

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

TESE

***Bulimulus tenuissimus* (MOLLUSCA) COMO NOVO HOSPEDEIRO EXPERIMENTAL
PARA *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA), UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
FISIOLÓGICO DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

FLORENCE GONÇALVES MARTINS

2018



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

***Bulimulus tenuissimus* (MOLLUSCA) COMO NOVO HOSPEDEIRO EXPERIMENTAL
PARA *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA), UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
FISIOLÓGICO DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

FLORENCE GONÇALVES MARTINS

Sob a orientação do Professor Dr.

Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação dos Professores Drs.

Juberlan Silva Garcia e Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M379b MARTINS, FLORENCE GONÇALVES, 1963-
Bulimulus tenuissimus (MOLLUSCA) COMO NOVO
HOSPEDEIRO EXPERIMENTAL PARA Angiostrongylus
cantoniensis (NEMATODA), UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
FISIOLÓGICO DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO /
FLORENCE GONÇALVES MARTINS. - 2018.
81 f.: il.

Orientador: JAIRO PINHEIRO SILVA.
Coorientador: CARLOS LUIZ MASSARD.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2018.

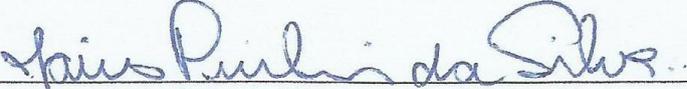
1. NEMATODA. 2. MOLLUSCA. 3. PARASITOLOGIA. 4.
RELACIONAMENTO PARASITO-HOSPEDEIRO. 5. FISIOLOGIA
COMPARADA. I. SILVA, JAIRO PINHEIRO, 1969-, orient.
II. MASSARD, CARLOS LUIZ, 1948-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. IV. Título.

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

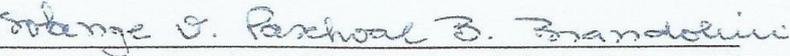
FLORENCE GONÇALVES MARTINS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

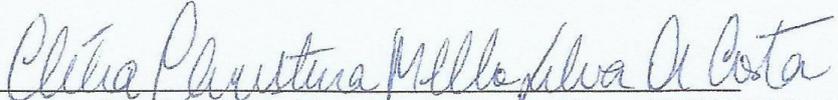
TESE APROVADA EM 28/02/2018.



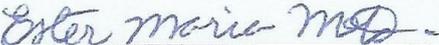
Jairo Pinheiro da Silva, Dr., UFRRJ (Orientador)



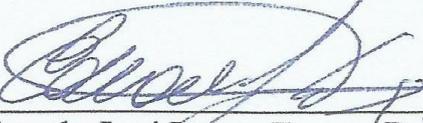
Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, Dra., UFRRJ



Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa, Dra., FIOCRUZ, RJ



Ester Maria Mota, Dra., FIOCRUZ, RJ



Eduardo José Lopes Torres, Dr., UERJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo e por todos que estiveram comigo até aqui.

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, junto ao PPGCV, durante todo o período de duração do curso.

RESUMO

MARTINS, Florence Gonçalves. *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca) como um novo hospedeiro experimental para *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda), um estudo morfológico e fisiológico da interação parasito-hospedeiro. 2018. xv + 66p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os moluscos são um requisito essencial para a conclusão do ciclo de vida pelo nematoide metastrogilídeo *Angiostrongylus cantonensis*, o agente causador de infecções em animais domésticos e selvagens, principalmente roedores, e também de angiostrongilíase neural ou meningite eosinofílica em humanos. O gastrópode terrestre *Bulimulus tenuissimus* é amplamente distribuído no território brasileiro e há outras espécies do mesmo gênero que ocorrem no Brasil e outros países, sobrepondo-se às regiões em que há relatos à ocorrência de *A. cantonensis* e angiostrongilíase. Apesar disso, não há registro na literatura, acerca desta espécie como hospedeiro intermediário para *A. cantonensis*. O presente estudo teve como objetivo infectar experimentalmente o molusco *B. tenuissimus*, utilizando larvas L1 de *A. cantonensis*, em condições laboratoriais, e acompanhar as alterações fisiológicas ocorridas. Para tal, durante o período do estudo, foram analisados os parâmetros da biologia reprodutiva de *B. tenuissimus*, metabolismo de carboidratos, produtos nitrogenados e cálcio. Também foram realizados estudos morfológicos, utilizando técnicas de histologia e microscopia eletrônica. Três semanas após a exposição às larvas L1, foi possível recuperar 17,2% das larvas L3 utilizadas para a exposição dos moluscos (1.200 larvas L1). As larvas foram observadas na massa cefalopédiosa (pé), ovotestis e nos tecidos do manto, dentro de uma estrutura granulomatosa constituída por infiltração hemocitária, mas não houve deposição de cálcio ou colágeno nessas estruturas em quantidade significativa. Os caracóis infectados apresentaram redução no tecido muscular fibroso na região do pé, perda da organização acinar na glândula digestiva, com aumento de material amorfo dentro dos ácinos e perda do padrão epitelial da organização nuclear nas células acinares. No entanto, o ovotestis, mesmo apresentando larvas em desenvolvimento, não foi afetado pela infecção, uma vez que houve um grande número de oócitos em desenvolvimento e espermatozóides em diferentes estágios de formação. Nos parâmetros reprodutivos estudados, os moluscos infectados apresentaram um pequeno aumento (+7%) no número total de ovos postos na primeira semana de infecção e uma queda de 5,4 % no número de moluscos eclodidos na segunda semana de infecção em relação aos não infectados. O conteúdo de galactogênio mostrou uma relação negativa com o tempo de infecção. O conteúdo de glicose na hemolinfa aumentou (+71,56%) na primeira semana pós-exposição, diminuindo na segunda (-4,92%) e terceira (+13,74%) semanas. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) aumentou na primeira semana ($11,00 \pm 4,62 \text{U/L}$) e mais ainda na segunda semana ($14,00 \pm 5,30 \text{U/L}$) pós-exposição, mas as variações não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle ($10,00 \pm 0,56 \text{U/L}$). As reservas de glicogênio da massa cefalopédiosa e da glândula digestiva foram reduzidas nas três semanas pós-exposição. O conteúdo de ácido pirúvico na hemolinfa de moluscos infectados foi reduzido na primeira (41,52%) e segunda (45,66%) semanas pós-exposição, e de ácido oxálico, aumentou (33,53 mg/g) em relação ao grupo controle (28,05mg/g). Contudo,

as variações não foram significativas. A concentração de proteínas totais aumentou na primeira semana (19,56%), retornando a valores próximos aos observados para o grupo controle, o que pareceu estar relacionado à lise dos tecidos, uma vez que o mesmo padrão de variação foi observado para as atividades da AST e ALT. Associado a isto, uma inversão do padrão excretor, passando a predominantemente uricotélico foi observado na segunda semana pós exposição, retornando ao padrão ureotélico no final do período pré patente. A infecção provocou hipercalcificação na concha de *B. tenuissimus* infectado com *A. cantonensis*, com aumento de 242% na concentração de CaCO₃, ao final do período pré patente; e hipercalcemia, sobretudo no final da terceira semana de infecção (+18,51%) em relação ao grupo controle. Os resultados revelam que *B. tenuissimus* é um hospedeiro experimental potencial, que apresenta um padrão de resposta fisiológica à infecção com *A. cantonensis* robusto, sendo capaz de manter seus processos fisiológicos básicos, além de suprir a demanda do parasito em desenvolvimento.

Palavras-chave: Bulimulidae; Metastrogylidae; Angiostrongilíase Neural, hospedeiro molusco

ABSTRACT

MARTINS, Florence Gonçalves. *Bulimulus tenuissimus* (mollusca) as a potential experimental host for *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda), a morphological and physiological study of host-parasite interaction. 2018. xv + 66p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Molluscs are an essential requirement for the completion of the life cycle by the metastarogillid nematode *Angiostrongylus cantonensis*, the causative agent of infections in domestic and wild animals, mainly rodents, as well as neural angiostrongyliasis or eosinophilic meningitis in humans. The terrestrial gastropod *Bulimulus tenuissimus* is widely distributed in Brazilian territory and there are other species of the same genus that occur in Brazil and other countries, overlapping regions where there are reports of *A. cantonensis* and angiostrongyliasis. Despite this, there is no record in the literature about this species as an intermediate host for *A. cantonensis*. The present study aimed to experimentally infect the *B. tenuissimus* mollusc, using *A. cantonensis* L1 larvae under laboratory conditions, and to monitor the physiological changes that occurred. For this, during the period of the study, the parameters of *B. tenuissimus* reproductive biology, carbohydrate metabolism, nitrogen products and calcium were analyzed. Morphological studies were also performed using histology and scanning electron microscopy. Three weeks after exposure to L1 larvae, it was possible to recover 17.2% of the L3 larvae used for exposure to molluscs (1,200 L1 larvae). The larvae were observed in the cephalopodal mass (foot), ovotestis and mantle tissues, within a granulomatous structure constituted by hemocytes infiltration, but there was no deposition of calcium or collagen in these structures in a significant amount. The infected snails showed reduction in the fibrous muscle tissue in the foot, loss of acinar organization in the digestive gland, with increase of amorphous material inside the acini and loss of the epithelial pattern and the nuclear organization in the acinar cells. However, the ovotestis, even presenting developing larvae, was not affected by the infection, since there was a large number of developing oocytes and spermatozoa at different stages of formation. In the reproductive parameters studied, infected molluscs showed a small increase (+ 7%) in the total number of eggs laid in the first week of infection and a decrease of 5.4% in the number of molluscs hatched in the second week of infection in relation to uninfected molluscs. The galactogen content showed a negative relation with the time of infection. The glucose content in hemolymph increased (+ 71.56%) in the first week post-exposure, decreasing in the second (-4.92%) and third (+ 13.74%) weeks. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) increased in the first week (11.00 ± 4.62 U/L) and even more in the second week (14.00 ± 5.3 U/L) after exposure, but the variations were not statistically significant when compared to the control group (10.00 ± 0.56 U/L). The glycogen stores in the cephalopodal mass and the digestive gland were reduced in the three weeks post-exposure. The content of pyruvic acid in the hemolymph of infected molluscs was reduced in the first (41.52%) and second (45.66%) weeks post-exposure, and oxalic acid increased (33.53 mg/g) in relation to the control group (28.05 mg/g). However, the variations were not significant. The total protein concentration increased in the first week (19.56%), returning to values close to those observed for the control group, which appeared to be related to tissue lysis, since the same pattern of variation was observed for the activities of AST and ALT was observed. Associated to this, a reversal

of the excretory pattern, passing to predominantly uricotelic was observed in the second week after exposure, returning to the ureotelic pattern at the end of the pre patent period. The infection caused hypercalcification in *B. tenuissimus* shell infected with *A. cantonensis*, with a 242% increase in CaCO₃ concentration, at the end of the pre patent period, in infected mollusc shells and hypercalcemia, especially at the end of the third week of infection (+18.51%) in relation to the control group. The results show that *B. tenuissimus* is a potential experimental host, which presents a physiological response pattern to infection with *A. cantonensis*, being able to maintain its basic physiological processes, besides supplying the parasite in development.

Key words: Bulimulidae; Metastrogylidae; Snail host; Neural angiostrongyliasis.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- Figura 1.** Microscopia de luz evidenciando a região da bolsa copuladora de *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: MALDONADO JR, Arnaldo; SIMÕES, Raquel; THIENGO, Silvana. Angiostrongyliasis in the Americas. In: *Zoonosis*. InTech, 2012..... 3
- Figura 2.** Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis*. **1** – consumo de moluscos infectados com larvas L3 pelos roedores; **2** – eliminação de larvas L1 nas fezes dos roedores infectados; **3** – infecção de moluscos com larvas L1, onde se dará seu desenvolvimento até L3 por sucessivas mudas; **4** – a infecção de humanos pode ser dar: **a** – pela ingestão de moluscos infectados contendo larvas L3; **b** – ingestão de vegetais crus contaminados com larvas L3; ou, **c** – ingestão de hospedeiros paratênicos contendo larvas L3.....
- Figura 3.** Distribuição de *Bulimulus tenuissimus*. **A.** No mundo (Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Bulimulus+tenuissimus> – Acesso em 03/08/2017); **B.** No Brasil. ● localidade de ocorrência da espécie; ● ocorrência para o estado, não detalhado (Fonte: <http://www.conchasbrasil.org.br/mapas/default.asp?idconcha=1189> - Acesso em 03/08/2017)..... 8
- Figura 4 . Figura 4.** Espécimes de *Bulimulus tenuissimus*. **A.** Exemplar adulto, evidenciando características da concha e parte da massa cefalopediosa (Disponível em <<http://www.biofaces.com/post/66993/caracol-terrestre/>> . Acesso em 12 abr 2018). **B.** Moluscos criados sob condições de laboratório, com 15-20 dias de eclodidos, evidenciando a alimentação feita a base de vegetais frescos e de ração para aves triturada e peneirada enriquecida com carbonato de cálcio na proporção de 3:1 elaborada segundo Silva (2008). Barra de escala = 2,0 cm. Fonte: Autora..... 16
- Figura 5 .** Procedimento realizado para a coleta de hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus*. Fonte: Autora..... 17
- Figura 6.** Larvas de terceiro estágio (L3) de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas de *Bulimulus tenuissimus* após 3 semanas (22 dias) de infecção experimental. **A.** Vista geral da larva com a presença do bulbo do esôfago (eb) e evidenciando a forma em “Q” característica de L3. **B-C.** Região anterior de larva L3 evidenciando a cavidade bucal, com as estruturas em forma de haste (rs) e as extremidades expandidas (kt) e canal e poro excretor (ep). **D.** Região posterior do copor da larva L3 onde é possível observar a região do ânus e a extremidade da cauda. Imagens obtidas por microscopia de luz de campo claro..... 22

- Figura 7.** Corte de tecido da região cefalopodal de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectado com *Angiostrongylus cantonensis*. **A.** Observação de duas larvas (l) em corte transversal, onde observamos o espessamento do tecido ao seu redor, o qual dá origem a estrutura granuloma-like (g) que envolve a larva em desenvolvimento, e uma outra larva em corte longitudinal. **B.** Observação de corte transversal de uma larva (l) em desenvolvimento no interior do molusco, onde observamos o corpo da larva, separado dos tecidos do molusco por uma estrutura dando origem a uma cápsula (s) que individualiza a larva dos demais tecidos do molusco hospedeiro..... 23
- Figura 8.** Secções histológicas de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. **A-F.** Secção de massa cefalopediosa mostrando perfis larvais (l) com numerosos hemócitos (ih) em torno deles. **F.** Corte evidenciando ausência de marcação para cálcio nas larvas (círculo). A, corados com hematoxilina e eosina; B-E corados com Tricrômico de Gomori; F, corado pela técnica de Von Kossa para detecção de cálcio..... 25
- Figura 9.** Secções histológicas de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. Região da glândula digestiva com vacuolização do citoplasma, perda da estrutura cúbica do epitélio do ácino (a), material amorfo (ma) dentro do lúmen, cuja luz está aumentada (is) e desorganização nuclear. B e F, corados com hematoxilina e eosina; A e C, corados com Tricrômico de Gomori..... 26
- Figura 10.** Secções histológicas de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. **A-C.** Região da massa cefalopediosa mostrando glândulas de muco com grandes quantidades de glicogênio em seu interior (seta branca) e perfis larvais (cabeça de seta) com depósitos de glicogênio dentro deles. **D.** Secção da glândula digestiva com desorganização da estrutura acinar e vacuolização do citoplasma (vc). Secções com 5µm. Corados pela reação com Ácido Periódico de Schiff (PAS). A e D barra de escala=100µm; B e C barra de escala=200µm..... 27
- Figura 11.** Relação entre o tempo de infecção com larvas de *Angiostrongylus cantonensis* e o número total de ovos por *Bulimulus tenuissimus*..... 29
- Figura 12.** Relação entre o tempo de infecção com larvas de

<i>angiostrongylus cantonensis</i> e o número de filhotes eclodidos/número de ovos postos por <i>Bulimulus tenuissimus</i>	29
Figura 13. Conteúdo de galactose (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na glândula de albúmem de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	30
Figura 14. Secções histológicas da região do ovotestis de <i>Bulimulus tenuissimus</i> experimentalmente infectados com 1.200 larvas L ₁ de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , por três semanas. A. Molusco não infectado evidenciando o aspecto normal da gônada, contendo espermatozoides (s) em diferentes estágios de desenvolvimento e oócitos (ov). B. Região do aparelho reprodutor e órgãos acessórios, onde podemos observar a glândula de albúmem (ag) fortemente corada evidenciando a grande quantidade de galactogênio neste órgão e parte da gônada (go) com oócitos (ov) e da glândula digestiva (dg). (b - inset). Detalhe da glândula de albúmen corada pelo PAS. C-F. Região do ovotestis de moluscos infectados, com larvas em desenvolvimento nos tecidos do órgão (seta branca) com infiltrados hemocitários (seta preta), glândula de albúmen (ag), porém ainda com a presença de espermatozoides (s) e oócitos (ov) em diferentes estágios de desenvolvimento. Há formação de granuloma (g) ao redor da larva em desenvolvimento. A, corado pela hematoxilina e eosina; B, corado pela reação do PAS para glicogênio; C,D e F, corado pelo trocrômico de Gomori; E, corado pela técnica de von Kossa para detecção de cálcio.....	31
Figura 15. Mudanças metabólicas em <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , por três semanas. A. Conteúdo de glicose, mg/dL, na hemolinfa. B. Atividade da lactato desidrogenase, U/L, na hemolinfa. C-D. Conteúdo de glicogênio na massa cefalopediosa e na glândula digestiva, mg de glicose/g de tecido peso fresco, repectivamente.....	35
Figura 16. Mudanças metabólicas em <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , por três semanas. Conteúdo de ácidos orgânicos, oxálico e pirúvico, na hemolinfa, mg/g. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos contole ao longo das três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre eles.....	36
Figura 17. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de <i>Bulimulus tenuissimus</i> com larvas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , e o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.....	37
Figura 18. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de <i>Bulimulus tenuissimus</i> com larvas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , e o conteúdo de ureia na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.....	38

Figura 19. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de <i>Bulimulus tenuissimus</i> com larvas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , e o conteúdo de ácido úrico na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.....	38
Figura 20. Relação entre a atividade das aminotransferases em hemolinfa de <i>Bulimulus tenuissimus</i> e o tempo após a exposição, em semanas, às larvas L1 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , experimentalmente, por três semanas. A. Atividade da aspartato aminotransferase (AST), expressa em U/L. B. Atividade da alanina aminotransferase (ALT), expressa em U/L.....	40
Figura 21. Relação entre o tempo de infecção de <i>Bulimulus tenuissimus</i> com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , expresso em semanas, e a concentração de cálcio. A. Hemolinfa, expresso em mg de cálcio/dL de hemolinfa; B. Concha, expresso em ppm de Ca ⁺⁺ /g de cinzas.....	42
Figura 22. Histoquímica para detecção de cálcio em tecidos de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados experimentalmente com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> . Técnica: von Kossa (Humason, 1979). A. Glândula digestiva, evidenciando intensa marcação de cálcio nas regiões de coloração preta; B. Massa cefalopediosa; C. Ovotestis; D. Massa cefalopediosa evidenciando as larvas de <i>A. cantonensis</i> em desenvolvimento sem a deposição de cálcio na região circunvizinha a estas.....	43

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

- Tabela 1 .** Alterações no número total de ovos postos e número de moluscos eclodidos/ovos postos por *Bulimulus tenuissimus* ao longo de três semanas após a exposição às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa nas três semanas. ^{a-b}=Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada semana do experimento, $P < 0,05$ ($X \pm SD$ =média±desvio padrão). N=número de dias em que foram coletados os ovos. N'=número de dias em que houve eclosão..... 28
- Tabela 2.** Concentração de glicose (mg/dL) e atividade da lactato desidrogenase (U/L) na hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* infectado experimentalmente com 1.200 larvas de *Angiostrongylus cantonensis*. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa nas três semanas. ^{a-b}=Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada semana do experimento, $P < 0,05$ ($X \pm SD$ =média±desvio-Padrão)..... 32
- Tabela 3.** Conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopediosa expresso em mg de glucose/g de tecido, peso fresco, em *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos pós-exposição, expresso em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre essas semanas. ^a=médias não diferem significativamente, $P < 0,05$ ($X \pm SD$ =média±desvio-padrão)..... 33
- Tabela 4.** Níveis de ácidos orgânicos na hemolinfa (mM) de *Bulimulus tenuissimus* infectados com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes períodos pós-exposição, expresso em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre essas semanas. ^a=médias não diferem significativamente, $P < 0,05$ ($X \pm SD$ =média±desvio padrão)..... 34
- Tabela 5.** Variação nos conteúdos de proteínas totais (g/L), ureia e ácido úrico, expressos em mg/dL, em hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* expostos às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente,

por três semanas. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância..... 37

Tabela 6. Variação na atividade das aminotrasferases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), em hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* expostos às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente, por três semanas. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b,c}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância..... 39

Tabela 7. Concentração de cálcio em hemolinfa *Bulimulus tenuissimus*, expressa em mg/dL, e em concha, expressoem ppm de Ca^{++} /g de cinzas, após a exposição às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b,c}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância..... 41

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Posição Taxonômica de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	3
2.2. Ciclo Biológicos de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	4
2.3. O Molusco <i>Bulimulus tenuissimus</i>	7
2.4. A Infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em humanos	9
2.5. Aspectos da relação entre <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e seu hospedeiro intermediário – molusco.....	10
2.5.1. Biologia reprodutiva.....	10
2.5.2. Metabolismo de carboidratos.....	11
2.5.3. Metabolismo de produtos nitrogenados.....	12
2.5.4. Alterações no metabolismo de cálcio.....	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos Gerais	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Coleta e Manutenção dos Moluscos	15
4.2. Obtenção dos Parasitos	16
4.3. Infecção Experimental	17
4.4. Formação dos Grupos	17
4.5. Dissecção e Coleta do Material	17
4.6. Biologia reprodutiva de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados experimentalmente com o <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	17
4.7. Parâmetros Bioquímicos	17
4.7.1. Determinação das Concentrações de Galactogênio e Glicogênio	17
4.7.2. Determinação das concentrações de glicose, proteínas totais, ureia, ácido úrico e atividade das enzimas lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase	18
4.7.3. Determinação de Cálcio	19
4.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	19

4.9. Análises morfológicas.....	19
4.9.1. Análise Histológica e Histoquímica	19
4.9.2. Microscopia eletrônica de varredura das lâminas de histologia.....	19
4.10. Análises Estatísticas	20
5. RESULTADOS	21
5.1. Infecção Experimental e Recuperação das Larvas L3	21
5.2. Alterações na morfologia de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	23
5.3. Aspectos biologia reprodutiva de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados experimentalmente com o <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	27
5.4. Metabolismo de carboidratos	32
5.5. Metabolismo de produtos nitrogenados	36
5.6. Metabolismo de cálcio	41
6. DISCUSSÃO	44
6.1. Infecção experimental e recuperação das larvas L3	44
6.2. Análise histológica e histoquímica	45
6.3. Aspectos da biologia reprodutiva de <i>Bulimulus tenuissimus</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	45
6.4. Metabolismo de carboidratos	46
6.5. Metabolismo de produtos nitrogenados	49
6.6. Metabolismo de cálcio	50
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO 1 . Representação esquemática dos procedimentos para obtenção de moluscos <i>Bulimulus tenuissimus</i> e das larvas L1 e L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em condições de laboratório, e formação dos grupos de moluscos infectados experimentalmente.....	63
ANEXO 2 . Análises De Ácidos Orgânicos Em Hemolinfa – 23_05_2017.....	64
ANEXO 3 . ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY - MARTINS, F. G., LIMA, M., G., CASTRO, R. N., SANT’ANNA, L. D., SANTOS, M. A. J. dos, GARCIA, J. S., PINHEIRO, J. 2018. <i>Bulimulus tenuissimus</i> (mollusca) as a new potential host of <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (nematoda), a histological and metabolic study. J. Invert. Pathol., vol. 154, pp.65-78.....	65
ANEXO 4 . ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY.....	66

1. INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) é um nematoide parasito, conhecido como verme pulmonar do rato, pela sua localização durante a fase adulta nos seus hospedeiros definitivos, os roedores. Foi descrito inicialmente como *Pulmonema cantonensis* Chen, 1935, em Canton, na China, durante pesquisa parasitológica em ratos. O parasito também pode infectar outros animais, silvestres e domésticos, dentre eles ruminantes, cavalos, cães e aves e, também o homem, sendo por isso considerado uma zoonose (LINDO et al., 2002).

A infecção no homem ocorre através da ingestão de alimentos crus contendo as larvas infectantes ou pela ingestão de hospedeiros intermediários ou paratênicos. É uma das principais causas da meningoencefalite eosinofílica, uma doença que pode ser letal. A infecção humana foi descrita primeiro em Taiwan em 1945, e desde então vários surtos com centenas de casos tem sido descritos (WANG, 2012). No Brasil, foram descritos casos de angiostrongilíase neural em humanos, sendo o primeiro registro feito em um congresso, por Graziela Maria Zanini e Carlos Graeff-Teixeira em dois pacientes, em janeiro de 2007, no Estado do Espírito Santo, Brasil (CALDEIRA et al., 2007).

O ciclo de vida de *A. cantonensis* requer mais de um hospedeiro. Os roedores, geralmente do gênero *Rattus* Fisher Waldhein, 1803 atuam como hospedeiros definitivos, nos quais os adultos do parasito se reproduzem e as fêmeas liberam seus ovos dentro das arteríolas pulmonares. Nos ovos, as larvas de primeiro estágio (L1) se desenvolvem e eclodem, migrando para dentro dos alvéolos e para a faringe onde são d

eglutidas e através do trato gastrintestinal, serão eliminadas nas fezes. Moluscos gastrópodes terrestres e aquáticos são os hospedeiros intermediários e se tornam infectados através da ingestão e/ou penetração dessas larvas de primeiro estágio. No molusco as larvas passam por duas mudas, e se tornam infectantes (L3) em torno de 15 dias. Os moluscos são ingeridos pelos hospedeiros definitivos ou pelos hospedeiros paratênicos que podem ser planárias, sapos, crustráceos e lagartos (WANG, 2008; MALDONADO et al., 2012).

O parasito possui pouca especificidade pelo hospedeiro intermediário e uma grande diversidade de espécies de moluscos terrestres e aquáticos já foi descrita como hospedeiro. Os estudos têm sido direcionados para a identificação das espécies envolvidas em cada região onde o *A. cantonensis* é detectado em roedores e principalmente onde ocorrem casos humanos. O isolamento e identificação de *A. cantonensis*, em condições de laboratório foram registrados, pela primeira vez no Brasil, a partir de moluscos coletados no Estado do Espírito Santo, após a notificação de dois casos de angiostrongilíase em humanos. Foram coletados moluscos *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) (Veronicellidae), *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Subulinidae), *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) (Achatinidae) e *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821) (Xanthonychidae), todos contendo larvas de *A. cantonensis* (CALDEIRA et al., 2007).

A família Bulimulidae Tryon, 1896 é principalmente sul-americana e reúne moluscos de tamanho médio a grande (10 a 80 mm), sendo *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1935) amplamente distribuída pelo território brasileiro (MORRETES 1949; OLIVEIRA & ALMEIDA 1999; SIMONE 2006). Possuem concha ovalada, medindo de 12 a 20 mm de comprimento, com cinco a seis voltas. Em condições de laboratório, os animais podem alcançar até 27 mm de comprimento (SILVA et al. 2008).

Nessa família, *B. tenuissimus* é a espécie que apresenta importância parasitológica, pois o mesmo atua como hospedeiro intermediário de vários parasitos de animais domésticos. No Brasil, Carvalho et al. (2012), em coleta de moluscos em área endêmica para *A. cantonensis* examinaram alguns exemplares pertencentes à família Bulimulidae, como *Tomigerus* sp., *Pseudoxychona* sp., *Rhinus* sp., *Bulimulus* sp., os quais não apresentaram a infecção por esse parasito. Posteriormente, Oliveira et al. (2015) em coleta no município de São Gonçalo, RJ coletou juntamente com outros moluscos, *B. tenuissimus*, porém essa espécie não apresentou positividade para esse parasito.

Nesse contexto, os bulimúlídeos têm sido coletados, no Brasil e em outros países, sem, contudo, haver registro da presença de larvas de *A. cantonensis* (KIM, 2014; CARVALHO et al., 2012). Porém, recentemente, em uma Dissertação de Mestrado, defendida em julho de 2017, na Fundação Universidade Federal de Sergipe, Jucicleide Ramos de Souza, coletou 978 exemplares de moluscos terrestres, identificados em 11 espécies e dois gêneros: *A. fulica* (399 espécimes), *Cyclodontina fasciata* (225), *Subulina octona* (135), *Bulimulus tenuissimus* (104), *Leptinaria unilamellata* (56), *Sarasinula linguaeformis* (30), *Streptartemon cookeanus* (7), *S. quixadensis* (2), *Omalonyx* sp. (7), *Alopeas gracille* (6), *Tamayoa banghaasi* (3), *Latipes erinaceus* (2), *Helicina* sp. (2). Após, a obtenção de larvas de nematoides por digestão química dos tecidos moles, a autora realizou a infecção artificial em *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), da linhagem Wistar e os nematoides (larvas e adultos) recuperados de moluscos e roedores tiveram seu DNA extraído, amplificados em direção à região COI (gene mitocondrial derivado do Citocromo Oxidase I) e sequenciados para a identificação específica dos nematoides. A infecção por *A. cantonensis* foi registrada em moluscos provenientes de todos os municípios investigados, envolvendo três espécies hospedeiras e, dos moluscos *B. tenuissimus* coletados em Barra dos Coqueiros, SE, 4,3% estavam infectados naturalmente com *A. cantonensis* (SOUZA, 2017).

Ainda não encontramos publicações na literatura sobre a infecção natural de *B. tenuissimus* com *A. cantonensis*, apesar desse molusco ser encontrado no mesmo habitat de outros moluscos hospedeiros naturais deste parasito. Em face do estado da arte acerca do estudo da possível interação entre *B. tenuissimus*-*A. cantonensis*, o presente trabalho teve como objetivo analisar as alterações morfológicas e respostas fisiológicas ao longo do desenvolvimento pré-patente deste nematoide no caracol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Posição taxonômica de *Angiostrongylus cantonensis*

A classificação dos angiostrongilídeos se apoia na morfologia da bolsa copuladora dos machos adultos, nos hospedeiros utilizados pelo parasito e o local da infecção no hospedeiro (Fig. 1).

Angiostrongylus é o gênero-tipo da família Angiostrongylidae, tendo sido proposto por Kamensky, em 1905 para *Strongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, a partir de espécimes recuperados da artéria pulmonar de cães. Railliet e Henry (1907) aparentemente desconheciam o trabalho de Kamensky, uma vez que não se referiram a *Angiostrongylus* quando criaram o gênero *Haemostromylus*. Esse gênero foi posteriormente reconhecido por vários autores (RAILLIET E HENRY, 1909; BAYLIS E DAUBNEY, 1926; YORK E MAPLESTONE, 1926). Leiper (1926) estabeleceu a prioridade de *Angiostrongylus* e tornou *Haemostromylus* sinonímia. Após essa discussão taxonômica, *Angiostrongylus vasorum* passou a ser espécie tipo do gênero *Angiostrongylus*.



Figura 1. Microscopia de luz evidenciando a região da bolsa copuladora de *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: MALDONADO JR, Arnaldo; SIMÕES, Raquel; THIENGO, Silvana. Angiostrongyliasis in the Americas. In: **Zoonosis**. InTech, 2012.

Angiostrongylus cantonensis foi descrito parasitando a artéria pulmonar de ratos em Canton, na China por Chen em 1935 e alocado no gênero *Pulmonema*, como *Pulmonema cantonensis*. A mesma espécie também foi descrita em 1937 como *Haemostromylus ratti* por Yokogawa, que não percebeu que se tratava da mesma espécie descrita anteriormente por Chen. O gênero *Pulmonema* foi posteriormente considerado sinônimo de *Angiostrongylus* e a espécie *H. ratti* foi sinonimizada com *A. cantonensis*.

Essas mudanças na nomenclatura foram amplamente aceitas, sendo *Angiostrongylus* o nome genérico mais amplamente usado. No entanto, em 1986, Ubelaker dividiu o gênero *Angiostrongylus* em cinco novos gêneros, com base na sua anatomia, principalmente da bolsa copuladora e espécies de hospedeiros definitivos. O gênero ficou assim dividido: *Angiostrongylus* (encontrado em carnívoros, como cães, raposas, gatos), *Parastrongylus* (murídeos como camundongos e ratos), *Angiocaulus* (mustelídeos como martens), *Gallegostromylus* (Muridae), *Stefanskostrongylus* (insetívoros). Em razão deste percurso taxonômico, *Angiostrongylus cantonensis*, foi transferido para o gênero *Parastrongylus*, por ter ratos como hospedeiros definitivos, se tornando *Parastrongylus cantonensis*.

Embora ocasionalmente usada, essa classificação não foi amplamente adotada e a espécie continua sendo referida como *Angiostrongylus cantonensis* (= *Parastrongylus cantonensis*).

A primeira descrição de *Angiostrongylus cantonensis* ocorreu em 1935, porém a primeira detecção de parasitismo no homem só aconteceu quase dez anos depois, quando Nomura e Lin (1944) recuperaram o parasito de um paciente com sintomas de meningite, em Taiwan (NOMURA & LIN, 1945). Esses sintomas nervosos ocorrem como consequência da migração das larvas no cérebro, onde causam uma inflamação eosinofílica severa.

Inicialmente, os parasitos identificados por Nomura e Lin, *op cit.*, foram denominados *Haemostromylus ratti* e, posteriormente, reclassificados como *A. cantonensis*.

2.2. Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis*

Os ciclos de vida dos nematoides *Metastrongylidae* apresentam moluscos como hospedeiros intermediários e marsupiais, insetívoros, carnívoros e roedores como hospedeiros definitivos.

O ciclo de vida de *A. cantonensis* (Fig. 2) é indireto e requer um hospedeiro intermediário e um definitivo. Os roedores, como hospedeiros definitivos, são infectados com *A. cantonensis* após a ingestão de larvas de terceiro estágio e o período pré-patente, tempo decorrido desde a infecção com as L3 até o aparecimento das primeiras L1 nas fezes, é de 42 a 46 dias nesses hospedeiros (BHAIBULAYA, 1975). As larvas L3 migram para o sistema nervoso central (SNC) do roedor, onde através de duas mudas alcançam os estágios L4 e L5. Na artéria pulmonar ocorre a maturidade sexual e a postura dos ovos. As L1 se desenvolvem nos ovos dentro dos capilares pulmonares, e quando eclodem migram através dos brônquios até a faringe sendo então deglutidas, atravessam o trato gastrointestinal e são liberadas junto às fezes (ALICATA, 1966; WANG et al., 2008).

Os moluscos (hospedeiros intermediários) são infectados após ingestão ou penetração direta das L1, as quais podem permanecer viáveis no ambiente por aproximadamente 12 dias (MACKERRAS & SANDARS, 1955). Duas mudas durante um período que pode variar entre duas a três semanas, são observadas nesses hospedeiros (L2 e L3) (YOUSIF & LAMMLER, 1975), sendo as larvas de terceiro estágio (L3) consideradas as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, que se infecta ao ingerir moluscos infectados, água ou vegetais contaminados com larva L3. Essa mesma forma de infecção pode ocorrer no homem, que é o

hospedeiro acidental dessa parasitose. Um terceiro hospedeiro pode estar incluído no ciclo de *A. cantonensis*, como crustáceos, peixes, anfíbios e répteis, considerados hospedeiros paratênicos, pois neles o parasito não sofre desenvolvimento evolutivo. No entanto, podem atuar como transmissores, amplificando a dispersão do parasito e distribuição geográfica da doença, atuando, então, como importantes agentes de dispersão espacial e temporal (THIENGO, 2010).

O parasito não completa o ciclo em humanos, mas permanece no sistema nervoso central onde causam a meningoencefalite eosinofílica, ou migram para outros sítios como o globo ocular causando a angiostrongilíase ocular (WANG et al., 2012).

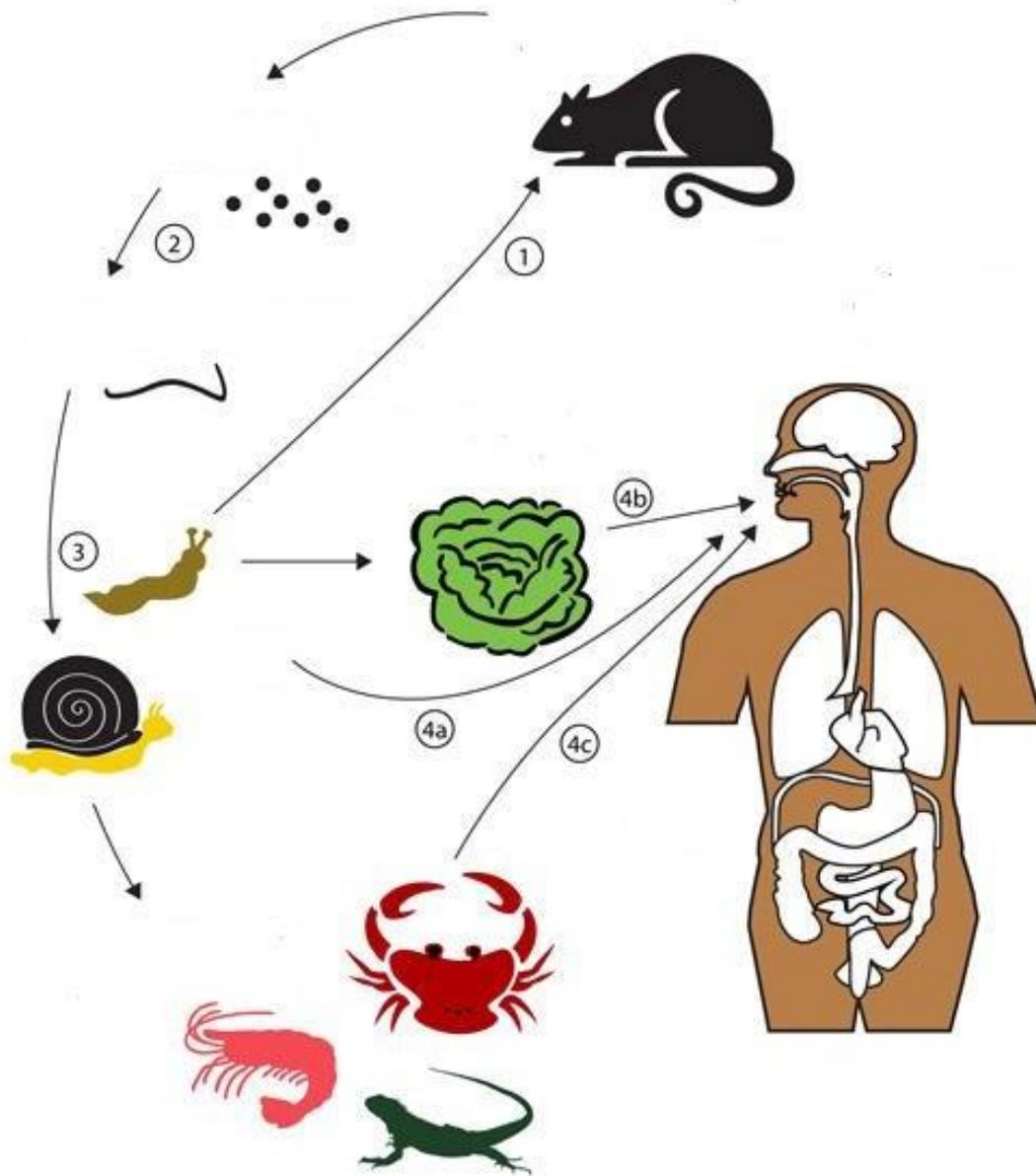


Figura 2. Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis*. **1** – consumo de moluscos infectados com larvas L3 pelos roedores; **2** – eliminação de larvas L1 nas fezes dos roedores infectados; **3** – infecção de moluscos com larvas L1, onde se dará seu desenvolvimento para L2 e em seguida, L3 infectante; **4** – a infecção de humanos pode ser dar: **a** – pela ingestão de moluscos infectados contendo larvas L3; **b** – ingestão de vegetais crus contaminados com larvas L3; ou, **c** – ingestão de hospedeiros paratênicos contendo larvas L3. Fonte: Modificado de WANG et al. (2008)

2.3. O molusco *Bulimulus tenuissimus*

A família Bulimulidae é composta por cerca de 144 gêneros e subgêneros, sendo, portanto, uma das famílias de moluscos gastrópodes mais numerosa e diversificada dentre os pulmonados terrestres (BREURE, 1979).

A espécie *Bulimulus tenuissimus* é constituída por moluscos gastrópodes terrestres, os quais, segundo Salgado e Coelho (2003), pertencem à família Bulimulidae. *Bulimulus tenuissimus* é um caracol terrestre amplamente distribuído no Mundo, principalmente nas Américas do Sul, Central e do Norte (METCALF, 1984; MIQUEL, 1991; PARENT & CRESPI, 2006; BREURE, 2016). No território brasileiro, esta espécie também está amplamente distribuída em muitas regiões (SIMONE, 2006; CARVALHO et al., 2012) (Fig. 3).

Bulimulus tenuissimus possui concha cônico-ovalada, perfurada, muito fina, translúcida, pouco brilhante, composta por estrias de crescimento e linhas espirais delicadas, de cor pálido, às vezes amarelada, marcada pelo crescimento das linhas espirais delicadas e estriadas. A espira da concha é cônica, o ápice agudo. A concha possui seis voltas, levemente convexas, aumentando com moderada rapidez, sendo a última volta convexa, não descendente e atenuada na base. A columela é oblíqua, em alguns espécimes, quase vertical. A abertura é oval, com coloração semelhante à região externa, com metade do comprimento da concha. O perístoma é simples, não expandido e agudo; a margem direita e arqueada de forma regular e a margem columelar é refletida para cima. A largura da concha é de cerca de 9mm e o comprimento de 17mm (SILVA et al., 2009), porém, em condições de laboratório, os moluscos podem alcançar até 27mm de comprimento de concha (SILVA et al., 2008) (Fig. 4A).

Esta espécie apresenta grande importância veterinária e econômica, uma vez que foi encontrada parasitada por *Davainea proglottina* (Davaine, 1860), *Patanaisia bragai* (Santos, 1934), *Postharmostomum gallinum* (Wintenberg, 1923), *Raillietina bonini* (Méglin, 1889) e *Brachylaemus mazzantti* (Travassos, 1927) (ARAÚJO, 1982; THIENGO & AMATO, 1995). Aliado a isso, *B. tenuissimus* é considerada uma praga para a agricultura (ARAÚJO, 1982, AGUDO-PADRÓN & LENHARD, 2011), um fato que fortalece a ampla distribuição e importância dessa espécie de molusco.

O sistema reprodutor foi extensivamente descrito por Araújo (1960) e com uma detalhada descrição histológica realizada por Rezende e Lanzieri (1964). *Bulimulus tenuissimus* é uma espécie ovípara e hermafrodita, capaz de realizar a autofecundação, porém a fecundação cruzada ocorre preferencialmente (SILVA et al., 2008). Os animais apresentam um padrão indeterminado de crescimento, apresentando relação positiva entre tamanho de concha e maturidade sexual (MEIRELES et al., 2008).

Na natureza, encontramos espécimes de *B. tenuissimus* dividindo o mesmo habitat que outras espécies de gastrópodes pulmonados terrestres, tais como, *B. similartis*, *L. unilamellata*, *S. octona*, *S. marginata*.

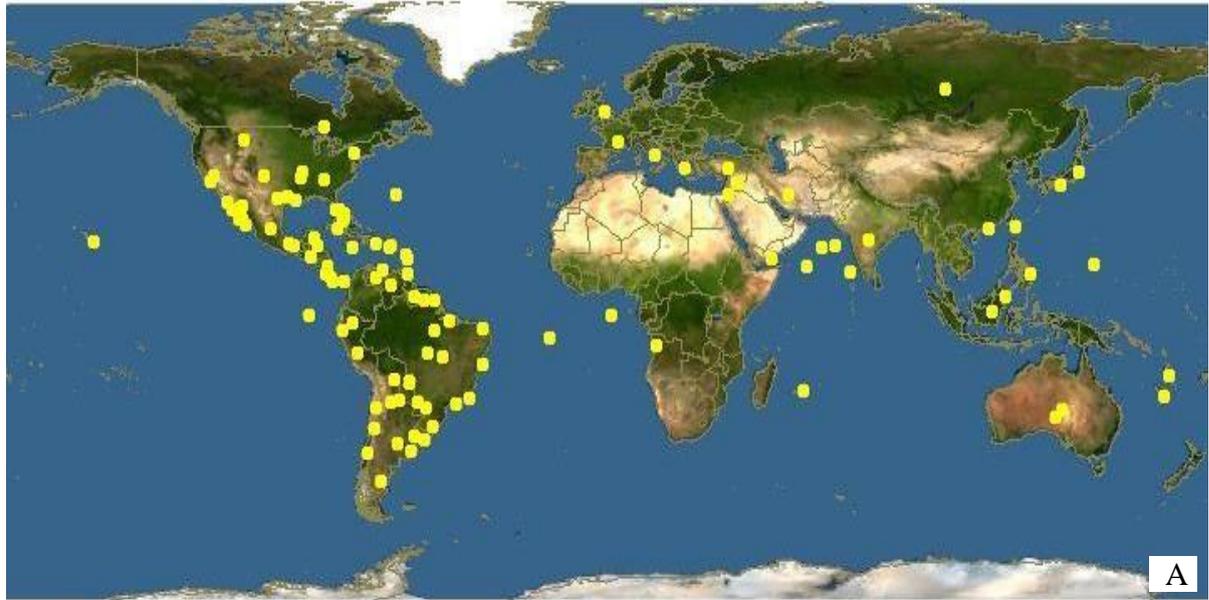


Figura 3 . Distribuição de *Bulimulus tenuissimus*. **A.** No mundo (Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Bulimulus+tenuissimus> – Acesso em 03/08/2017); **B.** No Brasil. ● localidade de ocorrência da espécie; ● ocorrência para o estado, não detalhado (Fonte: <http://www.conchasbrasil.org.br/mapas/default.asp?idconcha=1189> - Acesso em 03/08/2017).

2.4 . A infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em humanos

O patologista Joseph Alicata, foi um dos primeiros pesquisadores a relacionar casos de meningite ao parasitismo por *A. cantonensis*. Em 1961, no Hawaii, registrou o caso de um trabalhador japonês que apresentou um quadro de paralisia de ombros e braços, após a ingestão de lesmas. O exame do fluido cérebro-espinhal revelou uma moderada pleocitose eosinofílica. Pouco tempo depois, lesmas foram coletados na área do peridomicílio do paciente e examinadas, sendo então constatado a presença de larvas de *A. cantonensis*, confirmando a relação da patologia à esse parasito (ALICATA, 1966). No mesmo ano, seções do cérebro de um paciente, que morreu com sintomas de meningite também no Hawaii, foram examinadas pelo dr. Chappel que observou a presença de nematodeo, que mais tarde o médico Leon Rosen confirmou ser *A. cantonensis* (ROSEN et al., 1962). Posteriormente, experimentos foram realizados com primatas infectados experimentalmente com larvas L₃ de *A. cantonensis*, e como consequencia, síndromes neurológicas e meningoencefalite eosinofílica foram observadas nesses primatas (ALICATA, 1991).

A maioria dos casos da doença humana por *A. cantonensis* são de áreas tropicais e subtropicais no sudeste Asiático e nas Ilhas do Pacífico, regiões onde a parasitose foi inicialmente descrita, e de onde se dispersou pelo mundo. Sendo agora também encontrada na Austrália, África e Américas (MALDONADO et al., 2012; KIM et al., 2014).

Segundo Alicata (1966), *A. cantonensis*, evoluiu de um ancestral comum de roedores, de Moçambique e Madagascar, e apresentava como hospedeiro intermediário o molusco *A. fulica*, popularmente chamado de Caramujo Africano Gigante, sendo a rápida dispersão desse molusco a responsável pela ampla distribuição do parasito. Em controversa, Drozd et al. (1975) defenderam que essa dispersão começou mediante a relação do parasito com espécies de roedores, principalmente na Malásia e Austrália. Para os autores, as espécies de ratos domiciliados como *R. norvegicus* e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758, está relacionada ao fato desses animais sustentarem altas doses infectante, sem manifestar distúrbios relacionados ao sistema nervoso central, sugerindo uma adaptação com o hospedeiro. Recentemente, alguns estudos revelam que o parasito tem ampla pouca especificidade para o hospedeiro intermediário molusco, e que a rota mais possível de dispersão ocorreu através dos portos em função do grande tráfego de navios, contendo roedores infectados a bordo, e por fim a interação destes com a fauna de moluscos local (THIENGO, 1996; CARVALHO et al., 2012). Além das viagens comerciais, a migração de pessoas e animais e a mudança nos hábitos alimentares em um mundo com grande intercâmbio cultural, amplia as possibilidades de introdução dos hospedeiros e do parasito, criando oportunidades de dispersão (WANG et al., 2012).

No Brasil, em janeiro de 2006, dois indivíduos do sexo masculino, com 21 e 39 anos, respectivamente, deram entrada em um hospital no município de Cariacica, Espírito Santo (ES), com o quadro sintomático compatível com aquele conhecido para a meningite eosinofílica e relatando um episódio de ingestão de molusco terrestre cru. Aproximadamente, ao mesmo tempo, uma criança do sexo masculino, de um ano e meio de idade, na cidade de Vila Velha, ES também foi internado com sintomas semelhantes. Desta forma, este constitui o primeiro relato de angiostrongilíase em humanos no Brasil (CALDEIRA et al., 2007). Pouco tempo depois, em maio de 2008, uma paciente do sexo feminino, com 26 anos de idade, deu entrada no hospital da Restauração, Olinda, Pernambuco, apresentando dores nas articulações, sonolência e dificuldade progressiva em andar, além de um histórico passado de retardo mental; três meses depois de sua entrada no hospital, o diagnóstico de angiostrongilíase neural foi realizado através de exame pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), de líquido cerebrospinal.

Seguindo-se a estes relatos de angiostrongilíase em humanos, o inquérito malacológico realizado nas áreas circunvizinhas aos domicílios ou locais onde houve o relato e a sua confirmação, revelou pela primeira vez a presença de larvas de *A. cantonensis* em moluscos, sendo realizado por Caldeira et al. (2007) o primeiro registro de infecção natural de moluscos com larvas deste nematoide.

2.5. Aspectos da relação entre *Angiostrongylus cantonensis* e seu hospedeiro intermediário – molusco

A relação entre os metrastongylídeos e os moluscos, como seu hospedeiro intermediário, é obrigatória. Porém, curiosamente, apenas na década de 1970, Chariya Ratanarat Brockelman publicou os primeiros artigos acerca das alterações provocadas pela infecção por *A. cantonensis* em seu hospedeiro molusco, sendo a maioria dos estudos com a realção deste nematoide com o caramujo africano *Achatina fulica*, mas outras espécies de moluscos também foram estudadas por este autor (BROCKELMAN et al., 1976; BROCKELMAN, 1978; VACHANAVINICH & BROCKELMAN, 1979; BROCKELMAN & SITHITHAVORN, 1980). No Brasil, inegavelmente, nosso Grupo de Pesquisa é o que vem produzindo maior volume de informações acerca da relação entre o nematoide *A. cantonensis* e moluscos hospedeiros intermediários, com o foco sempre direcionado para moluscos do gênero *Biomphalaria*, como *B. glabrata* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011; 2012; 2013; 2014A; 2014B; LIMA et al., 2016; 2017).

Contudo, no Brasil, não encontramos estudos acerca das alterações morfológicas e fisiológicas em moluscos terrestres decorrentes da infecção por *A. cantonensis*, apesar haver registros na literatura sobre a ocorrência de angiostrongilíase neural associada a espécies de moluscos terrestres (ANDERSEN et al., 1986; LINDO et al., 2002; WANG et al., 2012), além da lista com mais de 50 espécies de moluscos terrestres apresentada por Kim et al. (2014) como hospedeiros de *A. cantonensis*. No Brasil, Thiengo et al. (2010) e Oliveira et al. (2015), representam alguns registros de moluscos terrestres encontrados naturalmente infectados com este nematoide. Porém, estudos não têm sido devotados a análise da interação entre estas diversas espécies de moluscos terrestres encontrados em nosso país e sua (possível) relação com *A. cantonensis*.

Assim, a ocorrência de *B. tenuissimus* nas áreas onde temos encontrado registros de ocorrência da doença angiostrongilíase neural, assim como, o registro negativo de sua ocorrência naturalmente infectada até meados do ano de 2017, quando Souza (2017), em seu trabalho de Dissertação de Mestrado, registrou a ocorrência de *B. tenuissimus* naturalmente infectada com *A. cantonensis* na Região Metropolitana de Aracaju, Sergipe, Brasil, são fatores que nos levam a buscar maiores informações sobre esta relação parasito-hospedeiro ainda inexplorada, não apenas com relação à espécie *B. tenuissimus*, mas também com relação a outros registros de bulimulídeos não infectados por este nematoide em áreas de ocorrência da angiostrongilíase neural.

2.5.1. Biologia reprodutiva

Tunholi-alves et al. (2011) foram os primeiros a registrarem alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada experimentalmente com *A. cantonensis*, observando a ocorrência do fenômeno de castração parasitária, sendo este classificado como um processo indireto e parcial, evidenciando redução em todos os parâmetros analisados em seu estudo (número total de ovos postos pelo molusco infectado, número de massa ovígeras, número de ovos/massa ovígera, número de ovos/molusco, porcentagem de ovos viáveis e conteúdo de galactogênio na glândula albúmen).

Lima et al. (2016) realizaram um estudo comparativo das respostas fisiológicas de *B. tenagophila* e *B. straminea* à infecção por *A. cantonensis*. Os resultados destes autores indicaram a ocorrência de compensação inicial no esforço reprodutivo em ambas as espécies de moluscos, mas em diferentes momentos no período pré-patente. Mais especificamente, houve-se uma redução de 46,53% na relação nº de ovos/massa ovígera em *B. straminea* infectada, refletindo um declínio de 50% na concentração de galactogênio contido na glândula de albúmen. As mudanças neste parâmetro também foram observadas em *B. tenagophila*, mas apenas no final do período de estudo, com uma redução de 15,49%. As análises histológicas indicam que as alterações observadas estão associadas aos danos nos tecidos, causados pela migração e desenvolvimento das larvas.

2.5.2. Metabolismo de carboidratos

Por causa do aumento da demanda por energia, devido ao fato dos moluscos terem que manter seus processos metabólicos vitais e fornecerem energia necessária para o desenvolvimento e crescimento das larvas em desenvolvimento, é de se esperar que surjam alterações no metabolismo de carboidratos nos moluscos parasitados por larvas de nematoides, uma vez que estes substratos são a principal fonte de energia para os moluscos (LIVINGSTONE & De ZWAAN, 1983).

Brockelman & Sithithavorn (1980), em um primeiro estudo acerca das alterações no molusco terrestre *A. fulica*, parasitada pelo nematoide pulmonar *A. cantonensis*, determinaram os níveis de carboidratos na hemolinfa e na glândula digestiva. O nível normal de glicose na hemolinfa de 11,7 mg% caiu para 4,25 mg% nos animais infectados, havendo, porém, diferença significativa após apenas uma semana de infecção. O nível de açúcares redutores totais na hemolinfa também diminuiu significativamente (12,3 mg% para 3,6 mg%) neste período. Posteriormente, estes autores demonstraram que os moluscos foram capazes de se adaptarem à infecção parasitária e a concentração de açúcares hemolinfáticos retornou à faixa normal.

Tunholi-Alves et al. (2014) observaram, em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*, uma redução significativa dos níveis de glicose na hemolinfa desde a primeira semana de infecção em relação ao grupo controle. A atividade de lactato desidrogenase (LDH) no grupo infectado foi significativamente maior do que a média do grupo controle. Esse aumento foi acompanhado por uma redução dos níveis de ácido pirúvico e um aumento nos níveis de ácido láctico na hemolinfa dos moluscos parasitados, confirmando a aceleração do metabolismo anaeróbio, necessário para que o hospedeiro obtenha energia e mantenha o equilíbrio redox nesta situação de demanda elevada por energia. Paralelamente, houve diminuição no teor de glicogênio dos tecidos de armazenamento, sendo essa redução significativamente maior na massa cefalopodia do que na glândula digestiva, demonstrando que, nesse sistema de interação, a mobilização de glicogênio não era suficiente para manter e restabelecer a glicemia normal dos caracóis infectados.

Lima et al. (2017) avaliaram o teor de glicose no conteúdo de hemolinfa e glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodia de *B. tenagophila* e *B. straminea* experimentalmente infectadas por *A. cantonensis*, juntamente com a atividade de LDH. Os caramujos apresentaram diminuição de 96% e 6,4% no teor de glicose em resposta à infecção por *A. cantonensis*, o que desencadeou uma transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio nas duas espécies de moluscos infectadas, *B. straminea* e *B. tenagophila*, respectivamente.

2.5.3. Metabolismo de produtos nitrogenados

Como consequência das alterações surgidas no metabolismo de carboidratos, os moluscos passam a fazer uso de outros substratos, alternativos, para a obtenção de energia, mantendo assim seu estado fisiológico basal e garantindo o desenvolvimento do parasito.

O efeito da infecção por *A. cantonensis* sobre a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e a concentração de proteínas totais, ácido úrico e ureia na hemolinfa de *B. glabrata* foram investigados por Tunholi-alves et al. (2012). A infecção por *A. cantonensis* induziu alterações graves no metabolismo do molusco hospedeiro, desencadeando mecanismos fisiológicos para minimizar os efeitos deletérios causados pelas larvas. Houve uma diminuição significativa, que ocorreu gradualmente à medida que a infecção avançava, na concentração de proteínas totais nos moluscos infectados. Essa mudança foi acompanhada por um aumento nas concentrações de ureia e uma diminuição dos níveis de ácido úrico na hemolinfa, sugerindo que neste modelo a infecção induz proteólise e inversão do padrão de excreção dos hospedeiros infectados, revelando uma alteração do padrão excretor de uricotélico para ureotélico nestas condições. Além disso, foram observadas variações nas atividades das aminotransferases, com níveis significativamente maiores nos grupos infectados do que no grupo controle.

Lima (2016), em seu trabalho de Tese de Doutorado, observou que, em *B. straminea*, uma forte relação positiva entre o período pós infecção e a concentração proteica hemolinfática ($r^2=0,90$) ocorreu, havendo elevação na concentração das proteínas circulantes após 11 dias da infecção em relação com os moluscos não infectados. Porém, em *B. tenagophila*, houve uma queda ao longo de todo o período observado, principalmente no período em que há desenvolvimento da larva de primeiro estágio (L1). Um aumento significativo foi observado nas atividades das aminotransferases, AST e ALT, em *B. straminea*, confirmando uma relação direta entre o período de infecção e a atividade das enzimas. Da mesma forma, a infecção de *B. tenagophila* apresentou valores elevados para a atividade enzimática de ALT, com seu pico marcadamente visível na terceira semana de infecção, quando já temos a presença de larvas de terceiro estágio (L3) completamente formadas no interior do corpo do molusco hospedeiro.

A infecção por *A. cantonensis* causou alterações no metabolismo de excreção dos produtos nitrogenados de ambas as espécies de moluscos. Em *B. straminea*, 6 dias pós infecção houve uma transição do padrão de excreção, com queda da concentração de ácido úrico e elevação da concentração de ureia circulante na hemolinfa. Em contrapartida, as concentrações de ureia mostram uma elevação de 570,17% para os moluscos, mas, no próximo ponto do desenvolvimento larval intramolusco analisado por esta autora, observa-se uma inversão deste perfil, com aumento de ácido úrico após 11 dias de infecção e estabelecimento deste comportamento até o final do período observado. Concomitantemente, as concentrações de uréia entram em queda e permanecem reduzidas até aos 21 dias pós-infecção.

Resultados semelhantes foram apresentados pela autora para *B. tenagophila* com uma inversão nos padrões de excreção, com redução da concentração hemolinfática de ácido úrico nos primeiros dias de infecção com seu menor valor na primeira semana de infecção em contraste com o grupo controle, havendo uma redução correspondente a 58,54%. A queda na concentração de ácido úrico foi acompanhada pela elevação dos níveis de ureia disponível na hemolinfa no mesmo período citado, tendo seu valor máximo na primeira semana de infecção. Assim como em *B. straminea* seguindo em direção à segunda semana de infecção, uma nova alternância é vista, agora com a elevação dos níveis de ácido úrico e queda nos níveis de uréia. Assim, em ambos os modelos usado por Lima

(2016), observamos a mudança no padrão excretor de uricotélico para ureotélico como resultado do desenvolvimento pré patente das larvas intramolusco.

2.5.4. Alterações no metabolismo de cálcio

Para os moluscos com concha, o cálcio é sempre visto como um elemento de extrema importância, por causa da acentuada participação deste metal na formação destas conchas, conferindo proteção aos moluscos contra predadores e garantindo sua perpetuação. Porém, o cálcio é um íon essencial como cofator de diversas enzimas, sobretudo as desidrogenases (E.C. 1.1), enzimas essenciais para o metabolismo de carboidratos, sobretudo nas reações de oxidações biológicas do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Além de estar diretamente envolvido na mediação de respostas imunológicas. Por esta razão, a investigação nas alterações nas concentrações de cálcio na concha e na hemolinfa, assim como, nos tecidos de moluscos infectados é de extrema importância biológica.

Tunholi-alves et al. (2013) observaram, pela primeira vez, que os níveis de cálcio na hemolinfa e conchas de *B. glabrata* experimentalmente infectadas por *A. cantonensis*, encontrados duas semanas após a infecção aumentaram significativamente em relação ao grupo de controle respectivo. No entanto, houve uma redução significativa na concentração deste íon na hemolinfa de moluscos infectados após uma semana de infecção em relação aos espécimes não infectados. Paralelamente, a hipocalcificação intensa da concha de caramujos infectados uma e duas semanas após a infecção ocorreu, diferindo significativamente em relação aos respectivos grupos de controle. Ao mesmo tempo, análises histoquímicas da glândula digestiva de caramujos infectados e não infectados evidenciaram alterações, com maior marcação nas células dos ácinos da glândula digestiva e do manto, assim como uma intensa marcação para cálcio na região perigranulomatosa, confirmando o papel desse íon como elemento importante no processo de encapsulamento do parasito.

Lima (2016) verificou que a infecção por *A. cantonensis* afetou a regulação do metabolismo de cálcio de ambas as espécies de hospedeiros estudados (*B. straminea* e *B. tenagophila*), havendo uma relação negativa entre o período pós infecção e a concentração de cálcio na hemolinfa dos moluscos. Assim como a concentração de CaCO_3 avaliado nas conchas de *B. straminea* apresentou uma redução no primeiro momento de avaliação, ao contrário do que foi visto em *B. tenagophila* no mesmo período. *B. tenagophila* infectada apresenta um quadro de hipocalcificação da concha, em relação aos moluscos não infectados, enquanto *B. straminea*, apresentou um perfil de hipercalcificação da concha em resposta ao parasitismo, o que pode estar associado ao seu menor tamanho quando comparada à *B. tenagophila*.

3. OBJETIVOS

3.1 . Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo realizar infecções experimentais deste molusco com larvas L1 de *A. cantonensis*, assim como analisar as respostas fisiológicas do hospedeiro ao longo do período pré patente de infecção.

3.2 . Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade de *B. tenuissimus* à infecção por *A. cantonensis*;
- Avaliar a influência da infecção por *A. cantonensis* no padrão reprodutivo de *B. tenuissimus*;
- Identificar alterações no metabolismo de carboidratos de *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis*;
- Analisar as respostas do metabolismo de produtos nitrogenados e aminotransferases (EC 2.6.1.1 e EC 2.6.1.2);
- Avaliar o metabolismo do cálcio em *B. tenuissimus* em função da infecção com *A. cantonensis*; e,
- Identificar alterações morfo-fisiológicas decorrentes dessa interação, através de análises histológicas e histoquímicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e manutenção dos moluscos

Os moluscos *B. tenuissimus* foram coletados manualmente de uma horta no município de Seropédica no Km 46 da antiga estrada Rio-São Paulo (Latitude: 22° 44' 38" S; Longitude: 43° 42' 27" W; Altitude: 26m) e levados para o Laboratório de Biofísica no Departamento de Ciências Fisiológicas (ICBS-UFRRJ) onde foram mantidos em terrários plásticos (31 x 21 x 10 cm) contendo 3 cm de terra vegetal esterilizada (120°C por 1 hora) no fundo. Cada terrário assim preparado abrigava 60 moluscos que eram alimentados com folhas de alface fresca (*Lactuca sativa*), fatias de cenoura (*Daucus carota*), chuchu (*Sechium edule*) e pepino (*Cucumis sativus*) e com ração para aves triturada e peneirada enriquecida com carbonato de cálcio na proporção de 3:1 (SILVA, 2008). A ração foi oferecida sobre recipientes plásticos de 3 cm de diâmetro com 0,5 cm de altura. A manutenção dos terrários foi feita três vezes por semana momento em que eram borrifados com água, se necessário, e os alimentos eram trocados; a terra também era revolvida para localização das posturas e os animais mortos eram retirados.

As posturas assim coletadas deram origem aos moluscos utilizados nesse experimento. Os ovos contados foram separados em placas de Petri sobre papel toalha úmido até a eclosão dos filhotes. Esses foram mantidos em recipientes plásticos (11cm x 7cm x 4cm) com dieta de alface, cenoura, chuchu e pepino sobre papel toalha umedecido durante 15 dias. A ração só foi oferecida após esse período, em recipientes de 1 cm de diâmetro com 0,2 cm de altura, para diminuir a mortalidade dos neonatos (os filhotes entravam nas vasilhas contendo a ração, mas não conseguiam sair) (Fig. 4B).

Esses moluscos, assim criados no laboratório, foram utilizados somente quando atingiram a maturidade sexual, com início de posturas, o que ocorreu quando os animais atingiram 90-120 dias de idade.



Figura 4. Espécimes de *Bulimulus tenuissimus*. **A.** Exemplar adulto, evidenciando características da concha e parte da massa cefalopediosa (Disponível em <<http://www.biofaces.com/post/66993/caracol-terrestre/>> . Acesso em 12 abr 2018). **B.** Moluscos criados sob condições de laboratório, com 15-20 dias de eclodidos, evidenciando a alimentação feita a base de vegetais frescos e de ração para aves triturada e peneirada enriquecida com carbonato de cálcio na proporção de 3:1 elaborada segundo Silva (2008). Barra de escala = 2,0 cm. Fonte: Autora.

4.2 . Obtenção dos parasitos

Os parasitos utilizados nesse estudo foram obtidos de um ciclo experimental mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR) da Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil. Esse ciclo teve início a partir de larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* obtidas de moluscos da espécie *Achatina fulica* coletados no município de São Gonçalo, RJ (22° 48' 26.7"S, 43°00'49.1"W). O ciclo é mantido utilizando *Rattus norvegicus* como hospedeiro definitivo e em *B. glabrata* como hospedeiro intermediário e tem o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA LW 47-14).

4.3. Infecção Experimental

As fezes dos *R. norvegicus* foram coletadas e processadas segundo a técnica de Baermann (WILLCOX & COURA, 1989) para coleta das larvas L1 de *A. cantonensis*.

Após jejum de 24h, moluscos *B. tenuissimus*, foram acondicionados individualmente em placas de 24 poços onde foram colocadas 1200 larvas L₁ de *A. cantonensis* sobre pequenos pedaços de pepino, sendo mantidos assim por 24 h, sendo depois retirados dos poços e transferidos para terrários preparados conforme descrito previamente.

4.4 . Formação dos grupos

A infecção foi acompanhada durante três semanas. Os moluscos foram divididos em grupos de infectados e controle. Ao todo, foram formados 18 grupos com dez moluscos cada, sendo nove infectados (três grupos por semana) e mais nove grupos controle, não infectados (três grupos por semana). Cada grupo de dez moluscos foi mantido em pote plástico de 12cm x 8 cm, com 3cm de terra e foram acompanhados conforme descrito a cima.

A densidade populacional nos recipientes (10 moluscos/terrário) foi mantida ao longo do estudo através de grupos de moluscos que foram submetidos as mesmas condições, chamados de grupo de reposição. À medida que os moluscos morriam, novos moluscos do grupo de reposição eram transferidos para os terrários, com a finalidade de manter a densidade populacional (Anexo 1).

4.5 . Dissecção e coleta de material

A cada semana após a infecção, as conchas dos moluscos eram lavadas e secas em papel toalha. A hemolinfa dos moluscos foi coletada através de ruptura do ápice da concha enquanto a massa cefalopediosa era suavemente empurrada para dentro da concha. A hemolinfa extravazava e era recolhida em microtubos mantidos em banho de gelo a 10°C durante a coleta e posteriormente armazenados a -20°C até a utilização da hemolinfa para as análises bioquímicas (Fig. 5).

As conchas foram removidas, sendo secas em ambiente e guardadas embrulhadas em papel toalha para posterior quantificação do cálcio.

Depois de retiradas as conchas, os moluscos foram dissecados no gelo e os tecidos da massa cefalopediosa, glândula digestiva e glândula de albúmen, mantidos em banho de gelo a 10°C durante a coleta, sendo pesados a seguir e posteriormente armazenados a -20°C até sua utilização.

Após o período pré-patente de infecção com *A. cantonensis*, espécimes de *B. tenuissimus* de cada grupo infectado foram submetidos à digestão química com pepsina-HCl para recuperação de larvas L₃, segundo Thiengo et al. (2010).



Figura 5 . Procedimento realizado para a coleta de hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus*.
Fonte: Autora.

46. Biologia reprodutiva de *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*

Em dias alternados, os terrários foram observados e a terra foi cuidadosamente revolvida com o auxílio uma espátula para encontrar os ovos. No mesmo momento, o número de moluscos vivos era registrado. Os ovos encontrados foram contados e transferidos para terrários-berçários e acompanhados até a eclosão dos moluscos (filhotes).

Por esta metodologia, foram analisados os parâmetros reprodutivos: número total de ovos postos, número total de moluscos recém-eclodidos e número de moluscos/ovos recém-eclodidos. Durante o período de infecção, as posturas foram retiradas dos terrários em dias alternados. Então, os ovos foram contados e observados até a eclosão dos filhotes, sendo esses observados por aproximadamente três semanas.

47. Parâmetros bioquímicos

4.7.1 . Determinação das concentrações de galactogênio e de glicogênio

A determinação dos conteúdos de galactogênio da glândula albúmen e de glicogênio em glândula digestiva e massa cefalopediosa de *B. tenuissimus* em diferentes períodos após a exposição às larvas (L1) de *A. cantonensis*, foi realizado segundo a técnica descrita por Pinheiro e Gomes (1994) e quantificado pela técnica do 3,5 DNS (SUMNER, 1924), sendo os resultados expressos em mg de glicose/g de tecido, peso fresco.

4.7.2 . Determinação das concentrações de glicose, proteínas totais, ureia, ácido úrico e atividade das enzimas lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase

Para a análise dos parâmetros concentração de glicose, proteínas totais, ureia e ácido úrico, e atividade enzimática de ALT (EC 2.6.1.2), AST (EC 2.6.1.1) e LDH (EC 1.1.1.27/EC 1.1.1.28), foi utilizado o analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®), realizando-se uma diluição da amostra matriz centrifugada, sem células, na proporção de 1:1 com água Milli-Q.

Na determinação de glicose, 3 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente de cor (fosfato 100 mmol.L⁻¹, fenol 5 mmol.L⁻¹, glicose oxidase 10 U.mL⁻¹, peroxidase 1 U.mL⁻¹, 4-aminoantipirina 0.4 mmol.L⁻¹, pH 7,5), e o produto da reação de oxidação 4-aminoantipirina foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 510 nm (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Para a determinação da concentração de proteínas totais, 4 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente de cor (acetato de cobre 6 mmol.L⁻¹, iodeto de potássio 12 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 1,15 mol.L⁻¹). O padrão usado foi albumina sérica bovina, na concentração de 50 g.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, e os resultados expressos em g.L⁻¹ (GORNALL et al., 1949).

Para a determinação do conteúdo de ureia, 10µL de hemolinfa foram adicionados a 1,5 µL da solução de trabalho contendo (Tris 100 mmol/L, 2-oxoglutarato 5,6 mmol/L, uréase >140 U/mL, glutamato desidrogenase > 140 U/mL, etilenoglicol 220g/L, azida sódica 0,95g/L, pH 8 + NADH 1,5 mmol/L, azida sódica 9,5 g/L). O produto formado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm, utilizando solução-padrão de ureia a 50 mg/dL, sendo expressos em mg/dL.

Para a determinação do conteúdo de ácido úrico, a 2 µL de hemolinfa foi adicionado 1 mL de reagente de trabalho (tampão 155 mM, 4-aminoantipirina ≥ 0,1 mM, peroxidase ≥ 1.000 U/L, azida sódica 0,02% e surfactantes + tampão 155 mM, ácido 3,5- dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato (DHBS) ≥ 2,5 mM, uricase ≥ 300 U/L, azida sódica 0,02% e surfactante). A leitura das absorvâncias foi feita por espectrofotometria, em 505 nm, contra branco de reação e usando solução-padrão de ácido úrico 6 mg/dL, sendo expressa em mg/dL.

Para a avaliação da atividade enzimática de ALT, 25 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 150 mmol.L⁻¹, L-alanina 750 mmol.L⁻¹, desidrogenase láctica > 1350 U.L⁻¹, pH 7,3, NADH 1,3 mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 75 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 148 mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5 g.L⁻¹). O produto formado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm, expressos em U/L¹ (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a avaliação da atividade enzimática da AST, 25 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 121 mmol.L⁻¹, L-aspartato 362 mmol.L⁻¹, desidrogenase málica > 460 U.L⁻¹, desidrogenase láctica > 660 U.L⁻¹, pH 7,8, NADH 1.3 mmol.L⁻¹, 2- oxoglutarato 75 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 255 mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5 g.L⁻¹). Os resultados, expressos em U.L⁻¹, foram lidos em espectrofotômetro a 340 nm (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a determinação da atividade da LDH, 6 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 100 mmol.L⁻¹, ácido pirúvico 2,75 mmol.L⁻¹, cloreto de sódio 222 mmol.L⁻¹, pH 7,2, NADH 1,55 mmol.L⁻¹, azida sódica 9,5 g.L⁻¹). As leituras foram feitas em

340 nm e os resultados expressos em U/L (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1989; SCIENTIFIC COMMITTEE RECOMMANDATIONS, 1982).

4.7.3 . Determinação de cálcio

A determinação de cálcio na concha e na hemolinfa foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Soido et al. (2009), onde a massa de carbonato de cálcio foi calculada e expressa em mg de CaCO_3 /g de cinza e a concentração hemolinfática expressa em mg/dl.

48. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras de hemolinfa contendo o coquetel inibidor de proteases foram desproteinizadas segundo o método de Nelson, para a determinação dos ácidos orgânicos (pirúvico, oxálico e láctico).

Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes na hemolinfa, foram utilizados padrões de ácido oxálico, pirúvico e láctico (Sigma Aldrich Steinheim, Alemanha) com alto grau de pureza.

Foram utilizados na cromatografia acetonitrila, fosfato de sódio desidrogenado e ácido fosfórico. Utilizou-se água ultrapura (Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). Estoques de soluções padrão foram diluídos em fase móvel e o tampão de fosfato foi ajustado para pH 2.2 com ácido fosfórico e estocados a 4 °C.

Todos os experimentos com CLAE foram conduzidos usando um sistema Shimadzu LC-20AT, equipado com um fotodetector (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japão) acoplado a um software LCSolution ChemStation. Para a separação, usou-se uma coluna de fase reversa C18 (150 × 4.5 mm I.D., 5 µm, Allure® Organic Acids, Restek) sob condições isocráticas. A fase móvel consistia em 1% de acetonitrila em 20 mol/L de solução aquosa de NaH_2PO_4 , ajustando pH para 2.2 usando H_3PO_4 . A velocidade de fluxo foi de 0.8 mL/min a 36°C. Os cromatogramas foram monitorados a 210 nm e o volume de injeção foi 20µL. Para identificar os ácidos orgânicos presentes nas amostras, o tempo de retenção das soluções contendo as amostras foram comparados às soluções-padrões puras. A quantificação foi realizada com base nos *plots* de calibração da área dos picos pela concentração. Uma curva de calibração foi calculada com cinco pontos de concentração das soluções padrão. O método foi o mesmo descrito por Tunholi-Alves et al. (2014) (Anexo 2).

49. Análises morfológicas

4.9.1. Histologia e histoquímica

Moluscos tiveram suas conchas retiradas e foram fixados inteiros em Dubosq-Brasil (FERNANDES, 1949) a cada semana do período de infecção, para serem processados histologicamente. Os cortes de 5 µm foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina ou com Tricrômico de Gomori. Também foi utilizada a reação com o ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar depósitos de glicogênio nos tecidos e a técnica de von Kossa para visualização de depósitos de cálcio em tecidos (HUMASON,1979). Os cortes foram observados com microscópio de luz Zeiss Axioplan. As imagens foram capturadas com câmera digital MRc5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

4.9.2. Microscopia eletrônica de varredura das lâminas de histologia

As amostras processadas como descrito no item 4.9.1, após terem sido cortadas, foram coletadas em lâminas de vidro, desparafinizadas em xilol, cobertas com uma camada de 10 a 15 nm de espessura de ouro e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Vegas

Tescan em modo auto vácuo e com aceleração de voltagem de 10 kV, WD 10, 55 mm. Todas as análises ultraestruturais foram realizadas no Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, RJ, com a colaboração do Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres.

4.10. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão de média, submetidos a ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey-Kramer ($\alpha=5\%$) para comparação das médias e análise de regressão polinomial para avaliar a relação entre o tempo de infecção e os parâmetros fisiológicos analisados (Prism, GraphPad, v. 5.00, Prism Inc.).

5 . RESULTADOS

5.1. Infecção experimental e recuperação das larvas L₃

Após duas semanas da exposição às larvas L₁ de *A. cantonensis*, foi possível recuperar larvas L₃ após digestão enzimática de *B. tenuissimus*. A quantidade total de larvas recuperadas foi de 11,25%, de uma carga de 1200 larvas/molusco. Três semanas após a exposição foi realizada uma nova recuperação de 17,2% de larvas L₃.

A observação destas larvas ao microscópio de luz, permitiu observarmos o corpo da larva completamente desenvolvida (Fig. 6A) com a distinção do bulbo do esôfago (eb), com as estruturas da região anterior apresentando a região na qual é possível encontrar as estruturas semelhantes à hastes (rs) (*rod-like structures*) com as suas extremidades expandidas (kt) (*knob-like tips*) (Fig. 6B-C). Na Fig. 6b, observamos o canal e a abertura anterior do poro excretor (ep) e a região do ânus (a) é vista na Fig. 6D.

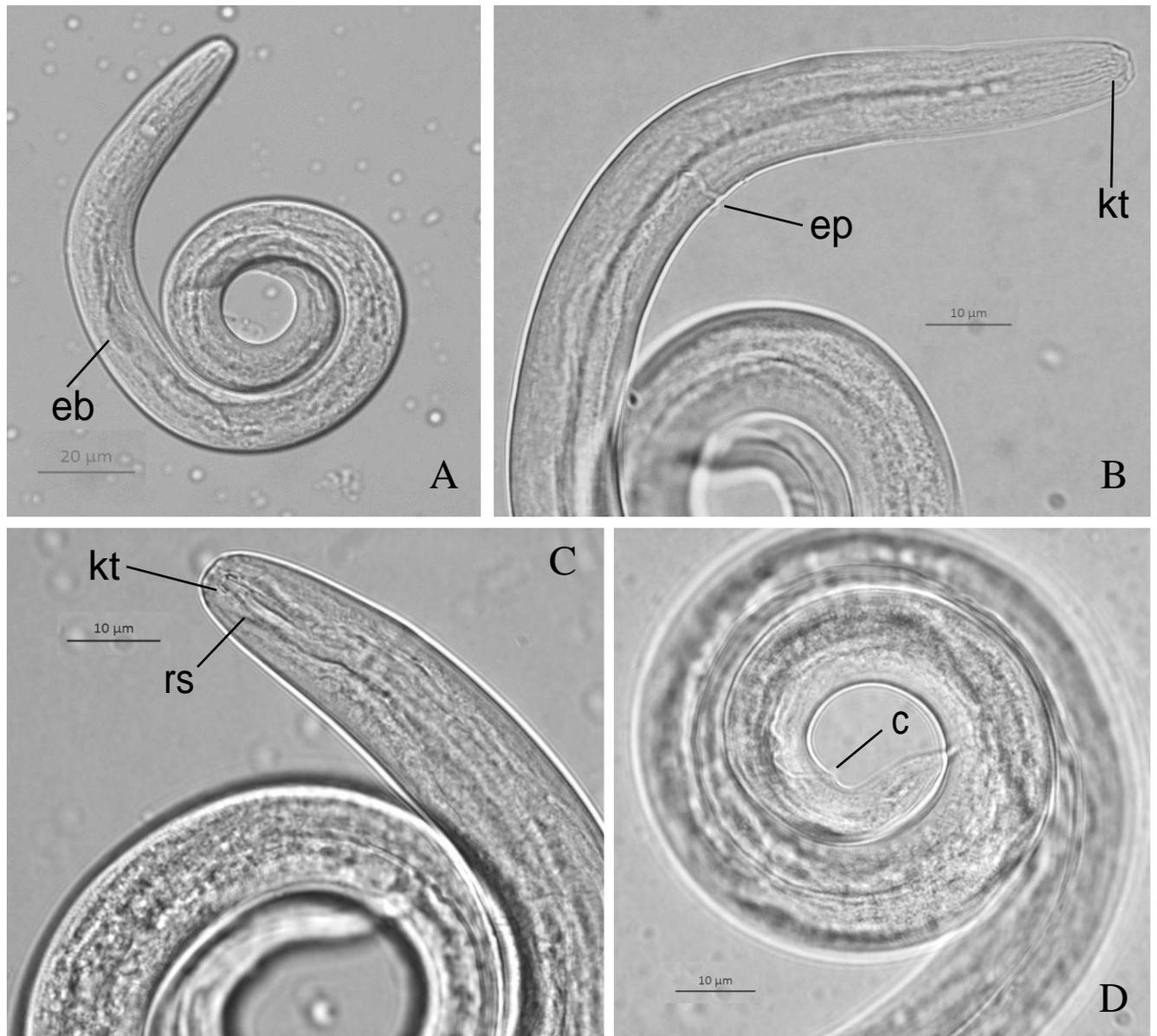


Figura 6. Imagens obtidas por microscopia de luz de campo claro de larvas de terceiro estágio (L3) de *Angiostrongylus cantonensis* recuperadas de *Bulimulus tenuissimus* após 3 semanas (22 dias) de infecção experimental. **A.** Vista geral da larva com a presença do bulbo do esôfago (eb) e evidenciando a forma em “Q” característica de L3. **B-C.** Região anterior de larva L3 evidenciando a cavidade bucal, com as estruturas em forma de haste (rs) e as extremidades expandidas (kt) e canal e poro excretor (ep). **D.** Região posterior do copo da larva L3 onde é possível observar a região da abertura posterior do sistema digestório (c) e a extremidade da cauda.

5.2. Alterações na morfologia de *Bulimulus tenuissimus* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*

A observação dos cortes histológicos ao MEV, permitiu a observação dos tecidos do molusco, sobretudo da região da massa cefalopediosa. Encontramos uma larva em uma seção longitudinal imerso em tecido muscular da massa cefalopediosa (Fig. 7A), com a presença de uma cápsula, provavelmente originada de células hospedeiras, circundando o corpo da larva dentro da qual a larva é mantida (Fig. 7B). Desta forma, observamos que, em *B. tenuissimus*, as larvas de *A. cantonensis* em desenvolvimento não estão mergulhadas nos tecidos, mas sim encerradas dentro de uma estrutura que individualiza o corpo da larva em relação aos tecidos do hospedeiro intermediário.

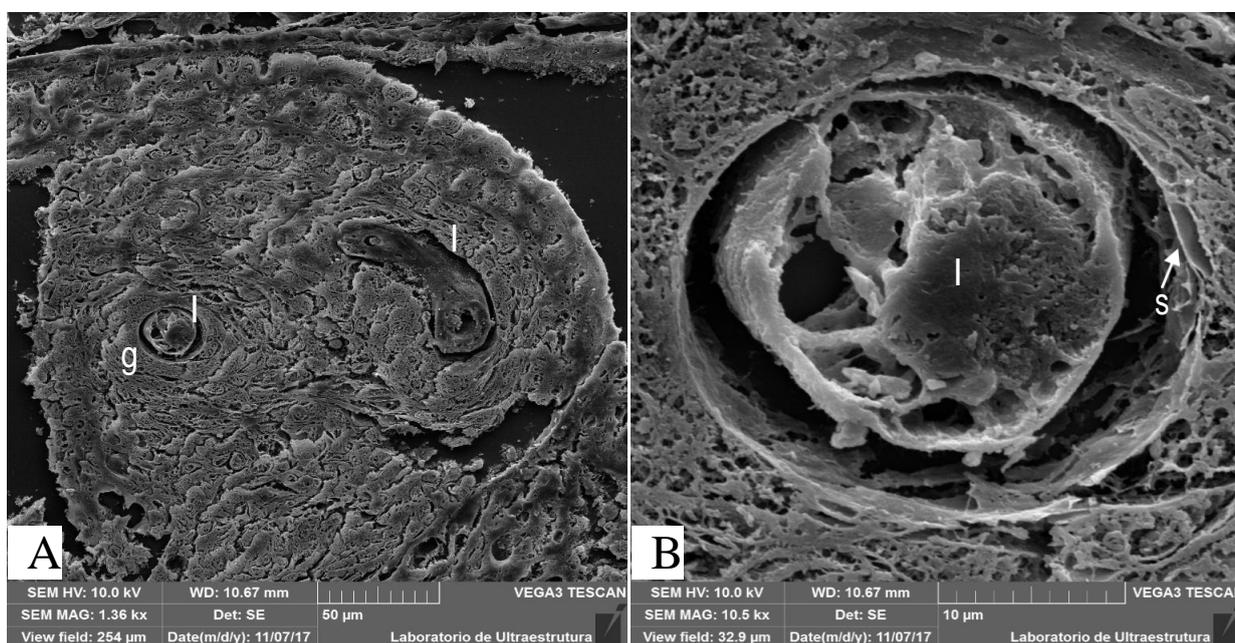


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de tecido da região cefalopediosa de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectado com *Angiostrongylus cantonensis*. **A.** Observação de duas larvas (l) em corte transversal, onde observamos o espessamento do tecido ao seu redor, o qual dá origem a estrutura granuloma-like (g) que envolve a larva em desenvolvimento, e uma outra larva em corte longitudinal. **B.** Observação de corte transversal de uma larva (l) em desenvolvimento no interior do molusco, onde observamos o corpo da larva, separado dos tecidos do molusco por uma estrutura dando origem a uma cápsula (s) que individualiza a larva dos demais tecidos do molusco hospedeiro.

As análises histológicas demonstraram a presença de larvas de *A. cantonensis* se desenvolvendo nos tecidos dos moluscos (Fig. 8A-F). O local de preferência para o desenvolvimento das larvas foi o tecido muscular na região da massa cefalopediosa, onde foi possível observar um grande número de perfis larvais e infiltrado hemocitário, mas não foi possível observar a formação de uma estrutura granulomatosa típica em torno das larvas. Ao exame dos cortes histológicos, não foram detectadas larvas na glândula digestiva, porém a estrutura histológica desta glândula sofreu alterações, com perda de organização dos ácinos,

onde não foi possível observar o arranjo cúbico do epitélio. As células epiteliais apresentaram uma clara vacuolização no citoplasma e material amorfo no lúmen acinar (Fig. 9A-D). O núcleo das células acinares não está evidente e parece ocorrer processo de picnose e cariorexia indicando processo de apoptose. A reação com o PAS mostrou uma pequena quantidade de glicogênio nessas células (Fig. 10D).

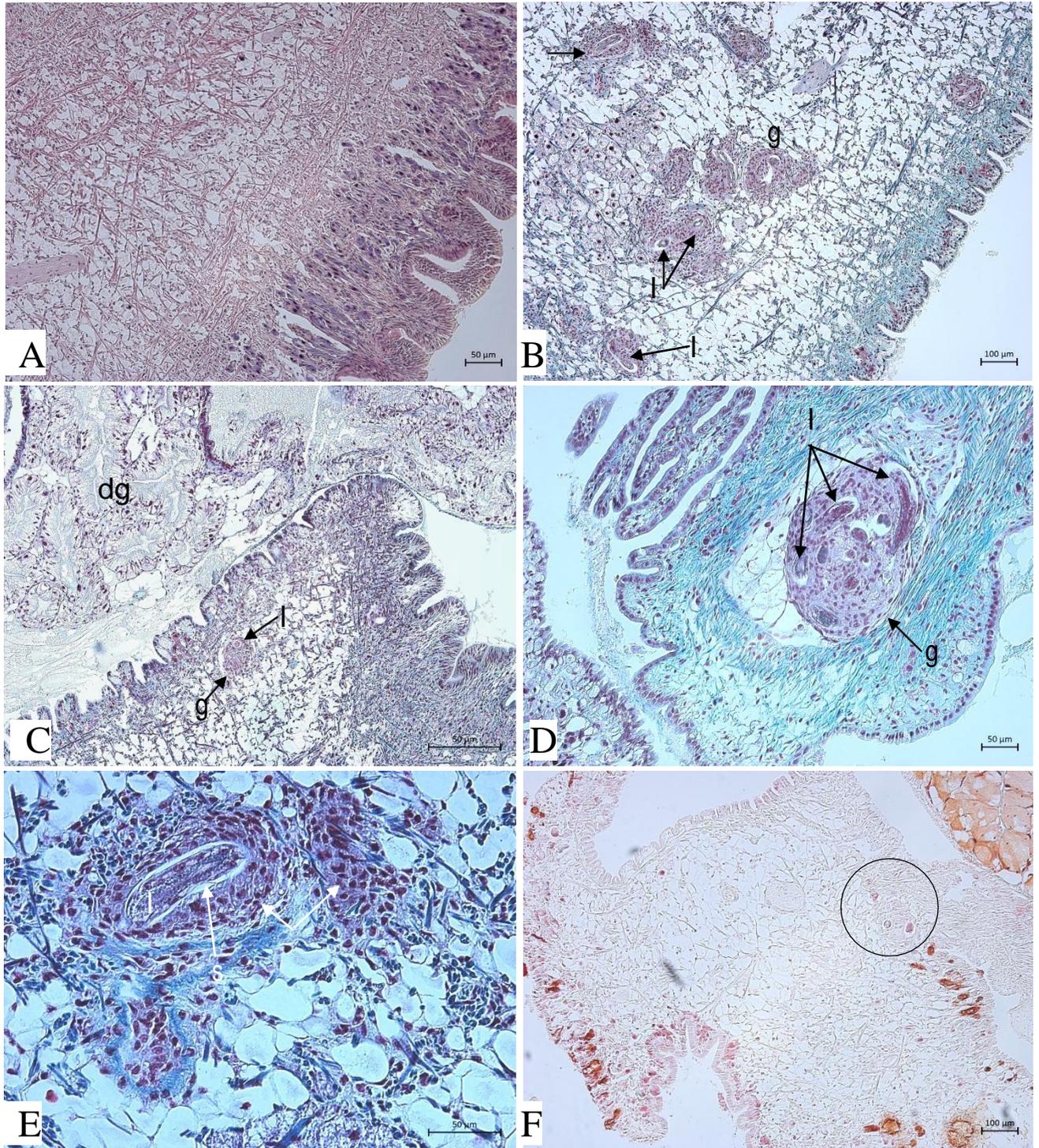


Figura 8. Secções histológicas de massa cefalopediosa de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas, evidenciando perfis larvais (l) com numerosos hemócitos (ih) em torno deles. **F.** Corte evidenciando ausência de marcação para cálcio nas larvas (círculo). A, corados com hematoxilina e eosina; B-E corados com Tricrômico de Gomori; F, corado pela técnica de Von Kossa para detecção de cálcio.

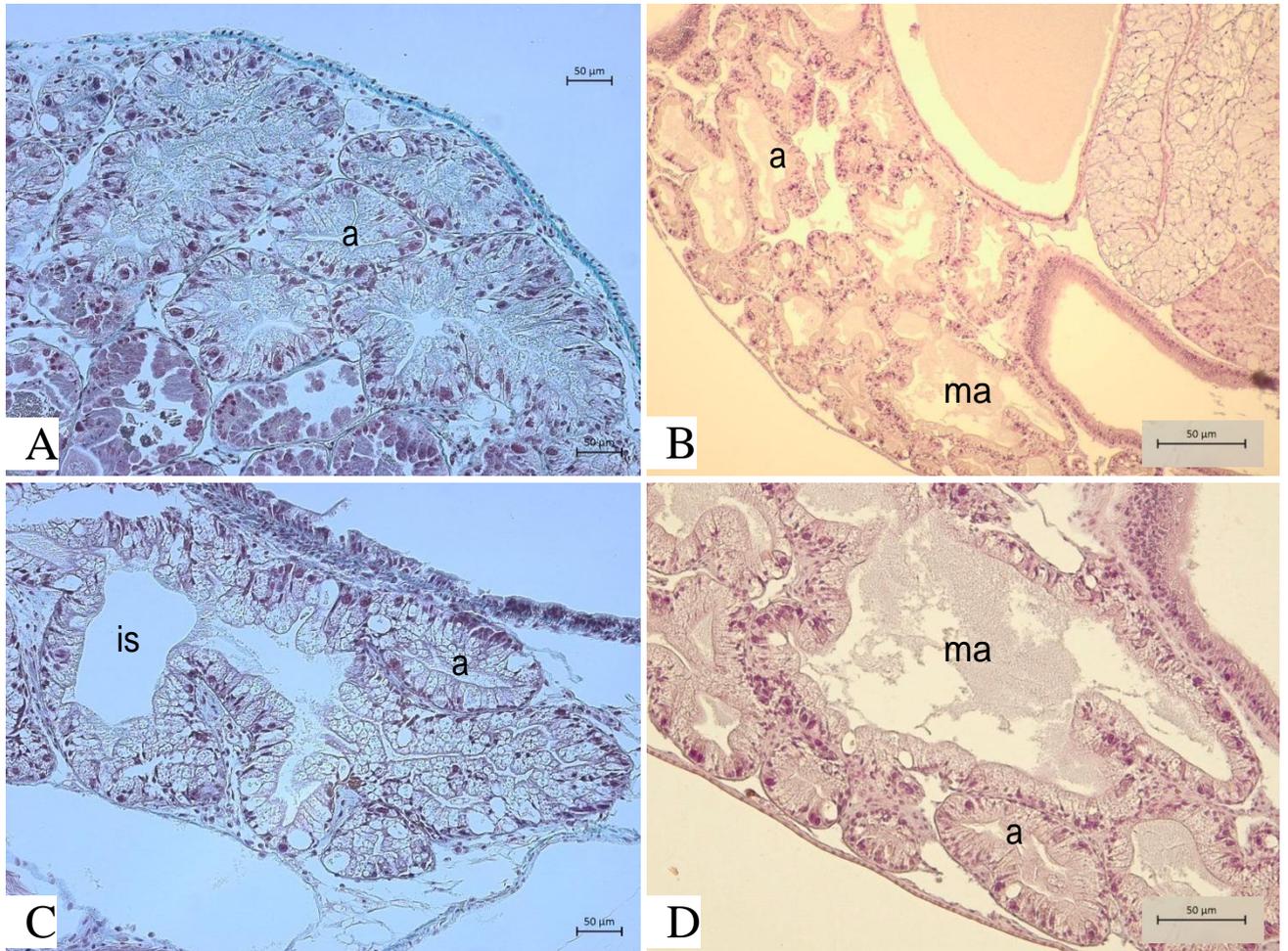


Figura 9. Secções histológicas de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. Região da glândula digestiva com vacuolização do citoplasma, perda da estrutura cúbica do epitélio do ácino (a), material amorfo (ma) dentro do lúmen, cuja luz está aumentada (is) e desorganização nuclear. B e D, corados com hematoxilina e eosina; A e C, corados com Tricrômico de Gomori.

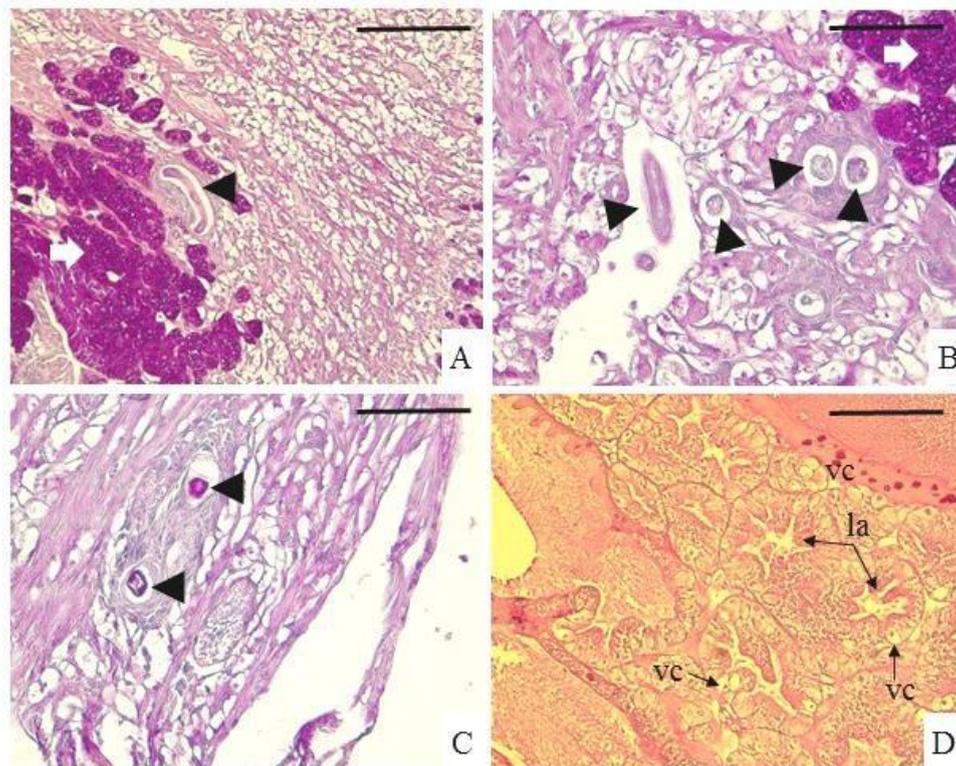


Figura 10. Secções histológicas de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. **A-C.** Região da massa cefalopediosa mostrando glândulas de muco com grandes quantidades de glicogênio em seu interior (seta branca) e perfis larvares (cabeça de seta) com depósitos de glicogênio dentro deles. **D.** Secção da glândula digestiva com desorganização da estrutura acinar e vacuolização do citoplasma (vc). Secções com 5µm. Corados pela reação com Ácido Periódico de Schiff (PAS). A e D barra de escala=100µm; B e C barra de escala=200µm.

5.3. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bulimulus tenuissimus* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*

O número total de ovos postos por *B. tenuissimus* não variou significativamente entre os grupos não infectados e infectados com *A. cantonensis*, e também não houve diferença significativa entre os períodos de infecção (Tab. 1). A análise dos valores das médias mostrou que o número de ovos aumentou na primeira e na terceira semanas após a exposição. O teste de regressão polinomial mostrou uma fraca relação positiva entre o período de infecção e o total de ovos postos por *B. tenuissimus* infectados (Fig. 11), reforçando o que foi demonstrado pelos valores médios que cresceram com a progressão da infecção.

A viabilidade dos ovos postos por *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis* foi avaliada pela análise do total de moluscos que eclodiram dos ovos. Mesmo na ausência de diferenças significativas entre os valores obtidos, uma redução progressiva ocorreu no número de moluscos recém-eclodidos nas diferentes semanas pós-exposição (primeira semana pós-exposição -0,18%; segunda semana pós-exposição -10,73%; terceira semana pós-exposição -

6,06%) (Tab. 1). Inversamente ao número total de ovos, a viabilidade mostrou uma tendência à redução através do período pré-patente (Fig. 12)

A razão entre os moluscos recém-eclodidos e os ovos postos foi analisada e observou-se uma redução significativa na segunda (-5,43%) e na terceira (-4,35%) semanas pós-infecção em relação aos valores observados para os não infectados e para a primeira semana pós-infecção (Tab. 1). Além disso, também ocorreu uma relação negativa entre esta razão (nº de neonatos/ovos) e o período de infecção.

O conteúdo de galactogênio mostrou uma relação negativa durante o período de infecção estudado. Mas apesar da redução visível (Fig. 13) na terceira semana pós-exposição o teste de comparação de médias não evidenciou diferenças significativas entre os valores observados para o grupo controle e os três grupos infectados.

Apesar de terem sido observadas larvas na região do ovotestis (Fig.14C), o tecido deste órgão manteve sua estrutura normal, com produção de espermatozóides e ovócitos.

Tabela 1. Alterações no número total de ovos postos e número de moluscos eclodidos/ovos postos por *Bulimulus tenuissimus* ao longo de três semanas após a exposição às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa nas três semanas.

Tempo de infecção (semanas)	Nº total de ovos postos X ± SD	Nº de moluscos eclodidos/ovos postos (%)
0	220,86 ± 33,55 ^a	0,92 ± 0,016
1	236,43 ± 45,94 ^a	0,92 ± 0,041
2	224,46 ± 25,47 ^a	0,87 ± 0,045
3	226,00 ± 30,09 ^a	0,88 ± 0,041

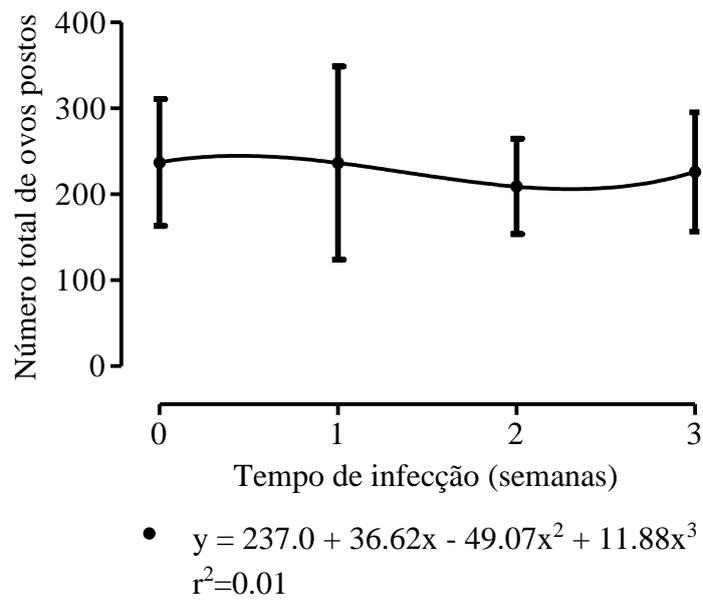


Figura 11. Relação entre o tempo de infecção com larvas de *Angiostrongylus cantonensis* e o número total de ovos por *Bulimulus tenuissimus*.

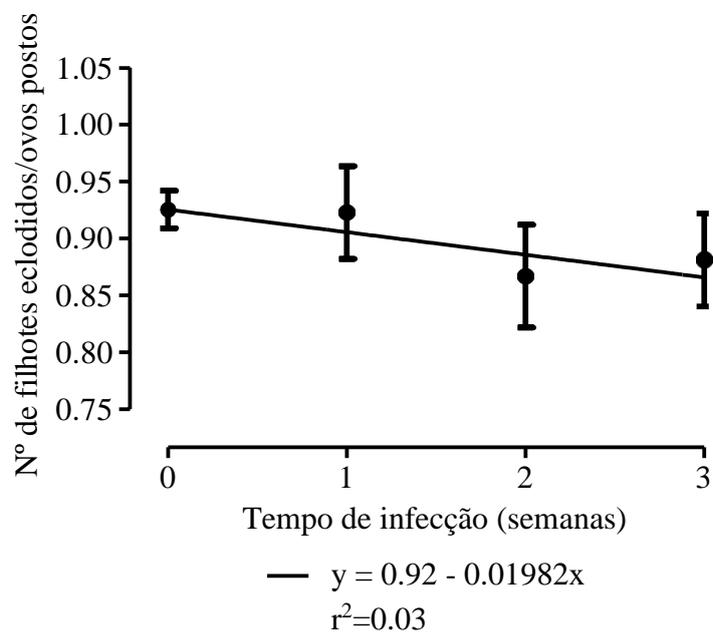


Figura 12. Relação entre o tempo de infecção com larvas de *Angiostrongylus cantonensis* e o número de filhotes eclodidos/número de ovos postos por *Bulimulus tenuissimus*.

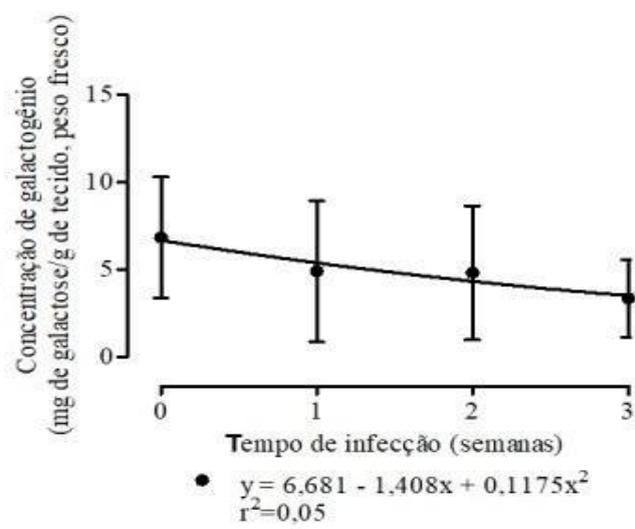


Figura 13. Conteúdo de galactose (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na glândula de albúmem de *Bulimulus tenuissimus* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*.

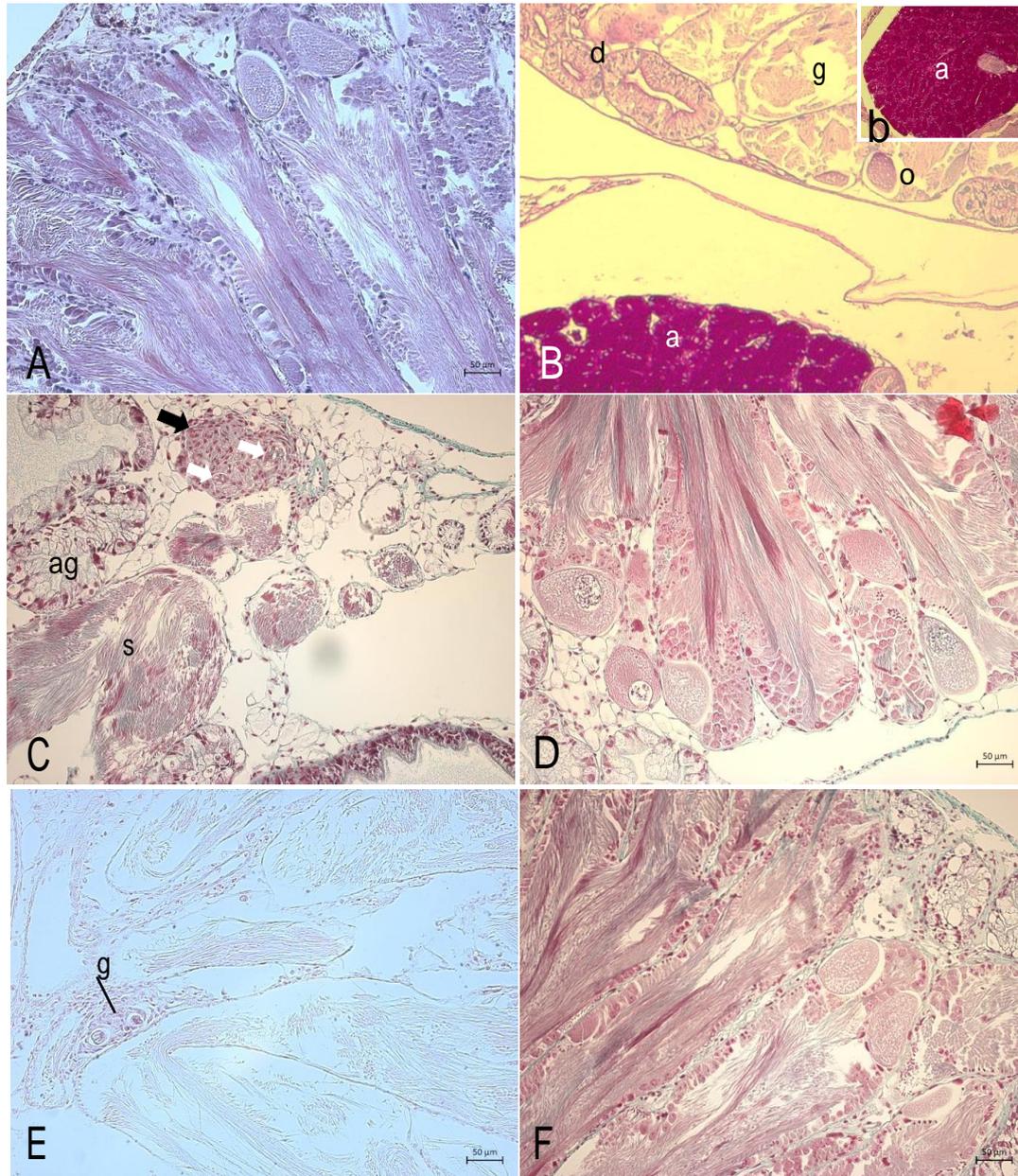


Figura 14. Secções histológicas da região do ovotestis de *Bulimulus tenuissimus* experimentalmente infectados com 1.200 larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. **A.** Molusco não infectado evidenciando o aspecto normal da gônada, contendo espermatozoides (s) em diferentes estágios de desenvolvimento e oócitos (ov). **B.** Região do aparelho reprodutor e órgãos acessórios, onde podemos observar a glândula de albúmem (a) fortemente corada evidenciando a grande quantidade de galactogênio neste órgão e parte da gônada (go) com oócitos (ov) e da glândula digestiva (dg). **(b - inset).** Detalhe da glândula de albúmem corada pelo PAS. **C-F.** Região do ovotestis de moluscos infectados, com larvas em desenvolvimento nos tecidos do órgão (seta branca) com infiltrados hemocitários (seta preta), glândula de albúmem (ag), porém ainda com a presença de espermatozoides (s) e oócitos (ov) em diferentes estágios de desenvolvimento. Há formação de granuloma (g) ao redor da larva em desenvolvimento. A, corado pela hematoxilina e eosina; B, corado pela reação do PAS para glicogênio; C,D e F, corado pelo trocrômico de Gomori; E, corado pela técnica de von Kossa para detecção de cálcio.

5.4. Metabolismo de carboidratos

O conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. tenuissimus* infectados foi significativamente diferente somente na primeira semana pós-exposição (Tab. 2), quando a glicemia aumentou 71,56% em relação aos valores observados para os moluscos não infectados ($34 \pm 7,55$ mg/dL). Na segunda e na terceira semanas pós-exposição o conteúdo de glicose foi menor do que o valor médio observado para o grupo controle (-4,92% e +13,74%, respectivamente), mas não foram observadas diferenças significativas entre esses valores (Tab. 2). A figura 15.A mostra a relação entre o conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. tenuissimus* durante o período pré-patente de *A. cantonensis*, revelando uma clara e forte tendência a normalizar a glicemia a partir da segunda semana pós-exposição.

Tabela 2. Concentração de glicose (mg/dL) e atividade da lactato desidrogenase (U/L) na hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* infectado experimentalmente com 1.200 larvas de *Angiostrongylus cantonensis*. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa nas três semanas. ^a-^b=Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada semana do experimento, $P < 0,05$ ($X \pm SD$ = média \pm desvio padrão).

Período de infecção (semanas)	Conteúdo de glicose (mg/dL) $X \pm SD$	Percentual de variação (%)	Atividade de LDH (U/L)	Percentual de variação (%)
0	34.00 ± 7.55^a	0	10.00 ± 0.56^a	0
1	58.33 ± 3.05^b	+71.56	11.00 ± 4.62^a	+10.00
2	32.33 ± 3.51^a	-4.92	14.00 ± 5.30^a	+40.00
3	29.33 ± 5.51^a	-13.74	9.00 ± 3.61^a	-10.00

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) estava ligeiramente aumentada (+10,0%) na primeira semana pós-exposição e aumentou mais na segunda semana pós-exposição, mas essas variações não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao valor observado para os moluscos controle ($10,0 \pm 0,557$ U/L) (Tab. 2). A regressão polinomial revelou a tendência à normalização das mudanças ocorridas no início do desenvolvimento larval intramolusco, variando a um valor que foi menor (-10,0%) do que os moluscos não infectados ao fim do período de análises (Fig. 15 B).

O conteúdo de glicogênio da massa cefalopodia foi reduzido na primeira e segunda semanas pós-exposição (-35,51% and -42,86%, respectivamente) em relação ao grupo controle ($2,447 \pm 1,392$ mg of glicose/g de tecido, peso fresco) (Tab. 3). Mesmo assim, na terceira semana pós-exposição, o conteúdo de glicogênio aumentou, mostrando uma redução de -30,85% em relação ao grupo controle. Novamente, o teste de regressão polinomial

mostrou que este parâmetro também tende a alcançar valores similares àqueles observados nos moluscos não infectados (Fig. 15 C).

Quando o glicogênio na glândula digestiva foi analisado, o valor observado para o grupo controle foi 5,27 mg de glucose/g de tecido, peso fresco, sendo reduzido nas três semanas de análises (-67,80%, -72,49% e -67,17%, respectivamente) (Tab. 3). Mesmo diante desta redução, os valores observados para os moluscos infectados não foram significativamente diferentes em relação aos moluscos não infectados, e exibindo uma relação negativa entre o conteúdo de glicogênio neste sítio e o período de infecção analisado (Fig. 15D).

Os resultados da histoquímica obtidos para a reação de PAS mostraram a presença de perfis larvais nos tecidos da massa cefalopediosa e do manto, com intensa marcação para glicogênio dentro do corpo da larva em desenvolvimento. Além disso, foi observado grande quantidade desse polissacarídeo estocado nos tecidos dos moluscos infectados (Fig. 10 A-C).

Tabela 3. Conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopediosa expresso em mg de glucose/g de tecido, peso fresco, em *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, em diferentes períodos pós-exposição, expresso em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre essas semanas. a=médias não diferem significativamente, P<0,05 (X±SD=média±desvio padrão).

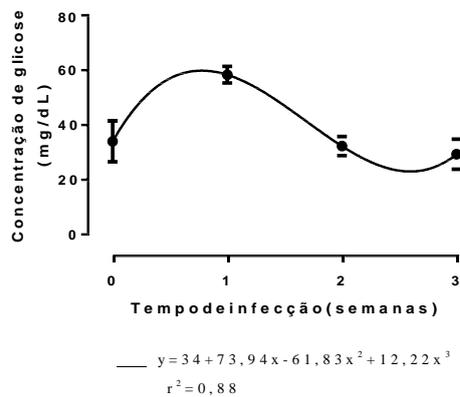
Período de infecção (semanas)	Conteúdo de glicogênio (mg of glucose/g de tecido peso fresco)			
	Massa cefalopediosa	Percentual de variação (%)	Glândula digestiva X ± SD	Percentual de variação (%)
0	2.45 ± 1.39 ^a	0	5.28 ± 4.08 ^a	0
1	1.58 ± 0.62 ^a	-35.51	1.70 ± 0.70 ^a	-67.80
2	1.40 ± 0.56 ^a	-42.86	1.45 ± 0.75 ^a	-72.49
3	1.70 ± 1.53 ^a	-30.61	1.73 ± 0.84 ^a	-67.17

A análise pela CLAE detectou somente a presença dos ácidos pirúvico e oxálico na hemolinfa de *B. tenuissimus* (Tab. 4), mas os valores obtidos não variaram significativamente durante o período pré-patente da infecção com *A. cantonensis*. O conteúdo de ácido pirúvico na hemolinfa de moluscos infectados foi reduzido na primeira e segunda semanas pós-exposição (41.52% e 45.66%, respectivamente), tendendo a alcançar valores próximos àqueles observados para o grupo controle (114.27 ± 18.35 mg/g) ao final do período pré-patente. A regressão polinomial revelou uma relação positiva entre o período de infecção e o conteúdo deste ácido na hemolinfa (Fig. 16).

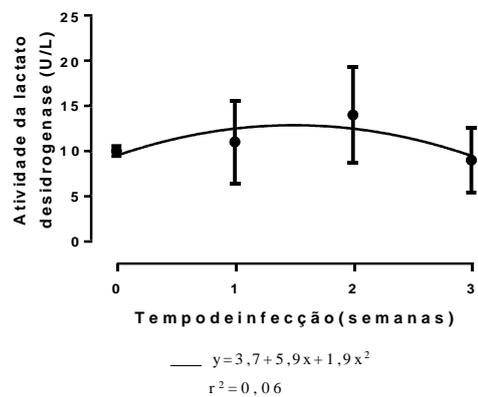
A concentração do ácido oxálico na hemolinfa de *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis*, aumentou (33,53 mg/g), representando um valor médio que foi 20,78% maior do que o observado para o grupo controle (28,05mg/g). Contudo, as variações não diferiram significativamente (Tab. 4). O teste de regressão polinomial revelou um padrão oscilante para o conteúdo de ácido oxálico na hemolinfa dos moluscos infectados durante o período de infecção estudado. O ácido succínico não foi detectado nos moluscos.

Tabela 4. Níveis de ácidos orgânicos na hemolinfa (mM) de *Bulimulus tenuissimus* infectados com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis* em diferentes períodos pós-exposição, expresso em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre essas semanas. a=médias não diferem significativamente, $P < 0,05$ ($X \pm SD = \text{média} \pm \text{desvio padrão}$).

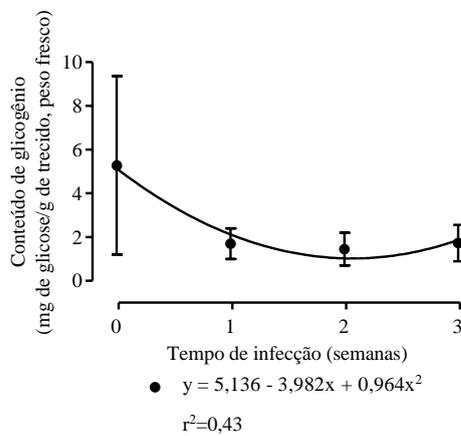
Período de infecção (semanas)	Ácido pirúvico $X \pm SD$	Conteúdo de ácido orgânico (mg/g)		
		Percentual de variação (%)	Ácido Oxálico $X \pm SD$	Percentual de variação (%)
0	$114,27 \pm 18,35^a$	0	$28,05 \pm 0,80^a$	0
1	$66,83 \pm 7,42^a$	-41,52	$33,53 \pm 5,79^a$	+19,54
2	$62,10 \pm 4,37^a$	-45,66	$28,50 \pm 8,40^a$	+1,60
3	$97,84 \pm 1,17^a$	-14,38	$39,59 \pm 11,29^a$	+41,14



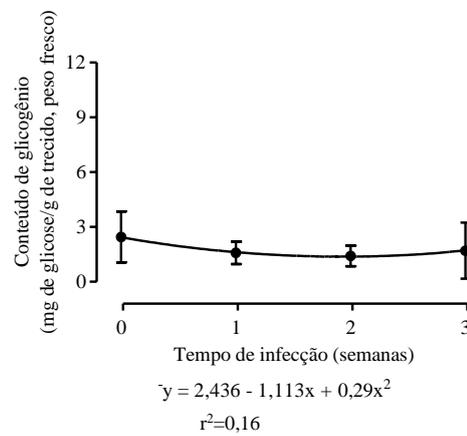
A



B



C



D

Figura 15. Mudanças metabólicas em *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. **A.** Conteúdo de glicose, mg/dL, na hemolinfa. **B.** Atividade da lactato desidrogenase, U/L, na hemolinfa. **C-D.** Conteúdo de glicogênio na massa cefalopediosa e na glândula digestiva, mg de glicose/g de tecido peso fresco, respectivamente.

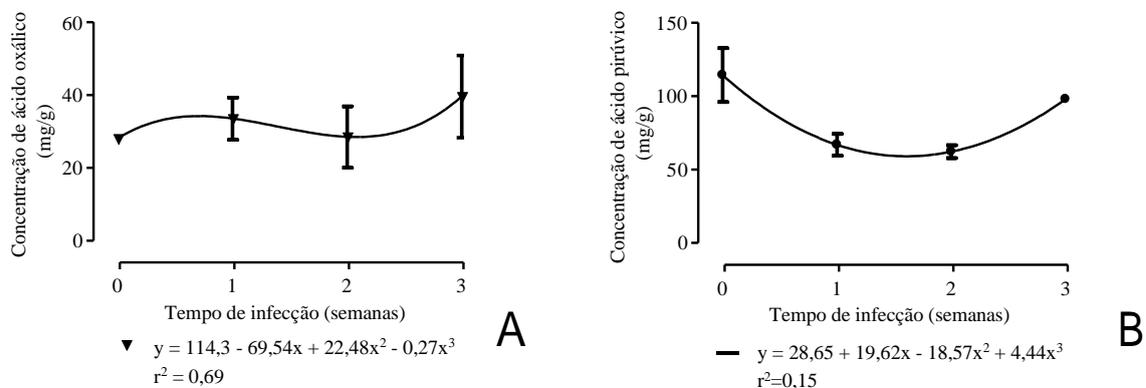


Figura 16. Mudanças metabólicas em *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com 1.200 larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, por três semanas. Conteúdo de ácidos orgânicos, oxálico (a) e pirúvico (b), na hemolinfa, mg/g. Semana 0 (zero) representa a média dos grupos controle ao longo das três semanas de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre eles.

5.5. Metabolismo de Produtos nitrogenados

A concentração de proteínas totais na hemolinfa de *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis*, está apresentada na Tabela 6, onde observamos que a proteinemia sofreu uma elevação significativa apenas na primeira semana pós-exposição quando o conteúdo de proteínas totais alcançou um valor 19,56% maior do que os moluscos não infectados ($15,30 \pm 0,33$ g/L), retornando progressivamente a valores próximos àqueles observados para o grupo controle (0). Quando submetidos à análise de regressão polinomial, uma relação positiva, porém fraca, foi observada entre o tempo de infecção e o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa (Fig. 17).

O conteúdo de ureia na hemolinfa de *B. tenuissimus* dos moluscos infectados se manteve sem variações significativas até a segunda semana pós-exposição às larvas de *A. cantonensis* (Tab. 5), porém na terceira semana de infecção observamos uma elevação de 308,32% na concentração deste produto nitrogenado de excreção na hemolinfa, em relação ao valor observado para o grupo de moluscos não infectados ($4,00 \pm 1,53$ mg/dL), sendo esta a única variação significativa observada neste parâmetro. Em função desta variação, uma forte relação positiva foi observada entre o conteúdo de ureia na hemolinfa de *B. tenuissimus* e o tempo de infecção com *A. cantonensis* (Fig. 18).

Na primeira semana após a exposição de *B. tenuissimus* às larvas L1 de *A. cantonensis*, observamos um aumento de 100% no conteúdo de ácido úrico na hemolinfa do molusco (Tab. 5) em relação ao grupo controle ($0,38 \pm 0,12$ mg/dL). Com a evolução da infecção, observamos um novo aumento significativo na concentração de ácido úrico na terceira semana pós exposição ($0,39$ mg/dL), alcançando um valor praticamente igual ao dos moluscos não infectados. Porém a comparação de médias feitas pelo teste de Tukey-Kramer revelou não haver diferença significativa entre os conteúdos de ácido úrico observado nos

diferentes períodos pré patentes analisados e aquele dos moluscos não infectados (0). A análise de regressão revelou uma fraca relação positiva entre os parâmetros analisados (Fig. 19).

No presente estudo a razão ureia/ácido úrico observada foi de 10,53 no grupo de moluscos não infectados, sendo reduzida nas segunda e terceira semanas após a exposição às larvas de *A. cantonensis*, segunda semana = 2,63; terceira semana = 2,56. Porém, no final do período de análise, terceira semana, houve uma elevação significativa para 27,22 nesta relação.

Tabela 5. Variação nos conteúdos de proteínas totais (g/L), ureia e ácido úrico, expressos em mg/dL, em hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* expostos às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente, por três semanas. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Tempo de infecção (semanas)	Concentração de proteínas totais (g/L)	Concentração de ureia (mg/dL)	Concentração de ácido úrico (mg/dL)	N
0	15,33 \pm 0,33 ^a	4,00 \pm 1,53 ^a	0,38 \pm 0,12 ^a	3
1	18,33 \pm 2,33 ^b	2,00 \pm 0,58 ^a	0,76 \pm 0,27 ^b	3
2	13,00 \pm 1,00 ^a	1,00 \pm 0,58 ^a	0,39 \pm 0,07 ^a	3
3	14,33 \pm 0,88 ^a	16,33 \pm 1,67 ^b	0,60 \pm 0,08 ^b	3

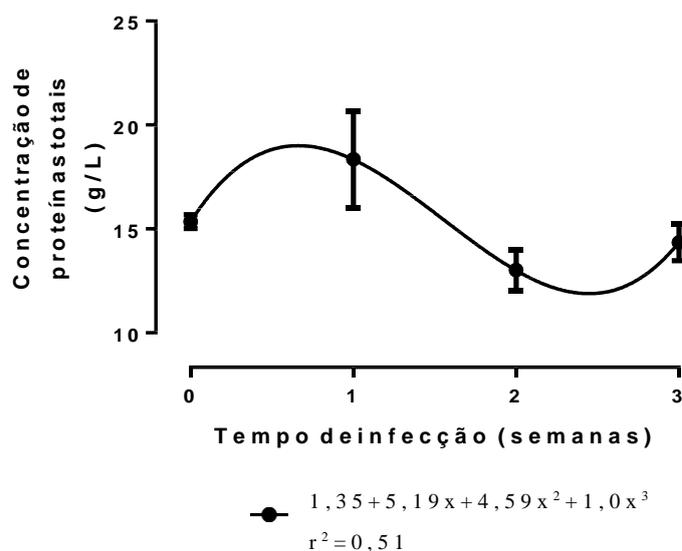


Figura 17. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de *Bulimulus tenuissimus* com larvas de *Angiostrongylus cantonensis*, e o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.

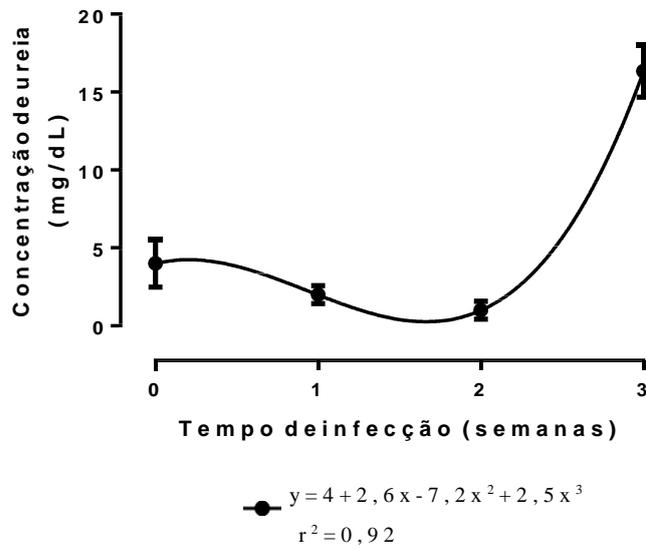


Figura 18. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de *Bulimulus tenuissimus* com larvas de *Angiostrongylus cantonensis*, e o conteúdo de ureia na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.

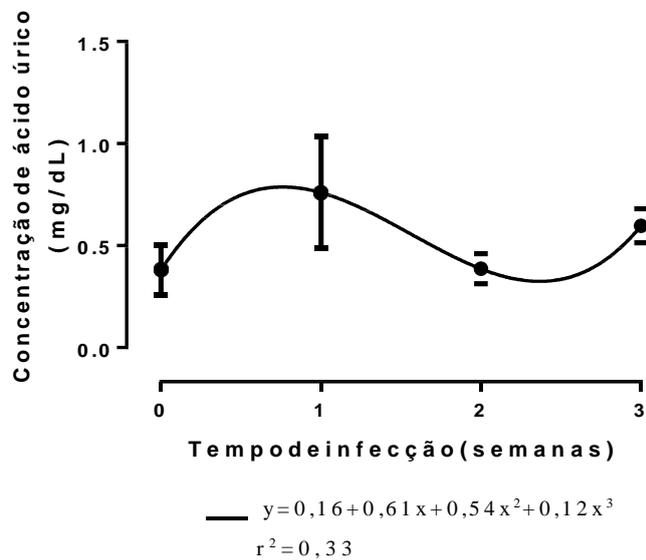


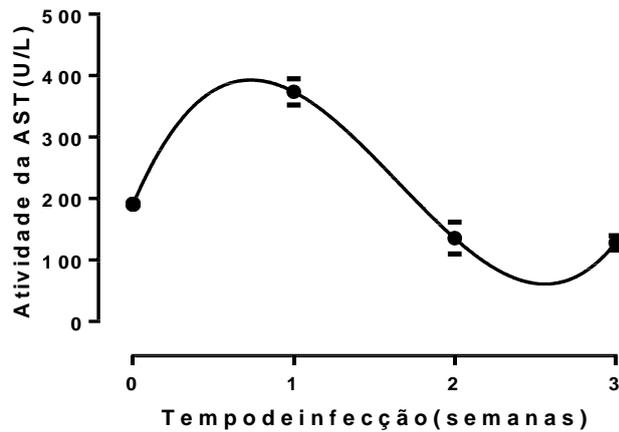
Figura 19. Relação entre o tempo de infecção, em semanas, de *Bulimulus tenuissimus* com larvas de *Angiostrongylus cantonensis*, e o conteúdo de ácido úrico na hemolinfa do molusco ao longo do período pré patente de três semanas.

A atividade das aminotransferases, AST e ALT, foi analisada ao longo das três semanas após a exposição de *B. tenuissimus* às larvas L1 de *A. cantonensis*. A atividade da AST sofreu uma elevação na primeira semana após a exposição, alcançando valores 96,50% maiores do que o observado para o grupo controle ($190,33 \pm 4,98$ U/L), sendo este valor significativamente diferente de todos os demais observados neste experimento. A partir deste período de infecção, houve uma redução progressiva da atividade desta enzima nas segunda e terceira semanas de infecção. Mesmo com esta redução, a atividade da AST manteve-se diferente daquela observada para os moluscos não infectados (Tab. 6). A análise de regressão polinomial de terceira ordem revelou uma forte relação positiva entre os tempos de infecção e a atividade da AST, indicando uma tendência a um padrão oscilante de variação da atividade desta enzima (Fig. 20A).

A atividade da ALT não variou significativamente na primeira semana de infecção de *B. tenuissimus* com *A. cantonensis* (Tab. 6), apesar de termos obtido um valor maior para a atividade desta enzima neste período de infecção em relação ao grupo controle ($7,67 \pm 0,67$ U/L). A partir da segunda semana de infecção a atividade da ALT apresentou reduções sequenciais, mantendo-se significativamente menor do que a atividade desta enzima na hemolinfa dos moluscos não infectados. Porém, a relação entre a atividade da ALT na hemolinfa de *B. tenuissimus* apresentou uma fraca relação positiva com o tempo de infecção com *A. cantonensis* (Fig. 20 B).

Tabela 6. Variação na atividade das aminotransferases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), em hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* expostos às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente, por três semanas. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b,c}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância.

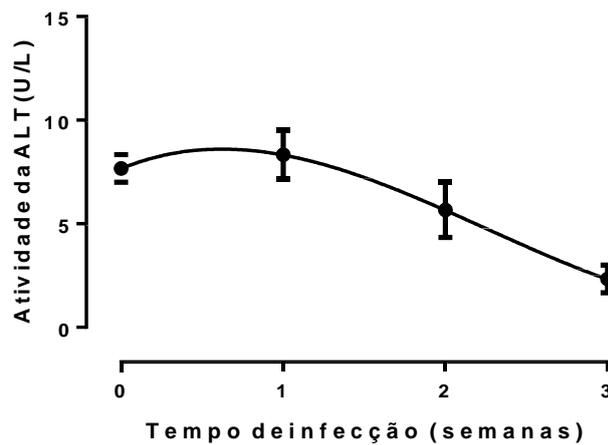
Tempo de infecção (semanas)	Atividade das aminotransferases		N
	AST (U/L)	ALT (U/L)	
0	$190,33 \pm 4,98^a$	$7,67 \pm 0,67^a$	3
1	$374,00 \pm 21,52^b$	$8,33 \pm 1,20^a$	3
2	$135,67 \pm 26,33^c$	$5,67 \pm 1,33^b$	3
3	$128,00 \pm 11,53^c$	$2,33 \pm 0,67^b$	3



A

$$y = 18,13 + 69,55x + 61,47x^2 + 13,51x^3$$

$$r^2 = 0,94$$



B

$$y = 0,95 + 1,53x + 0,49x^2$$

$$r^2 = 0,71$$

Figura 20. Relação entre a atividade das aminotransferases em hemolinfa de *Bulimulus tenuissimus* e o tempo após a exposição, em semanas, às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente, por três semanas. **A.** Atividade da aspartato aminotransferase (AST), expressa em U/L. **B.** Atividade da alanina aminotransferase (ALT), expressa em U/L.

5.6. Metabolismo de Cálcio

A calcemia na hemolinfa de *B. tenuissimus* experimentalmente infectado com *A. cantonensis* variou significativamente a partir da segunda semana após a exposição às larvas L1 deste nematoide (Tab. 7), evidenciando um padrão oscilante de variação, sendo aumentada em 9,84% na primeira semana de infecção, reduzida em 25,98% na segunda semana de infecção e novamente elevada em 18,51% no final do período de análise (terceira semana), quando comparados ao valor observado para o grupo controle ($255,95 \pm 34,68$ mg/dL). Apesar de tal padrão indicar uma tendência oscilante, observamos que ao final do período de desenvolvimento larval intramolusco a concentração de cálcio na hemolinfa tende a aumentar de forma mais pronunciada do que em períodos anteriores, o que foi reiterado pela forte relação positiva evidenciada pela análise de regressão polinomial (Fig. 21A).

Quando a concentração de cálcio foi analisada nas conchas de *B. tenuissimus*, observamos uma elevação progressiva do conteúdo deste íon desde a primeira semana de infecção com *A. cantonensis* (Tab. 7), alcançando um valor 241,69% maior ao final de terceira semana do período pré patente quando comparados com os moluscos não infectados do grupo controle, $285,47 \pm 28,33$ ppm de Ca^{++}/g de cinzas. A análise de regressão revelou uma relação positiva entre o tempo de infecção e o conteúdo de cálcio na concha de *B. tenuissimus* infectada com *A. cantonensis*, provavelmente devido a grande variação observada nos valores obtidos em cada período de análise esta relação foi fraca ($r^2=0,67$).

A análise histoquímica pela técnica de von Kossa revelou intensa deposição de cálcio nos tecidos da glândula digestiva (Fig. 22 A), porém nos demais tecidos, como os da massa cefalopediosa e da gônada, não foi observada tal deposição em mesma intensidade (Fig. 22 B-C). Não foi observada a deposição de íons cálcio ao redor das larvas de *A. cantonensis* em desenvolvimento (Fig. 22 D).

Tabela 7. Concentração de cálcio em hemolinfa *Bulimulus tenuissimus*, expressa em mg/dL, e em concha, expressoem ppm de Ca^{++}/g de cinzas, após a exposição às larvas L1 de *Angiostrongylus cantonensis*, experimentalmente. $\bar{X} \pm \text{SD}$ = média \pm desvio-padrão. N = número mínimo de determinações espectrofotométricas coerentes. ^{a,b,c}=médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Tempo de infecção (semanas)	Concentração de cálcio		N
	Hemolinfa (mg/dL)	Concha (ppm de Ca^{++}/g de cinzas)	
0	$255,95 \pm 34,68^a$	$285,47 \pm 28,33^a$	3
1	$281,14 \pm 7,19^a$	$519,09 \pm 118,96^a$	3
2	$189,45 \pm 1,52^b$	$574,07 \pm 65,10^a$	3
3	$303,34 \pm 5,15^c$	$976,34 \pm 343,67^b$	3

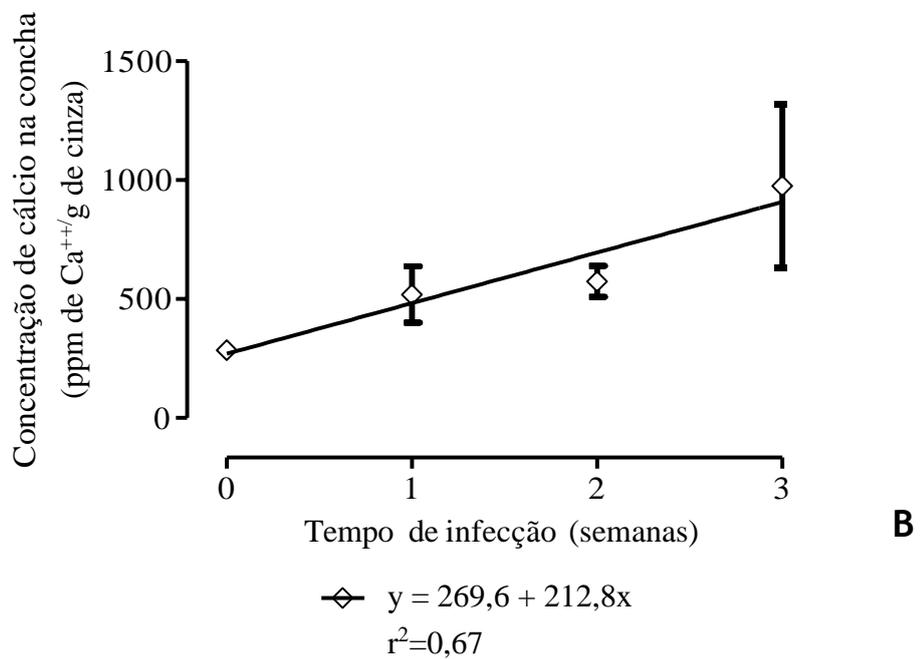
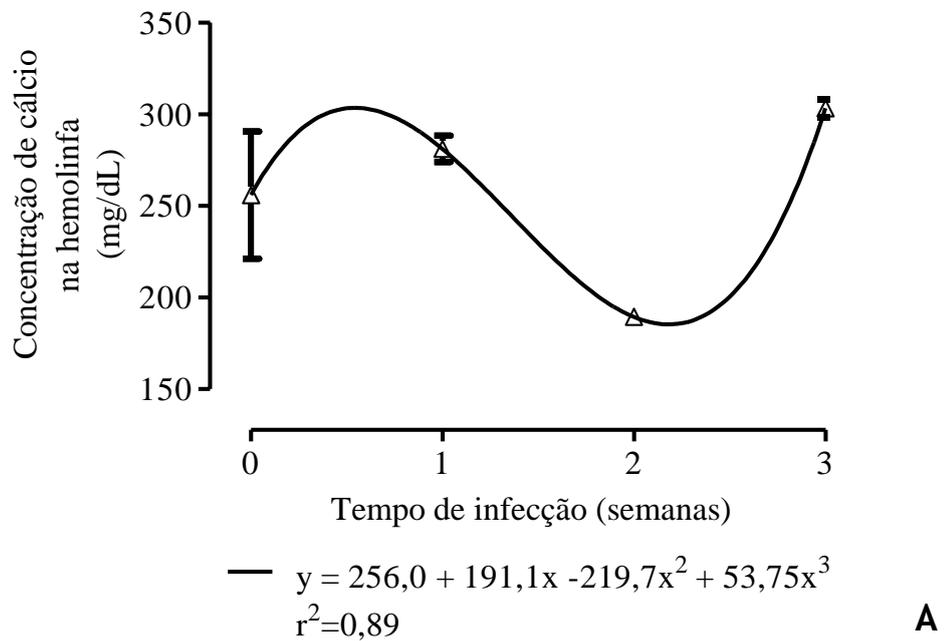


Figura 21. Relação entre o tempo de infecção de *Bulimulus tenuissimus* com *Angiostrongylus cantonensis*, expresso em semanas, e a concentração de cálcio. **A** . Hemolinfa, expresso em mg de cálcio/dL de hemolinfa; **B** . Concha, expresso em ppm de Ca⁺⁺/g de cinzas.

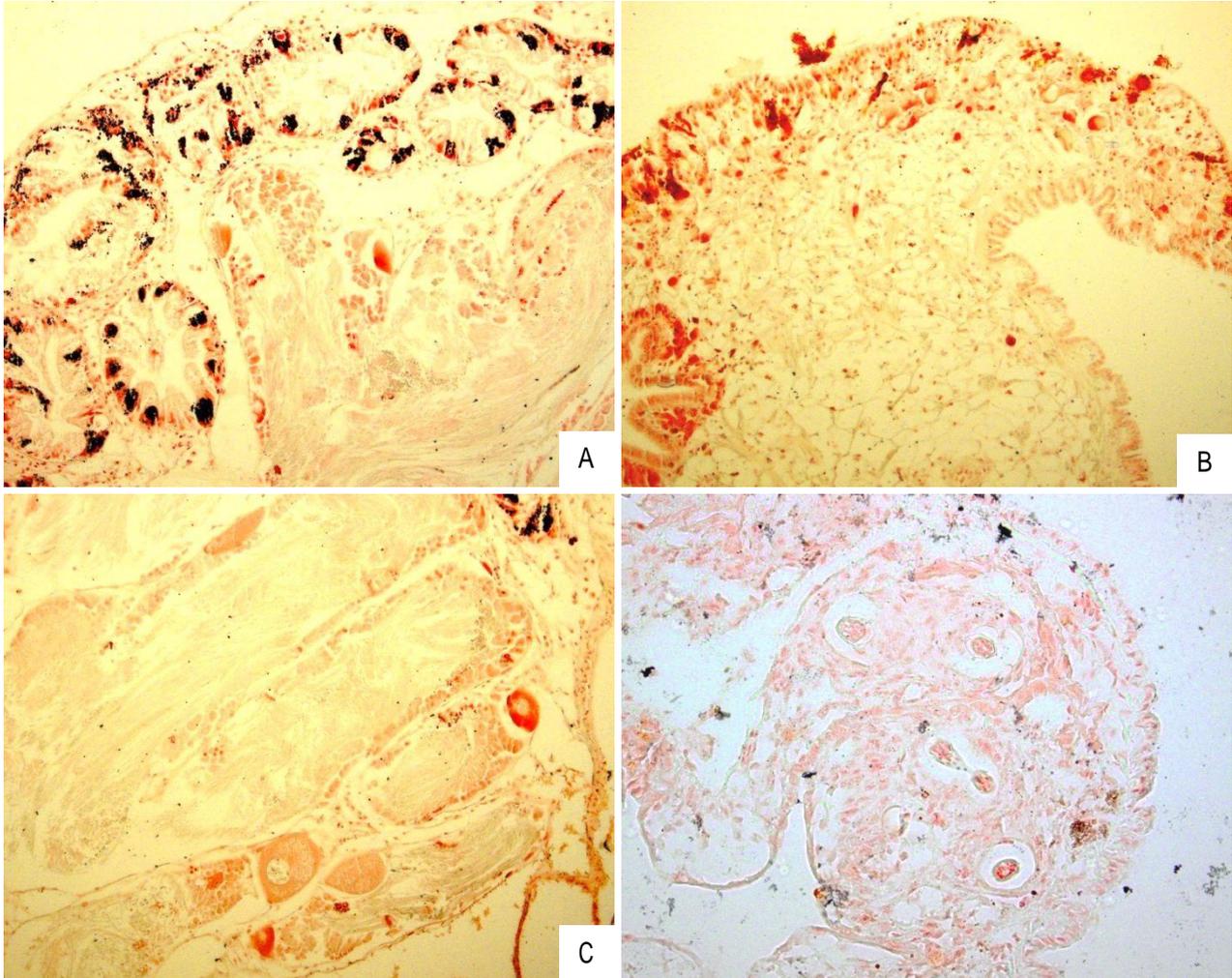


Figura 22. Histoquímica para detecção de cálcio em tecidos de *Bulimulus tenuissimus* infectados experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*. Técnica: von Kossa (Humason, 1979). **A.** Glândula digestiva, evidenciando intensa marcação de cálcio nas regiões de coloração preta; **B.** Massa cefalopediosa; **C.** Ovotestis; **D.** Massa cefalopediosa evidenciando as larvas de *A. cantonensis* em desenvolvimento sem a deposição de cálcio na região circunvizinha a estas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Infecção experimental e recuperação das larvas

Harris e Cheng (1975) atestaram que a via mais comum de infecção de *B. glabrata* experimentalmente exposta a larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis* foi via penetração das paredes gástrica e prointestinal após ingestão, com migração, através do rim e da crista retal, para o colar do manto e massa cefalopediosa do hospedeiro, onde os parasitos se alojaram. Eles também observaram que os parasitos foram encapsulados em *B. glabrata* em 24/48 h após a infecção. O encapsulamento ocorre como um processo de duas fases que envolve: **i** - infiltração inicial e agregação de células hemolinfáticas ao redor do parasito; e, **ii** - transformação posterior de agregados celulares em nódulos semelhantes a tecido fibroso. O pequeno número de parasitos, que foram encontrados em tecidos de crista retal, rim ou tecido conjuntivo vascular perto da gônada, foram encapsulados de forma semelhante.

Os resultados desses autores apresentaram algum tipo de similaridade com nossos achados no presente estudo. Apesar de alguns autores terem afirmado que a infecção do hospedeiro pelas larvas do primeiro estágio de *A. costaricensis* pode ocorrer através de uma via ativa, penetrando o tegumento do molusco (Thiengo et al., 2005; Banevicius et al., 2006), a distribuição larval no hospedeiro infectado apontou para a direção de uma infecção passiva, onde as larvas L1, uma vez ingeridas, penetram através da parede intestinal do molusco. Todavia, cabe destacar que o primeiro grupo de autores citados acima estudou a relação de *A. cantonensis* com *B. glabrata* ou *L. palustris* (Müller, 1774), moluscos de água doce, e no presente estudo o hospedeiro era um gastrópode terrestre.

Apesar dos hábitos do hospedeiro vertebrado definitivo, os roedores, a maior parte da contribuição na literatura sobre a relação entre moluscos e larvas de *A. cantonensis* foi feita com espécies de moluscos de água doce (Tunholi-Alves et al., 2014a; 2014b). Puthiyakunnon e Chen (2015) citam 15 espécies terrestres de moluscos, num total de 29 espécies, relatadas na literatura como hospedeiro intermediário de *A. cantonensis*. Mesmo porque a infecção definitiva do hospedeiro é mais provável de ocorrer se o hospedeiro intermediário for um molusco terrestre.

Por que isso importa?

Os autores citam massivamente a agregação de fibroblastos e a transformação de agregados celulares em uma estrutura de aparência mais fibrosa em torno das larvas encapsulantes, de forma diferente que foi observada no presente estudo. Isso pode ser explicado pelo fato de que os tecidos nos moluscos de água doce são mais macios e apresentam uma quantidade de água maior do que nos moluscos terrestres. Por esse motivo, em nossos resultados não houve a intensa transformação de agregados celulares em material fibroso como relatado por Harris e Cheng (1975), sendo os tecidos de *B. tenuissimus* mais densos do que os tecidos das diferentes espécies de moluscos dulciaquícolas encontrados nos estudos publicados.

Além disso, houve larvas nos tecidos musculares da massa cefalopediosa, manto e gônada (ovotestis), resultando em uma distribuição mais ampla dos parasitos em desenvolvimento no hospedeiro molusco (*B. tenuissimus*) do que as citações que encontramos nos estudos anteriores com moluscos de água doce.

A recuperação de larvas L3 no presente estudo, embora em percentual reduzido, mostrou que *B. tenuissimus* é um hospedeiro intermediário potencial para *A. cantonensis*. Lima et al. (2017) registraram uma recuperação de larvas de 32% e 20% para *B. straminea* e *B. tenagophila*, respectivamente, experimentalmente infectadas com 1.200 L1 de *A. cantonensis* e essas larvas se mostraram infectantes, uma vez que esses autores infectaram experimentalmente roedores (*Rattus norvegicus*) e recuperaram larvas L1 viáveis nas fezes liberadas pelos roedores infectados. No presente estudo, o número de larvas recuperadas (17,2%) foi inferior àquele registrado por Lima et al. (2017). Uma infecção experimental de ratos, como hospedeiro definitivo, foi realizada utilizando estas L3 e estamos aguardando o fechamento do período pré patente para detecção de larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes destes para confirmação da atuação de *B. tenuissimus* como hospedeiro intermediário de *A. cantonensis*.

6.2. Análise Histológica e histoquímica

Alterações histológicas foram observadas na glândula digestiva, a despeito da ausência de larvas se desenvolvendo nesse órgão. Isto pode sugerir que larvas de nematoides podem liberar alguns produtos de excreção/secreção, os quais interagem com os tecidos do molusco, resultando num processo tóxico. O status histológico observado no presente estudo é similar àquele registrado por Tunholi et al. (2013) em *B. glabrata* infectadas com *Echinostoma paraensei*, um trematódeo. Tunholi-Alves et al. (2015) registraram a presença de granuloma com larvas em desenvolvimento dentro dos tecidos da glândula digestiva de *A. fulica* infectados com *A. cantonensis*, o que difere dos resultados do presente trabalho, uma vez que não foi possível encontrar larvas ou granuloma nesse tecido em *B. tenuissimus* infectados. Apesar disso, as alterações histológicas no tecido da glândula digestiva foram semelhantes àquelas observadas por aqueles autores para *A. fulica/A. cantonensis*. Lima et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes aos de Tunholi et al. (2015), quando compararam infecções com *A. cantonensis* em duas espécies de *Biomphalaria*, com granulomas na glândula digestiva das duas espécies analisadas.

O infiltrado hemocitário que se formou em torno da larva de *A. cantonensis* em desenvolvimento no molusco *B. tenuissimus* foi diferente do granuloma típico observado por Lima et al. (2017) em *B. straminea* e *B. tenagophila* infectadas com *A. cantonensis*. Estes autores mostraram uma estrutura de granuloma com camadas concêntricas, formada por hemócitos e fibras colágenas. Tunholi-Alves et al. (2015) também observaram um granuloma típico em *A. fulica* infectados com *A. cantonensis*. Além dessas características, Tunholi-Alves et al. (2014a) observaram um grande depósito de grânulos de cálcio em torno do granuloma formado em *B. glabrata* infectado com *A. cantonensis*. Os resultados do presente estudo indicam que em *B. tenuissimus*, a reação do molusco à presença do parasito foi menor do que em *Biomphalaria* spp.

6.3. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bulimulus tenuissimus* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*

As alterações na biologia reprodutiva dos moluscos infectados com helmintos são frequentemente descritas através da análise dos parâmetros reprodutivos relacionados a postura, eclodibilidade e viabilidade dos ovos. A maioria dos estudos encontrados na literatura, apontam uma queda no desempenho reprodutivo, fenômeno esse denominado **Castração Parasitária** (BAUDOIN, 1975). Este autor estabeleceu que essa castração pode ser um processo direto, onde o parasito causa danos no tecido gonadal ou indireto em consequência da retirada de nutrientes pelos parasitos. Por outro lado, Minchela et al. (1985),

destacou uma outra estratégia usada pelo hospedeiro, a fim de aumentar seu desempenho reprodutivo, que pode ocorrer em um ou mais parâmetros reprodutivos, fenômeno denominado **Compensação Reprodutiva**.

Em Tunholi-Alves et. al. (2011), todos os parâmetros reprodutivos (número de massa de ovos por moluscos, número de ovos por moluscos, média de ovos por massa de ovos, taxa de eclosão e conteúdo de galactogênio na glândula de albúmem) de *B. glabrata* infectados com *A. cantonensis* foram reduzidos a partir da segunda semana de infecção, comprovando a castração parasitária. Contudo, não houve alterações histológicas no ovotestis, nem foram observadas larvas ou granulomas nesse tecido, tendo os autores concluído que tal castração seria indireta. Resultados diferentes foram observados por Lima et al. (2016) durante os estudos com *B. straminea* e *B. tenagophila* também infectados com *A. cantonensis*, onde para *B. straminea* foi apresentado uma redução dos valores com uma ligeira tendência a recuperação ao longo da infecção no número de ovos por molusco e no número de moluscos eclodidos, e para *B. tenagophila* houve um aumento no número de ovos por moluscos, mais acentuado na primeira e segunda semana de infecção com os valores dos infectados maiores que o grupo controle e uma redução acentuada na segunda semana de infecção em relação ao número de moluscos eclodidos por moluscos. A concentração de galactogênio na glândula de albúmem ficou bastante reduzida durante toda infecção em *B. straminea* enquanto que em *B. tenagophila*, o conteúdo de galactogênio nos moluscos infectados mais que dobrou na primeira semana em relação ao grupo controle e continuou com valores maiores do que o controle durante todo o período de infecção. A autora também observou danos teciduais e presença de granuloma no ovotestis. Sendo assim, a conclusão descrita foi de uma castração parcial e direta.

No presente estudo, apesar de, em média, o número total de ovos postos ter sido maior nos moluscos infectados, a grande amplitude de variação na amostra não dá a estes valores diferença significativa em relação aos animais não infectados, portanto, não podemos falar em termos de compensação da fecundidade, como observado por outros autores para moluscos infectados (MELLO-SILVA et al., 2007). Da mesma forma, não podemos falar em castração parasitária, como observado por Tunholi-Alves et al. (2011) para *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*. Os resultados obtidos no presente estudo indicam não haver influência, positiva ou negativa, da infecção com *A. cantonensis* sobre a biologia reprodutiva, de modo geral, de *B. tenuissimus*.

Do ponto de vista da ecologia da relação entre molusco-larva de nematoide, indica que, devido à ausência de efeitos da infecção sobre a biologia reprodutiva do molusco hospedeiro, *B. tenuissimus*, pode ser um excelente hospedeiro intermediário para *A. cantonensis* na natureza, tendo garantido o desenvolvimento larval intramolusco, sem, contudo, levar a prejuízos à população devido ao comprometimento do processo reprodutivo do molusco.

6.4. Metabolismo de carboidratos

Pinheiro e Amato (1994) observaram uma redução acentuada no conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. similis*, um molusco gastrópode, experimentalmente infectado com *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907, o qual alcançou um valor médio 62% menor do que moluscos não infectados 90 dias pós-infecção. Embora essas mudanças sejam geralmente observadas em moluscos infectados com larvas de trematodeos (Cheng & Lee, 1971; Cheng & Snyder, 1963; Mello-Silva et al. 2010; Tunholi et al., 2011), existem poucos dados sobre essas mudanças fisiológicas. Quando procuramos por alterações no metabolismo energético de moluscos terrestres infectados com larvas de nematoides, o

número de estudos é bem menor. Brockelman e Sithithavorn (1980) observaram que o nível normal de glicose na hemolinfa de *A. fulica* caiu de 19,05% para 4,25% somente após a primeira semana de infecção com *A. cantonensis*. De maneira contrária, no presente estudo foi observado um aumento significativo no conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis* somente na primeira semana de infecção. Desse ponto da infecção em diante, a glicemia alcançou valores que não diferiram daqueles observados para os moluscos controle.

De acordo com Thompson & Lee (1986), os moluscos têm uma boa capacidade de regular o conteúdo de glicose na hemolinfa, mesmo quando parasitados por larvas de trematódeos. Nossas observações claramente indicam uma queda na habilidade de regulação glicêmica em *B. tenuissimus* infectado com *A. cantonensis* na primeira semana pós-exposição, mas após este período, os mecanismos homeostáticos controlaram este parâmetro e pode-se observar uma tendência de retorno à normalidade dos valores.

A enzima LDH é um importante elo para o metabolismo energético anaeróbico, levando produtos da glicólise (ácido pirúvico) para a via fermentativa, formando ácido láctico. Lima et al. (2016) observaram que a redução no conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. straminea* e *B. tenagophila* infectados com *A. cantonensis* induziu uma transição do metabolismo de aeróbico para anaeróbico para manter seu balanço homeostático. Esses autores observaram uma variação na atividade da LDH de forma inversa àquele que ocorreu no conteúdo de glicose nesses moluscos infectados. O mesmo padrão foi observado por Tunholi-Alves et al. (2014b), que mostraram que a atividade de LDH aumentou quando o conteúdo de glicose estava reduzido na hemolinfa de *B. glabrata* infectados com *A. cantonensis*. Nossos resultados mostraram quando o conteúdo de glicose aumentou muito na primeira semana pós-exposição, a atividade da LDH aumentou levemente. Mas na segunda semana pós-exposição, o conteúdo de glicose reduziu muito, sendo acompanhado pelo maior aumento na atividade de LDH na hemolinfa de *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis*. Portanto, parece que as alterações na glicemia nesta espécie de molusco demandam mais tempo para desencadear o mecanismo homeostático. Além disso, estas alterações parecem ser menores do que as observadas por Tunholi-Alves et al. (2014b), que registraram mudanças na atividade de LDH em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis* maiores do que 100% durante as três semanas de infecção.

O conteúdo de glicogênio variou da mesma forma em ambos tecidos analisados (massa cefalopodia e glândula digestiva), sendo reduzido ao longo do período pré-patente. O padrão de variação no glicogênio estocado nesses tecidos indica que o molusco infectado está usando as reservas de carboidratos, através de uma via anaeróbica, para manter o metabolismo energético e a glicemia, mesmo com a demanda energética da larva em desenvolvimento. A atividade da LDH está aumentada na primeira e segunda semanas pós-exposição, e nesse período os depósitos de glicogênio estão reduzidos. Na terceira semana isto se inverte, com a redução na atividade de LDH e o aumento nas reservas de glicogênio sendo observada em ambos tecidos analisados.

Nos moluscos terrestres, o metabolismo energético é amplamente baseado na degradação de carboidratos (Livingstone e de Zwaan, 1983). Pinheiro e Amato (1994) observaram a redução nos depósitos de glicogênio em 86,4% e 79,1% na glândula digestiva e massa cefalopodia, respectivamente, de *B. similaris* infectados com *E. coelomaticum*, aliado a uma redução de 62,09% no teor de glicose na hemolinfa nesse sistema hospedeiro-parasito, evidenciando a quebra da homeostase glicídica nos moluscos infectados. No entanto, no presente estudo, foi possível observar que a manutenção da glicemia é alcançada e a demanda

energética é sustentada pelo consumo anaeróbico do glicogênio armazenado em ambos os sites analisados.

Os resultados da CLAE vieram confirmar esta hipótese. O ácido pirúvico é reduzido na primeira e segunda semanas após a exposição, e isso pode indicar que este ácido é conduzido a uma via anaeróbia, que gastou mais substratos para produzir energia em uma quantidade adequada para manter os diferentes processos fisiológicos no hospedeiro e garantir a energia suficiente para sustentar o desenvolvimento larval intramolusco larval. As alterações no conteúdo de ácido oxálico uma variação reduzida, quando comparada com aquela de ácido pirúvico, evidenciando que, em *B. tenuissimus*, isso não é significativamente afetado pela infecção, e não há comprometimento do metabolismo aeróbio. O aumento da demanda energética para os moluscos infectados é compensado pela aceleração do metabolismo anaeróbio.

Tunholi-Alves et al. (2014b) observaram uma redução acentuada na glicose da hemolinfa que foi acompanhada por redução significativa nos depósitos de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*. Alinhados a isso, esses autores observaram uma intensa depleção do ciclo de Krebs, sem detecção de ácido succínico e aumento da atividade de LDH em caramujos infectados, apontando claramente uma transição aeróbica para anaeróbia no metabolismo energético. No presente estudo, observou-se um padrão semelhante, com redução do teor de ácido pirúvico, aumento da atividade de LDH e aumento do ácido oxálico, evidenciando que o ácido pirúvico é conduzido a uma via anaeróbia, reduzindo a entrada desse ácido no Ciclo de Krebs, via complexo de piruvato desidrogenase, causando a acúmulo de ácido oxálico.

A redução observada nos depósitos de glicogênio não foi estatisticamente significativa e isso pode ser entendido quando os resultados histoquímicos (reação do PAS) são analisados. É evidente que as larvas em desenvolvimento retiram os nutrientes do hospedeiro e os armazenam como glicogênio em seu corpo. Mesmo assim, é possível observar grandes quantidades deste polissacarídeo nos tecidos da massa cefalopediosa e do manto. Não encontramos na literatura nenhum outro estudo em que as alterações nos conteúdos de carboidratos em moluscos tenham sido acompanhadas de reação PAS. Tunholi-Alves et al. (2015) registraram alterações significativas no metabolismo de produtos nitrogenados em *A. fulica* infectados com diferentes cargas de L1 de *A. cantonensis*. Esses resultados reforçam os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que as mudanças no metabolismo das proteínas e dos produtos nitrogenados da excreção são, geralmente, subsequentes às mudanças ocorridas no metabolismo dos carboidratos.

A maioria das informações encontradas na literatura são sobre o relacionamento fisiológico de *Biomphalaria* spp. e *A. cantonensis* (Tunholi-Alves et al., 2014b; Bonfim et al., 2014). O caracol *A. fulica* é apontado como o principal molusco terrestre hospedeiro intermediário para *A. cantonensis* em muitos países (Thiengo et al., 2010). Tunholi-Alves et al. (2014b) apresentaram um extenso estudo sobre as mudanças no metabolismo de carboidratos em *B. glabrata* infectadas com *A. cantonensis* e Lima et al. (2016) fizeram uma comparação entre as mudanças neste metabolismo em *B. straminea* e *B. tenagophila* em resposta à infecção com este nematoide.

As mudanças observadas no metabolismo energético (carboidratos) indicam que *B. tenuissimus* possui mecanismos mais eficientes de compensação das mudanças fisiológicas decorrentes do parasitismo e do fardo do desenvolvimento larval. Os resultados obtidos no presente estudo nos levam a concluir que *B. tenuissimus* não é apenas mais um hospedeiro, mas também um bom hospedeiro para *A. cantonensis*.

6.5. Metabolismo de produtos nitrogenados

Em uma ampla revisão Becker (1980) evidenciou as alterações metabólicas que surgem em *B. glabrata* decorrentes da infecção com *S. mansoni*, relatando a redução que ocorre na glicemia do molusco infectado, levando a alterações consequentes nos conteúdos de aminoácidos e proteínas na hemolinfa destes hospedeiros intermediários. Tais alterações também têm sido evidenciadas em outros sistemas parasito-hospedeiro, envolvendo tanto trematódeos (Tunholi et al., 2011) como nematóides (Tunholi-Alves et al., 2012).

O conhecimento acumulado pelos diversos resultados obtidos em nosso Grupo de Pesquisa (GP Fisiologia de Moluscos de Interesse Médico-Veterinário – Diretório dos Grupos de Pesquisa - CNPq) tem demonstrado que, apesar de Livingstone e de Zwaan (1983) apontarem que o metabolismo energético de moluscos é baseado principalmente em carboidratos como substratos para obtenção da energia necessária ao seu crescimento, desenvolvimento e manutenção do metabolismo basal, temos observado que há divergências neste aspecto no que tange aos moluscos aquáticos (dulciaquícolas) e terrestres. Nos moluscos terrestres os depósitos de carboidratos são mais significativos em quantidade do que nos moluscos aquáticos, o que indica que nestes últimos, outros substratos são utilizados em maior extensão do que nos moluscos terrestres em condições de normalidade metabólica e fisiológica (Becker & Schmale, 1975).

No presente estudo, a situação de estresse fisiológico, determinou uma elevação na glicemia do molusco na primeira semana de infecção e consequente redução dos depósitos de glicogênio nos tecidos da massa cefalopodia e da glândula digestiva, evidenciando o aumento da mobilização das reservas energéticas glicídicas do molusco para compensar o aumento da demanda que se estabelece em função do desenvolvimento larval intramolusco (Martins et al. *no prelo*).

Brockelman (1980) observou em *A. fulica* infectada com *A. cantonensis* alterações semelhantes no conteúdo de glicose. Em 1978, Brockelman, observou neste mesmo sistema parasito-molusco hospedeiro intermediário, a redução no conteúdo de proteínas totais de 1,77 mg% para 0,6 mg%, uma redução de 66% neste valor.

A intensa migração e o crescimento das L1 até completar seu desenvolvimento pré patente (de L1 até L3), causa uma série de danos teciduais, provocando o extravasamento de proteínas celulares, e esta alteração fisiológica pode levar o molusco a recrutar uma maior quantidade de proteínas, provavelmente, oriunda dos tecidos lesionados, o que fica evidente com a elevação da atividade das aminotransferases, AST e ALT, na hemolinfa de *B. tenuissimus* na primeira semana após a exposição às L1 de *A. cantonensis*.

Tunholi-Alves et al. (2012) observaram aumento na atividade da AST em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*, com alterações na atividade de ambas as enzimas, sendo a atividade da AST aumentada em até 49,62% e a ALT em 98,13% ao final do período de três semanas de desenvolvimento larval intramolusco.

Em consequência, observamos uma redução na concentração de ureia e aumento na concentração de ácido úrico na hemolinfa de *B. tenuissimus* na primeira semana após a exposição às larvas de *A. cantonensis*. Com o prosseguimento do desenvolvimento larval intramolusco, observamos uma perda na capacidade metabólica de manter a homeostase do metabolismo de produtos nitrogenados, pois mesmo com a queda na concentração de proteínas totais na hemolinfa a valores próximos aos observados no grupo controle, há uma elevação muito significativa na concentração de uréia na hemolinfa, e o conteúdo de ácido úrico, apesar de estar reduzido na terceira semana após exposição, ainda mantém-se elevado em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2000) ao analisarem e compararem os efeitos da infecção por *E. coelomaticum* sobre o metabolismo

de produtos nitrogenados em *B. similis*, havendo uma redução no conteúdo de ureia e elevação no de ácido úrico nos moluscos aos 30 dias de infecção com este trematódeo.

Desta forma, a hiperproteinemia que se estabelece leva o molusco a metabolizar estas proteínas em concentração superior à normal, formando elevada quantidade de produtos nitrogenados, como amônia, os quais precisam ser detoxificados pela via excretora.

Becker & Schmale (1975) observaram em *B. glabrata* mantida em jejum severo a alteração da concentração de ureia de 0,160 mg% para 5,12 mg%. Segundo Pinheiro (1996), em seu estudo com *B. similis*, 30 dias de jejum severo e assemelham a 104 dias de infecção com *E. coelomaticum* no que tange às alterações metabólicas observadas. Assim, podemos extrapolar os estudos de Becker & Schmale (1975) para comparações com o que deve ocorrer com *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*.

Os moluscos terrestres em função de sua maior dificuldade em manter o seu balanço hídrico, estando expostos a perda excessiva de água e, portanto, à dessecação, buscam mecanismos fisiológicos que evitem a perda excessiva de água. Assim, em condições normais, estes moluscos excretam predominantemente a ureia como produtos nitrogenados de degradação/excreção, exibindo um padrão excretor ureotélico predominante. Porém, a excreção de ureia leva a consequentes perdas de água em quantidades significativas.

Por esta razão, quando há uma produção aumentada de ureia pelos moluscos, como nas situações de inanição e de infecção por larvas de helmintos, nos moluscos terrestres, os produtos nitrogenados tendem a ser predominantemente excretados através da eliminação de ácido úrico, o qual pode ser excretado de forma altamente concentrada e com pequena perda hídrica para o molusco, levando o molusco a alterar seu padrão de excreção para uricotélico.

Tunholi-Alves et al. (2015), em um estudo com *A. fulica* experimentalmente infectada com *A. cantonensis* observaram redução na proteinemia dos moluscos infectados, sendo esta alteração acompanhada por aumentos significativos na concentração de ureia e de ácido úrico, sugerindo a ocorrência de uma intensa desaminação nos aminoácidos na hemolinfa destes hospedeiros em consequência da infecção. Estes autores sugeriram ainda que, a atividade aumentada das AST e ALT poderia estar relacionada a uma utilização de proteínas para obtenção de aminoácidos, objetivando seu direcionamento para a via da gliconeogênese para a obtenção de glicose *de novo*, constituindo, assim, uma forma alternativa de obtenção de energia pelos moluscos em função da aumentada demanda energética decorrente pela contínua retirada de nutrientes pelos parasitos em desenvolvimento e necessidade de manutenção do metabolismo basal dos hospedeiros.

A intensa migração e o crescimento das L1 até completar seu desenvolvimento pré patente (de L1 até L3), causa uma série de danos teciduais, provocando o extravasamento de proteínas celulares, e esta alteração fisiológica pode levar o molusco a recrutar uma maior quantidade de proteínas, provavelmente, oriunda dos tecidos lesionados, o que fica evidente com a elevação da atividade das aminotransferases, AST e ALT, na hemolinfa de *B. tenuissimus* na primeira semana após a exposição às L1 de *A. cantonensis*.

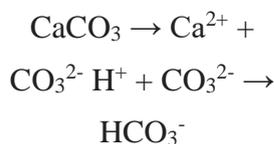
6.6. Metabolismo de cálcio

O cálcio é um metal que exerce um papel essencial na biologia dos moluscos gastrópodes, sobretudo daqueles terrestres, sendo um dos principais compostos inorgânicos da concha destes animais. O cálcio também tem sido citado como um importante fator limitante para a distribuição e sobrevivência do molusco caracol adulto, na taxa de oviposição e na sobrevivência e desenvolvimento de ovos e embriões (THOMAS et al., 1974; NDUKU & HARRISON, 1976; APPLETON, 1978; DAWIES & ERASMUS, 1984). O cálcio é utilizado em várias reações enzimáticas e também está envolvido em processos metabólicos

relacionados ao equilíbrio ácido-base da hemolinfa, sendo estocado como carbonato de cálcio (CaCO₃) neste sítio, e participando da formação do tampão bicarbonato (HCO₃⁻) (SMINIA et al., 1977, DE WITH & SMINIA, 1980).

As alterações que foram observadas no presente estudo reforçam as referências na literatura acerca da importância do íon cálcio na biologia dos moluscos gastrópodes terrestres. Quando comparamos os resultados acerca das alterações no metabolismo de carboidratos que ocorrem na primeira semana de infecção de *B. tenuissimus* com *A. cantonensis*, podemos inferir que a aceleração do metabolismo energético com a utilização de carboidratos, eleva a necessidade do hospedeiro em dispor de maior quantidade de íons cálcio, os quais atuam como cofator para diversas enzimas do metabolismo energético, sobretudo as desidrogenases, como a LDH, por exemplo, que foi objeto de análise no presente trabalho.

Além deste fato, observamos que uma aceleração do metabolismo anaeróbico da glicose, o que leva a um aumento da concentração de ácidos orgânicos na hemolinfa do animal, o que determina a necessidade de utilização de um processo de tamponamento da hemolinfa mais eficiente. Assim, o molusco hospedeiro intermediário tem a concentração de cálcio, sob a forma de bicarbonato de cálcio aumentada para fornecer o bicarbonato segundo a reação que se segue:



Alterações semelhantes foram observadas por Tunholi-Alves et al. (2014a), que analisaram o metabolismo de cálcio em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*, com a maior elevação na concentração deste metal na hemolinfa na segunda semana de infecção. Notem que a diferença observada entre os resultados obtidos no presente e aqueles de Tunholi-Alves et al. (*op cit.*), pode estar relacionada ao fato de que estes autores realizaram seu estudo utilizando um sistema parasito-hospedeiro onde o molusco era de hábito aquático, portanto, seu metabolismo energético não é tão fortemente baseado na degradação de carboidratos, como o que é observado para os moluscos terrestres. Portanto, aquelas alterações observadas por Tunholi-Alves et al. (2014a) ocorreram com uma diferença temporal, sendo as alterações notadas em *B. tenuissimus* surgidas ainda na primeira semana de infecção.

Outro resultado que mostra diferença em relação ao estudo de Tunholi-Alves et al. (2014a), é a hipocalcificação observada por estes autores em moluscos infectados com larvas dos nematoide *A. cantonensis*.

Ainda, podemos apontar o fato de *A. cantonensis* ter roedores como hospedeiro definitivo, e, segundo Morin et al. (2017) e Mattos (2014), estes animais têm elementos mais consistentes como base de sua preferência alimentar, uma vez que, em alguns roedores seus dentes crescem continuamente e os alimentos mais duros em sua consistência auxiliam no desgaste destes dentes, o que permite a boa mastigação e ingestão dos alimentos.

No presente estudo, *B. tenuissimus* infectados com *A. cantonensis* apresentou uma elevação gradual e progressiva. Outra vez, esta diferença pode estar relacionada com a diferença de habitat explorado por *B. glabrata* (aquático) e *B. tenuissimus* (terrestre), pois no molusco terrestre a concha servirá como elemento de proteção contra predadores, assim o aumento da concentração de cálcio na concha torna-a mais resistente a predadores, como aves, garantindo a conclusão do desenvolvimento larval intramolusco, constituindo, portanto, uma estratégia parasitária para garantir o desenvolvimento em seu hospedeiro intermediário.

Assim, os moluscos com concha mais resistentes se tornam menos vulneráveis ao

ataque de predadores, garantindo o desenvolvimento larval e, conseqüentemente,

sobrevivendo por mais tempo e tornado-se maiores, constituindo, portanto, um item alimentar mais atrativo para seus hospedeiros definitivos vertebrados, continuando a apontar para uma estratégia parasitária para assegurar a manutenção e transmissão do *A. cantonensis* entre os seus diferentes hospedeiros, intermediário (molusco terrestre) e definitivo (vertebrado roedor). As imagens observadas, através de análise histológica, no presente estudo, revelam a ausência de formação de um granuloma típico, havendo apenas a infiltração hemocitária intensa ao redor das larvas em desenvolvimento, porém sem a deposição de fibras colágenas e também sem a deposição de cálcio ao redor destas, o que aponta ainda para uma relação em que temos uma boa adaptação do sistema parasito-hospedeiro.

Segundo de Jong-Brink (1995) em uma extensa revisão, o sistema de defesa interno dos moluscos é afetado em paralelo a mudanças que ocorrem no sistema neuro-hormonal dos moluscos em respostas às infecções por trematódeos. Pela primeira vez, neste estudo, relatamos o mesmo processo ocorrendo em uma infecção molusco-larva de nematoide, uma vez que simultaneamente às alterações fisiológicas que observamos, na biologia reprodutiva, no metabolismo de carboidratos, produtos nitrogenados e mineral, cálcio, há uma indicação de ocorrência de modulação da resposta imunológica do hospedeiro pelo parasito, com infiltração hemocitária ao redor das larvas em desenvolvimento, porém estas continuam viáveis, uma vez que depósitos de glicogênio são observados em seu interior, porém não há deposição de fibras colágenas ou calcificação, o que ocorre comumente no processo de formação de granulomas típicos, levando, muitas vezes, a inviabilização do desenvolvimento larval por reduzir o aporte de nutrientes a estas larvas.

A calfluxina (CaF), é um neuropeptídeo derivado de um peptídeo precursor secretado pelas células caudo-dorsais na região gonadotrófica feminina do ovotestis do molusco, sendo responsável pelo influxo de cálcio nas mitocôndrias (DICTUS et al., (1987). Assim, as condições que alterem a atividade deste neuro-hormônio, levarão a alterações no metabolismo energético aeróbio, uma vez que as desidrogenases mitocondriais são essenciais para garantir o fluxo de elétrons que terminará com a produção de ATP no interior destas organelas.

As alterações que foram observadas nas concentrações de ácido oxálico, iniciador das reações do ciclo do ácido tricarbóxico, corroboram esta ideia de relação entre o conteúdo de cálcio no molusco e seu metabolismo energético, com este ácido variando sua concentração em um mesmo padrão observado para a variação de cálcio na hemolinfa do *B. tenuissimus* ao longo do desenvolvimento larval intramolusco de *A. cantonensis*.

Podemos assim apresentar os seguintes pontos: (i) A ampla distribuição de moluscos do gênero *Bulimulus* no Brasil, Estados Unidos e outros países da América, devem explicar a importância de estudos sobre o sistema *Bulimulus* spp.-*A. cantonensis*; (ii) Nossos resultados, pela primeira vez, demonstraram claramente que *B. tenuissimus* pode ser usado como hospedeiro intermediário para desenvolvimento larval de *A. cantonensis*, apresentando uma reação menos intensa às larvas em desenvolvimento deste parasito; (iii) A taxa de recuperação de L3 menor do que aquelas obtidas em outras espécies de moluscos (*B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *A. fulica*) não deve ser um fato para esquecer esses moluscos nos estudos epidemiológicos sobre angiostrongilíase neural, porque esta espécie é muito numerosa no ambiente onde ocorre. Em um período de coleta de duas horas, é possível encontrar mais de 300 caracóis em uma horta. Assim, a baixa taxa de formação de L3 pode ser compensada pelo grande número de espécimes num mesmo local, levando ao recrutamento contínuo por roedores; e, as alterações observadas nos metabolismos de carboidratos e produtos nitrogenados, indicam que o molusco *B. tenuissimus* e o nematoide *A. cantonensis* conseguem

manter esta relação de forma compensatória, na qual os efeitos que surgem em decorrência do parasitismo conseguem ser satisfatoriamente compensados pelo molusco hospedeiro. As alterações no metabolismo de cálcio vêm corroborar esta indicação, pois a aceleração do metabolismo anaeróbico de carboidratos, assim como o acúmulo de ácido oxálico, em função da redução da atividade do metabolismo oxidativo de carboidratos, levam á acidificação da hemolinfa, sendo esta elevada da acidez (redução do pH) corrigida pelo deslocamento do carbonato para formação do tampão bicarbonato, elevando, em consequência, a concentração de cálcio livre na hemolinfa, o qual é incorporado, de forma crescente, na concha do molusco. Tal estratégia, além de servir para a compensação das alterações metabólicas, torna o molusco mais resistente a predadores, por ter uma concha mais rígida, permitindo seu desenvolvimento e que os mesmos alcancem um tamanho maior, tornaqdo-se uma presa mais atrativa para os roedores, hospedeiros definitivos.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

1 – O molusco gastrópode terrestre *B. tenuissimus* é suscetível à infecção experimental com larvas de primeiro estágio (L1) de *A. cantonensis*, constituindo-se um bom hospedeiro intermediário para este nematoide parasito;

2 – A infecção experimental com L1 de *A. cantonensis* não provoca alterações significativas na biologia reprodutiva de *B. tenuissimus*;

3 – A infecção com L1 de *A. cantonensis* leva a mobilização das reservas de glicogênio da glândula digestiva e da massa cefalopédica de *B. tenuissimus*, havendo uma aceleração do metabolismo anaeróbico para a degradação da glicose, elevando a atividade da LDH e reduzindo a concentração de ácido pirúvico.

4 – A hiperproteinemia associada aos achados sobre a atividade de AST e ALT, indicam que a infecção com *A. cantonensis* leva a danos teciduais em *B. tenuissimus*, causando uma consequente predominância do padrão excretor uricotelico neste período, com subsequente retorno às condições iniciais;

5 – A infecção com *A. cantonensis* leva a um processo de hipercalcificação das conchas de *B. tenuissimus*, acompanhada de hipercalcemia, a qual pode estar associada às variações no metabolismo oxidativo evidenciadas pela variação na concentração de ácido oxálico, resultando em um maior direcionamento de cálcio para a concha do molusco;

6 – Apesar das alterações morfológicas na glândula digestiva, massa cefalopédica e ovotestis de *B. tenuissimus* infectada com *A. cantonensis*, estes órgãos parecem continuar a exibir sua atividade/funcionalidade sem diferenças significativas em relação aos moluscos não infectados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDO-PADRÓN, A.I.; LENHARD, P. Continental mollusc fauna of the Great Porto Alegre central region, RS, **Southern Brazilian Biodiversity J.** v.2, p.163-170, 2011.
- ALICATA, J.E. 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.
- ANDERSEN, E.; GUBLER, D. J.; SORENSEN, K.; BEDDARD, J.; ASH, L. R. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 35, n. 2, p. 319-322, 1986.
- ANDERSON, R.C. Keys to the genera of the superfamily Metastrongyloidea. In: Anderson, R.C.; Chabaud, A.G.; Willmott, S. Ed(s). **Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates**. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureau, n.5. 40, p. 1978.
- ARAÚJO, J.L.B.; REZENDE, H.E.B; RODRIGUES, P.A.F. Sobre “*Bulimulus tenuissimus*” (d’Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata). **Revista Brasileira de Biologia** 20: 33-42, 1960.
- ARAÚJO, J.L.B., 1982. Alguns moluscos terrestres como hospedeiros intermediários de animais domésticos, no Brasil: estudos sobre a anatomia sistemática e participação em helmintoses. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 104p.
- APPLETON, C.C. Review of literature on abiotic factors influencing the distribution and life cycles of bilharziasis intermediate host snails. **Malacological Review** 11, 1–25, 1978.
- BANEVICIUS, N.M.S.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. Comportamento do *Angiostrongylus costaricensis* em planorbídeos. **Braz. J. Biol.**, v. 66, no. 1b, p. 199-204, 2006.
- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde** 63, 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 fur Parasitenkunde** 51A, 407–411, 1975.
- 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.

- BONFIM, T.C.S.; MALDONADO JÚNIOR, A.; TUNHOLI, V.M.; TUNHOLI-ALVES, M.; FARO, M.J.; MOTA, M.E.; SILVA, T.C.B.; PINHEIRO, J.; GARCIA, J.S. Biochemical and histopathological alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*. **Journal of Invertebrate Pathology** 115, 2014.
- BREURE, A.S.H. Taxonomical, ecological and zoogeographical research on Bulimulidae (Gastropoda, Pulmonata). **Malacologia**, 18, 107- 114, 1979.
- BREURE, A.S.H. Caribbean *Bulimulus* revisited: physical moves and molecular traces (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). PeerJ 4, e1836. 2016.
- BROCKELMAN, C. R.; CHUSATAYANOND, W.; BAIDIKUL, V. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host, *Achatina fulica*. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, n. 1, p. 30-37, 1976.
- BROCKELMAN, C.R. Effects of parasitism and stress on hemolymph protein of the African giant snail, *Achatina fulica*. **Parasitology Research** 57, 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 fur Parasitenkunde**, 62, 285-291, 1980.
- CALDEIRA,R.L.; MENDONÇA, C.L.F.; 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 infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen,1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 887-889, 2007.
- CARVALHO, O.S.; SCHOLT, R.G., MENDONÇA, C.L.F.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Chen,1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p. 740-746, 2012.
- CHEN, H.T. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g., n.sp., des rats de Canton. **Annales of Parasitism Hum Comp**. v.13, p. 312-370, 1935.
- CHENG, T. C.; LEE, Fah Onn. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 18, n. 3, p. 395-399, 1971.
- CHENG, T.C.; SNYDER, Randall 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 *Glypthelmins pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. **Transactions of the American microscopical Society**, v. 81, n. 3, p. 209-228, 1962.
- COSTA, J.O.; ARAÚJO COSTA, H.M.; GUIMARAES, M.P. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the

genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 154, p. 9-16, 2003.

COWIE, R. Biology, Systematics, Life Cycle, and Distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the Cause of Rat Lungworm Disease. **Hawaii Journal of Medic and Public Health**. v.72 (6 Suppl 2), p. 6–9, 2013.

DAWIES, T.W.; ERASMUS, D.A. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria glabata*. **Cell Tissue Research** v.236, p. 643–649, 1984.

DE JONG-BRINK, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. **Advances in parasitology**, v. 35, p. 177-256, 1995.

DE MATTOS, I. Influência da disponibilidade de recursos alimentares na dinâmica populacional de roedores em áreas de campo de murundus de um cerrado no Brasil central. xiv, 86 f., il. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

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 Tecnology** v. 43, p. 365–371, 2000.

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

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.

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.

FERNANDES, M.C. Métodos Escolhidos de Técnicas Microscópicas, second ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ, 1949.

GUERINO, L. R.; PECORA, I. L.; MIRANDA, M. S.; AGUIAR-SILVA, C.; CARVALHO, O. D. S.; CALDEIRA, R. L.; SILVA, R. J. D. Prevalence and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) in Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 92-98, 2017.

HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. **Int. J. Parasitol.**, v. 5, no. 5, p. 521-528, 1975.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. W H Freeman & Co (Sd). 4th edition. San Francisco, USA, 1979.

JOOSSE, J. The hormone molluscs, p. 89-140. *In*: JANFER, H; DWNER, R.G.H.. (eds). **Vertebrate Endocrinology**, v.2. Academic Press, New York, 452p. 1988.

KIM, J.R.; HAYES, K.A.; YEUNG, N.W.; COWIE, R.H. Diverse gastropod hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm, globally and with a focus on the Hawaiian Islands. **PLoS One** v.9: e94969. 2014.

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

LIMA, M.G.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; GAUDÊNCIO, F.N.; MARTINS, F.G.; CASTRO, R.N.; THIENGO, S.C.; GARCIA, J.B.; MALDONADO, A.; PINHEIRO, J. The influence of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) infection on the aerobic metabolism of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Gastropoda). **Experimental Parasitology** v.171, p. 1-9, 2016.

LIMA, M. G., TUNHOLI-ALVES, V. M., BONFIM, T. C. S., GAUDÊNCIO, F. N., GARCIA, J. S., MALDONADO JR, A., PINHEIRO, J., THIENGO, S. C. . Effects of experimental *Angiostrongylus cantonensis* infection on the reproductive biology of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 149, p. 106-113, 2017.

LINDO, J.F.; WAUGH, C.; HALL, J.; CUNNINGHAM-MYRIE, C.; ASHLEY, D.; EBERHARD, M.L.; SULLIVAN, J.J.; BISHOP, H.S.; ROBINSON, D.G.; HOLTZ, T.; ROBINSON, R.D. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. **Emergent Infectious Diseases** v.8, p. 324-326 2002.

LIVINGSTONE, D.R., DE ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism of gastropods. *In*: P.W. Hochachka, The Mollusca Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics, Academic Press, London. 1983.

LV, S.; ZHANG, Y.; STEINMANN, P; ZHOU, X.N. Emerging angiostrongyliasis in mainland China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 161-164, 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. 1-21, 1955.

MALDONADO, JR. A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.M.; MOTTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.L.; 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. 938-941, 2010.

MALDONADO, A.; SIMÕES, R.O.; THIENGO, S.C. Angiostrongiliasis in the Americas. In: LORENZO-MORALES J., **Zoonosis**. Rijeka, Croatia: In Tech; p. 303-320, 2012.

MEIRELES, L.M.O.; SILVA, L.C.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. The influence of diet and isolation on growth and survival in the land snail *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 224–227, 2008.

MEIRELES, L.M.O.; SILVA, L.C.; JUNQUEIRA, F.O.; LOPES, J.F.S.; BESSA, E.C.A. Influência da densidade populacional sobre crescimento e fecundidade de *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae). **Revista Brasileira de Zociências** v.12, p. 51-58, 2010.

MELLO-SILVA, C.C., VILAR, M. M., BEZERRA, J. C. B., VASCONCELLOS, M. C. D., PINHEIRO, J., RODRIGUES, M. D. L. D. A. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v.102, n. 6, p. 671-674, 2007.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; VASCONCELLOS, M.C.D.; 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 do Instituto Oswaldo Cruz** v.105, p. 492-495. 2010.

METCALF, A.L. Distribution of land snails of the San Andres and Organ Mountains, southern New Mexico. *Southwest. Naturalist*, v.29, p.35-44, 1984.

MIQUEL, S.E. El género *Bulimulus* Leach, 1814, (Mollusca, Gastropoda, Stylommatophora) en la República Argentina. **Stud. Neotrop. Fauna Environ**, v. 26, p.93-112, 1991.

MORASSUTI, A.L.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.109 (4) p.399-407, 2014.

MORRETES, F.L. Contribuição ao estudo da fauna brasileira de moluscos. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia** v. 3 (7), p. 111-126, 1949.

MORIN, J. FERANTI, J. P. S.; MEDEIROS, I. R.; POZZOBON, D.; LEAL, K. W.; CORRÊA, L.F.D. Alongamento dentário de pré molares em porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.

NDUKU, W.K., HARRISON, A.D., 1976. Calcium as a limiting factor in the biology of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss) (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia** v.49, p. 143–170.

NOMURA,S.; LIN, H.H. First clinical case of *Haemostrongylus ratti*. **Taiwan Ni Ikai**, v.3, p.589-592, 1945.

OLIVEIRA, A.P.M.; GENTILE, R.; MALDONADO Jr., A.; TORRES, E.J.L.T.; THIENGO, S.C. *Angiostrongylus cantonensis* infection in molluscs in the municipality of São Gonçalo, a metropolitan área of Rio de Janeiro, Brazil: role of the *Achatina fulica* in parasite transmission dynamics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 110(6), p. 739-744, 2015.

OLIVEIRA, M.P.; M.N. ALMEIDA. 1999. **Conchas dos caramujos terrestres do Brasil**. Juiz de Fora, Editar Editora Associada, 61p.

PARENT, C.E., CRESPI, B.J. Sequential colonization and diversification of Galapagos endemic land snail genus *Bulimulus* (Gastropoda, Stylommatophora). **Evolution** v. 60, p. 2311-2328. 2006.

PINHEIRO, J.; GOMES, E.M. A method for glycogen determination in molluscs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.37, p 569-576, 1994.

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.

PUTHIYAKUNNON, S. and CHEN, X. 2015. *Angiostrongylus*. In: L. XIAO, U. RYAN and Y. FENG, Ed. *Biology of Foodborne Parasites*. Florida, USA: CRC Press, pp. 235-254. ISBN: 978-1-4665-6885-3

REZENDE, H.E.B.; LANZIERI, P.D. Observações anatômicas e histológicas sobre “*Bulimulus tenuissimus*” (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae). **Revista Brasileira de Biologia**, p. 409-415, 1964.

SALGADO, N.C.; COELHO, A.S. Moluscos terrestres no Brasil (Gastrópodes operculados ou não, exclusive Veronicellidae, Milacidae e Limacidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 51, p. 149-189. 2003.

SILVA, L.; MEIRELES, L.; VARGAS, T.; CARVALHO, C.M.; ARÉVALO, E.G.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Comportamento agregativo, preferência por sítio de repouso e variações diurnas de atividade em *Bulimulus tenuissimus* (d’Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae) no laboratório. **Revista de Etologia**, v.10, p. 27-33, 2011.

SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Influência da umidade do substrato sobre crescimento, produção de ovos e sobrevivência de *Bulimulus tenuissimus* (d’Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, p. 144-149, 2009.

SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Development and reproduction in *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 220–223, 2008.

SIMONE, L.R.L. Land and freshwater molluscs of Brazil. São Paulo: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. 2006.

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

SOUZA, J.R. Pesquisa e Identificação de Larvas de Nematódeos Recuperadas de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 e outros Moluscos Terrestres da Região Metropolitana de Aracaju, Sergipe. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe. 2017.

TEEM, J.L.; QVARNSTROM, Y.; BISHOP, H.S.; DA SILVA, A.J.; CARTER, J.; WHITE-MCLEAN, J.; SMITH, T. The occurrence of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, in nonindigenous snails in the Gulf of Mexico region of the United States. **Hawaii Journal Medical Public Health** 72 (Suppl 2), 11, 2013.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.L.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.M.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. 2010. 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.

THIENGO, S.C., BARBOSA, A.F., COELHO, P. M. and FERNANDEZ, M.A. Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. Brasília, I Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras. Disponível online em: <http://www.mma.gov.br/invasoras> [Acesso: 10/12/2017], 2005.

THIENGO, S.C.; AMATO, S.B. *Phyllocaulis variegatus* (Mollusca: Veronicellidae), a new intermediate host for *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 621-622, 1995.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO, A.JR; 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. 885–891, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V. M., TUNHOLI, V. M., LUSTRINO, D., AMARAL, L. S., THIENGO, S. C., PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 108, n. 3, p. 220-223, 2011.

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

TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V. M., GÔLO, P., LIMA, M. G., GARCIA, J. S., MALDONADO JÚNIOR, A., PONTES, E. G., BITTENCOURT, V. R. E. P., PINHEIRO, J.

Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Parasitology research**, v. 112, n. 5, p. 2111-2116, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V. M., TUNHOLI, V. M., GARCIA, J. S., COSTA-NETO, S. F. D., MALDONADO, A., SANTOS, M. A. J., THIENGO, S. C., PINHEIRO, J. Changes in the calcium metabolism of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of helminthology**, v. 88, n. 2, p. 160-165, 2014a.

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes et al. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology international**, v. 63, n. 1, p. 64-68, 2014b.

UBELAKER, J.E. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 237–244, 1986.

VACHANAVINICH, K.; BROCKELMAN, C. R. Studies on susceptibility of *Pila ampullacea*, to the infection with the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 10, n. 4, p. 514-519, 1979.

WANG, Q.P.; LAI, D.H.; ZHU, X.Q.; Chen, X.G.; Lun, Z.R. Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infective Diseases**. v. 8, p. 621-630, 2008.

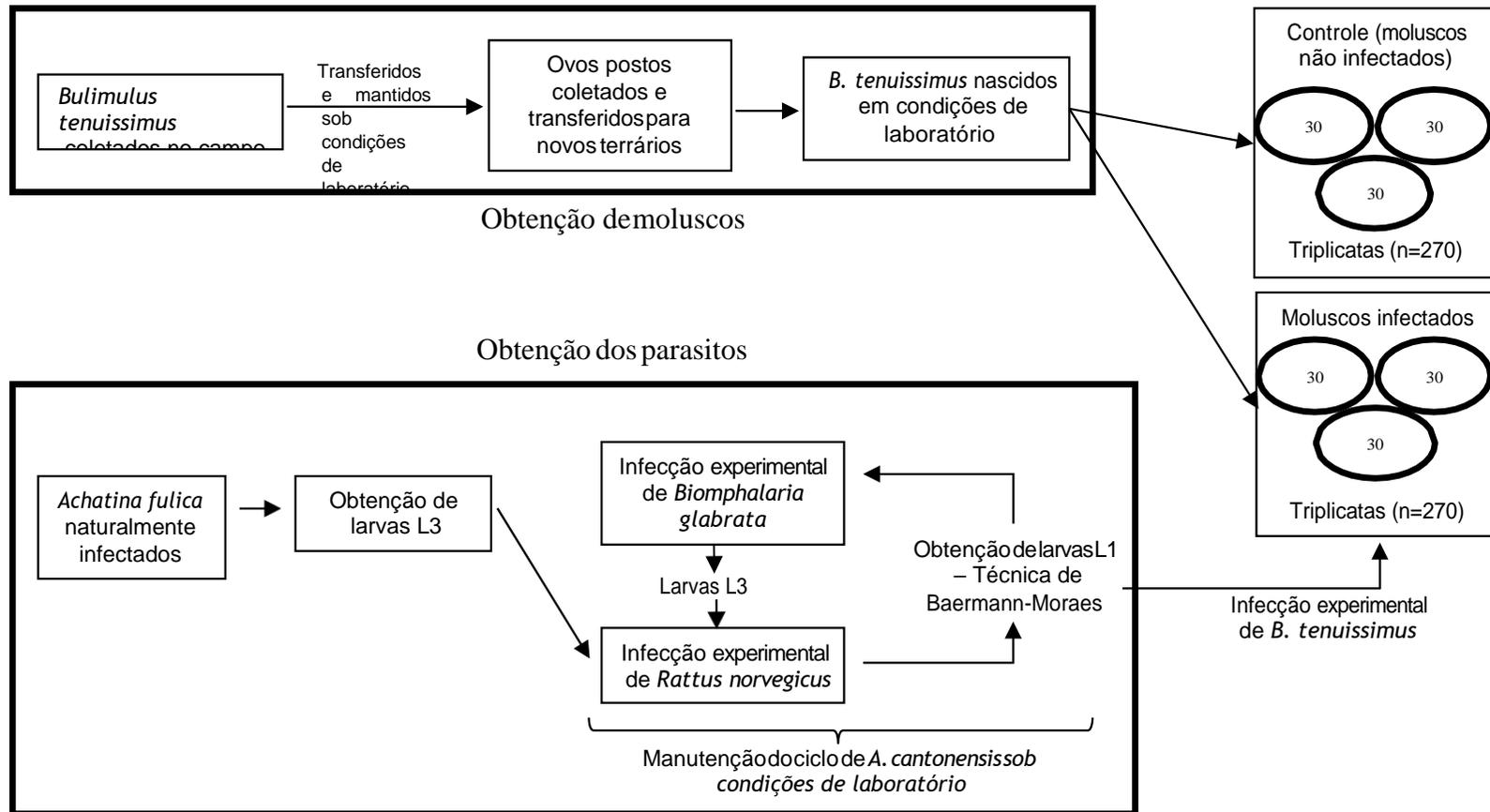
WANG, Q.P.; WU, Z.D.; WEI, J.; OWEN, R.L.; LUN, Z.R. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v 31, p. 389-395, 2012.

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.

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

YOUSIF, F.; LÄMMLER, G. The suitability of several aquatic snails as intermediate hosts for *Angiostrongylus cantonensis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 47, p. 203-210, 1975.

ANEXO 1



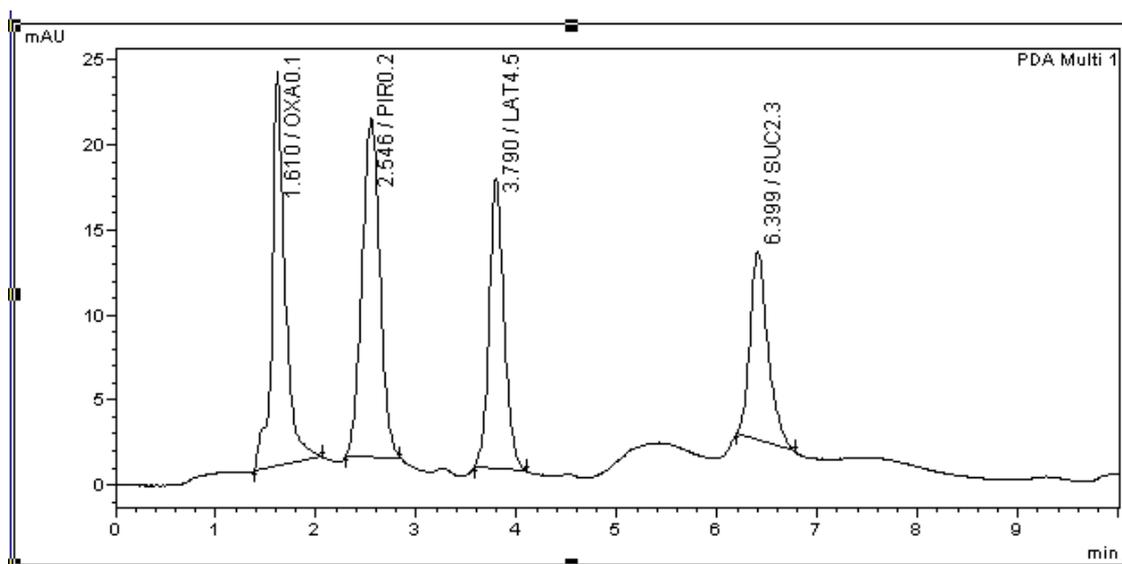
Representação esquemática dos procedimentos para obtenção de moluscos *Bulimulus tenuissimus* e das larvas L1 e L3 de *Angiostrongylus cantonensis* em condições de laboratório, e formação dos grupos de moluscos infectados experimentalmente.

ANEXO 2

ANÁLISES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM HEMOLINFA – 23_05_2017

C:\sinc\Wairo\Winicius\19_01_17\Mist I Oxa_Pir_Lat.lcd
Acquired by : rOSANE
Sample Name : Mist I
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : Mist I Oxa_Pir_Lat.lcd
Method File Name : Ac.Orgânicos_PDA_Restek.lcm
Data Acquired : 19/1/2017 09:47:51
HPLC Shimadzu LC-20AT , CBM-20A
Detector DAD SPD-M20A, forno CTO-20A
Coluna Restek-Allure Organic Acids -C18(15cm x4,6mm x5um)
Método Ac. Orgânicos_PDA_Restek
PDA-200-400nm (208nm)
Temp= 35C -TA- 8 min corrida
Solvente: B:ACN (1%)- A: Tampão 20mmol/L de Na2HPO4 ajustada a pH 2.2 com H3PO4
Volume 20uL - fluxo 1.1mL/min pressão= 77kgf/c

1. Análises da mistura padrão



ANEXO 3

ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

MARTINS, F. G., LIMA, M., G., CASTRO, R. N., SANT'ANNA, L. D., SANTOS, M. A. J. dos, GARCIA, J. S., PINHEIRO, J. 2018. *Bulimulus tenuissimus* (mollusca) as a new potential host of *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda), a histological and metabolic study. J. Invert. Pathol., vol. 154, pp.65-78.

Journal of Invertebrate Pathology 154 (2018) 65–73



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Bulimulus tenuissimus (mollusca) as a new potential host of *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda), a histological and metabolic study



Florence Gonçalves Martins^a, Mariana Gomes Lima^a, Rosane Nora Castro^b,
Luiza D'Oliveira Sant'Anna^b, Marcos Antônio José dos Santos^c, Juberlan Silva Garcia^d,
Jairo Pinheiro^{a, e, *}

^a Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, UFRJ, BR465, km7, Seropédica, RJ CEP 23.897-000, Brazil

^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRJ, BR465, km7, Seropédica, RJ CEP 23.897-000, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, BR465, km7, Seropédica, RJ CEP 23.897-000, Brazil

^d IZMIR, HOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Marquês, Rio de Janeiro, RJ CEP 21.040-360, Brazil

^e Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, BR465, km7, Seropédica, RJ CEP 23.897-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Comparative physiology
Host-parasite relationship
Carbohydrates metabolism
Angiostrongylus cantonensis
Bulimulidae

ABSTRACT

The terrestrial gastropod *Bulimulus tenuissimus* is widespread in South America. It is an intermediate host of many parasites, but there are no records of infection of this snail by *Angiostrongylus cantonensis*, despite the occurrence of this parasite and angiostrongyliasis cases in the same areas in which *B. tenuissimus* occurs. For this reason, it is important to investigate the susceptibility of *B. tenuissimus* to *A. cantonensis* infection, since it can be used as intermediate host of *A. cantonensis*, increasing the list of terrestrial gastropods that infect wild and domestic animals and humans with this parasite. The purpose of this study was to evaluate the susceptibility of *B. tenuissimus* to experimental infection with L1 larvae of *A. cantonensis*. The snails were exposed to 1200 L1 larvae and it was possible to observe many developing larvae in the cephalopodal mass and mantle tissues, with intense hemocyte infiltration and collagen deposition, but no typical granuloma structures were formed. The glucose content and lactate dehydrogenase activity in the hemolymph varied, indicating an increase of anaerobic energy metabolism in the middle of infection, but with a tendency to return to normal values at the end of pre-patent period. This was corroborated by the marked reduction in the glycogen content in the cephalopodal mass and digestive gland in the first and second week after exposure, followed by a slight increase in the third week. The content of pyruvic acid in the hemolymph was 14.84% lower at the end of pre-patent period, and oxalic acid content was 41.14% higher. These results indicate an aerobic to anaerobic transition process. The PAS reaction showed a large amount of glycogen inside the developing larvae and muscular tissues of the cephalopodal mass, indicating that despite the high consumption of this polysaccharide by the parasite, the snail is able to maintain its energy metabolism based on carbohydrates. The results reveal that *B. tenuissimus* is a robust host, which can live with the developing larvae of *A. cantonensis* and overcome the metabolic damages resulting from parasitism.

1. Introduction

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) is a parasitic metastrongylid nematode found in wild rodents, but it can also infect humans, causing eosinophilic meningoencephalitis, a kind of meningitis. It can also cause visual impairment, pain, keratitis, and retinal edema by infecting the human eye (Kanchanarany and Punyagupta, 1971). Although initially observed in Asia and Pacific regions (Alicata, 1966; Lv et al., 2009a,b), this disease is now widely recorded throughout the world, including the Americas (Teem et al., 2013) and particularly Brazil (Morassutti et al., 2014; Guerino et al., 2017). The heteroxenous

life cycle of this nematode involves a mollusk as intermediate host. This is an essential place for the parasite to complete development, since inside the snail host, the larvae undergo two changes, to L2 and L3. The vertebrate hosts, mainly wild rodents, ingest the infected snail or food where the L3 larvae have been released by the intermediate host and the life cycle is completed with the development to the adult stage. Due to the low intermediate host specificity, there is a long list of snail hosts of *A. cantonensis* (Kim et al., 2014), both aquatic and terrestrial species.

In the literature, there are many references to the African giant snail, *Achatina fulica* Bowdich, 1822, as the main intermediate host of *A. cantonensis* (Thiengo et al., 2010), but Caldeira et al. (2007) found

* Corresponding author at: Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, UFRJ, BR465, km7, Seropédica, RJ CEP 23.897-000, Brazil.
E-mail address: jps@ufrj.br (J. Pinheiro).

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.003>

Received 24 July 2017; Received in revised form 7 February 2018; Accepted 6 April 2018

Available online 07 April 2018

0022-2011/© 2018 Published by Elsevier Inc.

ANEXO 4

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY

12/04/2018

#188914 Avaliação



[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#)

[Capa](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#188914](#) > [Avaliação](#)

#188914 Avaliação

[RESUMO](#) [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores FLORENCE GONÇALVES MARTINS, JUBERLAN SILVA GARCIA, EDUARDO JOSÉ LOPESTORRES, MARCOS ANTONIO JOSÉ DOS SANTOS, CARLOS LUIZ MASSARD, JAIRO PINHEIRO 

Título FIRST RECORD OF BULIMULUS TENUISSIMUS (MOLLUSCA) AS AN EXPERIMENTAL INTERMEDIATE HOST OF ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS (NEMATODA)

Seção Artigos

Editor Brazilian Journal of Biology 

Avaliação

Rodada 1

Versão para avaliação [188914-900424-1-RV.DOC](#) 2017-12-10

Iniciado 2017-12-18

Última alteração 2018-02-22

Arquivo enviado Nenhum(a)

Versão do editor [188914-911462-1-ED.DOC](#) 2018-02-22

Versão do autor [188914-911442-1-ED.DOC](#) 2018-02-21

Rodada 2

Versão para avaliação [188914-900424-2-RV.DOC](#) 2018-03-07

Iniciado 2018-03-07

Última alteração 2018-03-22

Arquivo enviado Nenhum(a)

Decisão Editorial

Decisão Aceitar 2018-03-27

Notificar editor  Comunicação entre editor/autor  2018-03-27

Versão do editor Nenhum(a)

Versão do autor [188914-911442-2-ED.DOC](#) 2018-03-22 [EXCLUIR](#)

Transferir Versão do Autor Nenhum arquivo selecionado

OPEN JOURNAL SYSTEMS

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como: **jps**

- [Meus periódicos](#)
- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

AUTOR

Submissões

- [Ativo \(0\)](#)
- [Arquivo \(1\)](#)
- [Nova submissão](#)

NOTIFICAÇÕES

- [Visualizar](#)
- [Gerenciar](#)

IDIOMA

Selecione o idioma

Português (Brasil) ▼

TAMANHO DE FONTE

