

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO E DA
BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*
(SAY, 1818) (MOLLUSCA, GASTROPODA) INFECTADA
EXPERIMENTALMENTE POR *ANGIOSTRONGYLUS*
CANTONENSIS (CHEN, 1935) (NEMATODA,
METASTRONGYLIDAE).**

Vinícius Menezes Tunholi Alves

2012



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

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO E DA BIOLOGIA
REPRODUTIVA DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* SAY, 1818
(MOLLUSCA, GASTROPODA) INFECTADA EXPERIMENTALMENTE
POR *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (CHEN, 1935)
(NEMATODA, METASTRONGYLIDAE).**

VINÍCIUS MENEZES TUNHOLI ALVES

Sob a Orientação do Professor Doutor

Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação da Doutora

Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

592.57

A474c

Alves, Vinícius Menezes Tunholi, 1985-

T

Caracterização do perfil bioquímico e da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca, Gastropoda) infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda, Metastrongylidae) / Vinícius Menezes Tunholi Alves - 2012.

81 f. : il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 68-80.

1. Nematoda - Teses. 2. *Biomphalaria glabrata* - Teses. 3. Bioquímica clínica veterinária - Teses. 4. Bioquímica - Experiências - Teses. 5. Parasitologia veterinária - 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
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VINÍCIUS MENEZES TUNHOLI ALVES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _27/02/2012.



Prof.^o Dr. Jairo Pinheiro da Silva, UFRRJ

(Orientador)



Prof.^ª Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, UFRRJ

(Titular)



Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, IOC/FIOCRUZ

(Titular)

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, Lívia e minha avó, Eunice, pelo incentivo, carinho e pelos momentos de alegria.
- A minha co-orientadora, Dr^a Silvana Carvalho Thiengo, Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, RJ, 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 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!
- A minha namorada, Ludimila, pelo carinho, afeto e cumplicidade. Pela alegria em compartilhar e por todas as coisas que vivemos. Muito obrigado amor!
- A minha amiga Fabrícia por sua alegria, carinho e apoio. Obrigado de coração!

- Ao meu amigo, Danilo Lustrino, pelo apoio, dedicação e principalmente pela amizade. Pelo seu senso crítico, pelos momentos de alegrias, por se fazer presente nos momentos difíceis, pelas valiosas contribuições que certamente enriqueceu nosso trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes. **Caracterização do Perfil Bioquímico e da Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca, Gastropoda) Infectada Experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis*, (Nematoda, Metastrongylidae).** 2012. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O nematóide *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) é parasito de pulmões de roedores, primeiramente descrito em ratos silvestres por Cheng em 1935. Trata-se de um agente zoonótico, o qual causa angiostrongilíase humana. O ciclo de vida deste nematóide envolve obrigatoriamente a participação de moluscos como hospedeiros intermediários e crustáceos, anfíbios, peixes e répteis como hospedeiros paratênicos. Atualmente, o Brasil é considerado uma área de alto risco ao estabelecimento da angiostrongilíase humana, justificado pela ocorrência de moluscos, especialmente o caramujo africano, *Achatina fulica* (Bowdich, 1822), e roedores naturalmente infectados, fatores que favorecem diretamente a instalação do ciclo desta doença. 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 agentes transmitidos por estes organismos. Porém, quando nos referimos a modelos experimentais utilizando *A. cantonensis* e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), os dados ainda não foram caracterizados, o que preocupa, não apenas pela importância do parasito, mas também pela ampla distribuição da espécie *B. glabrata* no Brasil. Neste estudo, pela primeira vez foram avaliadas as alterações metabólicas de *B. glabrata*, decorrentes da infecção experimental por *A. cantonensis*. Para isso, foram utilizados moluscos da linhagem melânica 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 uma diminuição significativa nos conteúdos hemolinfáticos de glicose, proteínas e ácido úrico e um aumento nos conteúdos de ureia e na atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) dos grupos infectados em relação ao grupo controle. Variações nas reservas polissacarídicas também foram demonstradas, com os grupos infectados apresentando uma diminuição nas reservas de glicogênio da massa cefalopediosa, glândula digestiva e de galactogênio na glândula de albúmen, indicando um comprometimento do estado nutricional do molusco. Juntos, os resultados confirmam o envolvimento de mecanismos bioquímicos homeostáticos, caracterizados principalmente pela ativação do metabolismo protéico nos moluscos infectados, que passam a utilizar fontes não glicídicas para a produção de energia. Como consequência, um acúmulo de catabólitos do metabolismo protéico foi observado, o que poderia explicar em parte, as maiores concentrações de ureia na hemolinfa de animais infectados. Além disso, a maior atividade de centros enzimáticos nos organismos infectados sugere para LDH o provável envolvimento de uma via fermentativa na produção de energia, e no caso das transaminases (ALT e AST) uma importante associação entre o metabolismo protéico e a síntese de nova glicose, possibilitando a formação de α -cetoácidos a partir de aminoácidos gliconeogênicos. Adicionalmente, alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* revelam a

ocorrência do fenômeno de castração parasitária indireta, provavelmente como consequência ao estado de inanição observado durante o processo de infecção.

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

ABSTRACT

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes. **Characterization of the biochemical profile and reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca, Gastropoda) experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*, (Nematoda, Metastrongylidae).** 2012. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The nematode *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) is a parasite of rodent lungs, first described in wild rats by Cheng. It is a zoonotic pathogen that occasionally causes human eosinophilic meningoencephalitis. The life cycle of this nematode always involves the participation of snails as intermediate hosts. 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, favoring the establishment of this disease's cycle. 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 has yet to be any research on the interaction of *A. cantonensis* and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), which is cause for concern, not only because of the importance of this parasite, but also due to the widespread distribution of the freshwater snail *B. glabrata* 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 doses demonstrated a significant decrease in the hemolymphatic levels of glucose, proteins and uric acid and an increase in the level of urea and the enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of the infected groups in relation to the control groups. Variations in the polysaccharide reserves were also observed, with the infected groups having lower glycogen reserves in the cephalopod mass and digestive gland, and lower levels of galactogen in the albumen gland, indicating impairment of the infected snails' nutritional state. Together the results confirm the involvement of adaptive biochemical mechanisms, characterized mainly by the activation of the protein metabolism in the infected snails, which start to use non-glycidic sources to produce energy. As a consequence, there is an accumulation of catabolites from protein metabolism, which can partly explain the higher concentrations of urea in the hemolymph of the infected animals. Besides this, the greater activity of the enzyme centers in the infected organisms suggests, for LDH, the probable involvement of a fermentative route in the production of energy, and in the case of the transaminases (ALT and AST), an important association between protein metabolism and synthesis of new glucose, enabling the formation of α -ceto acids from glycogenic amino acids. Additionally, alterations in the reproductive biology of *B. glabrata* infected by *A. cantonensis* reveal the occurrence of parasite castration, probably as a result of the inanition observed during the infection process.

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

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Alterações na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* em resposta à infecção com *Angiostrongylus cantonensis* ao longo do tempo de infecção (1, 2 e 3 semanas). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Período zero (0) representa o valor médio do grupo controle em cada semana de observação. ^{a, b}=indicam médias que diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).....32

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Variação nos conteúdos de proteína total (g/dl), ácido úrico e ureia (mg/dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.....45

Tabela 2. Atividade das aminotransferases (ALT e AST) (UFR/ml) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.....45

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Concentração de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopédica de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ao nível de ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.....61

Tabela 2. Conteúdo de glicose e atividade da lactato desidrogenase na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ao nível de ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.....61

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo ilustrativo de vida do nematóide *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: WANG et al., 2008. 5
- Figura 2.** Larva L₁ de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas de *Pomacea canaliculata*. **A** - Larva recuperada 11 dias pós-infecção. O intestino torna-se escuro devido à distribuição dos grânulos refráteis, enquanto que o esôfago anterior (EB) e a linha da junção esôfago-intestino (EI) tornam-se evidentes. **B** – Larva com 15 dias pós-infecção. A linha que delimita a junção intestino-esôfago (EI) torna-se mais clara devido à distribuição heterogênea dos grânulos refráteis. Fonte: LV et al. (2009). 6
- Figura 3.** Larva L₂ de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas a partir de exemplares de *Pomacea canaliculata* experimentalmente infectada. (S) bainha, (EI) junção esôfago-intestino e (AC) cutícula anal. Fonte: LV et al., 2009. 7
- Figura 4.** Estágio L₃ de *Angiostrongylus cantonensis* sem bainha apresentando movimento em “Q”, fora do seu hospedeiro intermediário. Fonte: Lv et al., 2009. 8
- Figura 5.** Microscopia de luz de larva de terceiro estágio (L₃) de *Angiostrongylus cantonensis*. Extremidade posterior demonstrando uma cauda pontiaguda com acentuado recuo da superfície dorsal (TPT) e ânus (A) localizado distalmente a extremidade anterior. Fonte: THIENGO et al., 2010. 8
- Figura 6 e 7.** Microscopia de luz de *Angiostrongylus cantonensis*. Barra de escala: 25µm. (6), macho, visão ventral da bolsa copuladora, detalhe mostrando a espessura do raio dorsal, com três pequenos ramos (seta). (7), macho, vista lateral da bolsa copuladora, mostrando o gubernáculo. Fonte: THIENGO et al., 2010. 9

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Corte histológico da região ovotestis de *Biomphalaria glabrata*. a - Seção de molusco não infectado mostrando a região ovotestis funcionalmente ativo, com a estrutura do ácino (a) contendo espermatozoides agrupados pela extremidade anterior (cabeças) (sh) e a cauda (t) voltada para a luz do ácino . Barra de escala = 50 µm. b - Corte histológico da região do ovotestis de moluscos experimentalmente infectados com *Angiostrongylus cantonensis* exibindo uma região da gônada com um processo ativo de gametogênese, com o espermatozoides agrupados pela região da cabeça (sh) e suas caudas (t) projetada para o lúmen do ácino (a) e a completa ausência de larvas de nematóides em desenvolvimento nesta região . Barra de escala = 50 µm 31

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Relação entre as concentrações de proteínas totais expresso em g/dl (A), ureia expresso em mg/dl (B) e ácido úrico expresso em mg/dl (C) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos

moluscos do grupo controle obtidos no final de cada semana (1, 2, and 3 semanas). a, b, c - Médias diferem significativamente entre si (média±desvio-padrão).....46

Figura 2. Relação entre aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (B) expressado em URF por mililitro, na hemolinfa of *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos moluscos do grupo controle obtidos no final de cada semana (1, 2, e 3 semanas). a, b, c - Médias diferem significativamente entre si (média±desvio-padrão).....46

Figura. 3. 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.....47

CAPÍTULO 3

Figura 1. Relação entre concentração glicogênio na glândula digestiva (A), massa cefalopodia (B), glicose (C) e atividade da lactato desidrogenase (D) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos caramujos do grupo controle obtido no final de cada semana (1, 2 e 3 semanas). a, b, c, d - Médias diferem significativamente (média ± DP).....60

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| 2.1 Histórico..... | 2 |
| 2.2 Ciclo de vida | 3 |
| 2.3 Aspectos Morfológicos | 5 |
| 2.5 Hospedeiros de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e seu papel como reservatório e propagação da doença..... | 10 |
| 2.6 Importância do Filo Mollusca no desenvolvimento de estágios larvais de trematódeos e nematóides. | 12 |
| 2.7 Relação molusco-nematóide | 14 |
| 2.7.1 Aspectos relacionados à biologia reprodutiva de moluscos expostos a condição de infecção..... | 15 |
| 2.7.2 Aspectos relacionados aos conteúdos de carboidratos de moluscos expostos a condição de infecção..... | 17 |
| 2.7.3 Aspectos relacionados as alterações nos conteúdos de proteínas totais, produtos nitrogenados de degradação e das aminotransferases em moluscos: Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)..... | 20 |
| 3 OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 24 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 24 |
| 4 CAPÍTULO I..... | 25 |
| ALTERAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Biomphalaria glabrata</i> (MOLLUSCA, GASTROPADA) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA COM <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE). | 25 |
| RESUMO..... | 26 |
| ABSTRACT..... | 27 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 28 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.2.1 Parasitos | 29 |
| 4.2.2 Infecção dos moluscos | 29 |
| 4.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos..... | 29 |
| 4.2.4 Análise da taxa ovipositória de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> | 29 |
| 4.2.5 Determinação de galactogênio..... | 30 |
| 4.2.6 Análises Histológicas..... | 30 |
| 4.2.7 Análises estatísticas | 30 |
| 4.3 RESULTADOS | 30 |
| 4.4 DISCUSSÃO..... | 32 |
| 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 34 |
| 5 CAPÍTULO II | 37 |
| EFEITOS DA INFECÇÃO POR LARVAS DE <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE) SOBRE O METABOLISMO DE SEU HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO <i>Biomphalaria glabrata</i> (MOLLUSCA, GASTROPODA)..... | 37 |
| RESUMO | 38 |
| ABSTRACT..... | 39 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 40 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 5.2.1 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos..... | 41 |
| 5.2.2 Parasitos | 41 |
| 5.2.3 Infecção dos moluscos | 41 |
| 5.2.4 Dissecção e coleta da hemolinfa | 41 |
| 5.2.5 Determinação das Aminotransferases (AST e ALT)..... | 42 |
| 5.2.6 Dosagens de proteínas totais..... | 42 |
| 5.2.7 Determinação das concentrações de ácido úrico e ureia..... | 42 |
| 5.2.8 Análises Histológicas..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 5.2.9 Análise estatística | 42 |
| 5.3 RESULTADOS | 43 |
| 5.4 DISCUSSÃO..... | 46 |
| 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| 6 CAPÍTULO III | 52 |
| ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> (MOLLUSCA, GASTROPODA) EM FUNÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS</i> (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE)..... | 52 |
| RESUMO | 53 |
| ABSTRACT | 54 |
| 6.1 INTRODUÇÃO | 55 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| 6.2.1 Parasitos | 56 |
| 6.2.2 Infecção dos moluscos | 56 |
| 6.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos..... | 56 |
| 6.2.4 Análises das alterações bioquímicas em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> | 56 |
| 6.2.5 Análises estatísticas | 57 |
| 6.3 RESULTADOS | 57 |
| 6.4 DISCUSSÃO..... | 60 |
| 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 65 |
| 8 CONCLUSÕES..... | 67 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| 10 ANEXOS..... | 81 |

1 INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis foi primeiramente descrita em 1935 como partes da rotina de investigação parasitológica de ratos em Canton, China (HUNG; CHENG, 1988; PROCIV et al., 2000). Inicialmente, denominado *Pulmonema cantonensis* por Chen em 1935 (CHEN, 1935), o parasito foi incriminado como agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica em 1945 (NOMURA; LIN, 1945). O termo angiostrongylíase neural é devido ao amplo espectro de sinais neurológicos associados com a infecção por *A. cantonensis* (HUNG; CHENG, 1988). Durante décadas seguintes, tal helminto foi incriminado como causa mais comum da meningoencefalite eosinofílica tanto em humanos quanto em animais (GRAEF-TEIXEIRA et al., 2009).

Angiostrongylíase Neural é uma doença causada pela migração da larva de *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935. Tal patologia é caracterizada por uma disfunção ascendente do sistema nervoso central e frequentemente associada a uma infiltração eosinofílica e uma pleocitose eosinofílica na região. O processo patológico associado com 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).

Casos de infecções experimentais foram primeiramente descritos no final da década de 60 e início da década de 70 (JINDRAK; ALICATA, 1968), sendo o primeiro registro de infecção natural documentado por Mason em 1976 (MASON, 1989), que ao investigar sinais neurológicos em cães em Brisbane, Austrália constatou a presença de larvas compatíveis com *A. cantonensis*. A partir de então, um número crescente envolvendo animais domésticos e silvestres tem sido registrado exibindo a doença incluindo cavalos, ruminantes e aves (MCKENZIE et al., 1978).

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 evadem-se 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).

O seu ciclo biológico heteroxeno, envolve obrigatoriamente a participação de dois hospedeiros, sendo moluscos o hospedeiro intermediário, e roedor o hospedeiro definitivo caracterizando, portanto, um ciclo heteroxênico. Estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos como hospedeiros deste helminto, sendo que o caramujo africano, *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) taxonomicamente classificado na classe: Gastropoda, ordem: Stylommatophora e família: Achatinidae, associado a expansão dessa endemia. Dentre estes, a participação de espécies terrestres e aquáticas é registrada, apontando para a grande plasticidade do parasito, fator este que favorece diretamente o processo de disseminação da meningoencefalite eosinofílica (CALDEIRA et al., 2007, HARRIS; CHENG, 1975).

Biomphalaria glabrata (Say, 1818), encontra-se amplamente distribuída no território brasileiro, com ocorrência assinalada em 16 estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; CARVALHO et al., 2005). Esta espécie possui grande importância para a saúde pública por atuar como o principal hospedeiro intermediário do trematódeo digenético *Shistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agente etiológico da esquistossomose humana, sem dúvida uma séria endemia ainda hoje no país, devido à alta morbidade e ampla distribuição. Adicionalmente, estudos também têm confirmado a participação de *B. glabrata* como

hospedeiro intermediário 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 propagadores de doenças e, 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 (OMS, 1983). 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 da infecção experimental do molusco *B. glabrata* pelo nematóide *A. cantonensis*, durante o período pré-patente de desenvolvimento deste helminto no hospedeiro intermediário que segundo estudos, seria aproximadamente três semanas (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Angiostrongylus cantonensis foi primeiramente identificado como parasito de roedores em Canton, (CHEN, 1933). 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* (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 proposadamente lesmas como fonte alimentar e nove dias depois desenvolveu um quadro de paralisia principalmente de ombros e braços. Exemplos do fluído 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 nematóides 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, onde o parasito é considerado endêmico (BOWDEN, 1981; CALDEIRA et al., 2007, SIMÕES et al., 2011).

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 nematóides, 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 presepça 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_1), 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_1 , 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_3), 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 L₃. 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).

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 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 L₃ 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 dos estágios larvais no molusco.

Sauerlander (1976) estudou a via migratória de alguns nematóides, após infecção experimental de *A. fulica* com larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* (Baillet, 1866) /*A. cantonensis*. Em exame de cortes histológicos, foram observadas larvas no pulmão, manto, glândula digestiva, pé e trato gastrointestinal. 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 gastrointestinal; 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 L₃ 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 confirmada 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 (L₅), 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 na artéria pulmonar para finalizar o seu desenvolvimento (BHAIBULAYA, 1975) (Figura 1).

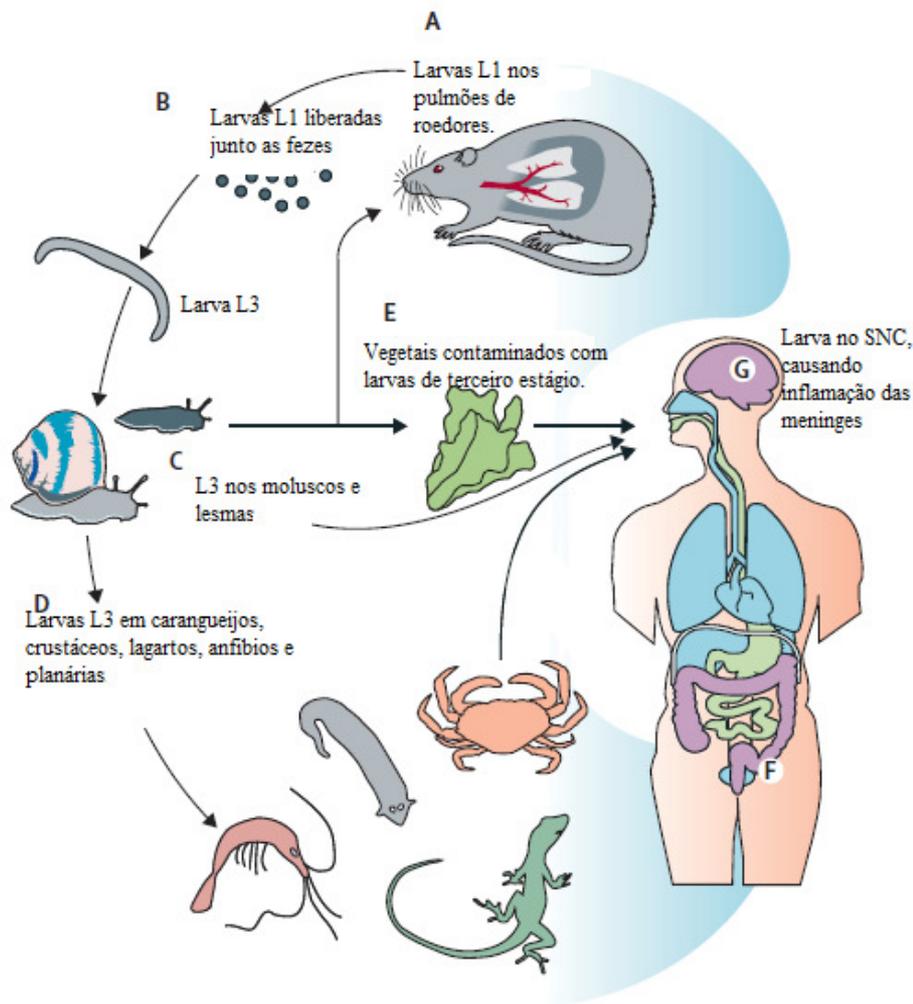


Figura 1. Ciclo ilustrativo de vida do nematóide *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: WANG et al., 2008.

2.3 Aspectos Morfológicos

Lv et al. (2009) investigaram aspectos relacionados à morfologia e o comportamento dos estágios larvais de *A. cantonensis* no molusco aquático *Pomacea canaliculata* (Lamarck,

1801), classificado taxonomicamente na classe: Gastropoda, ordem: Mesogastropoda e família: Ampullariidae. No presente estudo, a distribuição dos grânulos refráteis, aspectos estruturais da extremidade anterior e as variações existentes na bainha, foram utilizados como principais elementos de diferenciação morfológica entre os estágios larvais em desenvolvimento. Adicionalmente, o comportamento de locomoção das larvas fora do hospedeiro intermediário também foi avaliado, como parâmetros de comparação com outras espécies de nematóides.

Os resultados obtidos por estes autores demonstraram variações significativas no número e localização dos grânulos durante o desenvolvimento ontogênico do parasito. Na fase inicial, os grânulos emergiam diretamente da superfície corporal da L₁ em pequenas quantidades, porém à medida que se desenvolvia, um aumento significativo de tais estruturas era observado. A presença de uma linha transversal também foi notada, delimitando a junção esôfago-intestino e dividindo o corpo da larva em duas porções: anterior, com poucos grânulos refráteis, e posterior, com grânulos densos (Figura 2a). Posteriormente, antes da segunda muda, a linha que delimita a junção esôfago-intestino torna-se mais evidente em razão da distribuição heterogênea dos grânulos (Figura 2b).

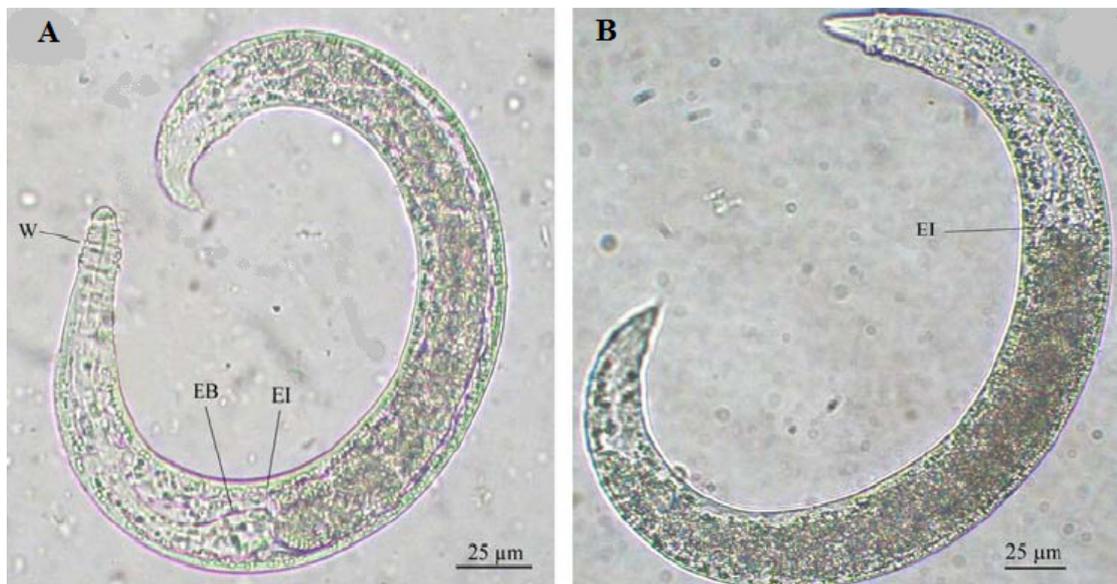


Figura 2. Larva L₁ de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas de *Pomacea canaliculata*. **A** - Larva recuperada 11 dias pós-infecção. O intestino torna-se escuro devido à distribuição dos grânulos refráteis, enquanto que o esôfago anterior (EB) e a linha da junção esôfago-intestino (EI) tornam-se evidentes. **B** - Larva com 15 dias pós-infecção. A linha que delimita a junção intestino-esôfago (EI) torna-se mais clara devido à distribuição heterogênea dos grânulos refráteis. Fonte: LV et al. (2009).

Aspectos estruturais também apontam variações relacionadas com a extremidade anterior das larvas. A presença de uma pequena abertura oral foi observada na fase inicial da L₁, conferindo um formato cônico à estrutura. No estágio L₂ de *A. cantonensis*, Lv et al. (2009) observaram claramente a presença de uma bainha, com abertura anal localizada distalmente a extremidade anterior com a junção esôfago-intestino mais evidente que o

estágio anterior (L₁) (Figura 3). Presença de estruturas em formato de haste também é observada nesta fase, mostrando-se similar no terceiro estágio evolutivo do parasito. Segundo os autores, neste estágio é possível a distinção do sexo, com abertural anal sendo visualizado apenas em exemplares fêmeas.

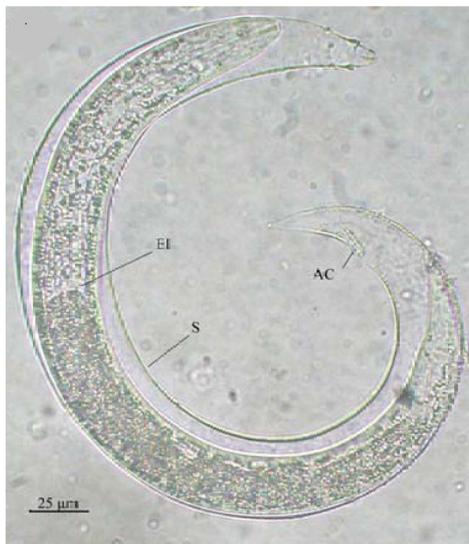


Figura 3. Larva L₂ de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas a partir de exemplares de *Pomacea canaliculata* experimentalmente infectada. (S) bainha, (EI) junção esôfago-intestino e (AC) cutícula anal. Fonte: LV et al., 2009.

Variações na bainha das larvas de *A. cantonensis* também foram registradas. Segundo Anderson (2000), a metodologia padrão utilizada para diferenciar estágios de nematóides em desenvolvimento é baseada principalmente na contagem do número de bainhas, sendo possível observar características das bainhas durante diferentes mudas, revelando aspectos importantes associados à própria biologia do parasito.

Segundo Lv et al. (2009) os diferentes estágios larvais de *A. cantonensis* apresentam alterações comportamentais. Estágios iniciais da L₁ recuperada a partir de fezes de roedores frequentemente apresentavam cauda enrolada, mesmo quando em movimento, bem diferente do comportamento registrado pelas larvas recuperadas a partir de moluscos no terceiro dia infecção, no qual apresentaram caudas esticadas. O terceiro estágio (L₃), apresentou como principal característica comportamental um movimento em “Q”. Este comportamento não foi observado em outras espécies de nematóides de vida livre, sendo, portanto, característico para *A. cantonensis* (Figura 4).



Figura 4. Estágio L₃ de *Angiostrongylus cantonensis* sem bainha apresentando movimento em “Q”, fora do seu hospedeiro intermediário. Fonte: Lv et al., 2009.

Thiengo et al. (2010), registraram o primeiro achado de *A. fulica* naturalmente infectado por larvas de *A. cantonensis* na região nordeste do Brasil. Neste trabalho, além de apresentar aspectos epidemiológicos atualizados da angiostrongilíase no país, os autores realizaram estudos morfológicos voltados para a identificação do parasito adulto e dos estágios larvais obtidos a partir da infecção experimental em *R. norvegicus*. Como principais resultados, variações morfométricas estabelecidas entre o primeiro e terceiro estágio do parasito foram registradas. Larvas L₁ apresentaram uma cauda esguia, enquanto larvas de terceiro estágio (L₃), caracterizaram-se por uma cauda pontiaguda com acentuado recuo da superfície dorsal (Figura 5).

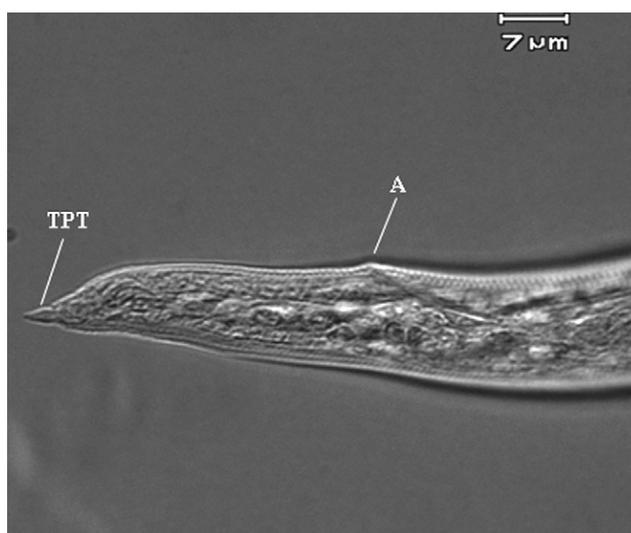


Figura 5. Microscopia de luz de larva de terceiro estágio (L₃) de *Angiostrongylus cantonensis*. Extremidade posterior demonstrando uma cauda pontiaguda com acentuado recuo da superfície dorsal (TPT) e ânus (A) localizado distalmente a extremidade anterior. Fonte: THIENGO et al., 2010.

Parasitas adultos de *A. cantonensis* foram caracterizados por um corpo filiforme em ambos os sexos, afilados em sua extremidade anterior. As fêmeas são maiores e mais robustas do que os machos. A vesícula cefálica encontra-se ausente, apresentado uma abertura oral simples, circundada por seis papilas (2 ventrais, 2 laterais e 2 dorsais). O esôfago é do tipo claviforme com o poro excretor localizado distalmente ao mesmo. Na extremidade posterior, a presença de uma pequena *bursa* levemente assimétrica foi observada em exemplares pertencentes ao sexo masculino, com raios ventrais menores do que os ventro-laterais, bifurcando-se no seu terço final. Os raios externo-dorsais são separados em sua extremidade. O raio dorsal mostrou-se mais curto e espesso, bifurcando em três ramos. Gubernáculo visível e levemente encurvado. Nas fêmeas, abertura vulvar localizou-se anteriormente ao ânus (THIENGO et al., 2010).



Figura 6 e 7. Microscopia de luz de *Angiostrongylus cantonensis*. Barra de escala: 25µm. (6), macho, visão ventral da bolsa copuladora, detalhe mostrando a espessura do raio dorsal, com três pequenos ramos (seta). (7), macho, vista lateral da bolsa copuladora, mostrando o gubernáculo. Fonte: THIENGO et al., 2010.

2.4 Classificação

Os metastrongylídeos consistem aproximadamente de 180 espécies de nematóides alocadas dentro de 40 gêneros. Atualmente, autores têm descrito uma nova espécie de metastrongilídeo *Angiostrongylus lenzii*, cujos aspectos morfológicos assemelham aqueles já observados em *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus gubernaculatus*, *Angiostrongylus schmidtii* e *Angiostrongylus morerai* (SOUZA et al., 2009). Em geral, são parasitos de mamíferos, principalmente habitando pulmões, e com poucas exceções, apresentam como hospedeiros intermediários moluscos. Desses, apenas cinco espécies são conhecidas por apresentar um neurotropismo durante migração no hospedeiro definitivo: *A. cantonensis*, *Angiostrongylus mackerrasae* (Bhaibulaya, 1968), *Angiostrongylus malaysiensis* (Bhaibulaya et Cross, 1971), *Parelaphostrongylus tenius* (Dougherty, 1945) e *Skrjabinstrongylus chitwoodorum* (Hill, 1939).

Segundo Anderson (1978), a família Angiostrongylidae apresenta 16 gêneros e aproximadamente 48 espécies com ampla distribuição geográfica principalmente entre marsupiais, insetívoros, carnívoros e roedores.

Até agora, pelo menos 20 espécies do gênero *Angiostrongylus* tem sido descritas parasitando roedores, insetívoros e carnívoros em todo mundo (OHBAYASHI et al., 1979), porém apenas duas espécies têm sido confirmadas como causa de doenças em humanos: *A. cantonensis* envolvido no sistema nervoso central e algumas vezes nos pulmões e *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971), que habita as artérias mesentéricas, ambas causando angiostrongylíases na América tropical (MORERA; CÉSPEDES, 1971). Diferentemente, mesmo apresentando ciclos de vida praticamente idênticos à espécie *A. cantonensis*, as espécies *A. malaysiensis* e *A. mackerrasae*, ainda não foram confirmados como causa de doenças envolvendo humanos, embora existam relatos suspeitando da participação de *A. malaysiensis* como causa de doença em humanos na Malásia (LIM; RAMACHANDRAN, 1979) e países vizinhos (CARNEY; STAFFORD, 1979). Experimentalmente, *A. malaysiensis* tem demonstrado causar doença neurológica em macacos, enquanto que apenas resultados sugestivos foram obtidos com *A. mackerrasae* devido às limitações do estudo.

O gênero *Angiostrongylus* foi originalmente provido de *Strongylus vasorum* (Baillet, 1866) por Kamenskii. Inicialmente identificado como *Pulmonema cantonensis* por Chen (CHEN, 1935) e *Haemostrongylus ratti* por Yokogawa (YOKOGAWA, 1937), foi reclassificado por Ash (ASH, 1967) para o gênero *Angiostrongylus* e finalmente, Dougherty classificou taxonomicamente como *A. cantonensis* (DOUGHERTY, 1946). Atualmente, segundo Drozd (1970), o parasito é considerado um membro do subgênero *Parastrongylus* infectando roedores em diferentes pontos do mundo (ANDERSON, 1978). Como quatro novas espécies foram descritas no início da década de 70: *Angiostrongylus schmidtii* (Kinsella, 1971), *A. malaysiensis*, *A. costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971), e *A. minutes* (Ohbayashi et al., 1979) uma subclassificação adicional foi requerida. Baseado no raio dorsal reduzido, raios laterais curtos e espículos filiformes pequenos, *A. costaricensis* foi movido dentro de um novo gênero, *Morerastrongylus*. Entretanto, por considerar esta nova classificação confusa, muitos pesquisadores preferem generalizar e utilizar o termo *Angiostrongylus* para todos os parasitos (BHAIBULAYA, 1979)

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

Alguns trabalhos 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 assumindo, portanto, importante papel na cadeia epidemiológica da doença. 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 *Pila polita*, concluindo que a dose do inóculo infectante atua como um importante fator extrínseco nesta manifestação.

No Brasil, o primeiro registro de moluscos naturalmente infectados por *A. cantonensis* foi realizado por Caldeira et al. (2007). Neste estudo, 270 espécimes de moluscos foram coletados e identificados como: *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), foram os primeiros a registrar exemplares de *A. fulica* naturalmente infectadas por *A. cantonensis* no Sul e Sudeste do Brasil.

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 confirmadas como hospedeiros intermediários deste nematóide. 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 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 L₁ liberadas junto às fezes de roedores infectados e por uma maior atividade de moluscos gastrópodes (KUTZ et al., 2002; EL-SHAZLY et al., 2002).

Tais estudos comprovam a grande plasticidade dessa espécie de parasito em relação ao seu hospedeiro intermediário infectando animais de diferentes ordens e famílias, além de destacar parâmetros ecológicos influenciando a taxa de infecção do hospedeiro. Apesar desta plasticidade, percebemos que algumas espécies mostram mais susceptíveis à infecção, explicada segundo autores, por fatores genéticos do próprio hospedeiro que acabam tornando mais sensíveis à infecção (AMARANTE, 2004).

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 angiostrongylíase 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 encontradas naturalmente infectados por larvas de *A. cantonensis*. O consumo de anfíbios indevidamente preparados tem sido implicado como fonte de infecções em humanos, principalmente na Tailândia, China e Estados Unidos. Entre os répteis, a partir de estudos de monitoramento realizado na Tailândia foi comprovada a infecção em por *A. cantonensis* e mais do que 18 casos de angiostrongylíase humana na Tailândia e Índia foram atribuídos ao consumo de lagartos (RADOMYOS et al., 1994; PANACKEL et al., 2006; HIDELARATCHI et al., 2005).

Rattus rattus (Linnaeus, 1758) e *R. norvegicus* (Berkenhout, 1769) 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 sexual 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*, porém o parasito não é capaz de completar o seu desenvolvimento e usualmente morre no sistema nervo central, causando um quadro inflamatório denominado meningoencefalite eosinofílica ou mesmo 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 nematóides 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 estágios larvais 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 angiostrongilose são agora exemplos de doença vinculada a 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 medicina veterinária, a espécie *Angiostrongylus vasorum* apresenta grande importância, em razão ao quadro patológico cardíaco gerado em seu hospedeiro definitivo, cães (BARÇANTE, 2006).

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 claramente 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*.

Estes moluscos morfologicamente apresentam concha discoidal, podendo chegar a mais de 40 mm de diâmetro. Apresenta 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; PARAENSE, 1975).

A distribuição geográfica revela *B. glabrata* e *B. straminea* como 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2007; CARVALHO et al., 2005). Este fato acrescido de sua importância epidemiológica faz da espécie *B. glabrata* um dos principais transmissores de parasitos e, portanto de grande relevância tanto em medicina humana quanto em veterinária.

2.7 Relação molusco-nematóide

De maneira geral, nematóides 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 estágios infectantes aos hospedeiros definitivos. Por outro lado, os Rhabditidas acabam utilizando tais organismos como hospedeiros definitivos, permitindo o desenvolvimento completo do ciclo biológico dos nematóides. De acordo com a literatura consultada, mais do que 108 espécies de nematóides 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 nematóides 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) atuam como hospedeiro paratênico para larvas de terceiro estágio (L₃) do nematóide *Anguillicola crassus* (Kuwahara, Niimi e Hagaki, 1974), agente patogênico para uma determinada espécie de enguia européia *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758).

Diferentemente, existem espécies de nematóides 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 Metastrongylídeos, no qual larvas de primeiro estágio infectam moluscos e se desenvolvem até estágios que serão adquiridos pelo hospedeiro definitivo (vertebrado) acidentalmente após consumo de moluscos infectados (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 estágios larvais 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).

Outra possibilidade é a utilização de moluscos como hospedeiro final. Neste, os nematóides podem ou não matar seu hospedeiro definitivo. Em associações em que nematóides utilizando moluscos como hospedeiro definitivo, três tipos de relação podem ser identificados. No primeiro tipo, nematóides se desenvolvem na cavidade corporal de moluscos, porém as formas adultas sendo encontradas também no ambiente. Como exemplo, citamos o relacionamento estabelecido entre estágios larvais de *Mermis nigrescens* (Dujardin, 1842) e o molusco *Deroceras agrestis* (Linnaeus, 1758). Neste caso, a infecção possibilita o desenvolvimento do nematóide até alcançar sua maturidade sexual, porém todo o processo reprodutivo do nematóide ocorre no ambiente (CHITWOOD; CHITWOOD, 1937).

No segundo tipo de associação utilizando moluscos como hospedeiros definitivos, todo ciclo evolutivo do nematóide é completado no hospedeiro, porém em nenhum momento, alterações patológicas são observadas nesta relação. Um exemplo é a relação do nematóide *Rhabditis axei* (Cobbold, 1884) com o molusco *A. fulica* (ODAIBO et al., 2000). Condições similares podem ser observadas em outros sistemas como *Hugotdiplogaster neozelandia* (Morand e Barker, 1995)/*Athoracophorus bitentaculatus* (Quoy e Gaimard, 1832) (MORAND; BARKER, 1995a) e na associação de *Nemhelix bakeri* (Morand e Petter, 1986) com o molusco *Helix aspersa* (Muller, 1774). Neste caso, moluscos atuam como único hospedeiro.

O terceiro tipo de relação é aquela em que todo o ciclo biológico do nematóide ocorre no hospedeiro definitivo (molusco), porém diferentemente dos casos acima relacionados, a associação resulta em alterações patológicas e frequentemente conduzindo a morte do animal. Como exemplos existem diferentes espécies de nematóides *Daubaylia potomaca*, *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider, 1859), *Phasmarhabditis neopapillosa* (Schneider, 1859) que realizam esta associação com seu hospedeiro molusco. Estudos realizados por Tan e Grewal (2001b) identificaram uma reação patológica na associação de moluscos com larvas de terceiro estágio de *P. hermaphrodita*. Segundo tais autores, este processo é resultado da liberação de bactérias que induziria a morte do hospedeiro em razão de sua multiplicação e produção de endotoxinas.

Neste contexto, alguns trabalhos têm demonstrado alterações bioquímicas em moluscos expostos à condição de infecção experimental por nematóides. 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.

2.7.1 Aspectos relacionados à biologia reprodutiva de moluscos expostos a condição de infecção.

Castração parasitária é definida como uma inibição total ou parcial da atividade reprodutiva do hospedeiro (BAUDOIN, 1975), sendo frequentemente observado na associação entre moluscos e trematódeos (LAUKNER, 1980). Tal fenômeno é resultado de ações físicas (CHENG; COOPERMAN, 1964) ou fisiológicas (PEARSON; CHENG, 1985) do parasito. Em ambos os casos, o parasito pode diretamente (PEARSON; CHENG, 1985) ou

indiretamente (SCHALLIG et al., 1991) comprometer o desenvolvimento gonadal do hospedeiro.

Dados na literatura indicam que, o primeiro registro de castração parasitária foi documentado por Maln (1881). A partir de então, o fenômeno tem sido revisado e registrado em vários grupos de organismos hospedeiros, envolvendo crustáceos (REINHARD, 1959), insetos (WULKER, 1964) e moluscos (WRIGHT, 1971).

Várias explicações de castração parasitária têm sido propostas. McClellnad e Bourns (1969), após estudar a relação entre *Lymanaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) e *Trichobilharzia ocellata* (La Vallete, 1855), observaram uma diminuição significativa na taxa ovipositória do organismo infectado. Segundo tais autores, esse comprometimento no desempenho reprodutivo pode ser entendido como resultado de uma resposta adaptativa primária do hospedeiro, o qual, passa a direcionar seu fluxo metabólico para atender suas necessidades basais. Para Sullivan et al. (1985), entretanto, a castração, pode ser entendida como consequência de duas causas: primária, quando as larvas em multiplicação e desenvolvimento induzem lesões mecânicas e putativas sobre os tecidos, resultando frequentemente em alterações nas gônadas do hospedeiro, ou ainda, mediante o envolvimento substâncias químicas, capazes de antagonizar a ação de hormônios reprodutivos, bem como uma causa secundária, caracterizada por alterações nutricionais capazes de resultar em um estado de inanição no organismo parasitado, em função da competição de nutrientes pelo parasito.

De Jong-Brink et al. (2001) estudando o modelo *L. stagnalis* e *T. ocellata* observaram mudanças significativas na atividade reprodutiva do hospedeiro, induzida principalmente por meio de uma manipulação neurofisiológica em benefício ao desenvolvimento dos estágios larvais. Este mecanismo, segundo tais autores, se basearia na presença de um neuropeptídeo denominado schistosomina identificado em estudo neuroendocrinológico envolvendo o mesmo modelo. Tal substância produzida a partir, de células caudo-dorsais e tecido conjuntivo e de hemócitos do próprio hospedeiro, passa a ter sua expressão modulada pelos estágios larvais do trematódeo em desenvolvimento. Neste estudo, observaram que os estágios de *T. ocellata* estimularam um aumento significativo deste neuropeptídeo (SCHALLIG et al., 1991) que tem sido funcionalmente envolvido na castração total ou parcial de *L. stagnalis* (HORDIJK et al., 1992). Segundo de Jong-Brink et al. (1988) este neuropeptídeo atua antagonizando a ação de um outro peptídeo denominado calfluxina responsável pelo influxo de cálcio no interior da matriz mitocondrial das células gonadais em *L. stagnalis*, essencial ao processo de fosforilação oxidativo (HINKLE; MCCARTY, 1978). Desde modo, considerando-se que a síntese de galactogêneo ocorre mediante uma via anabólica consumindo ATP, sua produção diminui, aumentando consequentemente o número de ovos inférteis por falta de nutrientes para o embrião.

Recentemente, Zhang et al. (2009) registraram a expressão deste neuropeptídeo (schistosomina) em *B. glabrata*. Após estudos, observaram variações significativas na expressão deste mediador durante o desenvolvimento ontogenético do molusco, demonstrando maior expressão de schistosomina em embriões e moluscos juvenis, sugerindo o provável envolvimento deste peptídeo no processo de desenvolvimento e não reprodutivo de *B. glabrata*. Adicionalmente, os dados indicaram que a infecção por duas espécies de trematódeos, *S. mansoni* e *Echinostoma paraensei* Lie & Basch (1967), não induziu em nenhum momento, durante desenvolvimento dos estágios larvais intramolusco, um aumento da expressão deste peptídeo em *B. glabrata* em comparação ao grupo controle, concluindo que neste modelo de interação, a schistosomina não é a causa de castração parasitária.

Outra consequência normalmente vista na associação envolvendo moluscos gastrópodes e larvas de trematódeos digenéticos é o gigantismo (ROTHSCHILD, 1936). Hodasi (1972), após estudar os efeitos da infecção em *L. truncatula* por estágios larvais de *F. hepatica* L.,

observou um período de crescimento acelerado dos moluscos entre a quarta e sétima semana, acompanhada pela cessação de produção de ovos na quinta semana após infecção decorrente de um processo de atrofia das gônadas. Por outro lado, Wilson e Denison (1980) estudando a mesma interface, atribuíram à destruição física do tecido como principal causa da ocorrência de castração em *L. truncatula*. Desde modo, percebemos que se trata de um fenômeno extremamente complexo e que os mecanismos envolvidos são variados, inclusive para o mesmo modelo de interação.

É interessante notar que alguns autores têm ainda registrado um aumento da atividade reprodutiva do hospedeiro como consequência da infecção. A este fenômeno, Minchella (1985), denominou de compensação da fecundidade onde moluscos infectados aumentam seus esforços reprodutivos, minimizando perdas futuras que seriam ocasionadas por este estresse. Schallig et al. (1991) estudando os efeitos da infecção sobre a biologia reprodutiva no modelo *L. stagnalis*/*T. ocellata*, observaram um aumento significativo no número de massas ovíferas entre a segunda e quarta semanas após infecção em relação a organismos não infectados. Tunholi et al. (2011), concluíram que a infecção experimental de *B. glabrata* com diferentes doses miracidiais (5 e 50) de *E. paraensei* induziu alterações significativas na atividade reprodutiva do hospedeiro, provavelmente como um mecanismo ecológico compensatório, sendo caracterizado principalmente por um aumento do desempenho reprodutivo dos organismos infectados. Contudo, não foram demonstradas variações em função da dose miracidial utilizada, indicando que neste modelo, as alterações observadas resultam apenas do processo de infecção. Parcialmente, esta compensação da fecundidade pode ser explicada pela idade e estágio de desenvolvimento reprodutivo dos moluscos no momento da infecção com o trematódeo. Esta variável pode gerar respostas diversas do molusco à infecção com as larvas de trematódeos.

Segundo Jarne e Delay (1991), os parasitos podem indiretamente, alterar a estrutura genética das populações em algumas espécies de moluscos prosobrânquios pela influência na reprodução desses animais. Especulam que este fato pode estender-se aos Basommatophoras e sugerem que por reduzir a atividade reprodutiva dos moluscos, esses tenderiam a utilizar a autofecundação, já que esta é reportada como tendo um “baixo custo” em comparação a fecundação cruzada. Entretanto, esses autores mencionam que, até então, não há evidências comprovando essa pressão em Basommatophora. No entanto, Cooper et al. (1994) demonstraram drástica redução na capacidade de produção de ovos de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* e Rupp (1996) demonstra diferenças como comportamento sexual de *B. glabrata* infectado e não infectado. O primeiro grupo, durante o acasalamento, tende a fazer quase sempre o papel do macho, indicando uma compensação a fecundidade reduzidacausada pela infecção.

Assim, fica evidente a ausência de um padrão, sugerindo que as variações observadas nos aspectos reprodutivos de moluscos infectados são dependentes dos modelos utilizados e que, portanto, cada parasito é capaz de induzir alterações específicas em seus hospedeiros.

2.7.2 Aspectos relacionados aos conteúdos de carboidratos de moluscos expostos a 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.

Cheng e Lee (1971), utilizando técnicas espectrofotométricas, observaram uma redução nos conteúdos de glicose na hemolinfa de *B. glabrata*, na terceira semana de infecção com *S. mansoni*, sugerindo que esta redução seria atribuída, pelo menos em parte, pela ingestão e utilização do parasito.

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 dos estágios larvais 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.

Liebsch e Becker (1990) compararam o efeito do jejum e da infecção por *S. mansoni* nos níveis hemolinfáticos de glicose em *B. glabrata*. Os resultados demonstraram que a infecção reduziu drasticamente os níveis glicêmicos do molusco, porém, os grupos expostos ao jejum apresentaram valores próximos do grupo controle, e que o pequeno decréscimo observado não foi considerado significativo.

No sistema *F. hepatica/ 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. Segundo os autores, esse período é marcado por uma elevada taxa de desenvolvimento do parasito, caracterizando desta forma, etapa de intensa competição por nutrientes a partir do seu hospedeiro. Adicionalmente, os resultados demonstraram que a infecção em nenhum momento afetou as reservas de carboidratos na glândula digestiva do molusco, já que estudos têm comprovado que o principal sítio de localização e dispersão das larvas após alcançar estágio L₃ seria a massacefalopodia, bem diferente do padrão observado em modelos envolvendo infecções por trematódeos digenéticos, cujos principais sítios seriam órgãos viscerais, especialmente glândula digestiva e glândula de albúmen

(TUNHOLI et al., 2011, PINHEIRO et al., 2009). Além disso, tais diferenças também resultariam das particularidades observadas durante o desenvolvimento no hospedeiro intermediário, já que nematóides 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 cefalopediosa 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 estágios larvais 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 (DE JONG-BRINK et al., 1988).

Outra reserva igualmente importante é o galactogênio, um D- e L-polímero de galactose encontrado restrito à glândula de albúmen nos moluscos e que desempenha papel importantíssimo na reprodução destes organismos, principalmente no desencadeamento da vitelogênese (GOUDSMIT; ASHWELL, 1965). O vitelo é o substrato energético que garante a sobrevivência do embrião e dos moluscos jovens no período inicial da vida (DREON et al., 2006). Autores vêm constatando que, as interações entre trematódeos digenéticos e moluscos acabam interferindo com a síntese de galactogênio no organismo hospedeiro prejudicando desta forma, seu desempenho reprodutivo (CHRISTIE et al., 1974; CREWS; YOSHINO, 1990). van Elk e Joosse (1991) realizaram um estudo bioquímico em *L. stagnalis* infectadas por *T. ocellata* e demonstraram que, a atividade da UDP-galactose 4-epimerase, enzima responsável pela conversão de glicose em galactose na glândula de albúmen dos organismos infectados, sofreu uma significativa redução, muito provavelmente em decorrência de uma modulação inibitória exercida pela infecção. A galactogênese, portanto, consiste numa via anabólica que depende de energia (ATP). Para isto, o processo de fosforilação oxidativa desencadeado a partir do influxo de íons cálcio para a matriz mitocondrial é necessária (HINKLE; McCARTH, 1978). de Jong-Brink et al. (1988) verificaram que *L. stagnalis* infectadas por *T. ocellata* apresentavam um aumento da atividade secretória da schistosomina, neuropeptídeo que atua diminuindo a entrada de íons cálcio nas mitocôndrias das células da glândula de albúmen nos moluscos infectados inibindo por conseguinte, a síntese de galactogênio.

Em seu estudo ultraestrutural, el-Saadany e Mohamed (1989) descreveram alterações morfológicas nas células secretoras da glândula de albúmen de *L. stagnalis* infectadas por *T. ocellata*. Segundo os autores, as células secretoras apresentavam complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso inativos, caracterizando a ausência de grânulos secretores, redução da altura do epitélio e crinofagia. Estas alterações provavelmente seriam resultado de algum tipo de interferência das larvas de *T. ocellata* sobre a síntese e liberação do hormônio gonadotrófico feminino no molusco hospedeiro.

Nos últimos anos, tem-se observado um crescente aumento no número de publicações voltadas para a caracterização dos padrões metabólicos de moluscos expostos a infecção por trematódeos. Porém, quando nos referimos de modelos experimentais utilizando nematóides os dados são bastante escassos, o que preocupa, já que algumas espécies assumem grande importância por afetar diretamente a saúde humana, como é o caso do nematóide *A. cantonensis* enquadrado como um dos agentes da meningoencefalite eosinofílica. Desta forma, acreditamos que os resultados obtidos neste estudo poderão fornecer informações valiosas possibilitando o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro e assim subsidiar trabalhos futuros focados principalmente no controle desta doença.

2.7.3 Aspectos relacionados as alterações nos conteúdos de proteínas totais, produtos nitrogenados de degradação e das aminotransferases em moluscos: Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

As infecções por larvas de trematódeos e nematóides resultam em alterações expressivas no estado metabólico de seu hospedeiro intermediário. Como consequência, uma intensa mobilização de reservas de carboidratos, estocados em células especializadas localizadas principalmente na glândula digestivas, manto e massa cefalopodia é observado. Nessa situação, molusco hospedeiro passa a utilizar de fontes não glicídicas necessárias para seu balanço energético. Tal fato resulta em alterações significativas especialmente nos estoques de proteínas e aminoácidos livres na hemolinfa de moluscos infectados (BECKER, 1980).

Nos últimos anos, aspectos bioquímicos envolvendo a interação entre molusco/parasito têm recebido maiores atenções. Neste sentido, várias investigações têm sido realizadas utilizando metodologias voltadas na quantificação de diferentes substratos, incluindo os conteúdos de proteínas na hemolinfa de gastrópodes parasitados por larvas de trematódeos, a fim de caracterizar o padrão metabólico do hospedeiro quando submetidos a esta condição (TARGETT, 1962; READER, 1971). Os resultados vêm demonstrando mudanças nos conteúdos totais de proteínas bem como nas frações individuais de proteínas incluindo aminoácidos. Por exemplo, Crews e Yoshino (1991), observaram uma redução na síntese de proteínas na glândula de albúmen e no ovotestis de *B. glabrata* aos 21 e 28 dias de infecção por *S. mansoni*, atribuindo a este fato, a provável interferência do parasito no sistema endócrino do molusco. Adicionalmente, Lee e Cheng (1972), estudando o mesmo modelo registraram um decréscimo nos conteúdos de proteínas na hemolinfa de moluscos infectados, sugerindo maior ativação do catabolismo protéico. Os autores observaram a ocorrência de uma hidrólise parcial das hemoglobinas nos moluscos infectados, seguida da ingestão do grupamento heme pelos estágios de esporocistos do parasito. Além disso, a hemorragia ocasionada durante a etapa de liberação cercarial especialmente no tecido muscular, também pode contribuir na redução de proteínas.

Lira et al. (2000) observaram alterações nos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa de *B. similis* após um curto período de jejum, caracterizando uma diminuição significativa dos níveis hemolinfáticos de proteínas nos animais expostos a condição de privação alimentar. Similarmente, estudos têm verificado mudanças quantitativas e qualitativas nos níveis de proteínas e carboidratos de moluscos submetidos a situações de estresses como jejum e infecção por trematódeos (SCHMALE; BECKER, 1977; BECKER; SCHMALE, 1975).

Bakry (2009) demonstrou mudanças sobre alguns parâmetros biológicos em *B. alexandrina* infectada experimentalmente por *S. mansoni*. Neste estudo, além de observar

alterações histológicas na glândula digestiva, variações hematológicas e bioquímicas na hemolinfa dos moluscos infectados também foram confirmadas. Como principais resultados, uma diminuição nos conteúdos de albumina foi verificada, provavelmente como reflexo ao dano gerado no parênquima da glândula digestiva pelos estágios larvais do parasito. Como consequência, reações inflamatórias são observadas cursando com a formação de granulomas e proliferação de tecido conjuntivo, afetando a reserva funcional do órgão e consequentemente na produção de albumina (RAWI et al., 1995).

Loker e Hertel (1987), estudando a relação *B. glabrata*/ *E. paraensei* constataram variações quantitativas nos componentes não celulares da hemolinfa em função da infecção. Os resultados indicaram alterações substanciais nos conteúdos polipeptídicos solúveis, revelando um aumento significativo nos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa de moluscos infectados em relação aos não infectados. Por outro lado, Tunholi et al (2011), avaliando o perfil bioquímico de *B. glabrata* infectada com diferentes doses miracidias (5 e 50) de *E. paraensei*, registraram um decréscimo significativo nas concentrações de proteínas totais nos moluscos expostos em ambas as doses, porém não foi observado uma variação dose dependente, indicando de neste modelo, as variações observadas no metabolismo de proteínas resultam apenas em resposta da infecção.

Brockelman (1978), investigando os efeitos do parasitismo sobre o perfil protéico no molusco gigante africano *A. fulica* infectado por *A. cantonensis* observou mudanças significativas em seu metabolismo, caracterizado por um decréscimo nos conteúdos totais de proteínas na hemolinfa. Porém, quando nos referimos às alterações fisiológicas de moluscos expostos à infecção por nematóides, as poucas informações existentes são discutidas apenas em função das alterações induzidas pela infecção sem, contudo, estabelecer uma associação temporal com o desenvolvimento dos estágios larvais intra-molusco.

Estudos também comprovam alterações metabólicas de moluscos como resposta a intoxicação por látex, utilizados como medida de controle. Mello-Silva et al. (2006, 2007, 2010) reportaram que doses sub-letais de *E. splendens* induziram significativas alterações fisiológicas em *B. glabrata* não infectadas, caracterizadas principalmente pela perda da homeostase, já que os animais expostos a esta condição tiveram seus estoques de carboidratos e proteínas reduzidos, conduzindo-os a um estado fisiológico incompatível à sobrevivência. Tais resultados estão de acordo com argumentos já postulados, confirmando a capacidade de moluscos em utilizar fontes protéicas como substratos alternativos em condições de estresse (STANISLAWSKY; BECKER, 1979).

Em detrimento da maior ativação do catabolismo protéico, como fonte de substratos alternativos utilizados na obtenção de energia em complementação às reservas de carboidratos já escassos, os moluscos passam a ter que lidar com as consequências metabólicas resultantes dessa ação. Dentre elas, a elevação das concentrações dos produtos nitrogenados de degradação são frequentemente observados, resultando no acúmulo hemolinfático de ureia, ácido úrico e amônia devido à extensa degradação de aminoácidos e proteínas pelo animal.

Pinheiro et al. (2009) estudando as alterações fisiológicas de *L. columella* infectada experimentalmente por *E. paraensei*, observaram um decréscimo significativo nos conteúdos de proteínas totais tanto na hemolinfa quanto nos tecidos da glândula digestiva. Estas alterações foram acompanhadas pelo aumento expressivos dos conteúdos de ureia e uma diminuição nas concentrações de ácido úrico nos moluscos infectados. Segundo os autores, este aumento dos níveis de ureia é resultado da ativação de enzimas catalíticas que aceleram a proteólise, como resposta fisiológica adaptativa do molusco a condição de estresse gerado pela infecção. Tunholi et al. (2011) estudando o modelo *B. glabrata*/*E. paraensei*, foram os primeiros a avaliar a possível influência de diferentes cargas miracidias nas alterações metabólicas do hospedeiro. Neste estudo, os autores constataram um aumento substancial dos

produtos nitrogenados de degradação, porém nenhuma relação foi estabelecida com a dose do inóculo infectante.

Becker (1980) observou maior ativação de centros enzimáticos ligados ao ciclo da ureia em moluscos submetidos a condições de estresse fisiológico, como a infecção por larvas de trematódeos. A variação observada nos produtos nitrogenados de excreção demonstra que nesta condição, o aumento dos níveis de ureia ocorre paralelamente à diminuição dos conteúdos de ácido úrico, sugerindo uma inversão no padrão de excreção dos moluscos infectados, passando de uricotélicos para ureotélicos. Esta mudança é extremamente vantajosa para o molusco, uma vez que a ureia é metabólito mesmo tóxico quando comparado com o ácido úrico (MELLO-SILVA et al., 2006). Em adição, Kurelec (1975) estudando a via catabólica da arginina no trematódeo *F. hepatica*, observou que durante a etapa de multiplicação assexuada, os estágios larvais necessitam de uma maior quantidade de arginina. Por tanto, o maior conteúdo de ureia registrado nos estudos acima, pode também estar associado à necessidade do parasito em incorporar componentes do ciclo da ureia necessário ao seu desenvolvimento.

Alguns autores, entretanto, relatam que em modelos experimentais utilizando moluscos aquáticos infectados por larvas de trematódeos, o perfil ureotélico de excreção permanece desde que, as concentrações dos produtos nitrogenados de degradação não excedam o ponto de saturação do ciclo da ureia, já que sua síntese é dependente do ácido aspártico.

No sistema *B. similaris/Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907, de Souza et al. (2000), registraram variações nos conteúdos dos produtos nitrogenados de degradação, como resultado das mudanças observadas no metabolismo de proteínas. Neste estudo, os autores demonstraram uma redução nos conteúdos de ureia, com o menor valor alcançado no trigésimo dia após a infecção, representando um decréscimo de aproximadamente 86% em relação ao valor médio do grupo controle. Porém, a variação registrada no conteúdo de ácido úrico mostrou-se significativa apenas no vigésimo quinto dia de infecção, correspondendo um acréscimo de 47% em relação ao grupo controle. Os resultados apresentados demonstram que neste sistema, o excesso de produtos nitrogenados não é detoxicado através da síntese de ácido úrico.

As aminotransferases ou transaminases constituem um grupo de enzimas que catalisam as interconversões de aminoácidos em α -ceto ácidos, ou vice-versa, pela transferência de grupamentos aminas (MOSS; HENDERSON, 1998). Por esta razão, apresentam um importante papel na associação de aminoácidos e metabolismo de carboidrato, possibilitando formar compostos utilizados como substratos na gliconeogênese.

A determinação das atividades das aminotransferases tem sido verificada em moluscos expostos a infecção experimental (MASOLA et al. 2008). Tunholi et al (2011), observaram variações fisiológicas em *B. glabrata* expostas a diferentes cargas miracídias (5 e 50) de *E. paraensei*. Neste estudo, um aumento significativo da EC2.6.1.1 L-aspartato: 2 oxoglutarato aminotransferase (AST) e EC2.6.1.2 L-alanina: 2 oxoglutarato aminotransferase (ALT) foram determinados, em razão a uma maior taxa de desaminação de aminoácidos, já que uma diminuição dos níveis de proteínas totais e um aumento na concentração de glicose hemolinfática foi observado nos organismos infectados. Desta maneira, o aumento da atividade dessas enzimas pode representar uma maior necessidade energética do hospedeiro, resultando na mobilização de fontes alternativas de energia, essenciais para a manutenção das suas necessidades vitais.

Pinheiro et al. (2001) observaram mudanças nas atividades das aminotransferases na hemolinfa de *B. similaris* sob condição experimental de jejum. Neste estudo, um aumento significativo da AST foi registrado logo no início do experimento, reduzindo seus valores próximos ao do grupo controle no final do experimento. Porém, variação significativa da ALT

foi demonstrada somente no trigésimo dia de jejum. Os resultados apresentados ratificam a capacidade de moluscos em utilizar outros substratos como fonte energética em condições de estresse e do envolvimento dessas enzimas no restabelecimento do balanço energético do hospedeiro. Além disso, o aumento de ambas aminotransferases pode representar grau de injúria celular, principalmente na glândula digestiva, normalizando seus valores em seguida, mediante atuação de enzimas de degradação presentes na hemolinfa do molusco.

Blasco e Puppo (1999), avaliando o efeito da exposição de metais pesados (Cu, Cd e Pb) no bivalve *Ruditapes philippinarum* (Adams e Reeve, 1850) (Mollusca: Bivalvia), observaram variações significativas nas atividades da AST e ALT, sinalizando o envolvimento dessas enzimas como biomarcadores de lesão celular. Isto tem sido previamente demonstrado por Douglas e Haskin (1976) onde observaram um aumento expressivo da atividade da ALT em *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) infectada por *Minchinia nelsoni* (Stauber e Mackin, 1966). Segundo os autores, este aumento resulta a partir da destruição dos tecidos das guelras pela presença de estágios do parasito em desenvolvimento, induzindo o extravasamento dessas enzimas para a hemolinfa dos moluscos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Nesta dissertação, devido à escassez de informações, pretendem-se investigar as alterações metabólicas resultantes da infecção experimental do molusco *B. glabrata* infectado por *A. cantonensis* durante seu período de desenvolvimento intra molusco.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar alterações bioquímicas de *B. glabrata*, induzidas pela infecção experimental com *A. cantonensis*, determinando os conteúdos de glicose, proteínas totais, uréia e ácido úrico hemolinfáticos, além de carboidratos de reserva estocados em sítios específicos no modelo estudado (massa cefalopodal, glândula digestiva e glândula de albúmen).
- Avaliar a biologia reprodutiva de *B. glabrata*, considerando parâmetros - chave como: número de massas ovíferas, o número de ovos/massas ovíferas, numero de ovos eclodidos/molusco, bem como a viabilidade dos ovos.
- Determinar as atividades da lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

4 CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA, GASTROPADA) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA COM *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE).

Alterações na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropada) experimentalmente infectada com *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae).

RESUMO

Angiostrongylus cantonensis é uma espécie de nematóide, parasitos de pulmões de roedores, de grande relevância em saúde pública por atuar como um agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana. Este estudo demonstrou pela primeira vez alterações na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com *A. cantonensis*. Os valores de todos os parâmetros analisados (número de ovos totais, número de massas ovíferas, número de ovos/massa, número de ovos/molusco, percentagem de viabilidade de ovos e conteúdos de galactogênio na glândula de albúmen) foram alterados com o progresso da infecção, com uma redução significativa dos valores iniciados na segunda semana de infecção em comparação ao grupo controle. Juntos, os resultados indicam a ocorrência de um processo de castração parasitária parcial de *B. glabrata* por larvas de *A. cantonensis*, provavelmente em resposta a depleção de reservas energética relacionada ao trato reprodutivo do hospedeiro, onde a castração foi resultado de um processo indireto, com nenhuma injúria dos tecidos gonadais.

Palavras chaves: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, castração parasitária.

ABSTRACT

Angiostrongylus cantonensis is a nematode parasite of rodent's lungs and has great relevance for public health because it is an etiological agent of eosinophilic meningoencephalitis. This study showed by the first time changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *A. cantonensis*. The values of all the parameters analyzed (total number of eggs, number of egg masses, number of eggs/mass, number of eggs/snail, percentage of viable eggs, and galactogen content in albumen gland) were altered with the progression of infection, with significantly reduced values starting in the second week of infection in comparison to the control group. The results indicate the occurrence of a partial parasitic castration of *B. glabrata* by larval *A. cantonensis* probably in response to the depletion of energy reserves related to the reproductive tract of the host, where the castration was the result of an indirect process, with no injuries to the tissues of the gonads.

Key words: *Angiostrongylus cantonensis*, *Biomphalaria glabrata*, parasitic castration

4.1 INTRODUÇÃO

Embora muitas espécies pertencentes ao gênero *Angiostrongylus* desempenhem provável potencial zoonótico, duas espécies em especial assumem maior importância, *A. cantonensis* (RICHARDS; MERRITT, 1967) e *A. costaricensis* (MORERA; CESPEDES, 1971). *Angiostrongylus cantonensis* é um nematóide parasito de pulmões de roedores silvestres, considerado o principal responsável da meningoencefalite eosinofílica humana, tendo sido registrado em várias regiões do mundo, como por exemplo, no sudeste da Ásia (TSAI et al., 2001), Ilhas do Pacífico (ALICATA, 1962; SLOM et al., 2002), América do Norte (DIAZ, 2008) e América do Sul (LIMA et al., 2009; THIENGO et al., 2010; MALDONADO et al., 2010).

Todos os membros da subfamília Angiostrongylinae apresentam obrigatoriamente um ciclo de vida heteroxeno utilizando moluscos como hospedeiros intermediários. Esta fase inicial é essencial para o desenvolvimento do parasito possibilitando-o atingir estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (STEWART et al., 1985). A participação de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Achatina fulica* Bowdich, 1822, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) e *Subulina octona* (Bruguière, 1789) como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* tem sido reportado por vários autores (YOUSIF; LÁMMLER, 1977; HARRIS; CHENG, 1975; CHENG; ALICATA, 1964; CALDEIRA et al., 2007). Juntos, estes dados sugerem uma grande capacidade de disseminação do parasito causador desta doença. Adicionalmente, é importante lembrar que todas as espécies de moluscos citados acima são encontradas no Brasil e em outros países tropicais (CALDEIRA et al., 2007).

Nos últimos anos, atenção adicional tem sido dedicada aos aspectos clínicos e o risco de infecção humana com *A. cantonensis* na América do Sul (THIENGO et al., 2010; LIMA et al., 2009). De acordo com recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983), o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças transmitidas por moluscos é baseado principalmente no controle da população desses organismos junto com o tratamento de animais e humanos infectados. Portanto, o entendimento a cerca das características reprodutivas de moluscos infectados com *A. cantonensis* é essencial no desenvolvimento de metodologias eficazes contra a disseminação da meningoencefalite eosinofílica. Contudo, é surpreendente que estudos sobre atividade reprodutiva de moluscos infectados por *A. cantonensis* ainda não tenham sido conduzidos, já que este parasito tem grande importância para a saúde pública e a resposta à infecção varia amplamente entre as espécies infectadas por diferentes helmintos (TUNHOLI et al., 2011; PINHEIRO; AMATO, 1995). Portanto, no presente estudo foi demonstrado, pela primeira vez, alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* causada pela infecção por *A. cantonensis* durante três semanas de infecção que corresponde o período pré-patente deste helminto (GUILHON; GAALON, 1969). Os diferentes mecanismos possivelmente relacionados neste fenômeno são também discutidos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Parasitos

Larvas L₃ de *A. cantonensis*, provenientes de *A. fulica* coletadas em Olinda, PE, 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 L₁ utilizadas neste estudo foram obtidas a partir desse ciclo experimental mantido nos laboratórios citados.

4.2.2 Infecção dos moluscos

As fezes de *R. norvegicus* infectados foram coletadas, e utilizadas para obtenção das larvas pela técnica de Baermann, empregada para separar e decantar as larvas L₁ (WILLCOX; COURA 1989). Após processamento das amostras fecais, espécimes de *B. glabrata* (8–12 mm) com 90 dias de idade, em média, foram expostos individualmente a aproximadamente 1200 L₁ em placas de 24 furos. Após 48 horas, os moluscos foram removidos e transferidos para aquários para a formação dos grupos experimentais (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

4.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos

Em cada aquário foram previamente colocados 1500ml de água desclorada onde era acrescentado cerca de 0,5g de CaCO₃. Uma vez por semana a água era renovada. Placas de isopor com ±2cm² foram colocadas no interior dos aquários, as quais serviram como substrato de oviposição para os moluscos.

Foram formados seis grupos, três grupos controle (não infectados) e três grupos de moluscos infectados. Cada aquário era composto por 10 moluscos, criados em laboratório desde a oviposição, para saber a idade e assegurar que não foram infectados por outros parasitos. Todo experimento foi feito em duplicata, utilizando um “n” total de 120 moluscos.

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* desidratadas. A manutenção do aquário foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários. O número de moluscos mortos foi observado.

4.2.4 Análise da taxa ovipositória de *Biomphalaria glabrata* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*

Em dias alternados, até o fim das três semanas de infecção, as placas de isopor foram retiradas dos aquários e os números de massas ovíferas e de ovos postos foram contados utilizando um microscópio estereoscópico. Após a contagem, as placas eram numeradas individualmente e colocadas em novos aquários livres de moluscos. Posteriormente, as massas ovíferas eram novamente observadas para contagem de ovos eclodidos. A viabilidade dos ovos, expresso em porcentagem, é o quociente entre o número de ovos eclodidos sobre o número de ovos postos em cada grupo experimental x 100.

4.2.5 Determinação de galactogênio

Cada semana após a infecção dez espécimes de cada grupo foram randomicamente escolhidos, dissecados e o complexo glândula de albúmen e ovotestis foram coletados e mantidos a -10°C até sua utilização para as análises bioquímicas. Galactogênio foi extraído de acordo com Pinheiro e Gomes (1994) e quantificado pela técnica do 3,5 DNS (Sumner, 1924), sendo expresso como mg de galactose/g de tecido, peso fresco. As medições foram feitas em triplicata.

4.2.6 Análises histológicas

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 histológicas de rotinas (HUMASON, 1979). As secções ($5\ \mu\text{m}$) foram coradas usando hematoxilina e eosina e observadas com microscópio de luz Zeiss Axioplan; imagens foram capturadas com uma câmara digital MRc5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

4.2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm erro 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.).

4.3 RESULTADOS

Mudanças nos padrões reprodutivos de *B. glabrata* infectadas por *A. cantonensis* foram observadas em relação ao grupo controle durante o período de estudo. A infecção induziu uma diminuição no número de massas ovígeras dos grupos infectados quando comparado ao grupo controle ($23,46\pm 1,46$), sendo considerado significativamente menor a partir da segunda semana pós-infecção ($12,18\pm 1,82$), quando a maior redução foi observada ($-46,29\%$) (Tabela 1).

Em relação ao número de ovos postos/molusco, o mesmo padrão de variação foi observado, sendo caracterizado por um decréscimo gradativo da taxa ovipositória com o progresso da infecção, com os valores significativamente menores registrados na segunda e terceira semanas ($157,09\pm 20,15$ e $157,73\pm 25,6$, respectivamente), em comparação ao grupo controle ($313,87\pm 22,60$), sendo também a maior redução observada na segunda semana de infecção ($-49,95\%$). Paralelamente, diferenças também foram observadas em relação à viabilidade dos ovos, sendo significativamente menor a partir da segunda semana de infecção ($134,36\pm 18,44$), com o menor valor registrado na terceira semana pós-infecção ($132,73\pm 24,48$) representando uma taxa de eclodibilidade de $85,53\%$ e $84,15\%$, respectivamente em relação à taxa percentual do grupo controle que foi de $98,03\%$ ($307,7\pm 22,27$) (Tabela 1).

Analisando a razão entre o número total de ovos/massa ovígera, observou-se uma redução na ordem de variação foi verificada, representada por um decréscimo médio durante todo o período de infecção, o qual alcançou $60,9\%$ na terceira semana de infecção, porém

somente os dados referentes a segunda e terceira semanas de análises diferiram-se significativamente do grupo não infectado ($15,76 \pm 1,33$) (Tabela 1).

O conteúdo de galactogênio também foi alterado com a infecção, onde um decréscimo significativo foi registrado a partir da segunda semana de infecção em relação ao grupo controle (Tabela 1). O menor conteúdo médio foi observado na segunda semana ($0,38 \pm 0,07$) representando um decréscimo de -33,3% em relação à média do grupo controle ($0,57 \pm 0,04$). Um perfil similar foi observado na terceira semana de infecção ($0,39 \pm 0,06$).

As análises histológicas não demonstraram alterações nos tecidos gonadais de moluscos infectados quando comparados com aqueles não infectados (Figura 1a e b). Em ambas, a estrutura do ovotestes parece estar preservada, onde o processo de formação de gametas mostra-se evidente, demonstrando a ausência de estágios larvais, bem como, a funcionalidade do órgão não sendo afetada pelo processo da infecção.

Tabela 1. Alterações na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* em resposta à infecção com *Angionstrongylus cantonensis* ao longo do tempo de infecção (1, 2 e 3 semanas). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Período zero (0) representa o valor médio do grupo controle em cada semana de observação. ^{a, b}=indicam médias que diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

| Grupos (Semanas) | Massas ovíferas/molusco | ovos/molusco | Ovos/massa | Ovos eclodidos | Viabilidade e (%) | Galactogenio (mg galactose/peso) |
|------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------|----------------------------------|
| 0 | $23,46 \pm 1,46^a$ | $313,87 \pm 22,60^a$ | $15,76 \pm 1,21^a$ | $307,70 \pm 22,27^a$ | 98,03 | $0,57 \pm 0,049^a$ |
| 1 | $22,80 \pm 1,82^a$ | $221,80 \pm 54,14^a$ | $12,68 \pm 2,00^a$ | $215,00 \pm 53,13^a$ | 96,93 | $0,55 \pm 0,069^a$ |
| 2 | $12,18 \pm 1,82^b$ | $157,09 \pm 20,15^b$ | $9,73 \pm 0,78^b$ | $134,36 \pm 18,44^b$ | 85,53 | $0,38 \pm 0,078^b$ |
| 3 | $12,60 \pm 2,17^b$ | $15,73 \pm 25,6^b$ | $9,60 \pm 0,76^b$ | $132,73 \pm 24,48^b$ | 84,15 | $0,39 \pm 0,066^b$ |

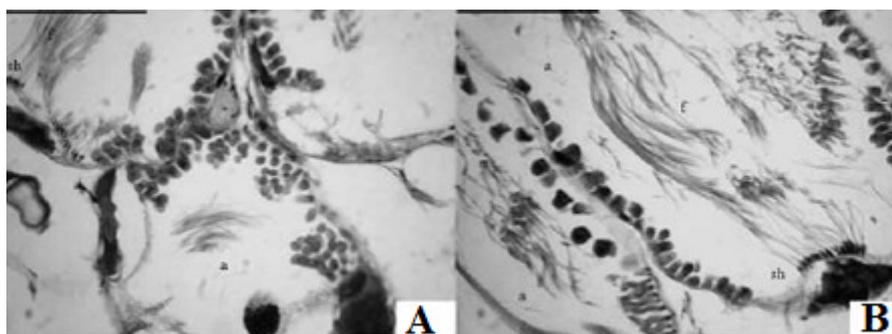


Figura 7. Corte histológico da região ovotestis de *Biomphalaria glabrata*. a - Seção de molusco não infectado mostrando a região ovotestis funcionalmente ativo, com a estrutura do ácino (a) contendo espermatozoides agrupados pela extremidade anterior (cabeças) (sh) e a cauda (t) voltada para a luz do ácino. Barra de escala = 50 μ m. b - Corte histológico da região do ovotestis de moluscos experimentalmente infectados com *Angiostrongylus cantonensis* exibindo uma região da gônada com um processo ativo de gametogênese, com o espermatozoides agrupados pela região da cabeça (sh) e suas caudas (t) projetada para o

lúmen do ácido (a) e a completa ausência de larvas de nematóides em desenvolvimento nesta região. Barra de escala = 50 µm

4.4 DISCUSSÃO

Estudos focando a infecção por trematódeos foram os primeiros a reportar severa diminuição da atividade reprodutiva em seus hospedeiros intermediários, um efeito denominado de castração parasitária (KOIE, 1969).

Aqui, a biologia reprodutiva de moluscos infectados e não infectados foram avaliados. As alterações na biologia reprodutiva são usualmente determinadas por meio da observação de parâmetros relacionados à atividade ovipositória e viabilidade dos ovos depositados. Mas, os mecanismos que desencadeiam a castração parasitária podem ser determinados utilizando diferentes ferramentas na investigação. Baudoïn (1975) afirmou que o fenômeno, castração parasitária, pode ser resultado de um processo direto, quando o parasito, diretamente, causam danos ao tecido gonadal, ou um processo indireto, em resposta a mobilização de nutrientes pelo parasito. Sullivan et al (1985) redefiniu esta ideia e dividiu a castração parasitária em dois grupos, a castração como um efeito primário, em resposta a ingestão de tecidos gonadais pelas larvas em desenvolvimento ou por meio da interferência de substâncias neuroendócrinas que modulam a atividade reprodutiva do molusco hospedeiro; ou castração parasitária como um efeito secundário, onde alterações metabólicas no molusco hospedeiro, resultarão em um estado fisiológico de jejum e, conseqüentemente, comprometendo a atividade reprodutiva do hospedeiro. Portanto, para obter informações que possam indicar os mecanismos envolvidos na castração parasitária em *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis*, análises histológicas foram realizadas a fim de verificar a presença de larvas no tecido reprodutivo do hospedeiro. Os conteúdos de galactogênio no complexo glândula de albúmen e ovotestis foram quantificados, por se tratar de um órgão sexual acessório e que sintetiza este polímero que é a principal fonte energética para a reprodução dos moluscos (GOUDSMIT; ASHWELL, 1965; GOMOT et al., 1989). Assim, alterações nos conteúdos de galactogênio neste sítio, refletirão sobre a viabilidade dos embriões em formação nos ovos, uma vez que este polissacarídeo é parte constituinte do fluido perivitelínico, o qual é utilizado como nutrientes para o desenvolvimento dos embriões nos ovos e logo após a sua eclosão. Assim, a redução do conteúdo de galactogênio irá resultar em uma baixa taxa de eclosão, caracterizando a castração parasitária como um processo nutricional.

Este estudo é um dos poucos, senão o único, sobre a biologia reprodutiva de moluscos infectados por larvas de nematóides, e parece ser único a descrever a ocorrência do fenômeno de castração parasitária neste sistema de relação. Contudo, outros autores têm demonstrado resultados similares em modelos utilizando insetos como hospedeiros intermediários (CHRISTIE, 1936; STRICKLAND, 1911; WELCH, 1965).

No presente estudo, uma redução contínua dos parâmetros analisados sobre a biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis* foi observado, caracterizando o fenômeno castração parasitária neste sistema parasito-hospedeiro. Porém, a interrupção completa na atividade reprodutiva não ocorreu. Em muitos estudos, uma completa inibição da atividade reprodutiva de moluscos infectados não foi observada, similarmente aos resultados obtidos aqui, caracterizando um fenômeno de castração parasitária parcial (FRYER et al., 1990).

Harris e Cheng (1975) observaram larvas de nematóides encapsulados no manto e massa cefalopodia de *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*, porém não foram verificados danos histológicos nos tecidos do sistema reprodutivo do hospedeiro. No presente

estudos, os resultados histológicos, não demonstraram larvas de *A. cantonensis* no tecido gonadal de *B. glabrata*, porém uma redução significativa de parâmetros biológicos reprodutivos foi observada, caracterizando, portanto, a ocorrência de uma castração parcial do molusco hospedeiro pelas larvas do parasito.

Brockelman et al. (1976) e Brockelman e Sithithavorn (1980) demonstraram uma redução nos conteúdos de proteínas, glicogênio e glicose em *A. fulica* infectado com *A. cantonensis*. Os resultados apresentados no presente estudo evidenciam uma redução progressiva nos conteúdos de galactogênio, demonstrando valores significativamente menores na segunda e terceira semana de infecção, corroborando com os resultados de Brockelman et al. (1976) e Brockelman e Sithithavorn (1980), relatando claramente que o desenvolvimento de larvas de *A. cantonensis* induz alterações no metabolismo energético de *B. glabrata*. Em resposta, o molusco hospedeiro reduz o esforço reprodutivo como uma estratégia passando a mobilizar reservas para atender inicialmente suas necessidades basais. Em adição, a castração parasitária pode ser classificada de acordo com Sullivan et al. (1985) como um efeito secundário em resposta a um estado fisiológico de jejum, desenvolvido no molusco hospedeiro como consequência da mobilização de nutrientes pelas larvas do nematóide em desenvolvimento.

Os parâmetros reprodutivos analisados foram relacionados com a diminuição dos conteúdos de galactogênio no complexo glândula de albúmen e ovotestis em moluscos infectados ocorreu a partir da segunda semana pós-infecção. Dictus et al. (1987) demonstraram a expressão de uma proteína responsável pela modulação da atividade reprodutiva de *L. stagnalis*. Este neuropeptídeo, a calfluxina, secretado pelas células caudo-dorsais do molusco, parece ser responsável pelo influxo de cálcio na mitocôndria das células secretoras da glândula de albúmen, estimulando com isso, a atividade sintética deste tecido. de Jong-Brink et al. (1988) observaram que na hemolinfa de *L. stagnalis* infectadas com larvas de *T. ocellata*, havia alguma substância capaz de antagonizar a ação de hormônios femininos envolvidos na reprodução, dentre eles a calfluxina e a qual denominaram schistosomina. A inibição/diminuição do influxo de íons cálcio para a matriz mitocondrial das células gonadais compromete todo o processo de fosforilação oxidativa e, por conseguinte, repercute numa menor produção de energia (ATP), que é essencial à galactogênese (Hinkle e Mc Carthy, 1978). Desta forma, se considerar que a galactogênese é uma via análoga a gliconeogênese, portanto uma via anabólica, o consumo de ATP é fundamental, onde qualquer comprometimento em sua síntese acabará resultando num decréscimo de reservas de galactogênio no interior dos ovos diminuindo sua viabilidade.

Finalmente, pela primeira vez os efeitos da infecção de *A. cantonensis* sobre a biologia reprodutiva de *B. glabrata* foram estudados e o fenômeno de castração parasitária confirmada, sendo classificada como um processo indireto e parcial. Os resultados obtidos aqui demonstram uma clara diminuição da atividade reprodutiva em *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis*. Além disso, somente a partir da segunda semana pós-infecção que foram observados os menores valores sugerindo que os efeitos patológicos produzidos pelas larvas do nematóide na biologia reprodutiva ocorreram neste tempo, e que pode ser explicado pelo menos em parte pela redução nos conteúdos de galactogênio na glândula de albúmen dos moluscos infectados. Estudos adicionais devem ser realizados para o melhor entendimento das alterações metabólicas que ocorrem no hospedeiro molusco em resposta a infecção por estágios larvais de *A. cantonensis* neste processo.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICATA, J.E. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. **Canadian Journal Zoology**, v.40, p.5-8, 1962
- BAUDOIN, M. Host Castration as a Parasitic Strategy. **Evolution**, v.29, p.335-352, 1975
- 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.30-37, 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.
- CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; 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.
- CHENG, T.C.; ALICATA, J.E. Possible role of water in the transmission of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). **The Journal of Parasitology**, v.50, p.39-40, 1964.
- CHRISTIE, J.R. Life history of *Agamermis decaudata*, a nematode parasite of grasshoppers and other insects. **Journal of Agricultural Research**, v.52, p.161-198, 1936.
- DE JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M.M.; BOER, H.H. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.65, p.91-100, 1988.
- DIAZ, J.H. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. **The Journal of the Louisiana State Medical Society**, v.160, p.333-342, 2008.
- DICTUS, W.J.; DE JONG-BRINK, M.; BOER, H.H. A neuropeptide (Calfluxin) is involved in the influx of calcium into mitochondria of the albumen gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.65, p.439-450, 1987.
- FERNANDES, M.C. Métodos Escolhidos de Técnica Microscópica, 2nd edn. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1949.
- FRYER, S.E.; OSWALD, R.C.; PROBERT, A.J.; RUNHAM, N.W. The effect of *Schistosoma haematobium* infection on the growth and fecundity of three sympatric species of bulinid snails. **Parasitology**, v.76, p.557-563, 1990.

- GOMOT, A.; GOMOT, L.; BOUKRAA, S.; BRUCKERT, S. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. **Journal of Molluscan Studies**, v.55, p.1-8, 1989.
- GOUDSMIT, E.M.; ASHWELL, G. Enzymatic synthesis of galactogen in the snail, *Helix pomatia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.19, p.417-422, 1965.
- GUILHON, J.; GAALON, A. Évolution larvaire d'un nematode parasite de pappariel circulatoire du chien dans l'organisme de mollusques dulçaquicoles. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.268, p.612-615, 1969.
- 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.
- HINKLE, P.C.; MCCARTHY, R.E. How cells make ATP. **Scientific American**, v.238, p.104-123, 1978.
- KOIE, M. On the endoparasites of *Buccinum undatum* L. with special reference to the trematodes. **Ophelia**, v.6, p.251-279, 1969.
- LIMA, A.R.; MESQUITA, S.D.; SANTOS, S.S.; AQUINO, E.R.; ROSA L DA R.; DUARTE, F.S.; TEIXEIRA, A.O.; COSTA, Z.R.; FERREIRA, M.L. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brasil. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v.67, p.1093-1096, 2009.
- MALDONADO, A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.; MOTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.1-4, 2010.
- PINHEIRO, J., AMATO, S.B., 1995. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.635-638, 1995.
- PINHEIRO, J.; GOMES, E.M. A method for glycogen determination in molluscs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.37, p.569-576, 1994.
- SLOM, T.J.; CORTESE, M.M.; GERBER, S.I.; JONES, R.C.; HOLTZ, T.H.; LOPEZ, A.S.; ZAMBRANO, C.H.; SUFIT, R.L.; SAKOLVAREE, Y.; CHAICUMPA, W.; HERWALDT, L.; JOHNSON, S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **The New England Journal Medicine**, v.346, p.668-675, 2002.
- 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.

STRICKLAND, E.H. Some parasites of *Similium* larvae and their effects on the development of the host. **The Biological Bulletin**, v.21, p.302-338, 1911.

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 of Biological Chemistry**, v.62, p.287-290, 1924.

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.

TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S.; LIN, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, W.R.; HUANG, C.K.; YEN, C.M. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. **American Journal Medicine**, v.111, p.109-114, 2001.

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 nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.220-223, 2011.

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, p.192-195, 2011.

WELCH, H.E. Taxonomy, life cycle, development and habits of two new species of Allantonematidae (Nematoda) parasitic in drosophilid flies. **Parasitology**, v.49, p.83-103, 1959.

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.

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

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.

5 CAPÍTULO II

**EFEITOS DA INFECÇÃO POR LARVAS DE *Angiostrongylus cantonensis*
(NEMATODA, METASTRONGYLIDAE) SOBRE O METABOLISMO
DE SEU HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO *Biomphalaria glabrata*
(MOLLUSCA, GASTROPODA).**

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

RESUMO

O efeito da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* sobre a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e os conteúdos de proteínas totais, ácido úrico e ureia na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* foram investigados. Após uma, duas e três semanas de infecção experimental, os moluscos foram dissecados para coleta da hemolinfa. A infecção por *A. cantonensis* induziu importantes alterações no metabolismo do molusco hospedeiro, resultando no acionamento de mecanismos fisiológicos direcionados a minimizar os efeitos deletérios desta relação. Foi observado um decréscimo significativo nos conteúdos de proteínas totais nos animais infectados, diminuindo gradativamente com o avançar da infecção. Esta mudança foi acompanhada concomitantemente pelo aumento das concentrações de ureia e uma diminuição dos níveis de ácido úrico hemolinfáticos, sugerindo que neste modelo a infecção induz uma proteólise e uma inversão do padrão de excreção nos moluscos infectados. Além disso, variações nas atividades das aminotransferases foram determinadas, com os grupos infectados apresentando valores significativamente maiores em relação ao grupo controle. Os resultados apresentados indicam um aumento do metabolismo protéico nos moluscos infectados, já que ocorreu um aumento no conteúdo de catabólitos nitrogenados como a ureia, além de confirmar a participação das aminotransferases como enzimas chaves envolvidas no metabolismo de carboidratos.

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

ABSTRACT

The effect of *Angiostrongylus cantonensis* infection on the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity and the concentration of total proteins, uric acid and urea in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* were investigated. The snails were dissected after one, two and three weeks of infection to collect the hemolymph. The infection by *A. cantonensis* induced severe changes in the snail host metabolism, triggering physiological mechanisms to minimize the deleterious effects caused by the larvae. There was a significant decrease in the concentration of total proteins in the infected snails, which occurred gradually when the infection advances. This change was accompanied by an increase in the concentrations of urea and a decrease in the levels of uric acid in the hemolymph, suggesting that in this model the infection induces proteolysis and inversion of the excretion pattern of the infected snails. Besides this, variations in the activities of the aminotransferases were observed, with significantly higher levels in the infected groups than in the control group. These results indicate an increase in the protein metabolism of the infected snails, since there was an increase in nitrogen catabolites such as urea.

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

5.1 INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis é considerado o principal agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica, caracterizada por uma intensa reação inflamatória das meninges (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 2009). Esta zoonose, que é endêmico no Sudoeste Asiático e Ilhas do Pacífico, é considerada uma doença emergente, pois tem apresentado notável expansão geográfica, assim como seus hospedeiros (HOLLINGWORTH; COWIE, 2006). De acordo com Qiao-Ping Wang et al. (2006) cerca de 2.800 casos já foram registrados no mundo. Vários surtos da doença têm sido registrados nas ilhas do Pacífico (ALICATA, 1962; SLOM et al., 2002; KLIKIS; PALUMBO, 1992) e nos últimos 10 anos, ocorreram especialmente na China (TSAI et al., 2001, LV et al., 2009, 2011), Tailândia e Estados Unidos (DIAZ, 2008). Na América do Sul, os primeiros casos foram registrados no Brasil, dois para o município de Cariacica, estado do Espírito Santo e dois para o estado de Pernambuco (municípios de Escada e de Olinda), todos quatro causados pela ingestão de moluscos infectados com larvas de terceiro estágio (L₃) de *A. cantonensis* (CALDEIRA et al., 2007; THIENGO et al., 2010, LIMA et al., 2009).

A participação de diferentes espécies de moluscos como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* tem sido observada: *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), *Subulina octona* (Bruguière, 1792), *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) e *Pomacea lineata* (Spix in Martius, 1827) (CALDEIRA et al., 2007; MALDONADO et al., 2010) e, *Biomphalaria glabrata* (YOUSIF; LAMMLER, 1977; HARRIS; CHENG, 1975). Ao alcançar o molusco hospedeiro, os helmintos conquistam um novo nicho ecológico, consistindo principalmente da hemolinfa do molusco. Nesta circunstância, o parasito passa a competir por nutrientes do próprio hospedeiro, além de liberar seus produtos de excreção/secreção, causando severas alterações no organismo do hospedeiro (STEWART et al., 1985; BROCKELMAN et al., 1976; BROCKELMAN ; SITHITHAVORN, 1980). Tal condição acaba resultando em uma redução na taxa metabólica de moluscos infectados que passa a utilizar reservas, estrategicamente estocadas, para manter suas funções vitais enquanto ao mesmo tempo, fornecem nutrientes para as larvas do parasito se desenvolver. Tais alterações conduzem a um balanço energético negativo, caracterizado pelo consumo de glicogênio a partir da glândula digestiva e massa cefalopediosa, utilizando substratos alternativos, como as proteínas, para sua sobrevivência e reprodução (BECKER, 1980). Esta fase inicial é essencial para o desenvolvimento do parasito, possibilitando alcançar estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (STEWART et al., 1985).

Além disso, evidências estudos tem demonstrado que diferentes espécies de moluscos apresentam diferentes respostas quando são submetidos a condições de estresse tais como o jejum e infecção por helmintos (PINHEIRO; AMATO, 1994, DE SOUZA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2001, PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011). Nestes estudos, foi observado que moluscos aquáticos demonstraram maior depleção de proteínas do que carboidratos em relação a moluscos terrestres, sugerindo que o metabolismo de proteínas nesses animais exerce papel central na manutenção da sobrevivência de moluscos aquáticos parasitados. Portanto, o objetivo deste estudo foi fornecer informações sobre as concentrações de proteína totais, ácido úrico e ureia juntamente com a atividade da EC2.6.1.1 L-aspartate: 2 oxoglutarate aminotransferase (AST) e EC2.6.1.2 L-alanine: 2 oxoglutarate aminotransferase (ALT) na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*, possibilitando o melhor entendimento das alterações bioquímicas e injúrias teciduais do molusco (Blasco e Puppo 1999; Pinheiro et al., 2001). Além disso, informações sobre alterações metabólicas no modelo *B. glabrata/A. cantonensis* ainda não foram realizados. Isto é causa de preocupação já que

estudos têm registrado a excelente adaptação desta espécie de planorbídeo a regiões tropicais, como o Brasil, (PARAENSE, 1975), destacando o risco da transmissão de agentes patológicos, incluindo *A. cantonensis* (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 2009).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos.

Em cada aquário foram previamente colocados 1500 ml de água desclorada onde era acrescentado cerca de 0.5g de CaCO₃.

Foram formados seis grupos, três grupos controle (não infectados) e três grupos de moluscos infectados. Cada aquário era composto por 10 moluscos, criados em laboratório desde a oviposição, para saber a sua idade e assegurar que não foram infectados por outros parasitos. Todo experimento foi feito em duplicata, utilizando um “n” total de 120 moluscos.

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* desidratadas. A manutenção do aquário foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários. O número de moluscos mortos foi observado.

5.2.2 Parasitos

Larvas L₃ de *A. cantonensis*, provenientes de *A. fulica* coletadas em Olinda, PE, 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 L₁ utilizadas neste estudo foram obtidas a partir desse ciclo experimental mantido nos laboratórios citados.

5.2.3 Infecção dos moluscos

As fezes de *R. norvegicus* infectados foram coletadas e utilizadas para obtenção das larvas pela técnica de Baermann, empregada para separar e decantar as larvas L₁ (WILLCOX; COURA 1989). Após processamento das amostras fecais, espécimes de *B. glabrata* (8–12 mm) com 90 dias de idade, em média, foram expostos individualmente a aproximadamente 1200 L₁ em placas de 24 furos (YOUSIF; LAMMLER, 1977). 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 durante todo o experimento (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

5.2.4 Dissecção e coleta da hemolinfa

Semanalmente pós-infecção, dez espécimes de cada grupo experimental foram dissecados e a hemolinfa coletada através de punção cardíaca e mantida a -10°C até a utilização para análises bioquímicas. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo durante as dissecações.

5.2.5 Determinação das Aminotransferases (AST e ALT)

Para os ensaios das aminotransferases, 0,5 ml de substrato para ALT ou AST (solução contendo L-alanina a 0,2M ou L-aspartato a 0,2M; α -cetogluturato a 0,002M e tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4) foi incubado a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, 100 e 200 μ l de hemolinfa (para ALT e AST, respectivamente), foram adicionados, homogeneizado e novamente incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 0,5mL de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001M foram adicionados e mantidos a 25 °C por 20 min. As reações foram interrompidas pela adição de 5 mL de NaOH 0,4M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 505 nm (KAPLAN; PESCE, 1996). Os resultados foram expressos como URF/ml.

5.2.6 Dosagens de proteínas totais

Este ensaio foi feito de acordo com a técnica do Biureto (WEICHSELBAUM, 1946). Uma mistura de 50 μ l de hemolinfa e 2,5 ml do reagente de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M, e sulfato de cobre 0,01M) foi homogeneizado, e deixado sob temperatura ambiente e após 5 min. as leituras foram realizadas em espectrofotômetro 550nm. Os resultados foram expressos como g/dl.

5.2.7 Determinação das concentrações de ácido úrico e ureia

Para a determinação do ácido úrico, 50 μ l de hemolinfa foi misturado com 2 ml do reagente de cor (tampão fosfato de sódio 100mmol/l [pH 7,8] contendo 4mmol/L diclorofenol-sulfonato, 4-aminoantipirina 0,5mmol/L, 120U \leq uricase, 4.980U \leq ascorbato oxidase, 1.080U \leq peroxidase). A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 5 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 520 nm (BISHOP et al., 1996). Os resultados foram expressos como mg/dl.

O ensaio para dosagem de ureia foi realizado através da adição de 2 ml de solução contendo 60 mmol de salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio 3,4 mmol, e EDTA dissódico 1,35 mmol. Então, foram adicionados 2 μ l de urease e 20 μ l de hemolinfa. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 5 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados foram expressos como mg/dL (CONNERTY et al., 1955).

5.2.8 Análises Histológicas

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 histológicas de rotinas (HUMASON, 1979). As secções (5 μ m) foram coradas usando hematoxilina e eosina e observadas com microscópio de luz Zeiss Axioplan; imagens foram capturadas com uma câmara digital MRc5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

5.2.9 Analise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão e o teste de Tukey/ANOVA foram utilizados para a comparação das médias. A regressão polinomial foi aplicada para análise da relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção ($\alpha=5\%$) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

5.3 RESULTADOS

Os conteúdos de proteínas totais, ácido úrico, ureia e atividade das aminotransferases (ALT e AST) na hemolinfa de moluscos não infectados e infectados, durante etapa de desenvolvimento dos estágios larvais do parasito, são demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Em todos os parâmetros analisados, diferenças significativas foram observadas entre os grupos infectados e seu grupo controle.

Mudanças no metabolismo protéico de moluscos infectados foram registradas, onde uma forte relação negativa estabelecida entre o tempo de infecção e os conteúdos de proteínas totais na hemolinfa foi demonstrada ($r^2=0,71$) (Figura 1a). Os menores valores foram observados na segunda ($2,76\pm 0,249$) e terceira semana após infecção ($2,61\pm 0,24$), representando um decréscimo de -22,90% e -18,43% respectivamente, em relação aos valores dos grupos controles correspondentes (2ª semana, $3,58\pm 0,15$ e 3ª semana, $3,20\pm 0,04$).

A infecção de *B. glabrata* por *A. cantonensis* causou alterações no metabolismo dos produtos nitrogenados de excreção, induzindo um aumento nas concentrações de ureia e uma redução nos conteúdos de ácido úrico na hemolinfa dos moluscos. Diferença significativa nos conteúdos de ureia foi observada a partir da segunda semana de infecção ($1,78\pm 0,08$), com maior valor registrado na terceira semana ($2,00\pm 0,27$), representando um acréscimo de 173,97% em relação ao valor médio apresentado pelo grupo controle ($0,74\pm 0,01$) (Tabela 1). Ao contrário, os menores conteúdos de ácido úrico foram verificados nos períodos mais tardios da infecção, com o menor valor registrado na segunda semana de infecção ($1,22\pm 0,15$) diferindo significativamente do seu grupo controle ($5,71\pm 0,16$). Além disso, existiu uma forte relação para os conteúdos de ureia e ácido úrico nos moluscos infectados ($r^2= 0,81$, $r^2= 0,94$) respectivamente, (Figura 1b e 1c).

Um aumento significativo nas atividades da ALT e da AST na hemolinfa de moluscos infectados também foi observado. Existe uma forte relação negativa estabelecida entre o período de infecção e a atividade das enzimas, em virtude dos elevados valores dos coeficientes de determinação ($r^2=0,95$ e $r^2=0,98$) respectivamente (Figura 2a e 2b). A atividade da ALT aumentou 98.13% no final da terceira semana e infecção ($90,09\pm 3,13$) diferindo do grupo controle ($45,47\pm 2,98$). Variação similar foi observada na atividade da AST, com maior valor alcançado na terceira semana de infecção ($130,08\pm 2,49$) indicando um aumento de 51,87% em relação ao valor médio do grupo controle ($85,65\pm 3,65$) (Tabela 2).

As análises histológicas demonstraram alterações significativas na glândula digestiva de moluscos infectados (Figura 3a e b) quando comparados com aqueles não infectados (Figura 3c e d). No grupo infectado, observamos uma intensa desorganização celular, caracterizadas na forma de reações granulomatosas em diferentes níveis de desenvolvimento. Já no grupo controle (moluscos não infectados), as análises demonstram a ausência de estágios larvais, sendo a funcionalidade e integridade do órgão preservado.

Tabela 1. Variação nos conteúdos de proteína total (g/dl), ácido úrico e ureia (mg/dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.

| Semanas | Concentração de Proteínas Totais (mg/dl) | | Concentração de Ácido Úrico (mg/dl) | | Concentração de Ureia (mg/dl) | |
|---------|--|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Controle | Infectado | Controle | Infectado | Controle | Infectado |
| | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP |
| 1 | 3,61 \pm 0,26 ^a | 3,59 \pm 0,07 ^a | 5,52 \pm 0,12 ^a | 3,72 \pm 0,30 ^b | 0,72 \pm 0,01 ^a | 0,70 \pm 0,09 ^a |
| 2 | 3,58 \pm 0,15 ^a | 2,76 \pm 0,24 ^b | 5,71 \pm 0,16 ^a | 1,22 \pm 0,15 ^b | 0,75 \pm 0,02 ^a | 1,78 \pm 0,08 ^b |
| 3 | 3,20 \pm 0,04 ^a | 2,61 \pm 0,24 ^b | 5,46 \pm 0,07 ^a | 1,41 \pm 0,01 ^b | 0,74 \pm 0,01 ^a | 2,00 \pm 0,27 ^b |

Tabela 2. Atividade das aminotransferases (ALT e AST) (UFR/ml) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.

| Semanas | Atividade da ALT (UFR/ml) | | Atividade da AST (UFR/ml) | |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Controle | Infectado | Controle | Infectado |
| | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP |
| 1 | 55,38 \pm 8,20 ^a | 75,17 \pm 1,09 ^a | 84,21 \pm 6,72 ^a | 111,95 \pm 2,89 ^b |
| 2 | 47,83 \pm 2,50 ^a | 92,86 \pm 6,13 ^b | 85,88 \pm 3,09 ^a | 127,41 \pm 1,66 ^b |
| 3 | 45,47 \pm 2,98 ^a | 90,09 \pm 3,13 ^b | 86,88 \pm 1,15 ^a | 130,08 \pm 2,49 ^b |

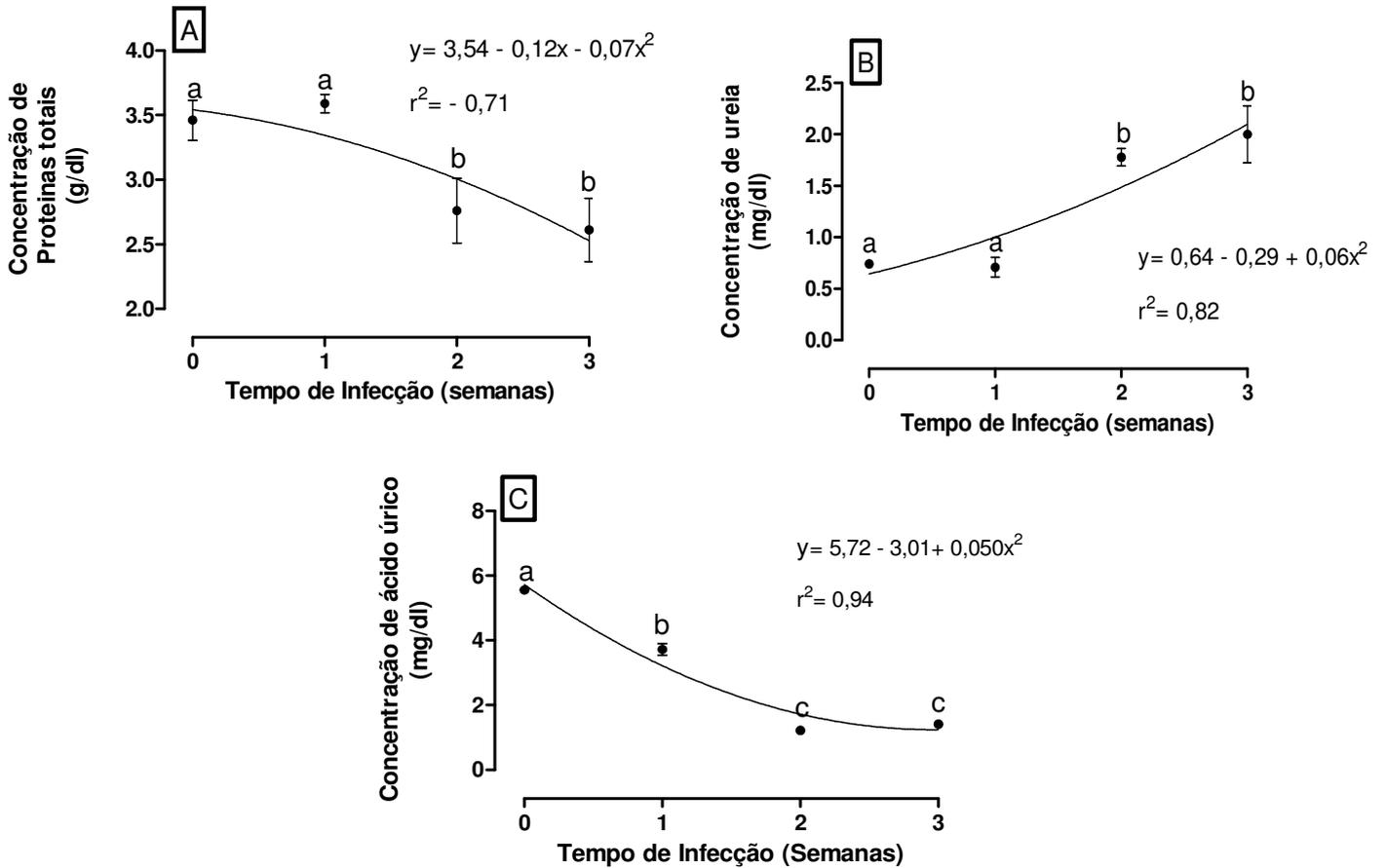


Figura 1. Relação entre as concentrações de proteínas totais expresso em g/dl (A), ureia expresso em mg/dl (B) e ácido úrico expresso em mg/dl (C) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos moluscos do grupo controle obtidos no final de cada semana (1, 2, and 3 semanas). a, b, c - Médias diferem significativamente entre si (média±desvio-padrão).

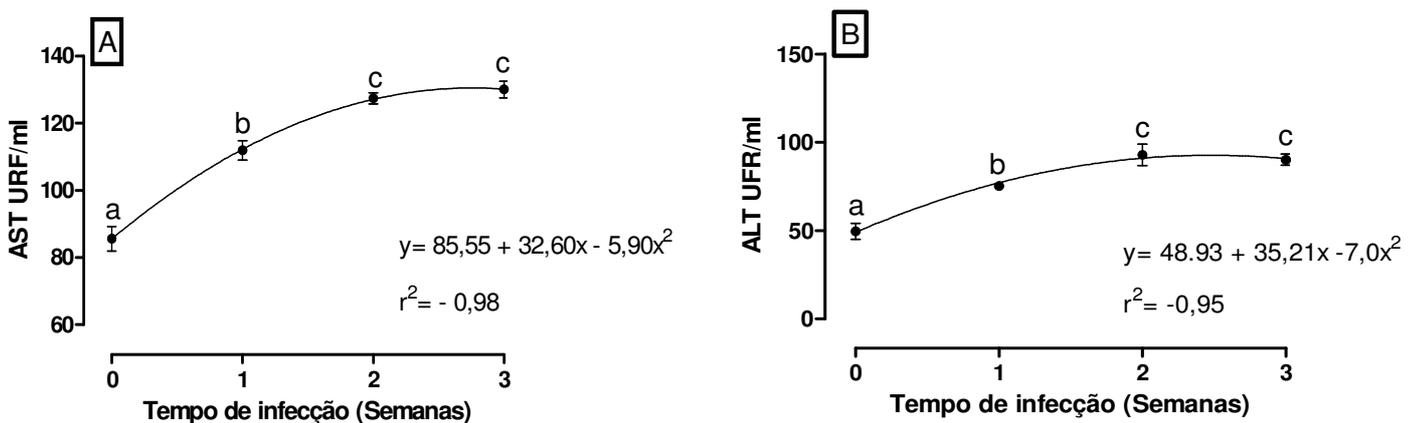


Figura 2. Relação entre AST (A) and ALT (B) expresso em URF por mililitro, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos

moluscos do grupo controle obtidos no final de cada semana (1, 2, and 3 semanas). a, b, c - Médias diferem significativamente entre si (média±desvio-padrão).

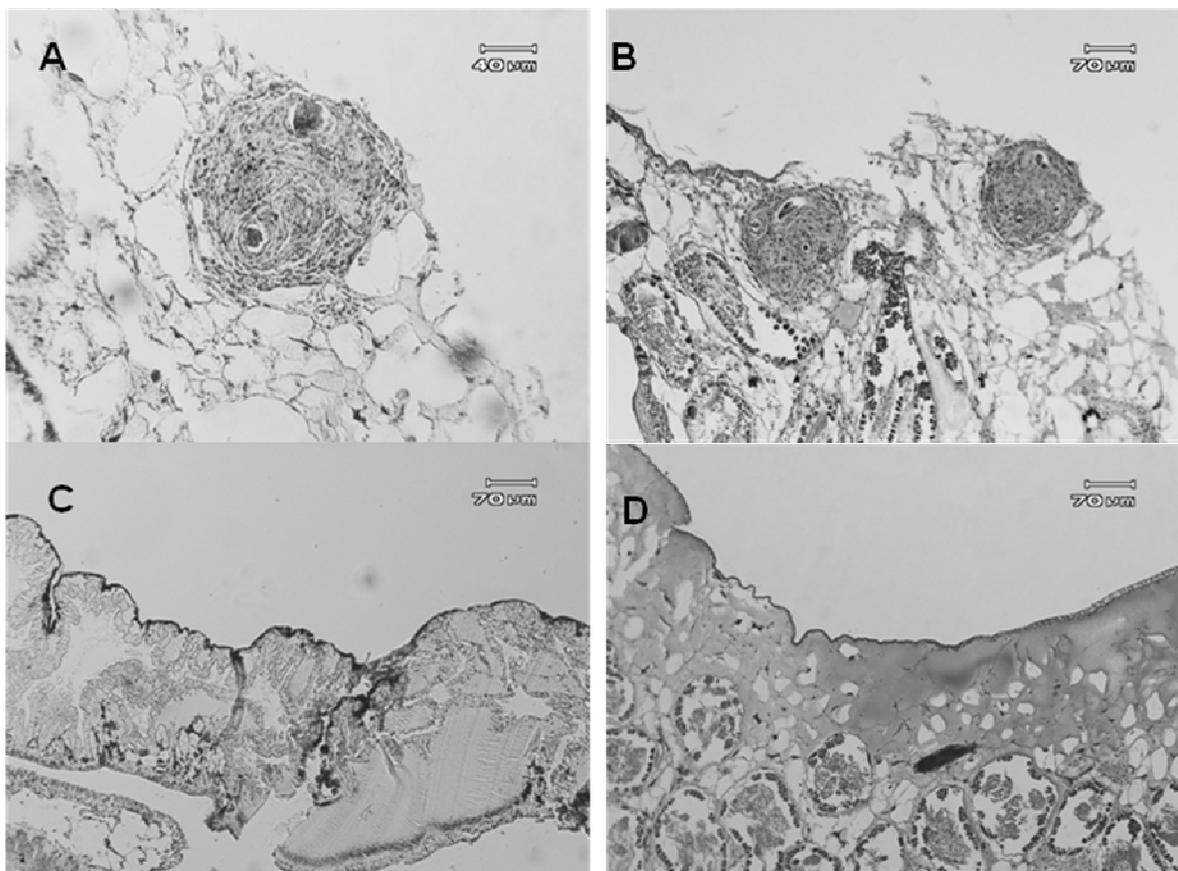


Figura. 3. Glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* infecta por *Angiostrongylus cantonensis* demonstrando reações granulomatosas, de aspecto nodular esférico, caracterizadas por concentração gradativa de hemócitos. Figuras C e D: Glândula digestiva de moluscos não infectados demonstrando ausência de estágios larvais

5.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, uma redução nas concentrações de proteínas totais em *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* foi observada, provavelmente em resposta ao desenvolvimento de estágios larvais intramolusco, os quais estimulam a mobilização de reservas não glicídicas do hospedeiro necessárias para atender suas necessidades basais. Estes dados podem também ser resultado da absorção direta de aminoácidos a partir da hemolinfa como fonte energética para o desenvolvimento ontogenético do parasito, hipótese esta sugerida por estudos envolvendo infecções de moluscos por trematódeos (TUNHOLI et al., 2011, PINHEIRO et al., 2009; DE SOUZA et al., 2000), porém resultados contrários foram obtidos por Brockelman (1978), estudando o modelo *A. fulica/A. cantonensis*. Neste estudo, os conteúdos de proteínas totais não demonstraram qualquer alteração nos animais infectados em relação ao grupo controle (não infectado). Adicionalmente, Brockelman e Sithithavorn (1980) observaram significativa redução de reservas de carboidratos e açúcares hemolinfáticos de *A. fulica* infectada com *A. cantonensis*. Juntos, estes achados corroboram a hipótese de que moluscos

aquáticos são muito mais dependentes do metabolismo de proteínas em condições de estresse como o parasitismo em relação a moluscos terrestres.

Alterações nos níveis dos produtos nitrogenados de degradação foram também observados, com um aumento substancial nos conteúdos de ureia e uma significativa redução nas concentrações de ácido úrico na hemolinfa dos moluscos infectados em relação a espécimes não infectados. Estas alterações podem sinalizar um aumento na taxa de desaminação dos aminoácidos, como substrato alternativo utilizado para a formação de glicose. Como consequência, o acúmulo de ureia na hemolinfa é relatado, como previamente verificado (BECKER; SCHMALE, 1975; TUNHOLI et al., 2011). Além disso, similarmente ao observado em estudos envolvendo infecção de moluscos por trematódeos (KURELEC, 1975; PINHEIRO et al., 2009), caracterizou-se a alteração do padrão de excreção de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis*, passando o hospedeiro a excretar mais ureia minimizando os efeitos deletérios da infecção. Estas alterações observadas nos produtos nitrogenados de degradação podem representar um mecanismo interessante de adaptação do hospedeiro a condições de estresse, além de ser extremamente útil às larvas em desenvolvimento, já que a ativação do ciclo da ureia resulta na maior aquisição de arginina pelo parasito, servindo de suporte para seu desenvolvimento (MELLO-SILVA, 2010).

O aumento de atividade de ambas as aminotransferases foi observado nos moluscos infectados. As aminotransferases, também chamadas de transaminases, constituem um grupo de enzimas que catalizam a transferência reversível do grupamento amino de um aminoácido para um α -ceto ácido, ou vice-versa, e, portanto fundamentais ao metabolismo de carboidratos por estar relacionado com a gliconeogênese (MOSS; HENDERSON, 1998). Assim, em condições de estresse, como jejum e infecção por larvas de trematódeos o aumento da atividade dessas enzimas na hemolinfa de moluscos pode ser explicado em parte como uma resposta fisiológica ao balanço energético negativo observado, catalizando a síntese de glicose a partir de aminoácidos gluconeogênicos (MANOHAR et al., 1972, PINHEIRO et al., 2001). Os resultados aqui apresentados indicam que o aumento da atividade dessas enzimas é resultado de uma maior demanda energética, induzindo mobilização de fontes protéicas, incluindo aminoácidos, como tentativa de restabelecer a glicemia e o estado energético dos organismos expostos à infecção, já que este aumento ocorreu concomitantemente à diminuição dos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa (MASOLA et al. 2008).

Estudos têm validado o envolvimento deste grupo de enzimas como excelentes biomarcadores de lesão celular (BLASCO; PUPPO, 1999; LIRA et al., 2000). Tunholi et al. (2011), estudando a interface *B. glabrata*/*E. paraensei*, observaram um aumento significativo da atividade dessas enzimas nos moluscos infectados principalmente no final do período pré-patente, o qual coincidiu com a formação de estágios de rédias do parasito. Segundo Fried e Huffman (1996), este estágio apresenta uma abertura oral que possibilita a larva se alimentar diretamente de tecidos de seu hospedeiro, em especial da glândula digestiva, induzindo um extravasamento das transaminases para a circulação hemolinfática. Diante disso, o aumento das atividades da ALT e AST em *B. glabrata* infectadas por *A. cantonensis* pode ser também em decorrência da presença de larvas do parasito, principalmente se considerarmos que a partir da segunda semana após infecção, larvas L₂ são encontradas na glândula digestiva (GUILHON; CENS, 1973) e na terceira semana, larvas L₃ encontram-se localizadas na massa cefalopédica (SAUERLANDER, 1976). Esta possibilidade torna-se melhor compreendida a partir das alterações morfológicas observadas nos tecidos do grupo infectado confirmando deste modo a utilização dessas enzimas como biomarcadores de lesão celular.

Finalmente, embora muitos estudos têm sido conduzidos para melhor entender os aspectos metabólicos de moluscos infectados por trematódeos, pouco é conhecido sobre este aspecto considerando nematóides como agentes infectantes. Pela primeira vez, os efeitos da

infecção por *A. cantonensis* sobre o metabolismo de produtos nitrogenados de excreção e sobre a atividade das aminotransferases foram analisados. Os resultados obtidos evidenciaram uma alteração no padrão excretor de uricotélico para ureotélico nos moluscos infectados como estratégia de detoxificação do organismo hospedeiro em decorrência da sobrecarga de degradação de substratos nitrogenados como fonte alternativa para a obtenção de energia para sua manutenção e para garantir o desenvolvimento das larvas de *A. cantonensis*. As lesões teciduais, constatadas na análise histológica, ajudam a explicar em parte, os valores crescentes das transaminases aqui observados, relacionado aos danos teciduais causados pelo crescimento e migração das larvas, levando à pressão mecânica dos tecidos e à migração destas até atingirem o término do desenvolvimento larval intramolusco. O melhor entendimento do relacionamento metabólico do molusco nesta relação poderá subsidiar trabalhos futuros, voltados para o desenvolvimento de novos protocolos focados em seu controle, e conseqüentemente, da angiostrongilíase humana.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICATA, J.E. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as acausative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. **Canadian Journal Zoology**, v.40, p.5-8, 1962

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

BECKER, W.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation ammonia, urea and uric acid in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.51A, p.407-411, 1975.

BISHOP, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. Clinical chemistry. Principles, procedures, correlations, thirdth edn. Lippincott, Filadélfia, 1996.

BLASCO, J.; PUPPO, J. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.122, p.253-263, 1999.

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.30-37, 1976.

BROCKELMAN, C.R. Effects of parasitism and stress on hemolymph protein of the African giant snail, *Achatina fulica*. **Parasitology Research**, v.57, p.137-144, 1978.

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 für Parasitenkunde**, v.62, p.285-91, 1980.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; 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.

CONNERTY, H.V.; BRIGGS, A.R.; EATEN, E.H. Determination of blood urea nitrogen using a simple stabilizing reagent. **American Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.1321-1325, 1955.

De SOUZA, R.M.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M.; PINHEIRO, J. The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.365-371, 2000.

DIAZ, J.H. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. **The Journal of the Louisiana State Medical Society**, v.160, p.333-342, 2008.

FRIED, B.; HUFFMAN, J.E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v.38, p.311-368, 1996.

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.

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.

HOLLINGSWORTH, R. G.; COWIE, R. H. Apple snails as disease vectors. Pages 121-132 in R. Joshi and L. Sebastian, eds. Global advances in ecology and management of golden apple snails. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Muñoz, Nueva Ecija, 2006.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. Clinical chemistry, Thirdth edn. Mosby, St. Louis, 1996.

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

LV, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.X.; ZHANG, C.W.; STEINMANN, P.; ZHOU, X.N.; UTZINGER, J. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. **Parasitology Research**, v.104, p.1351-1359, 2009.

MALDONADO, A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.; MOTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca:

Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.1-4, 2010.

MANOHAR, L.; RAO, P.V.; SWAMI, K.S. Variations in aminotransferase activity and total free amino acid level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, p.36-41, 1972.

MASOLA, B.; CHIBI, M.; KANDARE, E.; NAIK, Y.S.; ZARANYIKA, M.F. Potential marker enzymes and metal-metal interactions in *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70, p.79-87, 2008.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, M.C.; BEZERRA, J.C.B.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v.117, p.101-104, 2011.

MOSS, D.W.; HENDERSON, A.R. Enzimas. In CA Burtis ER Ashwood (eds), *Tietz Fundamentos de Química Clínica*, 4th ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 275-325, 1988.

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

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.; CHAGAS, G.M. Aminotranferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1161-1164, 2001.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.JR.; 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.

QIAO-PING, W.; DE-HUA, L.; XING-QUAN, Z.; XIAO-GUANG,C.; ZHAO-RONG, L. Human angiostrongyliasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.8, p.621-630. 2008.

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

SLOM, T.J.; CORTESE, M.M.; GERBER, S.I.; JONES, R.C.; HOLTZ, T.H.; LOPEZ, A.S.; ZAMBRANO, C.H.; SUFIT, R,L.; SAKOLVAREE, Y.; CHAICUMPA, W.; HERWALDT, .L.; JOHNSON, S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **The New England Journal Medicine**, v.346, p.668-675, 2002.

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.

TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S.; LIN, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, W.R.; HUANG, C.K.; YEN, C.M. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. **American Journal Medicine**, v.111, p.109- 114, 2001.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.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**, In Press, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.N.; 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.

WEICHSELBAUM, C.T.E.. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.16, p.40-49, 1946.

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

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 für Parasitenkunde**, v.53, p.247-250, 1977.

6 CAPÍTULO III

ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (MOLLUSCA, GASTROPODA) EM FUNÇÃO DA INFECÇÃO POR *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE)

Alterações no metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria glabrata*
(Mollusca, Gastropoda) em função da infecção por *Angiostrongylus cantonensis*
(Nematoda, Metastroyliidae)

RESUMO

A atividade da lactato desidrogenase bem como, os conteúdos de glicose na hemolinfa e de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Angiostrongylus cantonensis* foram analisados. Após uma, duas e três semanas de infecção os moluscos foram dissecados para coleta da hemolinfa e separação dos tecidos. Foi observada alteração na glicemia dos moluscos durante o período de parasitismo, manifestado pela redução de seus níveis a partir da primeira semana pós-infecção quando comparado ao grupo controle. Alterações também foram verificadas na atividade da lactato desidrogenase, com os grupos infectados apresentando valores significativamente maiores em relação à média do grupo controle. Em paralelo, foi verificado um decréscimo no conteúdo de glicogênio nos tecidos de armazenamento, sendo tal redução drasticamente maior na massa cefalopediosa, em comparação à glândula digestiva, demonstrando que neste sistema de interação, a mobilização de glicogênio não se mostrou suficiente em restabelecer a normoglicemia nos animais infectados.

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

ABSTRACT

The activity of lactate dehydrogenase along with the concentration of glucose in the hemolymph and of glycogen in the digestive gland and cephalopediose mass of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* was analyzed. After one, two and three weeks of infection, the snails were dissected to collect the hemolymph and to separate the tissues. The level of glucose in the hemolymph declined as of the first week after infection in comparison with the control group. The lactate dehydrogenase activity of the snails in the infected groups was significantly higher than the average for the control group. In parallel, there was a decrease in the glycogen stored in the tissues, a reduction that was significantly greater in the cephalopediose mass than in the digestive gland, demonstrating that in this interaction system, the mobilization of glycogen was not sufficient to maintain and reestablish the normoglycemia of the infected snails.

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

6.1 INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis é um nematóide parasito de pulmões de roedores silvestres sendo o mesmo enquadrado como agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana. Estudos epidemiológicos têm confirmado a ocorrência desta zoonose em diferentes regiões do mundo, com aproximadamente 2800 casos já registrados, chamando à atenção sua rápida disseminação (QIAO-PING WANG et al., 2006). Nos últimos 10 anos, os principais surtos ocorreram em áreas consideradas endêmicas, especialmente na China (TSAI et al., 2001), Tailândia e Estados Unidos (DIAZ, 2008). Atualmente, o Brasil é considerado área de risco para esta helmintíase, sendo notificados dois episódios em humanos. Em ambos os casos, a infecção resultou da ingestão de moluscos, e após exames, ratificaram o envolvimento de *A. cantonensis* como agente etiológico (CALDEIRA et al., 2007).

Todos os membros da subfamília Angiostrongylinae apresentam obrigatoriamente um ciclo de vida heteroxeno utilizando moluscos aquáticos ou terrestres como hospedeiros intermediários. Esta fase inicial é essencial para o desenvolvimento do parasito possibilitando-o atingir estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (ANDERSON, 1982). A participação de *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro intermediário de *A. cantonensis* tem sido registrada (YOUSIF; LAMMLER, 1977; HARRIS; CHENG, 1975) e segundo Paraense (1975), esta espécie de planorbídeo é encontrada ao longo da faixa costeira do Brasil apresentando excelente adaptação às condições ambientais do país.

Alterações no metabolismo de carboidratos em moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos têm sido registradas por alguns autores (PINHEIRO et al., 2009; MOORE; HALTON, 1973). Segundo Tunholi et al. (2011), a rota migratória realizada pelas larvas de trematódeos à glândula digestiva, sítio caracterizado por uma circulação hemolinfática especial, resulta na remoção de nutrientes da hemolinfa pelos parasitos, bem como na excreção de substâncias pelos mesmos, modificando desta maneira a composição normal desse meio. Como consequência, hospedeiro passa a acionar ou redirecionar seu fluxo metabólico no sentido anaeróbico para a produção de energia, sendo a alteração mais notável a inversão parcial do ciclo de Krebs (BEZERRA et al., 1997).

Brockelman e Sithithavorn (1980) verificaram variações no metabolismo de *Achatina fulica* quando infectadas por estágios larvais de *A. cantonensis*, repercutindo em uma redução significativa das reservas de carboidratos e açúcares hemolinfáticos do hospedeiro. Observações desses autores sugerem que a glicose é um substrato energético essencial para o hospedeiro, bem como para os estágios larvais do parasito em desenvolvimento. Em oposição, Brockelman (1978), estudando a mesma interface não observou quaisquer alterações no metabolismo protéico de *A. fulica*. Esses estudos nos permitem sugerir que moluscos terrestres utilizam preferencialmente carboidratos como substrato energético quando submetidos a condições de estresse, como o parasitismo.

No entanto, dados acerca das alterações no metabolismo de carboidratos em *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* ainda não foram determinados, o que preocupa, não apenas pela importância do parasito, mas também pela ampla distribuição desse molusco em regiões tropicais como o Brasil. Desta maneira, a fim de atender as recomendações da OMS, as quais priorizam o desenvolvimento de medidas voltadas para o controle desses organismos como base para erradicação de doenças, inclusive a meningoencefalite eosinofílica, o presente estudo objetivou analisar as concentrações de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopédica, assim como o conteúdo de glicose e atividade da enzima lactato desidrogenase (L-desidrogenase láctica) (EC1.1.1.27) (LDH) na hemolinfa de *B. glabrata* submetidas a infecções por estágios larvais de *A. cantonensis* possibilitando o melhor entendimento na

relação parasito/hospedeiro, traçando um perfil comparativo com aqueles já realizados utilizando *A. costaricensis*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Parasitos

Larvas L₃ 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 L₁ utilizadas para a infecção experimental do hospedeiro intermediário foram obtidas a partir desse ciclo que vem sendo mantido nos laboratórios 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 L₁ (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 L₁ (YOUSIF; HAMMIER, 1977). 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 L₁ 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.

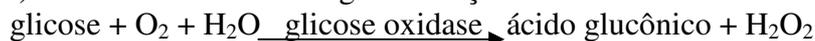
Os aquários foram cobertos com tampas acrílicas com um pequeno furo, permitindo uma boa aeração e impedindo a saída dos moluscos, assim como, a entrada de insetos. Depois de 1, 2 e 3 semanas após a infecção, dez moluscos de cada grupo foram dissecados e os tecidos e hemolinfa coletados e armazenados 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[®]).

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 glucose 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:

1. Lactato + NAD \longrightarrow NADH + piruvato
2. NADH + FMS \longrightarrow NAD + FMS reduzido
3. FMS red. + alúmen férrico \longrightarrow FMS + alúmen ferroso
4. Alúmen ferroso + 1,10-fenantrolina \longrightarrow complexo corado

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

Os resultados numéricos obtidos foram expressos através de média ± desvio-padrão e submetidos ao teste de Tukey-Kramer para comparação de médias e ao teste de regressão polinomial para verificar a relação entre os resultados observados e o tempo de infecção estudado ($\alpha=5\%$).

6.3 RESULTADOS

A infecção por *A. cantonensis* induziu severas alterações no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata*. O conteúdo de glicose e atividade da lactato desidrogenase na hemolinfa, bem como os níveis de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa nos diferentes grupos (controle e infectados) são apresentados a seguir. Em todos os parâmetros estudados, diferenças significativas entre os grupos experimentais foram verificadas.

Em relação aos conteúdos de glicose, a infecção proporcionou mudanças no estado nutricional do organismo hospedeiro, onde uma relação positiva foi observada entre o tempo de infecção e a concentração de glicose na hemolinfa dos grupos estudados ($r^2=0,94$) (Figura 1). Os valores médios dos organismos infectados diferiram significativamente do grupo controle, sendo o menor valor registrado na segunda semana de infecção ($74,01\pm 2,30$), correspondendo a um decréscimo de aproximadamente 33,61% em relação ao seu respectivo grupo controle ($111,48\pm 3,95$) (Tabela 2).

Alterações na atividade da LDH também foram caracterizadas. Logo na primeira semana, a infecção proporcionou um aumento significativo na atividade enzimática ($33,45\pm 4,56$) em relação à média do grupo controle ($18,23\pm 2,34$) (Figura 1) indicando um aumento de aproximadamente 83,48%. Porém, o maior valor registrado foi na segunda semana de infecção ($40,32\pm 4,45$) correspondendo um acréscimo de 121% em comparação aos organismos não infectados (Tabela 2).

Quando foram verificados os conteúdos de glicogênio na glândula digestiva, a mesma ordem de variação foi notada, com os grupos infectados apresentando valores significativamente menores em relação à média dos seus respectivos grupos controles (não infectados) (Tabela 1). Existe um decréscimo de 49,82% nos conteúdos de glicogênio após a primeira semana de infecção ($13,24\pm 0,40$) em relação à média do grupo controle ($26,39\pm 0,35$) (Figura 1), entretanto o menor valor observado foi após a terceira semana de infecção ($11,79\pm 0,51$) (Tabela 1).

Da mesma forma, a infecção por *A. cantonensis* induziu severas alterações nos conteúdos de glicogênio na massa cefalopediosa dos grupos infectados, sendo observado um decréscimo gradativo no conteúdo desse polissacarídeo com o avançar da infecção. Assim, os menores valores foram registrados a partir da segunda e terceira semanas de infecção ($10,24\pm 1,18$ e $4,04\pm 1,04$) respectivamente, diferindo significativamente entre si, bem como em relação ao valor médio do grupo controle ($18,04\pm 1,15$) (Figura 1).

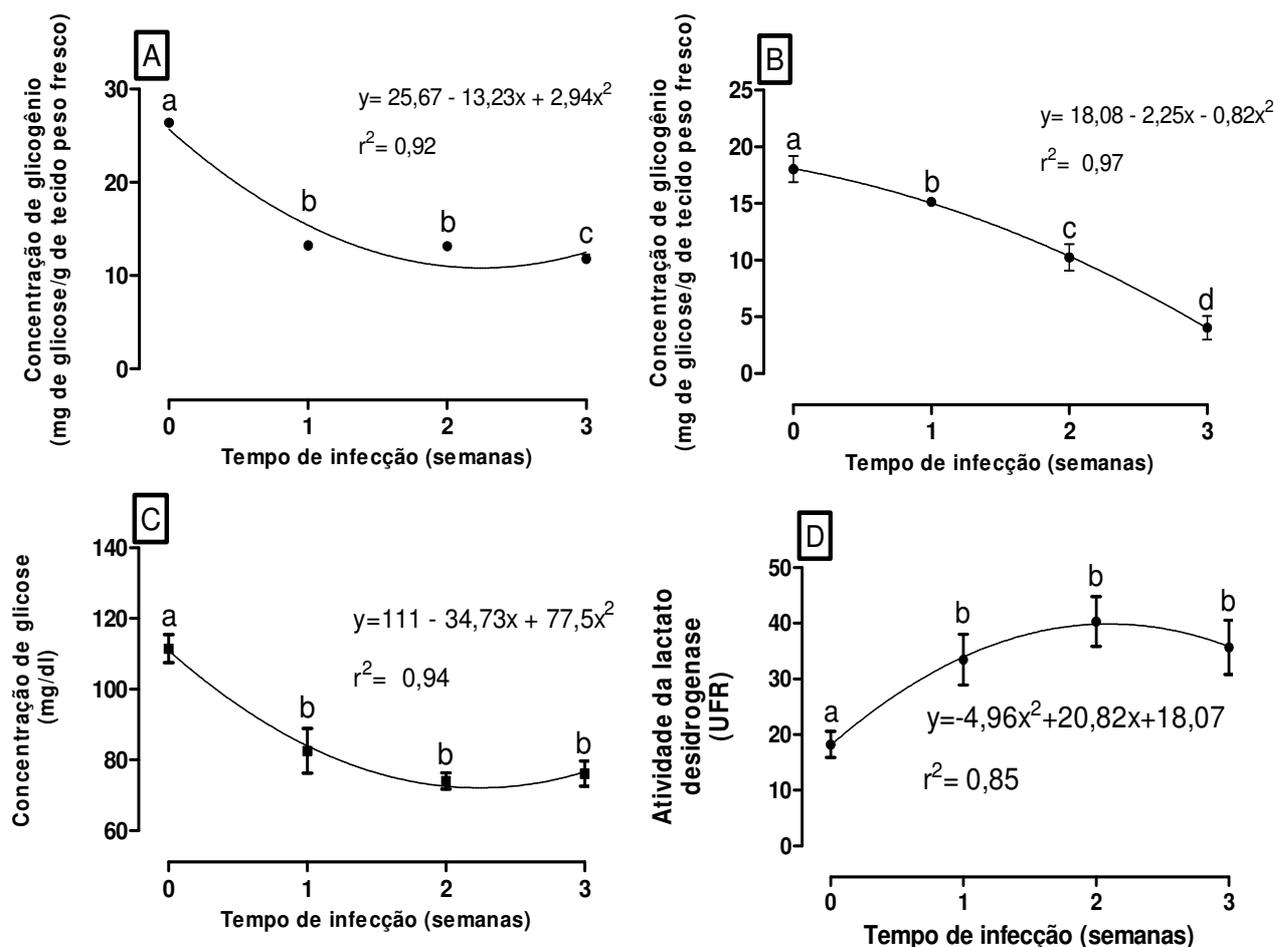


Figura 1. Relação entre concentração glicogênio na glândula digestiva (A), massa cefalopédica (B), glicose (C) e atividade da lactato desidrogenase (D) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*. Zero (0) representa a média dos caramujos do grupo controle obtido no final de cada semana (1, 2 e 3 semanas). a, b, c, d - Médias diferem significativamente (média \pm DP).

Tabela 1. Concentração de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ao nível de ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.

| Semanas | Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) Glândula digestiva | | Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) Massa cefalopediosa | |
|---------|--|-------------------------------|---|-------------------------------|
| | Controle | Infectado | Controle | Infectado |
| | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP |
| 1 | 25,83 \pm 0,37 ^a | 13,24 \pm 0,40 ^b | 18,9 \pm 1,18 ^a | 15,15 \pm 0,30 ^b |
| 2 | 26,76 \pm 0,99 ^a | 13,15 \pm 0,18 ^b | 17,62 \pm 1,58 ^a | 10,24 \pm 1,18 ^b |
| 3 | 26,58 \pm 1,21 ^a | 11,79 \pm 0,51 ^b | 17,63 \pm 0,75 ^a | 4,04 \pm 1,04 ^b |

Tabela 2. Conteúdo de glicose e atividade da lactato desidrogenase na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. ^{a, b} = Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente em linha ao nível de ($\alpha = 5\%$). Média \pm DP = média \pm desvio padrão.

| Semanas | Concentração de glicose (mg/dl) | | Atividade da LDH (UI) | |
|---------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Controle | Infectado | Controle | Infectado |
| | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP | X \pm DP |
| 1 | 110,16 \pm 6,33 ^a | 82,58 \pm 6,33 ^b | 17,27 \pm 2,42 ^a | 33,45 \pm 4,56 ^b |
| 2 | 112,29 \pm 4,36 ^a | 74,01 \pm 2,30 ^b | 16,32 \pm 2,17 ^a | 40,32 \pm 4,45 ^b |
| 3 | 111,99 \pm 3,48 ^a | 76,13 \pm 3,58 ^b | 21,10 \pm 2,43 ^a | 35,60 \pm 4,87 ^b |

6.4 DISCUSSÃO

A redução na concentração de glicose na hemolinfa de moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos foi registrada por vários autores (FRIEDLE, 1971; STANISLAWSKY; BECKER, 1979). Cheng e Snyder (1962) estudando a relação entre *B. glabrata* e *Schistosoma mansoni* observaram que durante o desenvolvimento intramolusco dos estágios larvais do helminto, ocorria com a diminuição do conteúdo de glicose no hospedeiro intermediário. Esta redução se deu através da obtenção direta deste

monossacarídeo a partir da hemolinfa pelo parasito, ou indiretamente por meio da quebra de polissacarídeos dos tecidos do molusco em consequência à infecção.

Resultados apresentados por Mello-Silva et al. (2010), indicam uma diminuição significativa nos conteúdos de glicogênio em sítios específicos de *B. glabrata*, principalmente na glândula digestiva, após infecção experimental por *S. mansoni*. Tais observações remetem claramente a ocorrência de mecanismos fisiológicos intimamente associados na manutenção do estado bioenergético do hospedeiro, já que a partir dessa mobilização a normoglicemia era restabelecida.

Paralelamente, estudos de Brockelman et al. (1976) ressaltam que a infecção de *A. cantonensis* em *A. fulica* promoveu significativo decréscimo na concentração de glicose somente após a primeira semana de infecção, sendo o organismo hospedeiro capaz de restabelecer seu nível glicêmico logo em seguida. Este período, segundo os autores, é crucial para o molusco, uma vez que, caracteriza-se por uma elevada taxa de crescimento dos estágios intramolusco do nematóide. O intenso desenvolvimento das larvas de *A. cantonensis* observado durante os dias iniciais da infecção é provavelmente acompanhado por um grande consumo de glicose hemolinfática pelo parasito, edificando desta maneira o principal período de competição por nutrientes com o hospedeiro (BROCKELMAN; SITHITHAVORN, 1980). No presente estudo, observou-se uma severa diminuição no conteúdo de glicose logo após os períodos iniciais de infecção por *A. cantonensis* em *B. glabrata*, porém em detrimento ao estudo anterior, o estado hipoglicêmico deste permaneceu ao longo do período pré-patente do parasito, sugerindo uma menor plasticidade metabólica de *B. glabrata* quando comparado com *A. fulica*.

Aceleração do metabolismo anaeróbico nos moluscos infectados foi também observada, possivelmente como uma via alternativa de manutenção energética do hospedeiro. Estudos têm demonstrado uma sobreposição de centros enzimáticos relacionados à via glicolítica, especialmente a LDH, como fatores essenciais ao sucesso da infecção envolvendo tanto trematódeos (EL-ANSARY et al., 2000) quanto nematóides (STEWART et al., 1985). Essa ativação é fundamental a sobrevivência do hospedeiro, pois possibilita produzir energia e excretar substâncias oriundas do seu metabolismo sem causar, inicialmente grandes danos a estrutura celular (SCHOTLLER, 1986). Autores ainda relatam que *Biomphalaria alexandrina* infectada por *S. mansoni* apresenta uma reduzida capacidade em realizar as oxidações do ciclo do ácido tricarboxílico, baixa atividade da citocromo oxidase, reduzida capacidade de realizar a gliconeogênese e elevada produção de lactato (ISHAK et al., 1975). Assim, a possível redução no metabolismo aeróbico de *B. glabrata* infectadas por *A. cantonensis* pode resultar de eventos similares já descritos em moluscos infectados por larvas de trematódeos.

Stewart et al. (1985), após investigarem alterações patofisiológicas em *B. glabrata* infectada por *Angiostrongylus costaricensis*, observaram mudanças no conteúdo de glicose nos moluscos infectados, caracterizado pelo aumento nos níveis hemolinfáticos deste açúcar a partir do 12^o dia pós infecção, atingindo valores significativamente maiores após 27^o dia de infecção em comparação ao grupo controle (não infectado). O aumento de glicose observado neste estudo ocorreu mediante à diminuição dos conteúdos de glicogênio da massa cefalopediosa e do aumento desse polissacarídeo na glândula digestiva dos animais infectados. Nossos resultados indicam que, embora ocorra uma marcante diminuição nos conteúdos de glicogênio tanto na glândula digestiva quanto na massa cefalopediosa, a mesma não se mostrou capaz em restabelecer os valores basais de glicose nos grupos infectados, sugerindo que neste sistema, *A. cantonensis* induz alterações mais severas no metabolismo de carboidratos em *B. glabrata* do que *A. costaricensis*.

Os conteúdos de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *B. glabrata* analisados durante o desenvolvimento dos estágios larvais intramolusco de *A. cantonensis*

foram significativamente reduzidos neste período, sendo que esta diminuição é muito mais drástica na massa cefalopediosa. Estudo realizado por Shih e Chen (1982) registrou atividade de enzimas glicolíticas em exemplares juvenis de *A. cantonensis*, indicando a presença de uma via oxidativa voltada para a manutenção do equilíbrio energético do parasito. Deste modo, este maior decréscimo de glicogênio registrado no tecido muscular pode em parte ser explicado pela presença de estágios L₃ do parasito, que segundo Hexiang et al. (2009), após estudarem o ciclo biológico de *A. cantonensis* sob condições experimentais, concluíram ser o principal sítio de localização e distribuição das larvas, que passam a utilizar indiretamente este polissacarídeo como substrato energético mediante sua mobilização pelo hospedeiro, como tentativa de normalizar os valores basais de glicose essencial a sua sobrevivência.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.30-37, 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.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.; 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.

CHENG, T.C.; SNYDER, R.W. Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I. A review. II. The utilization of the host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glypthelminis pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. ***Transactions of the American Microscopical Society***, v.81, p.209-228, 1962.

DIAZ, J.H. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. ***The Journal of the Louisiana State Medical Society***, v.160, p.333-342, 2008.

EL-ANSARY, A.; SAMMOUR, E.M.; MOHAMED, A.M. Susceptibility of *Biomphalaria alexandrina* to infection with *Schistosoma mansoni*: Correlation with the activity levels of certain glycolytic enzymes. ***Journal of the Egyptian Society of Parasitology***, v.30, p.547-560, 2000b.

FRIEDLE, F.E. Glucose in the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*: Basal values and an effect of ingested carbohydrate. ***Comparative Biochemistry Physiology (A)***, v.39, p.605-610, 1971.

- HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angyostrongylus 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.
- 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.
- MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, 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. *hislopii* latex. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.492-495, 2010.
- 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.
- PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v.55, p.105-111, 1975.
- 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, EM. A method for glycogen determination in mollusc. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.37, n.3, 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.
- QIAO-PING, W.; DE-HUA, L.; XING-QUAN, Z.; XIAO-GUANG, C.; ZHAO-RONG, L. Human angiostrongyliasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.8, p.621-630, 2008.
- SAUERLANDER, R. Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.49, p.263-80, 1976.
- SCHOTTLER, U. Weitere untersuchungen zun anaeroben energiestoffwechsel des 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*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.13, p.114–119, 1982.

STANISLAWSKY, E.; BECKER, W. Influence of semi-synthetic diets, and infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda) on the metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **Comparative Biochemistry physiology (B)**, v.63, p.527-533, 1979.

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.

TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S.; LIN, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, W.R.; HUANG, C.K.; YEN, C.M. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. **American Journal Medicine**, v.111, p.109- 114, 2001.

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

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 infection with and the distribution of *Angionstrongylus cantonensis* larvae in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.53, p.247-250, 1977.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que a infecção experimental por *A. cantonensis* induziu variações no perfil reprodutivo de seu hospedeiro intermediário, *B. glabrata*, sendo constatada uma significativa redução no número de ovos/molusco, número de massas ovíferas/molusco, número de ovos/massa e viabilidade caracterizando, portanto o fenômeno da castração parasitária. Com propósito de agregar informações a fim de determinar o possível mecanismo relacionado na ocorrência deste fenômeno, análises histológicas de parte do tecido gonadal dos grupos infectados e controle foram realizados, além de testes bioquímicos, voltados para a extração e quantificação do galactogênio, uma importante reserva de carboidratos estocados exclusivamente em células especializadas da glândula de albúmen, essencial ao processo reprodutivo do hospedeiro por configurar parte estrutural do fluído perivitelíco, utilizado como principal substrato energético durante etapa de desenvolvimento embrionário.

As análises histológicas não demonstraram alterações nos tecidos gonadais de moluscos infectados quando comparados com aqueles não infectados, bem como, a total ausência de estágios evolutivos do parasito, com a estrutura e funcionalidade do órgão preservado. Entretanto, quando analisados os conteúdos de galactogênio, observamos um significativo decréscimo desse polissacarídeo na glândula de albúmen de moluscos infectados, sendo esta diminuição manifestada principalmente a partir da segunda semana de infecção, período que coincidiu com a redução do desempenho reprodutivo do hospedeiro, sugerindo que a ocorrência desse fenômeno “castração parasitária” provavelmente decorre em razão das alterações nutricionais impostas pelo processo da infecção.

Essa possibilidade torna-se melhor compreendida a partir das alterações confirmadas tanto no metabolismo de proteínas, quanto no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata*. No primeiro caso, a infecção resultou em um estado hipoproteínêmico, caracterizado por uma severa redução dos conteúdos de proteínas totais hemolinfáticas. Essa redução indica uma resposta fisiológica adaptativa do hospedeiro à infecção, o qual passa a utilizar aminoácidos como substrato alternativo para a manutenção de seu metabolismo oxidativo.

Junto a essa redução, alterações nos produtos nitrogenados de degradação foram também observados, com acúmulo de uréia e uma redução significativa nos conteúdos de ácido úrico hemolinfáticos confirmados nos grupos infectados. O aumento hemolinfático de uréia provavelmente decorre em razão ao processo dessaminativo de aminoácidos, resultante da intensa proteólise induzida pela infecção. Além disso, nossos resultados confirmam a inversão no padrão de excreção do molusco hospedeiro de uricotélico para ureotélico, indicando um mecanismo interessante de adaptação do hospedeiro a condições de estresse, além de ser extremamente útil às larvas em desenvolvimento, já que a ativação do ciclo da ureia resulta na maior aquisição de arginina pelo parasito, servindo de suporte para seu desenvolvimento.

Paralelamente a essas alterações, o aumento na atividade das aminotransferases (AST e ALT) foi também demonstrado nos grupos infectados. Tal aumento ratifica o envolvimento dessas enzimas na associação entre o metabolismo de proteínas e o metabolismo de carboidratos, por catalizar a transferência reversível do grupamento amina de um aminoácido para um α -ceto ácido, utilizados como substrato na glicogênese para a síntese de uma nova glicose. Esse mecanismo é vital a sobrevivência do hospedeiro, possibilitando-o sintetizar glicose a partir de substratos não glicídicos, especialmente aspartato e alanina, como tentativa de restabelecer a normoglicemia nos animais infectados. Nesta circunstância, é bem provável que moluscos infectados apresentem uma reduzida capacidade em realizar as oxidações do ciclo do ácido tricarboxílico, ajudando a explicar o aumento da atividade da LDH.

8 CONCLUSÕES

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

- A infecção experimental de *Biomphalaria glabrata* por estágios larvais de *Angiostrongylus cantonensis* resultou em uma clara diminuição da atividade reprodutiva do hospedeiro, a partir da segunda semana de infecção, caracterizando o fenômeno de castração parasitária parcial e indireta porque as larvas não se localizavam no ovotestis.
- A redução nos conteúdos de galactogênio no complexo glândula de albúmen-ovotestes de moluscos infectados a partir da segunda semana indica comprometimento do estado energético do molusco, confirmando que as alterações observadas no padrão reprodutivo decorre de um processo indireto, caracterizados pela ausência das larvas no ovotestis.
- O aumento nos conteúdos hemolinfáticos de uréia e a diminuição nos valores de ácido úrico, sugerem uma inversão do padrão de excreção dos moluscos infectados de uricotelico para ureotelico.
- Uma redução gradativa nos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa de moluscos infectados foi observada, com o menor valor registrado na terceira semana de infecção, provavelmente em resposta ao balanço energético negativo imposto pela infecção.
- Os valores crescentes das transaminases (ALT e AST) com avançar da infecção sugerem uma tentativa de manutenção do estado energético do hospedeiro, ou ainda, em resposta a lesões teciduais resultantes do processo de migração larval até alcançar seu completo desenvolvimento.
- 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.
- O aumento na atividade da LDH verificado em moluscos infectados indica uma aceleração do metabolismo anaeróbico nos moluscos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, A.F. Resistência genética a helmintos gastrointestinais. V simpósio da sociedade brasileira de melhoramento animal. p. 23-27, 2004.
- 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. 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, 1967.
- BAKRY, F.A. Effect of Infection with *Shistosoma mansoni* on Some Biological Parameters in *Biomphalaria alexandrina* Snails. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.4, n.3, p.180-190, 2009.
- 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.
- BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. **Evolution**, v.29, p.335-352, 1975.
- 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.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation-ammonia, urea, and uric acid- in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.51 A, p.407-411, 1975.

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

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

BLASCO, J.; PUPPO, J. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.122, p.253-263, 1999.

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.

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.

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.; COOPERMAN, J.S. Studies of host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. V. The invasion of the reproductive system of *Helisoma trivolvis* by the sporocysts and cercariae of *Glythelmins pennsylvaniensis* Cheng. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.83, p.12-23, 1964.

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.

CHRISTIE, J. D.; FOSTER, W. B.; STAUBER, L. A. The effect of parasitism and starvation on carbohydrate reserves of *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.23, n.1, p.55-62, 1974.

COOPER, L.A.; RICHARDS, C.S.; LEWIS, F.A.; MINCHELLA, D.J. *Schistosoma mansoni* between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental parasitology**, v.79, p.21-28, 1994.

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.

CREWS, A.E.; YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on level of translatable mRNA and on polypeptide synthesis in the ovotestis and albumen gland of *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.72, p.368-380, 1991.

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 JONG-BRINK, M.; BERGAMIN-SASSEN, M.; SOTO, M.S. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. **Parasitology**, v. 123, p.129–41, 2001.
- DE JONG BRINK, M. The effects of desiccation and starvation upon the weight, histology and ultrastructure of the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v.136, p.229-262, 1973.
- DE JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M.M.; BOER, H.H. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.65, p.91–100, 1988.
- DE SOUZA, R.M.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M.; PINHEIRO, J. The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenads products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.43, p.365–371, 2000
- 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.
- DOUGLAS, W.R.; HASKIN H.H. Oyster-MSX interactions: alterations in hemolymph enzyme activities in *Crassostrea virginica* during the course of *Minchinia nelsoni* disease development. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.27, p. 317-323, 1976.
- 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.
- EL-SAADANY, M. M.; MOHAMED, A. M. Effect of infection with *Trichobilharzia ocellata* and *Schistosoma mansoni* on the ultrastructure of the albumen gland of their respective hosts, *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria glabrata*. **Folia Morphologica**, v.37, p.264-273, 1989.

- EL-SHAZLY.; EL-HAMSHARY, E.M.; EL-SHEWY, K.M.; RIFAAT, M.M.; EL-SHARKAWY, I.M. Incidence of *Parastrostrongylus cantonensis* larvae in different freshwater snail in Dakahlia Governorate. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v.32, p.579-588, 2002.
- FERNANDO, R.L. Angiostrongyliasis. In: FERNANDO, R.L. **Tropical Infectious Diseases**. London, Greenwich Medical Media, 2001, p.107-110.
- GOUDSMIT, E.M.; ASHWELL, G. Enzymatic synthesis of galactogen in the snail, *Helix pomatia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.19, p.417-422, 1965.
- GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOMÉ, J.W.; PINTO, S.C.C.; CAMILO-COURA, L.; LENZI, H. L. *Phylliocalis 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 *Angyonstrongylus cantonensis* light microscopy. **International Journal of 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.
- 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.
- HINKLE, P.C.; MCCARTY, R.E. How cells make ATP. **Scientific American**, v.238, p.104–123, 1978.
- HODASI, J.K.M. The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea truncatula*. **Parasitology**, v.65, p.359-369, 1972.
- HORDIJK, P.L.; DE JONG-BRINK, M.; TERMAAT, A. The neuropeptide schistosomin and hemolymph from parasitized snails induce similar changes in excitability in neuroendocrine cells controlling reproduction and growth in a freshwater snail. **Neuroscience Letters**, v.136, n.2, p.193–7, 1992.
- HUNG, T.P.; CHEN, E.R. Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*). **Handbook of Clinical Neurology**, v.52, p.545-562, 1988.
- IIVORKII, I.P. Interrelations in the *Fasciola hepatica*-water snail system. **Parazitologiya**, v.23, p.355-358, 1989.

- 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.
- JARNE, P.; DELAY, B. Populations genetics of freshwater snails. **Tree**, v.6, p.383-386, 1991.
- 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.
- KURELEC, B. Catabolic path of arginine and NAD regeneration in the parasite *Fasciola hepatica*. **Comparative Biochem Physiology**, v.51b, p.151-156, 1975.
- 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.
- LEE, F.O.; CHENG, T.C. *Schistosoma mansoni*: alterations in total protein and hemoglobin in the haemolymph of infected *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.31, p.203-216, 1972.
- 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, 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.

LIRA, C. R. S.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M.; PINHEIRO, J. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, p.907-913, 2000.

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.

LV, S.; ZANG, Y.; LIU, H.; ZANG, CHAO-WEI.; STEINMANNI.; NONG, X.; UTZINGER, J. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1351-1359, 2009.

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.

MALM, A. W. Om Cirripeder funna vid Bohuslans Kust. Goteborgs Naturhist. **Museum, Zool.-zoot. Afdelningarna**, v.3, p.26-32, 1881.

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.

MASOLA, B.; CHIBI, M.; KANDARE, E.; NAIK, Y.S.; ZARANYIKA, M.F. Potential marker enzymes and metal-metal interactions in *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to cadmium. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.70, p.79-87, 2008.

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

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

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. *hislopilii* 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. *hislopilii* látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.492-495, 2010.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; BEZERRA, J.C.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; DE L. RODRIGUES, M. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.671-674, 2007.

MINCHELLA, D.J. Host-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v.90, p.205-216, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e controle da esquistossomose (PCE)/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. Ed. Brasília editora do Ministério da Saúde - Série A. Normas e manuais técnicos, 2007. 178p.

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 truncates*. **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 fur Parasitenkunde**, v.43, p.1-16, 1973.

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.

- MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. Enzimas. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.275-325.
- 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 *Haemostrongylus 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 *Thaistrongylus harinasutai* gen. et sp.n. (Metastrongyloidea: Angiostrongylidae) from wild rats. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.27, p.5-10, 1979.
- 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.
- PEARSON, E.J.; CHENG, T.C. Studies on parasitic castration: Occurrence of a gametogenesis inhibiting factor in extracts of *Zoogonius lasius* (Trematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.46, n.2, p.165-168, 1985.
- 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). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407- 410, 1994.
- PINHEIRO, J.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M. Aminotranferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1161–1164, 2001.

- 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 metacercariae on the digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology**, v.63, p.483-489, 1971.
- REINHARD, E. G. Parasitic castration of Crustacea. **Expl. Parasit.** v.5, p.79-107, 1956.
- 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.
- ROTHSCHILD, M. Gigantism and variation in *Peringia ulvae* Pennant 1777, caused by infection with larval trematodes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.30, p.537-546., 1936.
- RUPP, J.C. Parasite-altered behaviour: impact of infection and starvation on manting in *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**, v.113, p.357-365, 1996.
- SAUERLANDER, R. Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 49, p. 263-80, 1976.
- SCHALLIG, D.H.F.H.; HORDIJK, P.L.; OOSTHOEK, P.W.; JONG-BRINK, M. Schistosomin, a peptide present in the hemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail central nervous system. **Parasitology Research**, v.77, n.2, p.152–6, 1991.

SCHMALE, H.; BECHER, W. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity, in starvation and with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.58 B, p.321-330, 1977.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática. **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.

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, J.G.R.; SIMÕES, R.O.; THIENGO, S.A.R.C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; RODRIGUES-SILVA, R.; LANFREDI, R. M.; MALDONADO, A. A New Metastrongilid Species (Nematoda: Metastrongylidae): A Lungworm from *Akodon montensis* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v.95, p.1507-1511, 2009.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; FERREIRA, S.S.; GUIMARÃES, C.T.; VIEIRA, L.B.F.; MARIANI, R. Moluscos límnicos da microregião de Belo Horizonte, Minas Gerais, com ênfase 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 Brasil, Série Esquistossomose 1, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 76 pp, 1990.

STANISLAWSKI, E.; BECHER, W. Alterations of free amino acid content in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) in starvation and after infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.63 B, p.477-482, 1979.

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.

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. Helmitoses 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.

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

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.; 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, 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, 2011.

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, 2011.

- VAN ELCK, R.; JOOSSE, J. The UDP-galactose 4-epimerase of the albumen gland of *Lymnaea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematode infection on its activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.70B, p.45-52, 1981.
- WANG, K.; FENG, L.; WEI, X. One case of angiostrongyliasis misdiagnosed as tuberculosis. **Chinese Journal of Antituberculosis**, v.29, p.469–70, 2007.
- WANG, Q.P.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. Invasive freshwater snail, China. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1119–20, 2007.
- WILSON, R.A.; DENISON, J. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.61, p.109–119, 1980.
- 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 angionstrongylosis. **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.
- 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.
- ZANG, SI-MING.; NIAN, H.; WANG, B.; LOKER, E.S.; ADEMA, C.M. Schistosomin from the snail *Biomphalaria glabrata*: Expression studies suggest no involvement in trematode-mediated castration. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.165, p.79-86, 2009.

10 ANEXOS