menores valores foram registrados na segunda e terceira semana após a infecção ( $10,24 \pm 1,18$  e  $4,04 \pm 1,04$  mg de glicose/g de tecido;  $P < 0,05$ ), respectivamente. Esses valores diferiram significativamente daqueles apresentados pelo grupo controle ( $18,04 \pm 1,15$  mg de glicose/g de tecido;  $P < 0,05$ ).

Alterações nas concentrações de ácidos orgânicos foram também observados. A concentração de ácido oxálico reduziu 30,60% nos moluscos infectados uma semana após a

infecção ( $46,09 \pm 1,79$  mM;  $P < 0,05$ ), diferindo significativamente do valor médio apresentado pelo grupo controle ( $66,42 \pm 0,32$  mM). Variação similar ocorreu para as concentrações de ácido succínico nos grupos infectados, com valores significativamente menores daqueles utilizados na confecção da curva padrão (Tabela 3). Os níveis de ácido pirúvico foram também menores nos grupos infectados, e novamente diferiu significativamente do grupo controle durante todo o experimento. As menores concentrações desse substrato ocorreram nos períodos iniciais da infecção (primeira e segunda semanas), não sendo possível ser detectado a partir da segunda semana de infecção (Tabela 3). Em contraste, os níveis de ácido láctico nos moluscos infectados aumentaram, com o maior valor observado na segunda semana de infecção ( $119,92 \pm 1,20$  mM;  $P < 0,05$ ) (Tabela 3), diferindo significativamente do grupo não infectado ( $3,68 \pm 1,53$  mM;  $P < 0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 1.** Atividade da lactato desidrogenase (UI) e concentração de glicose (mg/dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. <sup>a, b</sup> = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada semana de experimento.  $P < 0,05$  (média  $\pm$  desvio-padrão).

Semanas	Atividade da lactato desidrogenase (UI)		Concentração de glicose (mg/dL)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
1	$17,74 \pm 2,52^a$	$33,45 \pm 4,56^b$	$110,99 \pm 4,12^a$	$82,58 \pm 6,33^b$
2	$19,03 \pm 2,20^a$	$40,32 \pm 4,45^b$	$113,02 \pm 3,41^a$	$74,01 \pm 2,30^b$
3	$17,92 \pm 2,30^a$	$35,67 \pm 4,87^c$	$110,43 \pm 4,32^a$	$76,13 \pm 3,58^b$
R <sup>2</sup>	0,85		0,94	

**Tabela 2.** Conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodal, expressados em (mg de glicose/ g de tecido, peso fresco) de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, dados em semanas. <sup>a, b</sup> = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle. P<0.05 (média ± desvio-padrão).

Semanas	Conteúdo de glicogênio (mg glicose/g tecido, peso fresco)			
	Glândula digestiva		Massa cefalopediosa	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
1	25,58±0,39 <sup>a</sup>	13,24±0,40 <sup>b</sup>	18,18±1,24 <sup>a</sup>	15,15±0,30 <sup>b</sup>
2	26,94±0,27 <sup>a</sup>	13,15±0,18 <sup>b</sup>	17,94±1,03 <sup>a</sup>	10,24±1,18 <sup>b</sup>
3	26,65±0,39 <sup>a</sup>	11,79±0,51 <sup>b</sup>	17,99±1,18 <sup>a</sup>	4,04±1,04 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0,92		0,97	

**Tabela 3.** Concentração de ácidos orgânicos (mM) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes períodos pós-infecção. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análises, uma que não foram encontradas diferenças significativas entre eles. a, b = Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle. P<0.05 (média ± desvio-padrão).

Semanas	Ácido oxálico (mM)	Ácido succínico (mM)	Ácido pirúvico (mM)	Ácido láctico (mM)
0	66,42±0,32 <sup>a</sup>	40,18±0,63	82,08±6,60 <sup>a</sup>	3,86±1,53 <sup>a</sup>
1	46,09±1,79 <sup>b</sup>	ND	6,20±2,25 <sup>b</sup>	104,91±1,00 <sup>b</sup>
2	47,23±0,66 <sup>b</sup>	ND	ND	119,92±1,20 <sup>b</sup>
3	60,74±0,38 <sup>b</sup>	ND	65,82±5,58 <sup>b</sup>	20,13±1,52 <sup>b</sup>

## 6.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, uma acentuada redução nos conteúdos de glicose foi observada após a infecção por *A. cantonensis* em *B. glabrata*, permanecendo baixo durante todo o período pré-patente de desenvolvimento do parasito. Por outro lado, Brockelman et al. (1976) reportaram que a infecção de *A. cantonensis* em *Achatina fulica* causou uma redução significativa nas concentrações de glicose hemolinfática apenas na primeira semana de infecção, sendo o hospedeiro capaz de restabelecer sua glicemia em seguida. Este período, de acordo com os autores, é crucial para o molusco, sendo caracterizado não somente por um aumento na taxa de crescimento do parasito, mas também por uma maior competição de nutrientes, que passam ser assimilados pelas larvas do nematoide diretamente da hemolinfa de seu hospedeiro intermediário. Contudo, a discrepância observada entre os resultados dos dois estudos pode ser parcialmente explicada pela diferença de massa corporal de *A. fulica* e *B. glabrata*, resultando em significativas variações nos níveis de glicogênio estocados. Adicionalmente, autores estudando a interface *B.glabrata/A. cantonensis*, tem demonstrado intensa desorganização celular, principalmente na massa cefalopediosa e glândula digestiva, caracterizados na forma de reações granulomatosas e infiltrados hemocitários (HARRIS; CHEN, 1975; TUNHOLI et al. 2013). Assim, acreditamos que o não restabelecimento da normoglicemia nos moluscos infectados possa também decorrer dessas alterações histológicas, indicando algum grau de comprometimento na capacidade funcional dos tecidos reportados, afetando a síntese e estocagem de glicogênio.

As concentrações de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *B. glabrata* durante o desenvolvimento larval de *A. cantonensis* foram significativamente reduzidos, com alterações mais severas sendo observadas no tecido muscular. Shih e Chen (1982) reportaram a ocorrência de enzimas glicolíticas nos estágios larvais de *A. cantonensis*, indicando a presença de uma via oxidativa direcionada na manutenção do balanço energético do parasito. Assim, a maior redução nas concentrações de glicogênio no tecido muscular, provavelmente decorre em função da presença de estágios L<sub>3</sub> do nematoide. De acordo com Hexiang et al. (2009), este tecido corresponde o principal sítio de localização distribuição das larvas no estágio final de seu desenvolvimento. Portanto, o intenso desenvolvimento larval de *A. cantonensis* nos períodos iniciais de desenvolvimento causa grande consumo de glicose hemolinfática, desencadeando depleção das reservas de glicogênio do molusco, como tentativa de restabelecer os níveis de glicose circulante.

Uma aceleração do metabolismo anaeróbio nos moluscos infectados foi também observada, em razão ao aumento significativo da atividade da LDH. Estudos tem demonstrado uma sobreposição de centros enzimáticos relacionados à via glicolítica, especialmente a LDH, como fatores essenciais para o sucesso da infecção por trematódeos (TUNHOLI et al., 2013) e nematóides (STEWART et al., 1985). Esta ativação é fundamental a sobrevivência do hospedeiro, possibilitando o molusco obter energia e ao mesmo tempo excretar substâncias resultantes de seu metabolismo sem causar inicialmente danos à estrutura celular. Previamente, Ishak et al. (1975) reportaram um comprometimento na capacidade oxidativa relacionada ao ciclo do ácido tricarbóxico, baixa atividade da citocromo oxidase e aumento da produção de lactato em *Biomphalaria oxidativa* infectada por *S. mansoni*. Portanto, a possível redução no metabolismo aeróbio de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* possa resultar de eventos similares daqueles descritos e reportados em moluscos infectados por larvas de trematódeos.

Para confirmar se a infecção por *A. cantonensis* ativou realmente vias anaeróbias de produção de ATP em *B. glabrata*, e ao mesmo tempo complementar os dados previamente obtidos por Tunholi-Alves et al. (2011, 2012), no qual correlacionaram a ocorrência da castração parasitária como causa direta da depleção de reservas energéticas e alteração no metabolismo oxidativo no modelo *B.glabrata/A.cantonensis*, as concentrações de alguns ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo aeróbio do hospedeiro durante a infecção foram analisados. De acordo com os resultados, o aumento na atividade da LDH ocorreu paralelamente com a diminuição nos níveis hemolinfáticos de ácido pirúvico e um aumento nas concentrações de ácido láctico nos moluscos infectados em comparação ao grupo controle. Este cenário metabólico confirma a ativação do metabolismo anaeróbio fermentativo, por uma via dependente da LDH, possibilitando o hospedeiro a obter energia (ATP) pela redução do ácido pirúvico a ácido láctico, bem como, assegurar a reoxidação do NADH (TUNHOLI et al., 2013). Tal condição representa uma interessante resposta adaptativa do hospedeiro, possibilitando-o utilizar a glicose como substrato energético mesmo em condição de estresse fisiológico.

Pinheiro et al. (2009) reportaram uma significativa redução nos conteúdos de ácido oxálico em moluscos após a infecção. De acordo com os autores, quando parasitados, moluscos apresentam uma severa redução nos níveis de glicose hemolinfáticas e de suas reservas teciduais. Assim, como tentativa em restabelecer sua normoglicemia, o hospedeiro começa a utilizar de substratos não glicídicos tais como lipídios (TUNHOLI-ALVES et al.,

2013) e aminoácidos (TUNHOLI et al., 2013), alterando frequentemente as concentrações de ácidos orgânicos hemolinfáticos. Na luz desses achados, a diminuição nas concentrações de ácido oxálico observado nos grupos infectados pode ser resultado do direcionamento desse ácido para gliconeogênese em resposta a hipoglicemia observada nesses organismos. Adicionalmente, a diminuição nos níveis desse ácido observado em *B. glabrata* infectada pode também resultar da incorporação dessa molécula como substrato ao desenvolvimento de larvas de *A. cantonensis*. A utilização de alguns ácidos orgânicos, especialmente oxálico, como substrato necessário ao desenvolvimento de esporocistos e rédias de *S. mansoni* em *B. glabrata* tem sido demonstrada (MASSA et al., 2007).

A infecção por *A. cantonensis* também resultou na redução dos níveis de ácido succínico na hemolinfa, estando abaixo do limite de detecção dos valores utilizados para a confecção da curva padrão. Resultados similares têm sido previamente observados por autores estudando outros sistemas de relação parasito/hospedeiro (TUNHOLI et al., 2013). Segundo esses autores, esta variação resulta da ativação da fumarato redutase, enzima responsável pela oxidação do malato a succinato, no sentido contrário do ciclo de Krebs. Como consequência, o succinato é metabolizado a propionato, gerando energia e ajudando a manter o balanço redox. Estas reações contribuem para a redução nas concentrações deste ácido no modelo aqui estudo.

Este artigo é o primeiro a registrar os efeitos patofisiológicos da infecção por *A. cantonensis* sobre o metabolismo de carboidratos e concentrações de ácidos orgânicos em *B. glabrata*. Os resultados apresentados confirmam a perda da homeostase glicêmica nos organismos infectados, indicando a ativação de mecanismos fisiológicos compensatórios necessários para a sobrevivência do hospedeiro e completo desenvolvimento parasitário. O aumento da atividade da LDH, associado com a redução nos níveis de ácido pirúvico e acúmulo de ácido láctico na hemolinfa de moluscos infectados, demonstram a ativação do metabolismo anaeróbio fermentativo como uma interessante estratégia metabólica do hospedeiro. Portanto, os dados apresentados aqui complementam aqueles publicados por Tunholi-Alves et al. (2011, 2012) e fortemente sugerem que a castração parasitária, observada neste modelo de infecção, foi desencadeada por uma depleção metabólica.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROCKELMAN, C.R.; CHUSATAYANOND, W.; BAIDIKUL, V. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host *Achatina fulica*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.7, p.30–7, 1976.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.887–9, 2007.

HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis* light microscopy. **International Journal for Parasitology**, v.5, p.521–528, 1975.

HEXIANG, L.; ZHANG, Y.I.; SHAN, LV.; LING, HU.; XIAONONG, Z. Establishment and observation of the life cycle of *Angiostrongylus cantonensis* in a laboratory setting. **Journal Pathologie Biologie**, v.4, p.836–839, 2009.

ISHAK, M.M.; MOHAMED, A.M.; SHRAF, A.A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.53, p.499–505, 1975.

MASSA, D.R.; CHEJLAVA, M.J.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.101, p.925–928, 2007.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.492–5, 2010.

PINHEIRO, J.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthynchidae). **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407–10,1994.

PINHEIRO, J.; GOMES, E.M. A method for glycogen determination in molluscs. **Brazilian Archive Biology and Technololy**, v.37, p.569–576, 1994.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55–59, 2009.

SCHOTTLER, U. Weitere untersuchungen zun anaeroben energiestoffwechsel dès polychaeten *Arenicola marina* L. **Zool Beitr NF**, v.30, p.141–152, 1986.

SHIH, H.H.; CHEN, S.N. Glycolytic enzymes in juvenile and adult *Angiostrongylus cantonensis*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.13, p.114–119, 1982.

STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45,p.152–157, 1985.

SULLIVAN, J.T.; CHENG, T.C.; HOWLAND, K.H. Studies on parasitic castration: castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.104, p.154–171, 1985.

SUMNER, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. **Journal Biology Chemistry**, v.62, p.287–290, 1924.

TIELENS, A.G.M. Energy generation in parasitic helminths. **Parasitology Today**, v.10, p.346–352,1994.



TUNHOLI, V.M.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, N.; SANT'ANA, L.; GARCIA J.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v.133, p.403–410, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V.; TUNHOLI, V.M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143–147, 2012.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GARCIA, J.; COSTA-NETO, S.F.; MALDONADO, A.; SANTOS, M.A.J.; PINHEIRO, J. Changes in the calcium metabolism of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Helminthology**, 2013 [in press].

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO, JR.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PINHEIRO, J., et al. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212–216, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.S.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.220–223, 2011.

WANG, Q.P.; DE-HUA, L.; XING-QUAN, Z.; XIAO-GUANG, C.; ZHAO-RONG, L.; Human angiostrongyliasis. **Lancet Infect Dis**, v.8, p.621–630, 2008.

WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Nova concepção para o método de Baermann – Moraes – Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.539–565, 1989.

YOUSIF, F.; LÁMMLER, G. The mode of infectionwith and the distribution of *Angionstrongylus cantonensis* larvae in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Z Parasitenkd**, v.53, p.247–50, 1973.

## 7 CAPÍTULO IV

**ALTERAÇÕES NA FISIOLOGIA MITOCONDRIAL DE  
*Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA: GASTROPODA) APÓS INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA:  
METASTONGYLIDAE)**

Alterações na fisiologia mitocondrial de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) após infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastongylidae)

## RESUMO

O efeito da infecção pré-patente de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) no sistema mitocondrial de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) foi estudada. Os dados obtidos indicam uma supressão no metabolismo oxidativo aeróbio de moluscos infectados (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> semanas), sendo parcialmente restabelecido na etapa final do desenvolvimento parasitário (3<sup>o</sup> semana). Como principais resultados, um comprometimento no estado 2 respiratório (basal) e 3 (fosforilativo) de *B. glabrata* foram demonstrados, repercutindo em um decréscimo significativo no consumo basal de oxigênio em relação ao grupo controle, após a adição de succinato e ADP respectivamente. Mudanças no estado 3u mitocondrial, estado desacoplado, foi também apresentado no início da infecção. Tal condição por ser explicada por um decréscimo quantitativo no número de mitocôndrias no tecido analisado, ou ainda, por uma supressão de centros enzimáticos que integram vias oxidativas aeróbias do hospedeiro, como consequência a ação inibitória dos produtos de secreção/excreção parasitário. Tais resultados complementam dados previamente publicados, e ressaltam a importância de vias fermentativas anaeróbias no processo de manutenção do balanço redox de moluscos infectados.

Palavra-chaves: Carboidratos, relação parasito-hospedeiro, metabolismo oxidativo.

## ABSTRACT

The effect of pre-patent *A. cantonensis* infection (Nematoda: Metastrongylidae) in the mitochondrial system of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) was studied. The data indicate a suppression in aerobic oxidative metabolism of infected snails (1 and 2 weeks), partially restored in the final stage of parasite development (3rd week). As main results, a compromise in the state 2 respiratory (baseline) and 3 (phosphorylation) of *B. glabrata* were demonstrated, reflecting in a significant decrease in basal oxygen consumption compared with the control group, after the addition of succinate and ADP respectively. Changes in mitochondrial 3u state, uncouple state, was also established at the start of the infection. This condition to be explained by a quantitative decrease of mitochondria in the examined tissue, or by a deletion of enzymatic centers which comprise aerobic oxidative pathways the host as a result the inhibitory action of the products secretion and excretion parasite. These results complement previously published data, and emphasize the importance of anaerobic fermentation pathways in the maintenance process of the redox balance of infected snails.

Keywords: Carbohydrates, host-parasite relationship, oxidative metabolism

## 7.1 INTRODUÇÃO

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematoide metastrongilídeo que apresenta um ciclo de vida heteroxênico, onde moluscos atuam como os principais hospedeiros intermediários e roedores *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* como hospedeiros definitivos (WANG et al., 2008). Embora roedores atuem como hospedeiros naturais para este nematoide, humanos podem acidentalmente infectar-se, desenvolvendo um sério processo patológico denominado meningoencefalite eosinofílica humana, ou simplesmente angiostrongilíase neural (THIENGO et al., 2010). Nos últimos anos, vários casos da doença têm sido notificados em diferentes regiões do mundo sendo atualmente enquadrada como uma doença emergente no Brasil (MORASSUTTI et al., 2014).

De acordo com Caldeira et al. (2007), um dos fatores que contribuem diretamente para a rápida disseminação da doença é a baixa especificidade do parasito em relação ao seu hospedeiro intermediário. Estudos epidemiológicos tem confirmado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos terrestres como hospedeiros naturais de *A. cantonensis* (MORASSUTTI et al., 2004, MALDONADO et al., 2010) destacando a participação do planorbídeo *Biomphalaria glabrata*, com hospedeiro potencial (TUNHOLI-ALVES et al., 2014). Isto é causa de preocupação, uma vez que, autores tem demonstrado a excelente adaptação dessa espécie de gastrópode em regiões tropicais, como o Brasil (PARAENSE et al., 1975), o que aumenta o risco de transmissão de doenças, incluindo a meningoencefalite eosinofílica humana ( GRAEFF- TEIXEIRA et al., 2009).

Esta condição tem motivado estudos a melhor entender o sistema de relação *A. cantonensis/B. glabrata*, possibilitando identificar diferentes vias no qual o parasito age sobre o metabolismo do hospedeiro, e a via que este hospedeiro reage à influência do parasito (TUNHOLI-ALVES et al., 2011, 2012, 2014a,b). Os resultados desses estudos demonstraram que a infecção por *A. cantonensis* induziu significativas alterações no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata*, caracterizada por um decréscimo nos conteúdos de glicose na hemolinfa e de reservas polissacarídicas estocadas na glândula digestiva e massa cefalopediosa, além de variações nos perfis proteico, lipídico e mineral. Tais alterações ocorreram concomitantemente com a sobreposição de importantes centros enzimáticos, tais como as aminotransferases e lactato desidrogenase, indicando que a infecção por *A. cantonensis* resulta em um aumento na taxa de desaminação de aminoácidos, bem como, a ativação do seu metabolismo anaeróbio. Contudo, o preciso mecanismo no qual a infecção

por *A.cantonensis* afeta o metabolismo oxidativo de seu hospedeiro intermediário ainda não foi caracterizado.

Estudos prévios têm demonstrado que a infecção experimental de *S. mansoni* em *B. alexandrina* não somente diminui a taxa de consumo de oxigênio, mas também compromete o metabolismo aeróbio e anaeróbio do hospedeiro, inibindo a taxa de oxidação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e estimulando a produção de ácido láctico e outros produtos finais do metabolismo anaeróbio em moluscos infectados (MOHAMED, 1971, ISHAK et al., 1975). Esta condição, também observada em outros sistemas de relação, permite o molusco hospedeiro em manter seu balanço redox ao mesmo tempo em que garante a produção de energia (TUNHOLI et al., 2013).

Assim, com o propósito de complementar dados previamente publicados por Tunholi-Alves et al. (2014), que demonstram a participação de vias fermentativas relacionadas na manutenção do balanço redox do hospedeiro, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da infecção pré-patente de *A. cantonensis* sobre alguns complexos proteicos que integram a cadeia respiratória mitocondrial de *B. glabrata*, focando suas análises na glândula digestiva (DGG) do hospedeiro, por configurar o principal sítio de desenvolvimento do nematoide.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Parasitos

Larvas L<sub>3</sub> de *A. cantonensis* provenientes de *A. fulica* coletadas em Olinda, Pernambuco, Brasil em 2008 no peridomicílio de uma paciente diagnosticada com meningoencefalite eosinofílica foram inoculadas em *Rattus norvegicus* no Laboratório Nacional de Referência em Malacologia Médica e no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, onde o ciclo desde então vem sendo mantido. As larvas L<sub>1</sub> utilizadas para a infecção experimental do hospedeiro intermediário foram obtidas a partir desse ciclo que vem sendo mantido nos laboratório citados.

### 7.2.2 Infecção dos moluscos

As fezes de *R. norvegicus* infectados foram coletadas e a técnica de Baerman posteriormente empregada para separar e decantar as larvas L<sub>1</sub> (WILLCOX; COURA, 1989). Após processamento das amostras fecais, moluscos de linhagem pigmentada (8–12 mm) com

90 dias em média foram colocados individualmente em placas de cultivo celular, contendo aproximadamente 1200 L<sub>1</sub>. Após 48 horas, os moluscos foram removidos e transferidos para aquários para a formação dos grupos experimentais, sendo mantidos em sala com temperatura controlada a 26 °C.

### **7.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos**

Os moluscos foram mantidos em aquários contendo 1500 ml de água desclorada, no qual 0,5g de CaCO<sub>3</sub> foram adicionados, no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, IOC. A água foi substituída uma vez por semana. Quatro grupos foram formados: Um grupo controle (não infectado) e três grupos infectados. Cada aquário continha 6 moluscos, criados em laboratório desde a eclosão para se saber a idade e assegurar que não foram infectados por outros parasitos. O experimento foi conduzido, utilizando um total de 24 moluscos, dos quais 6 formaram o grupo controle (não infectado) e 18 moluscos formaram os grupos infectados. Os aquários foram mantidos em sala com temperatura controlada de 25 °C durante todo o experimento. O estudo foi conduzido durante três semanas, etapa que corresponde período de desenvolvimento intra-molusco do nematóide em *B. glabrata* (TUNHOLI-ALVES et al., 2012). A alimentação dos moluscos foi realizada com folhas de alface (*Lactuca sativa L.*) frescas e desidratadas *ad libitum*, sendo as folhas lavadas em água de torneira antes de serem oferecidas aos moluscos.

A manutenção dos aquários foi realizada em dias alternados e durante o processo de manutenção, as folhas oferecidas aos animais foram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários.

Os aquários foram cobertos com tampas acrílicas com um pequeno furo, permitindo uma boa aeração e impedindo a saída dos moluscos, assim como, a entrada de insetos. Depois de 1, 2 e 3 semanas após a infecção, seis moluscos de cada grupo foram dissecados e o tecido (glândula digestiva) coletado para posterior análise. Após o período pré-patente, espécimes de *B. glabrata* de cada grupo experimental foram randomicamente selecionadas e submetidas ao processo de digestão química contendo pepsina e HCl.

### **7.2.4. Dissecção dos moluscos e coleta dos tecidos**

Semanalmente moluscos de cada grupo experimental (n=6) foram dissecados e os tecidos, complexo glândula digestiva gônada (DGG), separados para análises. A



permeabilização tecidual (DGG) foi realizado de acordo com Kuznetsov et al. (2002). Rapidamente, os tecidos (DGG) de *B. glabrata* infectada e controle foram manipulados mecanicamente, com auxílio de pinças e tesoura, em placa de petri na presença de 100µl de meio de respiração (MIR05) contendo 60 mmol<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,4, 110 mmol l<sup>-1</sup> manitol, 60 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 5 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 0,2 mg ml<sup>-1</sup> BSA (BSA<sub>FFA</sub>), permitindo maior acessibilidade dos substratos as mitocôndrias intactas. Após o processamento dos tecidos, os mesmos foram pesados e acondicionados em frascos ésteres contendo meio (MIR05).

#### **7.2.5. Consumo de oxigênio pelo tecido permeabilizado utilizando respirômetria de alta resolução.**

O consumo de oxigênio foi determinado através do respirômetro de alta resolução (orooboros Oxygraph; Innsbruck, Austria) (GNAIGER, 2001). Os tecidos foram incubados com 2 ml do meio MIR05, e a cuba foi fechada imediatamente antes do início do experimento. A respiração basal (estado 2) foi medida após adição de substratos mitocondriais (pulsos de 5 mmol l<sup>-1</sup> de piruvato e malato para o complexo 1 e 10 mmol l<sup>-1</sup> de succinato para o complexo 2). A taxa de respiração fosforilativa (estado mitocondrial 3) foi medida através da adição de 0,5 mmol l<sup>-1</sup> de ADP, enquanto que o estado 4o (vazamento de prótons) e estado 3u (estado desacoplado) foram determinados pela adição de 1 mg ml<sup>-1</sup> de oligomicina e 0,4 mmol l<sup>-1</sup> de FCCP, respectivamente. Para a determinação do consumo de oxigênio não mitocondrial, rotenona e antimicina A (1 mmol l<sup>-1</sup> e 5 mmol l<sup>-1</sup>, respectivamente) foram adicionados.

#### **7.2.6. Análises estatísticas**

Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão da média e submetidos ANOVA one-way com pós-teste de Tukey-Kramer ( $\alpha=5\%$ ) para comparação das médias (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

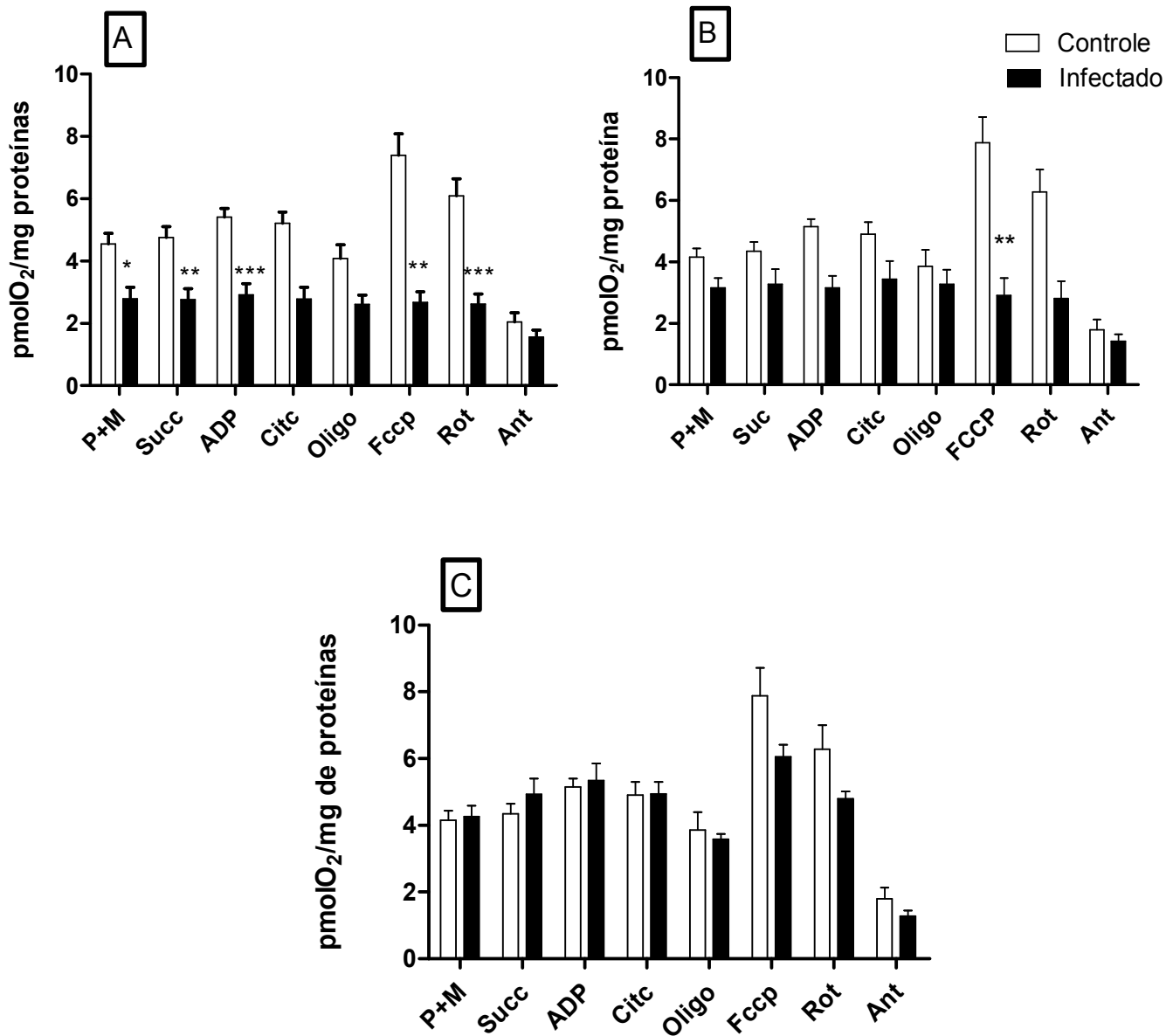
### **7.3 RESULTADOS**

No presente estudo, alterações significativas no sistema mitocondrial de *B. glabrata* infectada experimentalmente por *A. cantonensis* foi demonstrado. Os resultados apresentados, indicam uma supressão no metabolismo oxidativo mitocondrial do hospedeiro e um

comprometimento nos diferentes estados respiratórios. Este efeito, observado principalmente no grupo exposto a uma semana de infecção, representa um decréscimo de aproximadamente 38% ( $2,78 \pm 0,37$ ), 41% ( $2,76 \pm 0,34$ ) e 46% ( $2,91 \pm 0,36$ ) no consume basal de oxigênio, após adição sequencial de (P+M), (Succ) e (ADP) no meio, diferindo-se significativamente do grupo controle (Fig 1A). Condição similar foi observado para o estado 3u mitocondrial (desacoplado). Nesta circunstância, a adição do agente desacoplador no meio (FCCP) induziu um decréscimo significativo no consume de oxigênio em moluscos infectados, diferindo-se do valor médio apresentado pelo grupo controle ( $7,39 \pm 0,69$ ).

Em moluscos expostos à duas semanas de infecção, alterações no estado respiratório mitocondrial foi demonstrado apenas para o estado 3u (desacoplado). Neste caso, a infecção por *A. cantonensis* induziu um decréscimo de 63% ( $2,9 \pm 0,57$ ) no consume de oxigênio, após adição de FCCP no meio, quando comparado a moluscos não infectados ( $7,87 \pm 0,84$ ) (Fig 2).

Perfil contrário de variação foi apresentado nos grupos expostos a três semanas de infecção. Em todos os estados mitocondriais analisados, a infecção por este metastrongilídeo não resultou em decréscimos significativo no consume de oxigênio quando comparado a moluscos controle, sugerindo a ocorrência de uma plasticidade mitocondrial (Figura 1)



**Figura 1.** Relação estabelecida entre o consumo de oxigênio mitocondrial de *B. glabrata*, expressado por pmol O<sub>2</sub>/mg proteína e adições sequenciais de Malato (M) (5 mM), Piruvato (P) (5 mM), ADP (0,5 mM), Oligomicina (Oligo) (1ug/ml), FCCP (0,4 uM), Rotenona (Rot) (1 uM) e Antimicina A (Ant) (5 uM), após primeira (A), segunda (B) e terceira (C) semana de infecção por *Angiostrongylus cantonensis*. \* = Médias diferem significativamente entre si (média±EP). Grupo controle (N=7 moluscos); grupo infectado (N=7 moluscos).

## 7.4 DISCUSSÃO

Sob condições fisiológicas, moluscos apresentam seu metabolismo oxidativo baseado predominantemente em vias aeróbias, no qual, o ciclo de Krebs, assume papel central no processo de geração de energia (Tunholi et al., 2013). No entanto, quando submetidos a condições de estresse, como aquelas induzidas pela infecção por larvas de helmintos, tais organismos podem direcionar seu fluxo metabólico, resultando na ativação de centros enzimáticos relacionados a vias fermentativas (Bezerra et al., 1997). Esse fato tem sido recentemente documentado por Tunholi-Alves et al. (2014), estudando a interface *B. glabrata/A.cantonensis*, no qual mencionam a transição do metabolismo oxidativo do hospedeiro, em resposta ao desenvolvimento ontogênico intra-molusco do nematoide. Apesar desse estudo, as possíveis alterações resultantes da infecção por *A. cantonensis* sobre a fisiologia mitocondrial de *B. glabrata* ainda não foram determinadas, limitando o conhecimento acerca da relação estudada.

Os dados apresentados nesse estudo indicam que a infecção pré-patente de *A. cantonensis* induz alterações substanciais na fisiologia mitocondrial de *B. glabrata*, caracterizada por uma supressão do metabolismo oxidativo aeróbio e, por conseguinte, em uma redução no consumo basal de oxigênio em relação ao grupo controle. Tais alterações mostraram-se mais pronunciadas na etapa inicial do desenvolvimento parasitário (primeira e segunda semanas) sendo parcialmente restabelecida na terceira semana de infecção. De acordo com os resultados, um comprometimento no estado 2 respiratório (basal) e 3 (fosforilativo) de *B. glabrata* foram demonstrados no início da infecção, repercutindo em uma menor reposta após a adição de succinato e ADP respectivamente. Condições similares foram apresentadas por Mohamed e Ishak (1982), estudando a interface *B. alexandrina/S. mansoni*. Segundo os autores, a redução na taxa de consumo de oxigênio no sistema mitocondrial de moluscos infectados pode ser parcialmente explicada pela ação direta das larvas de diferentes estágios no tecido do hospedeiro, resultando em alterações teciduais relevantes, especialmente no complexo gônada-glândula digestiva, ou ainda, mediada pela atuação de produtos de secreção e excreção parasitário, o qual inibiriam as reações de óxido redução de integram o ciclo de Krebs e, por conseguinte, todo o processo de fosforilação mitocondrial. Nessa circunstância, a manutenção do balanço redox do hospedeiro estaria seriamente comprometida, favorecendo a ativação de mecanismos complementares (MANTAWY et al., 2013) como já descrito em outros estudos envolvendo a relação entre moluscos e larvas de helmintos (TUNHOLI et al., 2013; BEZERRA et al., 1997).

No presente estudo, mudanças significativas no estado 3u mitocondrial, estado desacoplado, foram demonstrados após a adição da FCCP (carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona). Este composto caracteriza-se quimicamente por apresentar natureza lipossolúvel, dissipando o gradiente eletroquímico gerado na fosforilação oxidativa através da membrana mitocondrial interna. Isso resulta em uma perda no controle respiratório que conduz a um aumento no consumo de oxigênio não acoplado a síntese de ATP (DOS SANTOS et al., 2012). Assim, o menor consumo de oxigênio e, por conseguinte na taxa de respiração de moluscos infectados por *A. cantonensis* (1 e 2 semanas), na presença do agente desacoplador, sugere uma redução no número de complexos proteicos que integram a cadeia respiratória, ou ainda um menor número de mitocôndrias, como consequência a ação espoliativa do parasito sobre o tecido do hospedeiro. Outra explicação consiste na diminuição na velocidade das reações de oxidação do ciclo do ácido tricarboxílico, em relação a moluscos não infectados. Como consequência, um decréscimo na taxa de produção e reoxidação de NADH e FADH<sub>2</sub> são esperados, comprometendo diretamente a conversão da força eletromotriz em uma força próton-motriz (FURUSHIMA et al., 1990). Tais resultados complementam aqueles previamente apresentados por Tunholi-Alves et al. (2014) e sugerem que sob tais condições, a manutenção do balanço redox do hospedeiro é diretamente dependente de vias fermentativas, no qual a lactato desidrogenase, assume papel central nesse processo.

Interessantemente, perfil contrário de variação foi demonstrado no grupo após 3 semanas de exposição às larvas L1, sugerindo um processo de biogênese mitocondrial. De acordo com autores, esse efeito pode estar relacionado com o aumento da expressão de fatores nucleares e genes mitocondriais envolvidos na modelagem dessas organelas, contribuindo para a formação de novos complexos respiratórios (Lemoine et al., 2008; BREMER et al., 2012). Assim, a ausência de variação entre os grupos, aponta para o restabelecimento do metabolismo oxidativo aeróbio, e conseqüentemente, para a reconstituição do gradiente de prótons gerado durante a reoxidação do NADH e do FADH<sub>2</sub> na fosforilação oxidativa. Tais resultados coincidem com a etapa de desenvolvimento do parasito, uma vez que, na terceira semana de infecção, larvas de segundo estágio abandonam o complexo gônoda-glândula digestiva, e através sistema hemolinfático, migram em direção aos ductos das glândulas produtoras de muco localizada na massa cefalopediosa, completando seu desenvolvimento. Outra possibilidade é a participação de mecanismos envolvidos no processo de plasticidade da função mitocondrial. Esse efeito tem sido documentado por Bishop et al. (2002) ao estudar o

efeito do jejum sobre a estrutura e função mitocondrial no gastrópode *Helix aspersa*. Para os autores, a redução no metabolismo oxidativo aeróbio apresentado pelos moluscos deprimidos metabolicamente, deve-se a downregulação temporária de centros enzimáticos relacionados com o ciclo de Krebs (citrato sintase) e com a cadeia transportadora de elétrons (citocromo c oxidase), sendo restabelecido com o retorno da capacidade metabólica. Assim, o aumento da capacidade oxidativa apresentada pelos moluscos expostos a três semanas de infecção em relação àqueles submetidos à fase inicial do desenvolvimento parasitário pode também estar relacionada a fatores intrínsecos mitocondriais, que passam a ter sua atividade normalizada concomitantemente à migração de estágios larvais para o sítio final de desenvolvimento.

Pela primeira vez, o efeito da infecção de *A. cantonensis* sobre a fisiologia mitocondrial de *B. glabrata* foi demonstrado. Os resultados apresentados indicam que a infecção pré-patente por este metastrongilídeo compromete o metabolismo oxidativo aeróbio de seu hospedeiro, repercutindo em uma diminuição no consumo basal de oxigênio. Este efeito, observado no início do desenvolvimento parasitário indica que esta etapa é a mais crítica no sucesso da infecção, e que pode ser explicada por uma diminuição na densidade mitocondrial do tecido analisado, ou ainda, por uma supressão de centros enzimáticos relacionados às reações oxidativas. Tais achados complementam aqueles publicados por Tunholi-Alves et al. (2014) e ressaltam a importância de vias fermentativas envolvidas no restabelecimento do balanço redox do hospedeiro.

## REFERÊNCIA

BEZERRA, J.C.B.; BECKER, W.; ZELCK, U.E. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.421– 425, 1997.

BISHOP, T.; OCLOO, A.; BRAND, M.D. Structure and function of mitochondria in hepatopancreas cells from metabolically depressed snails. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.75, p.134-144, 2002.

BREMER, K.; MONK, C.T.; GURD, B.J.; MOYES, C.D. Transcriptional regulation of temperature-induced remodeling of muscle bioenergetics in goldfish. **American Journal of Physiology**, v.303, , p.150-158, 2012.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.887–9, 2007.

DOS-SANTOS, R.S.; GALINA, A.; SEIXAS, W. Cold acclimation increases mitochondrial oxidative capacity without inducing mitochondrial uncoupling in goldfish white skeletal muscle. **Biology Open**, v.2, p.82-87, 2012.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A.C.A.; YOSHIMURA, K.. Update on eosinophili meningoencephalitis and its clinical relevance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.322–348, 2009.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respir. Physiol**, v.128, p.277-297, 2001.

ISHAK, M.M.; MOHAMED, A.M.; SHRAF, A.A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry Physiology (B)**, v.53, p.499-505, 1975.

KUZNETSOV, A.V.; STROBL, D.; RUTTMANN, E.; KONIGSRAINER, A.; MARGREITER, R.; GNAIGER, E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. **Anal. Biochem**, v.305, p.186-194, 2002.

LEMOINE, C. M.; GENGE, C. E.; MOYES, C. D. Role of the PGC-1 family in the metabolic adaptation of goldfish to diet and temperature. **Journal of Experimental Biology**, v.211, p. 1448-1455, 2008.

MANTAWY, M.M.; MOHAMED, N,Z.; ARFA, A,F.; ALY, H,F. Carboxylic Acids and their metabolic enzymes as new novel biomarkers of susceptible, resistant strains of *Biomphalaria alexandrina* and snails infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.4, p.1039-1040, 2013.

MOHAMED, A.M.; ISHAK, M.M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncates*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289-292, 1982.

MORASSUTTI, A.L.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, p.399-407, 2014.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v.55, p.105-111, 1975.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta tropica**, v.115, p.194-199, 2010.

TUNHOLI, V.M.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R.N.; GARCIA, J.; MALDONADO, A.; DOS SANTOS, M.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v.133, p.403-410, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.; AMARAL, L.; GARCIA, J.; OLIVEIRA, A.M.; J.; MALDONADO, A.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca:Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v.63, p.64-68, 2014.



TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GOLO, P.; LIMA, M.; GARCIA, J.; MALDONADO, A.; PONTE, E.G.; BITTENCOURT, V.P.; OINHEIRO, J. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Parasitology Research**, v. 115, p. 1136-1142, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.S.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.220-223, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143-147, 2012.

WANG, Q.P.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. Invasive freshwater snail, China. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1119–20, 2007.

WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Nova concepção para o método de Baermann – Moraes – Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.539–565, 1989.

YOUSIF, F.; LÄMMLER, G. The mode of infection with and the distribution of *Angionstrongylus cantonensis* larvae in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 53, p. 247-250, 1977.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo demonstramos que a infecção experimental por *A. cantonensis* induz significativas alterações no metabolismo de *B. glabrata*. Os resultados aqui descritos complementam aqueles apresentados por Tunholi-Alves et al. (2011, 2012), e sugerem que as alterações reportadas na biologia reprodutiva de moluscos infectados, “castração parasitária”, decorrem de alterações nutricionais induzidas pelo parasito. Tais alterações mostram-se especialmente relacionadas ao metabolismo de carboidratos, uma vez que, significativo decréscimo nos conteúdos hemolinfáticos de glicose e de reservas polissacarídicas estocadas na glândula digestiva e massa cefalopediosa foram confirmados. Esse perfil de resposta contribui para a redução nos estoques de galactogênio localizado na glândula de albúmen de *B. glabrata*, o que explica a redução na viabilidade dos embriões, reportados, sobretudo, na segunda semana de infecção (TUNHOLI-ALVES et al., 2011). Este cenário metabólico foi acompanhado por mudanças no metabolismo oxidativo do hospedeiro, caracterizado não somente pelo aumento na atividade da lactato desidrogenase, mais também por uma redução nos níveis de ácido pirúvico e acúmulo de ácido lático na hemolinfa, sugerindo que sob tais condições, a manutenção do balanço redox do hospedeiro passa ser assegurada por vias fermentativas, onde a lactato desidrogenase assume papel relevante nesse processo. Na tentativa de restabelecer seu estado normoglicêmico, o hospedeiro começa a utilizar substratos não glicídicos, principalmente lipídios e aminoácidos, alterando as concentrações de alguns ácidos carboxílicos na hemolinfa. Esta tendência conduz para a redução nos conteúdos de oxaloacetato, que passam a compor vias anabólicas, como a gliconeogênese, em resposta a hipoglicemia reportada nos organismos infectados.

Tais mudanças observadas no metabolismo oxidativo do molusco hospedeiro foram acompanhadas por alterações em sua fisiologia mitocondrial, caracterizada por uma redução significativa no consumo basal de oxigênio. Estes resultados foram relacionados a uma diminuição quantitativa de mitocôndrias no tecido analisado, em resposta a ação espoliativa e ao processo inflamatório gerado ao em torno das larvas

Em consequência ao balanço energético negativo impulsionado pelo parasitismo, *B. glabrata* redireciona seu fluxo metabólico, onde a produção de energia química (ATP) passa agora ser assegurada principalmente pela oxidação de aminoácidos e lipídios. Isso resulta no decréscimo do conteúdo hemolinfático de proteínas, além de variações nos níveis de compostos nitrogenados como mostrado por TUNHOLI-ALVES et al. (2012). O acúmulo de

compostos nitrogenados na hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis* associado ao aumento simultâneo nas atividades das aminotransferases (ALT e AST), confirma uma maior taxa de desaminação de aminoácidos, resultando na síntese de estruturas carbonadas ( $\alpha$ -cetoácidos) que são incorporados em vias metabólicas principais, sobretudo a gliconeogênese e ciclo de Krebs, visando restabelecer seu balanço energético.

Como esperado, mudanças no metabolismo mineral de *B. glabrata* foram também observadas durante infecção por *A. cantonensis*. Assim, o decréscimo nas concentrações hemolinfáticas de cálcio observado na primeira semana de infecção decorre provavelmente da maior deposição desse íon na glândula digestiva de moluscos infectados. Este processo permite modular vias oxidativas relacionadas na produção de energia, principalmente via glicolítica e ciclo de Krebs, destacando a importância desse íon como cofator enzimático. No entanto, como consequência a depleção de reservas energéticas polissacarídicas estocadas na glândula digestiva e massa cefalopodia (TUNHOLI-ALVES et al., 2014a), moluscos infectados começam a utilizar proteínas com substrato alternativo para produção de energia, alterando o pH hemolinfático em função ao processo de desaminação de aminoácidos. Nestas circunstâncias, carbonato de cálcio é mobilizado da concha para a hemolinfa, ajudando a manter o balanço ácido-base por meio da liberação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um importante componente do sistema de tampão bicarbonato, explicando o processo de hipocalcificação observado na segunda semana de infecção (TUNHOLI-ALVES et al., 2014b).

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A infecção por *A. cantonensis* induziu um aumento significativo nos conteúdos hemolinfáticos de cálcio em paralelo a hipocalcificação em seu hospedeiro intermediário. Tais alterações remetem a existência de mecanismos fisiológicos precisamente integrados entre hemolinfa e concha, como tentativa de restabelecer o equilíbrio ácido-base, bem como, auxiliar o fortalecimento da resposta imunológica do molusco.
- Os resultados histopatológicos e histoquímicos aqui apresentados confirmam a participação de íons cálcio como importante elemento no processo de encapsulação parasitária, resultando na formação de áreas de calcificação, especialmente na glândula digestiva.
- A infecção experimental de *Biomphalaria glabrata* por estágios larvais de *Angiostrongylus cantonensis* resultou em alteração em seu metabolismo lipídico, indicando que ambos, parasito e hospedeiro, são capazes de utilizar TAG como substrato energético e CHO como precursor para a síntese de novos componentes de membrana.
- O aumento nos conteúdos de FA no complexo gônoda-glândula digestiva de animais infectados indica a mobilização de reservas de lipídios neutros, estocados especialmente na forma de TAG. Essa alteração ocorreu em paralelo ao aumento da atividade de lipases e esterases teciduais, sugerindo que sob tais condições, o processo lipolítico de *B. glabrata* está ativado.
- A infecção com *A. cantonensis* afetou os depósitos de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodal, bem como nos conteúdos de glicose hemolinfático, os quais foram reduzidos ao final do período de infecção.

- Alterações no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* foram acompanhadas por mudanças em seu metabolismo oxidativo, caracterizado pela ativação de vias fermentativas anaeróbicas, como àquelas dependentes da lactato desidrogenase, além de variações quantitativas nos conteúdos de ácido láctico, pirúvico e oxálico.
- O aumento nos conteúdos hemolinfático de ácido láctico, associado com a diminuição significativa dos níveis de ácido pirúvico e oxálico na hemolinfa de moluscos infectados, demonstram que a manutenção do balanço redox do hospedeiro é assegurada por vias anaeróbicas, no qual a lactato desidrogenase, assume papel central nesse processo.
- A infecção por *A. cantonensis* resulta na supressão do metabolismo oxidativo mitocondrial de *B. glabrata*, comprometendo diferentes estados respiratórios.
- A redução do metabolismo oxidativo aeróbio de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis*, sugere uma redução quantitativa de mitocôndrias presentes na glândula digestiva, em função ao processo espoliativo e inflamatório frequentemente associado, ou ainda, em função da supressão de centros enzimáticos relacionados às reações oxidativas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICATA, J.E.; BROWN, R.W. Observation on the Method of Human Infection with *Angiostrongylus cantonensis* in Tahiti. **Canadian Journal of Zoology**, v.40, p.755-760, 1962.

ALICATA, J.E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. **Advence in Parasitology**, v.3, p.223-48, 1965.

ALICATA, J. The presence of *Angiostrongylus cantonensis* in islands of the Indian Ocean and probable role of the giant African snail, *Achatina fulica*, in dispersal of the parasite to the Pacific Islands. **Canadian Journal of Zoology**, v.44, p.1041-1049, 1966.

ALICATA, J.E. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. **Parasitology Today**, v.7, p.151-153, 1991

AMARAL, A. D.F.; BUSETI, E. T. Fasciolose hepática humana no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, p. 141-145, 1979.

ANDERSON, R.C. Keys to genera of the superfamily Metastrongyloidea. In: ANDERSON, R.C.; CHABAUD, A.G.; WILLMOTT, S. **CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates**. 1. ed. Farnham Royal Wallingford Chpt. 5, 1978.

ANDERSON, R.C. Nematode parasites of vertebrates: **Their development and transmission**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000.

ASH, L.R. *Angiostrongylus michiganensis* sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea). A lungworm occurring in the shrew, *Sorex cinereus*, in Michigan. **Journal Parasitology**, v.53, p.625-629, 1968.

BANDSTRA, S.R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414–418, 2006.

BANEVICIUS, N.M.S.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; LINHARES, A.X. Behavior of *Angiostrongylus costaricensis* in Planorbids. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p.199-204, 2006.

BARBOSA, F.S. Natural infection with *Schistosoma mansoni* in small mammals trapped in the course of a schistosomiasis control project in Brazil. **Journal for Parasitology**, v.58, p.405-407, 1972.

BEAVER, P.C.; ROSEN, L. Memorandum on the first report of *Angiostrongylus* in man by Nomura & Lin, 1945. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.13, p.589-590, 1964.

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.63, p.101-111, 1980.

BEZERRA, J.C.B.; BECKER, W.; ZELCK, U.E. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.421–425, 1997.

BHAIBULAYA, M.; CROSS, J.H. *Angiostrongylus malaysiensis* (Nematoda: Metastrongylidae), a new species of rat lung-worm from Malaysia. **Southeast Asian J Tropical Medicine Public Health**, v.2, p.527-534, 1971.

BHAIBULAYA, M. Comparative studies on the life history of *Angiostrongylus mackerrasae* Bhaibulaya, 1968 and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). **International Journal for Parasitology**, v.5, p.7-20, 1975.

BHAIBULAYA, M. Morphology and taxonomy of major *Angiostrongylus* species of eastern Asia and Australia. In: CROSS, J.H. **Studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia**, Special Publication No. 2 (NAMRU-2-SP-44). Taipei: US Naval Medical Research Unit. 1979. p. 4-13

BOWDEN, D.K. Eosinophilic meningitis in the New Hebrides: two outbreaks and two deaths. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, n.5, p.1141-1143, 1981.

BRANDOLINI, S.V.P.B.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, n.2, p.411-418, 1996.

BROCKELMAN, C.R.; CHUSATAYANOND, W.; BAIDIKUL, V. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host, *Achatina fulica*. Southeast. Asian. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.7, p.30-37, 1976.

BROCKELMAN, C.R.; SITHITHAVORN, P. Carbohydrate reserves and hemolymph sugars of the African giant snail, *Achatina fulica* in relation to parasitic infection and starvation. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.62, p.285-91, 1980.

CAMPBELL, B.G.; LITTLE, M.D: The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.38, p.568-573, 1988.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.887-9, 2007.

CARNEY, W.P.; STAFFORD, E.E. Angiostrongyliasis in Indonesia: a review. In: CROSS, J.H. **Studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia**, Special Publication No. 2 (NAMRU-2-SP-44). Taipei: US Naval Medical Research Unit. 1979. p. 14-25.



CARVALHO, O. S.; DUTRA, L. V.; MOURA, A. C. M.; FREITAS, C. C.; AMARAL, R. S.; DRUMMOND, S. C.; FREITAS, C. R.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; MELO, G. R.; RAGONI, V.; GUERRA, M. 2005. Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 12. (SBSR) 16-21 abr. 2005, Goiania. São José dos Campos; INPE, 2005. Comunicações, p. 2083-2086.

CHEN, H.T. A preliminary report on a survey of animal parasites in Canton, China, rats. **Lingnan Science Journal**, v.12, p.65-74, 1933.

CHEN, H.T. Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g. n.sp., des rats de canton. **Ann Parasitol Hum Comp**, v.13, p.312-317, 1935.

CHENG, T.C.; LEE, F.O. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.395-399, 1971.

CHITWOOD, B.G.; CHITWOOD, M.B. Snails as hosts and carriers of nematodes and Nematomorpha. **The Nautilus**, v.50, p.130-135, 1937.

CHOTMONGKOL V, SAWANYAWISUTH K. Clinical manifestations and outcome of patients with severe eosinophilic meningoencephalitis presumably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, v.33, p. 231-34, 2002.

CIARAVOLO, R.M.C.; PINTO, P.L.S.; MOTA, D.J.G. Meningite eosinofílica e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis*: um agravo emergente no Brasil. **Vector Inf Tec Cient SUCEN**, v. 8, p.7-8, 2010.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.13-19, 2004.

COUTO, M.S.R. Caracterização da atividade aglutinante da hemolinfa de mexilhões *Perna perna*. Trabalho de conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2001.

CREWS, A.E.; YOSHINO, T.P. Influence of larval schistosomes on polysaccharide synthesis in albumin glands of *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**, v.101, p.351-359, 1990.

CRIBB, T.H.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. The nature and evolution of the association among digeneans, mollusks and fishes. **International Journal For Parasitology**, v.31, p.997-1011, 2001.

CROSS, J.H. Experimental studies on *Angiostrongylus* species and strains in monkeys and laboratory animals. In: CROSS, J.H. **Studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia**, Special Publication No. 2 (NAMRU-2-SP-44). Taipei: US Naval Medical Research Unit. 1979. p. 118-37.

CROSS, J.H.; CHEN, E.R. Angiostrongyliasis. In: MURRELL, K.D.; FRIED, B. **Food-borne parasitic zoonoses**. New York: Springer. 2007. p. 263–90.

DE WITT, N.D.; SMINIA, T. The effects of the nutritional state and the external concentration of the ionic composition of the haemolymph and on calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v.83, p.213–227, 1980.

DITTMAR, K.; TEEGEN, W.R. The Presence of *Fasciola hepatica* (Liver-fluke) in Humans and Cattle from a 4,500 Year Old Archaeological Site in the Saale- Unstrut Valley, Germany. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.1, p. 141-143, 2003.

DOUGHERTY, E.C. The genus *Aelurostrongylus* (Cameron, 1927) (Nematoda: Metastrongylidae) and its relatives with description of *Parafilaroides* gen. nov. and *Angiostrongylus gubernaculatus*, sp nov. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.13, p.16-26, 1946.

DROZDZ, J. Revision de la systematique du genre *Angiostrongylus* Kamensky 1905 (Nematoda: Metastrongyloidea). **Ann Parasitol Hum Comp**, v.45, p. 597-603, 1970.

DROZDZ, J.; GORECKA, T.; BINH, N.H. The occurrence of nematodes of the subfamily Angiostrongylinae in Vietnam and the question of geographical origin of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935). **Acta Parasitologica Polonica**, v.23, p.115-126, 1975.

EAMSOBHANA, P., TUNGTRONGCHITR, A. Angiostrongyliasis in Thailand. In: Arizono N, Chai JY, Nawa Y, Takahashi Y, eds. Asian parasitology volume 1: food-borne helminthiasis in Asia. Chiba, Japan: **The Federation of Asian Parasitologists**, p. 183-97, 2005.

EL-SHAZLY.; EL-HAMSHARY, E.M.; EL-SHEWY, K.M.; RIFAAT, M.M.; EL-SHARKAWY, I.M. Incidence of *Parastrongylus cantonensis* larvae in different freshwater snail in Dakahlia Governorate. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v.32, p.579-588, 2002.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.; PINTO, P.L.; MOTA, D.J.; GRYSCHER, R.C. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55, p.129-132, 2013.

ERASMUS, D.A. The Biology of Trematodes. Edward Arnold, London, 1972.

FERNANDO, R.L. Angiostrongyliasis. In: FERNANDO, R.L. **Tropical Infectious Diseases**. London, Greenwich Medical Media, 2001, p.107-110.

FRIED, B.; SCHAFER, S.; KIM, S. Effects of *Echinostoma caproni* infection on the lipid-composition of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.353-354, 1989.

FRIED, B.; SHERMA, J. Thin layer chromatography of lipids found in snails (Gastropoda: Mollusca). **Journal of Planar Chromatography**, v.3, p.290-299, 1990.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A.C.A.; YOSHIMURA, K.. Update on eosinophili meningoencephalitis and its clinical relevance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.322–348, 2009.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOMÉ, J.W.; PINTO, S.C.C.; CAMILO-COURA, L.; LENZI, H. L. *Phylliocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.65-68, 1989.

GREWAL, P.S.; GREWAL, S.K.; TAN, L.; ADAMS, B.J. Parasitism of Molluscs by Nematodes: Types of Associations and Evolutionary Trends. **Journal of Nematology**, v.35, p.146-156, 2003.

HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angyongstrongylus cantonensis* light microscopy. **International Journal for Parasitology**, v.5, p.521–528, 1975.

HEXIANG, L.; ZHANG, YI.; SHAN, LV.; LING, HU.; XIAONONG, Z. Establishment and observation of the life cycle of *Angiostrongylus cantonensis* in a laboratory setting. **Journal of Pathogen Biology**, v.4, p.836-839, 2009.

HE, Z.Y.; JIA, L.; HUANG, F. Survey on the outbreak of human angiostrongyliasis in Beijing. **Chinese Journal of Public Health**, v.23, p.1241-1242, 2007.

HIDELARATCHI, M.D.; RIFFSY, M.T.; WIJESEKERA, J.C. A case of eosinophilic meningitis following monitor lizard meat consumption, exacerbated by anthelmintics. **Ceylon Medical Journal**, v. 50, p. 84–86, 2005.

HUNG, T.P.; CHEN, E.R. Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*). **Handbook of Clinical Neurology**, v.52, p.545-562, 1988.

HUNSBERGER, A.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of *Echinostoma caproni* miracidia dose on the neutral and polar lipids of *Biomphalaria glabrata* as determined by high-performance thin-layer chromatograph. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 76-83, 2013.

HUMICZEWSKA, M.; RAJSKI, K. Lipids in the host–parasite system: digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected the developmental stages of *Fasciola hepatica*. **Acta Parasitologica**, v.50, p.235–239, 2005.

IBRAHIM, M.M. Prevalence and Intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snail in relation to some ecological and biological factors. **Parasite**, v.14, p.61-70, 2009.

ISHAK, M.M.; MOHAMED, A.M.; SHRAF, A.A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry Physiology (B)**, v.53, p.499-505, 1975.

JINDRAK, K.; ALICATA, J.E. Comparative pathology in experimental infection of pigs and calves with the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.78, p.371-382, 1968.

JINDRAK, K.; ALICATA, J.E. Experimentally induced *Angiostrongylus cantonensis* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.449–456, 1970.

JOOSSE, J. Hormone mollusks. In: JAFER, H.; DWER, R.G.H. **Invertebrate Endocrinology**. 1. ed. New York, USA.

KLIKS, M.M.; PALUMBO, N.E. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. **Social Science and Medicine**, v.34, p.199-212, 1992.

KUTZ, S.J.; HOBERG, E.P.; NISHI, J.; POLLEY, L. Developmente of muskox lunworm, *Umingmakstrogylus pallikuukensis* (protostrongylidae), in gastropods in the Arctic. **Canadian Journal of Zoology**, v. 8, p. 1977-1985, 2002.

KUTZ, S.J.; HOBERG, E.P.; POLLEY, L. A new lungworm in muskoxen: An exploration in Arctic parasitology. **Trends in Parasitology**, v.17, p.276–280, 2001.

LAUKNER, G. Diseases of Mollusca: Gastropoda. **Diseases of Marine Animals**. 1. ed. New York: O.Kinne, 1980. p. 311-424.

LIEBSCH, M.; BECKER, W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. **Journal Comparative Physiology B**, v.160, p.41-50, 1990.

LIMA, A.R.M.C.; MESQUITA, S.D.; SANTOS, S.S.; AQUINO, E.R.P.; ROSA, L.R.S.; DUARTE, F.S.; TEIXEIRA, A.O.; COSTA, Z.R.S.; FERREIRA, M.L.B. Alicate disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.67, p.1093–1096, 2009.

LIMA, L.C.; MASSARA, C.L.; SOUZA, C.P.; VIDIGAL, T.D.; LENZI, H.L.; CARVALHO, O.S. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, p.399-402, 1992.

LIM, B.L.; RAMACHANDRAN, C.P. Ecological studies of *Angiostrongylus malaysiensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in Malaysia. In: CROSS, J.H. **Studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia**, Special Publication No. 2 (NAMRU-2-SP-44). Taipei: US Naval Medical Research Unit. 1979. p. 26-48.

LIMAYE, L.S.; BHOPALE, M.K.; SENGUPTA, S.R, et al: Transmission of *Angiostrongylus cantonensis* infection to experimental albino rats. **Indian Journal of Helminthology**, v.42, p.37-40, 1990.

LINDO, J.F.; ESCOFF, E.R.Y.; REID, B.; CODRINGTON, G.; CUNNINGHAM-MYRIE, C.; EBERHARD, M.L. Fatal autochthonous eosinophilic meningitis in a Jamaican child caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p. 425-28, 2004.

LOKER, E.S.; HERTEL, L.A. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **Journal of Parasitology**, v.73, p.503-513, 1987.

MACKERRAS, M.J.; SANDARS, D.F. The life history of the rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae. **Australian Journal of Zoology**, v.3, p.1-25, 1955.

MAGALHAES, A.C.S. A influência de diferentes concentrações de carbonato de cálcio no manejo da população de *Biomphalaria glabrata* em condições laboratoriais. Monografia, Faculdades São José, Rio de Janeiro, 2009.

MAGALHÃES, A.; PINHEIRO, J.; MELLO-SILVA, C.C. A mobilização do cálcio em *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes quantidades de carbonato de cálcio. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, p.46-55, 2011.

MAS-COMA, S.; ESTEBAN, J.; BARGUES, M. Epidemiología de la fascioliasis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. **Boletín de la Organización Mundial de la Salud**, v.77, p. 340-346, 1999.

MASON, K.V. Haematological and cerebrospinal fluid findings in canine neural angiostrongylosis. **Australian Veterinary Journal**, v.66, p.152-154, 1989.

MASSA, D.R.; CHEJLAVA, M.J.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.101, p.925-928, 2007.

McKENZIE, R.A.; GREEN, P.E.; WOOD, A.D. *Angiostrongylus cantonensis* infection of the brain of a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*). **Australian Veterinary Journal**, v.54, p. 86-88, 1978.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3-8, 2006.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, M.C.; VILAR, M.M.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.492-495, 2010.

MODENA, C.M.; COELHO, P.M.Z.; BARBOSA, F.S.; LIMA, W.S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine-*Biomphalaria glabrata*-bovine model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.11–16, 1993.

MOHAMED, A.M.; ISHAK, M.M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289-292, 1982.

MOORE, M.N.; HALTON, D.W. Histochemical change in the digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.43, p.1-16, 1973.

MORASSUTTI, A.L.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, p.399-407, 2014.

MORAND, S.; BARKER, G.M. *Hugotdiplogaster neozelandia* n. gen., n. sp. (Nematoda: Diplogasteridae), a parasite of the New Zealand endemic slug, *Athoracophorus bitentaculatus* (Quoy and Gaimard, 1832) (Gastropoda: Athoracophoridae). **The New Zealand Journal of Zoology**, v.22, p.109–113, 1955a.



MORERA, P. Angiostrongilíase abdominal. Um problema de saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.21, p.81-83, 1988.

MORERA, P.; CÉSPEDES, R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v.18, p.173-85, 1971.

MOREIRA, V.L.C.; GIESE, E.G.; MELO, F.T.; SIMÕES, R.O.; THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; SANTOS, J.N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta Tropica**, v.125, p.90-97, 2013.

NEW, D.; LITTLE, M.D.; CROSS, J. *Angiostrongylus cantonensis* infection from eating raw snails. **The New England Journal Medical**, v.332, p.1105–1106, 1995.

NOMURA, S.; LIN, H.H. First clinical case of *Haemostromylus ratti*. **Taiwan No Ikai**, v.3, p.589 - 592, 1945.

ODAIBO, A.B.; DEHINBO, A.J.; OLOFINTOYE, L.K.; FALODE, O.A. Occurrence and distribution of *Rhabditis axei* (Rhabditida; Rhabditidae) in African giant snails in southwestern Nigeria. **Helminthologia**, v.37, p.233–235, 2000.

OHBAYASHI, M.; KAMIYA, M.; BHAIBULAYA, M. Studies on the parasite fauna of Thailand. I. Two new metastrongyloid nematodes, *Angiostrongylus siamensis* sp. n. and *Thaistromylus harinasutai* gen. et sp.n. (Metastrongyloidea: Angiostrongylidae) from wild rats. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.27, p.5-10, 1979.

OLAFSEN, J.A.; FLETCHER, T.C.; GRANT, P.T. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. **Dev. Comparative Immunology**, v.16, p.123-138, 1992.

OMAR, S.C.; SCHOLTE, R.G.; MENDONÇA, C.F.; PASSOS, L.K.; CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in molluscs from harbor areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.740-746, 2012.

PASCHOAL, S.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) em *Bradybaena similaris* (Fe'ussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): Alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermedia'rio. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p.411–418, 1996.

PASCUAL, G.J.E.; AGUILAR, P.P.H.; GALVEZ, O.M.D. Finding of *Angiostrongylus cantonensis* in the cerebrospinal fl uid of a boy with eosinophilic meningoencephalitis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.133, p.92-95, 1981.

PANACKEL, C.; CHERIAN, G.; VIJAYAKUMAR, K.; SHARMA, R.N. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.24, p.220–21, 2006.

PARAENSE, W.L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A.S. (Ed.) *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1970. 13-30p.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v.55, p.105-111, 1975.

PARAENSE, W.L.; ARAÚJO, M.V. *Biomphalaria glabrata* no Estado do Piauí. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p.385-387, 1984.

PINHEIRO, J.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407- 410, 1994.

PINHEIRO, J.; GOMES, E.M. A method for glycogen determination in molluscs. **Brazilian Archive Biology and Technololy**, v.37, p.569–576, 1994.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55–59, 2009.

PROCIV, P.; SPRATT, D.M.; CARLISLE, M.S. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1295-1303, 2000.

RADOMYOS, P.; TUNGTRONGCHITR, A.; PRAEWANICH, R. Occurrence of the infective stage of *Angiostrongylus cantonensis* in the yellow tree monitor (*Varanus bengalensis*) in five provinces of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v.25, p.498–500, 1994.

RAWI, S.M.; EL-GINDY, H.I.; HAGGAG, A.M.; ABOU EL HASSAN, A.; ABDEL KADER, A. New possible molluscicides from *Calendula micrantha* officinalis and *Ammi majus* plants' physiological effect on *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Journal Egyptian Germany Society of Zoology**, v.16, p.69-75, 1995.

READER, T.A.J. The Pathological effects of sporocysts, rediae and metacercarie on the digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Molusca, Gastropoda). **Parasitology**, v.63, p.483-489, 1971.

RODONAYA, T.E. The biology of the lungworm *Protostrongylus tauricus* from the European hare. **Parazitologicheskii Sbornik, Tbilisi**, v.4, p.91–101, 1977.

ROSEN, L.; CHAPPEL, R.; LAQUEUR, G.L. Eosinophilic Meningoencephalitis caused by a metastrongyloid lungworm in rats. **Journal of the American Medical Association**, v.179, p.620-624, 1962.

SAUERLANDER, R. Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 49, p. 263-80, 1976.

SCHOTTLER, U. Weitere untersuchungen zun anaeroben energiestoffwechsel dès polychaeten *Arenicola marina* L. **Zool Beitr NF**, v.30, p.141–152, 1986.

SHIH, H.H.; CHEN, S.N. Glycolytic enzymes in juvenile and adult *Angiostrongylus cantonensis*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.13, p.114–119, 1982

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepatica. **A Hora Veterinária**, n.1, p.13-18, 1995.

SILVA, R.E. Estudo malacológico da Bacia Hidrográfica do Lago Soledade (Ouro Branco, Minas Gerais): teste de susceptibilidade com os transmissores do *Schistosoma mansoni*. Caracterização de larvas de trematódeos emergentes de moluscos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 146p, 1992.

SIMÕES, R.O.; MONTEIRO, F.A.; SÁNCHEZ, E.; THIENGO, S.C.; GARCIA, J.S.; COSTA-NETO, S.F.; MALDONADO JR., A. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p.1331–1333, 2011.

SLOM, T.J, CORTESE, M.M.; GERBER, S.I.; JONES, R.C.; HOLTZ, T.H.; LOPEZ, A.S.; ZAMBRANO, C.H.; SUFIT, R.L.; SAKOLVARRE, Y.; CHAICUMPA, W.; HERWALDT, B.L.; JOHNSON, S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **The New England Journal Medical**, v.346, p. 668–75, 2002.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; FERREIRA, S.S.; GUIMARÃES, C.T.; VIEIRA, L.B.F.; MARIANI, R. Moluscos limnicos da microregião de Belo Horizonte, Minas Gerais, com êfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.449-456, 1998.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C. Moluscos de Interesse Parasitológico do Brazil, Série Esquistossomose 1, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 76 pp, 1990.

STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic Alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45, p.152-157, 1985.

SULLIVAN, J.T.; CHENG, T.C.; HOWLAND, K.H. Studies on parasitic castration: castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.104, p.154–171, 1985.

SUMNER, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. **Journal Biology Chemistry**, v.62, p.287–290, 1924.

TAN, L.; GREWAL, P.S. Pathogenicity of *Moraxella osloensis*, a bacterium associated with a nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* to the slug, *Deroceras reticulatum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.5010–5016, 2001b.

TESANA, S.; SRISAWANGWONG, T.; SITHITHAWORN, P.; LAHA, T. *Angiostrongylus cantonensis*: Experimental study on the susceptibility of apple snails, *Pomacea canaliculata* compared to *Pila polita*. **Experimental Parasitology**, v.118, p.531-535, 2008.

THIENGO, S.C. Helmintoses de interesse médico-veterinário transmitidas por moluscos no Brasil. In: SANTOS, S.B.; THIENGO, S.C.; PIMENTA, A.D.; FERNANDEZ, M.A.; ABSALÃO, R.S. **Tópicos em Malacologia Ecos do XVII Encontro brasileiro de malacologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de malacologia, 2007. p.287-294.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; GRAULT, C.E.; SILVA, H.F.R.; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B. Freshwater snail and *Schistosoma mansoni* in the State of Rio de Janeiro, Brazil: III- Mesorregion Baixada. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.43-46, 2002a.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.;MAGALHÃES, M.G.; SANTOS, S.B. Freshwater snail and *Schistosoma mansoni* in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I- Metropolitan Mesorregion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.177-184, 2001.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta tropica*, v.115, p.194-199, 2010.

THOMAS, J.D.; BENJAMIN, M.; LOUGH, A.; ARAM, R.H. The effects of calcium in the external environment on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say). **Journal of Animal Ecology**, v.43, p.839–860, 1974.

THOMPSON, S. N.; LEE, R. K. W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the <sup>31</sup>P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.72, p.417- 421, 1986.

TIELENS, A.G.M. Energy generation in parasitic helminths. **Parasitology Today**, v.10, p.346–352,1994.

TOMA, H.; MATSUMURA, S.; OSHIRO, C.; HIDAKA, T.; SATO, Y. Ocular angiostrongyliasis without meningitis symptoms in Okinawa Japan. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.211–213, 2002.

TSAI, H.C.; LEE, S.S.; HUANG, C.K.; YEN, C.M.; CHEN, E.R.; LIU, Y.C. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p.222–26, 2004.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.; AMARAL, L.; GARCIA,.; OLIVEIRA, A.M.; J.; MALDONADO, A.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca:Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v.63, p.64-68, 2014.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.S.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.220-223, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.; LUSTRINO, D.; GOLO, P.; MALDONADO, A.; BITTENCOURT, V.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212-216, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GOLO, P.; LIMA, M.; GARCIA, J.; MALDONADO, A.; PONTE, E.G.; BITTENCOURT, V.P.; PINHEIRO, J. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). *Parasitology Research*, v. 115, p. 1136-1142, 2013.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, n.2, p.192-195, 2011a.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.; MALDONADO, A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 109, p.855-891, 2011b.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M., GARCIA, J.S.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v.129, p.266–269, 2011c.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143-147, 2012.

TUNHOLI, V.M.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R.N.; GARCIA, J.; MALDONADO, A.; DOS SANTOS, M.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v.133, p.403-410, 2013.

WANG, K.; FENG, L.; WEI, X. One case of angiostrongyliasis misdiagnosed as tuberculosis. **Chinese Journal of Antituberculosis**, v.29, p.469–70, 2007.

VAZQUEZ, J.J.; BOILS, P.L.; SOLA, J.J. Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. **Gastroenterology**, v.105, p.1544-1549, 1993.

WALLACE, G.D., ROSEN, L. Studies on eosinophilic meningitis. I. Observations on the geographic distribution of *Angiostrongylus cantonensis* in the Pacific area and its prevalence in wild rats. **American Journal of Epidemiology**, v.81, p.52-62, 1956.

WANG, Q.P.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. Invasive freshwater snail, China. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1119–20, 2007.

WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Nova concepção para o método de Baermann – Moraes – Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.539–565, 1989.



WRIGHT, C. A. 1971. Flukes and snails. Science of biology series No. 4. George Allen and Un- win Ltd., London, p. 168.

WRIGHT, J. D.; KELLY, W. R.; WADDEL, A. H.; HAMILTON, J. Equine neural angionstroglylosis. **Australin Veterinary Journal**, v.68, p.58-60, 1991.

WUYLKER, W. Parasite-induced changes of internal and external sex characteristics in insects. **Experimental Parasitology**, v.15, p.561-597, 1964.

WU, C.H.; YAN, X.H. Outbreak of human angiostrongyliasis in Fuzhou. **Chinese Journal of Zoonoses**, v.20, p.454, 2004.

WU, G.H. *Angiostrongylus cantonensis*. In: Tang JQ, ed. Nature-borne diseases. Beijing: Science Press, 2006: 1182-89 (em Chines).

YANG, F.Z.; ZHANG, Y.Z.; TU, Z.P.; XU, L.S. Survey on the outbreak of human angiostrongyliasis caused by eating snails. **Strait Journal of Preventive Medicine**, v.10, p.44-45, 2004.

YII, C.Y. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.25, p.233-49, 1976.

YOKOGAWA, S. A new species of nematode found in the lungs of rats, *Haemostrongylus ratti* sp. nov. **Transactions of the Natural History Society of Formosa**, v.27, p.247-250, 1937.

YOUSIF, F.; LÁMMLER, G. The mode of infection with and the distribution of Angionstrongylus cantonensis larvae in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 53, p. 247-250, 1977.

ZELCK, U.E.; BECKER, W.; BAYNE, C.J. The plasm proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Dev Comparative Immunology*, v.19, p. 181-194, 1995.

ZHENG, R.Y.; JIN, R.; LIN, B.C.; PAN, C.W.; XUE, D.Y. Probing and demonstrating etiological factors for outbreak of *Angiostrongylasis cantonensis* in Wenzhou. **Journal Preventive Medicine**, v.13, p.105-07, 2001.