

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

***Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA
INFECÇÃO SOBRE O METABOLISMO DE *Biomphalaria straminea* E *Biomphalaria
tenagophila* (Mollusca)**

MARIANA GOMES LIMA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PARASITOLOGIA

***Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA
INFECÇÃO SOBRE O METABOLISMO DE *Biomphalaria straminea* E *Biomphalaria
tenagophila* (Mollusca)**

MARIANA GOMES LIMA

*Sob a orientação do Professor Doutor **Jairo
Pinheiro da Silva** e Co-orientação do Professor
Doutor **Douglas McIntosh** e da Pesquisadora
Doutora **Silvana Aparecida Rogel Carvalho
Thiengo.***

Abril de 2016

636.089696

L732a

T

Lima, Mariana Gomes, 1983-

Angiostrongylus cantonensis (Nematoda): estudo comparativo dos efeitos da infecção sobre o metabolismo de Biomphalaria straminea e Biomphalaria tenagophila (Mollusca) / Mariana Gomes Lima. - 2016.

xx, 87 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 75-87.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Molusco - Parasito - Teses. 3. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 4. Nematoda - Teses. 5. Molusco como transmissor de doenças - Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

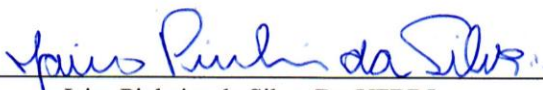
**Ao meu filho Miguel Lisbôa e ao meu
amor Francy Lisbôa**

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

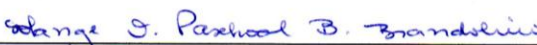
MARIANA GOMES LIMA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor**, no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia.

TESE APROVADA EM 23/02/2016.



Jairo Pinheiro da Silva. Dr. UFRRJ



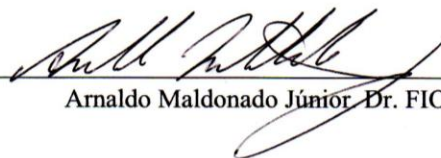
Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini. Dr. UFRRJ



Lângia Colli Montresor. Dr. FIOCRUZ,RJ



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



Arnaldo Maldonado Júnior. Dr. FIOCRUZ,RJ

**É caminhando que se faz o caminho.
Então, sigamos!**

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento que sempre me traz coisas boas, pois me faz sentir realizada e abençoada por todos que cruzaram, passaram e ficaram em meu caminho. O doutorado é um caminho longo e com muitos desafios pessoais e profissionais. Até aqui sempre fui acompanhada pela minha família, amigos e profissionais que me deram um pouco de seus conhecimentos, sabedoria e parceria. Ao meu pai e grande incentivador, Gelson, quero agradecer por exatamente tudo desde as minhas primeiras letras até o dia de hoje, sempre ao meu lado. Assim como a Josi, e meus irmãos, Luciana, Juliana e João Vitor que sempre viveram todos os momentos mais importantes da minha vida. Não deixando para trás primos, tios, cunhados e sobrinhos que sempre estão por perto e tornam o caminho mais colorido. Em especial e com todo meu amor, agradeço ao meu marido e filho, Francly e Miguel Lisboa, que durante estes anos de doutoramento caminharam fielmente ao meu lado. Abrimos mãos uns da presença dos outros para conquistarmos uma vida realizada juntos, a partir dos planos e sonhos que construímos dia após dia. Agradeço imensamente aos meus amigos e parceiros no Laboratório de Biofísica - UFRRJ, Florence Martins, Fabrício Gaudêncio, Vinícius Tunholi, Victor Tunholi, Tatiane Cristina, Vanessa Xavier e Mariana Seabra, que de todas as maneiras possíveis fizeram esse projeto de vida possível. Em especial, Flor, Fabrício e Tati que da maneira mais empenhada e dedicada fizeram do meu doutoramento na França uma luta pessoal. Muito obrigada, meus queridos!! Vocês foram sensacionais!! E eu espero sempre retribuir a altura! E agradeço a ele, meu querido orientador, Jairo Pinheiro que há treze anos me acompanha, orienta, instrui, aconselha, me põe para pensar e repensar. Obrigada pela dedicação, carinho e confiança! A minha co-orientadora, Silvana Thiengo que sempre de maneira amável me acolheu, me instruiu e me deu todos os instrumentos e condições para realizar esse trabalho que construímos de maneira conjunta. Ao Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose-Malacologia e ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios-IOC/FIOCRUZ, RJ, que me receberam e dedicaram seus dias, espaço e conhecimento para realização desse trabalho; em especial aos amigos e colegas, Paulo Cesar, Martae Fabrício Chagas Pinto, Lângia Colli Montesor, Patrícia Diniz, Ana Maria Ramos (Aninha), Elisângela Feitosa da Silva, Heloísa Brandão, Raquel Leal, que sempre me receberam muito bem, auxiliaram e ajudaram na construção do meu conhecimento. Aos doutores Arnaldo Maldonado e Juberlan Garcia que acreditaram nesse projeto, me deram todo o suporte para que ele se cumprisse. Muito obrigada! Em especial, agradeço aos doutores Benjamin Gourbal, Guillaume Mitta, André Therón, Guillaume Tetreau, Richard Galinier, David Durval, Christoph Grunau, Cristian Chaparro da Université de Perpignan Via Domitia – França, que me receberam durante meu doutoramento sanduíche de maneira excepcional. Deram-me novas perspectivas, me ensinaram a ver e a pensar a ciência de

maneira inovadora. Generosamente me deram condições de trabalho, participação em decisões dos trabalhos em andamento, palestras e workshop para meu aperfeiçoamento. E de maneira generosa mantêm as portas abertas para novos planos em conjunto. Agradeço aos doutorandos Silvain Pinaud, Anaïs, Kelly Brener, Rodolfo Rondon, Benoit Aliaga, Ariadna Picart, Nele Boon, Marión Picard, David Roquis e Ronaldo de Carvalho que me deram uma estadia fabulosa e aprimoram meu francês. Merci à tous!!

BIOGRAFIA

Mariana Gomes Lima, filha de Gelson Florentino Lima e Maria Lucia Gomes Lima, nasceu dia 10 de agosto de 1983, na cidade de Belford Roxo, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o Ensino Fundamental no Colégio Flama e, posteriormente, o Ensino Médio no Colégio Antares e no CAP UNIGRANRIO, todos no município de Duque de Caxias.

No ano de 2002, ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, graduando-se em outubro de 2006.

Durante a Graduação, sempre se interessou pelas áreas de Bioquímica e Fisiologia Animal e, por isso, estagiou desde o 3º período do curso no laboratório de Biofísica, na área de fisiologia e bioquímica de moluscos, sob a orientação do professor Dr Jairo Pinheiro da Silva. Posteriormente, no 5º período estagiou no Laboratório de Dípteros de Importância Médica e Forense – FIOCRUZ-RJ, sob a orientação da Dr. Margareth Queiroz, onde permaneceu até o fim da graduação. Durante esta fase foi apresentada a área de parasitologia, a qual se dedicou nos anos seguintes. Durante o período de janeiro 2007 a janeiro de 2008 participou de um programa de aperfeiçoamento oferecido internamente pelo Laboratório de Dípteros, onde trabalhou com testes para controle de parasitos e vetores através do uso de látex de *Euphorbia splendens*.

No início de 2008, foi aprovada na seleção de Mestrado pela mesma Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, agora no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV-UFRRJ), sob a orientação do professor Jairo Pinheiro da Silva, tendo recebido a bolsa de estudos da Capes. Ao ingressar no Laboratório de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, Mariana participou de congressos nacionais e internacionais sempre voltando suas pesquisas ao estudo dos efeitos bioquímicos do látex de *E. splendens* sobre o metabolismo e fisiologia de *Biomphalaria glabrata* infectada e não infectada pelo *Schistosoma mansoni*. O projeto de mestrado foi co-orientado pela pesquisadora Doutora Clélia Christina Corrêa de Mello-Silva, FIOCRUZ –RJ.

Durante o ano de 2010 ao final de 2011 dedicou-se à maternidade. No início de 2012 ingressou no curso de doutoramento pela PPGCV-UFRRJ, sob a orientação do Dr. Jairo Pinheiro, sendo agora bolsista CNPq. Durante o doutoramento participou de eventos

internacionais no Equador, México, e nacionais para apresentações orais, treinamentos e palestras. Desenvolvendo o projeto intitulado: *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): estudo comparativo dos efeitos da infecção sobre o metabolismo de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca), sob a orientação dos doutores Jairo Pinheiro (UFRRJ), Silvana Thiengo (FIOCRIZ-RJ) e Douglas McIntosh (UFRRJ). Durante o doutoramento ministrou aulas de bioquímica e de fisiologia e bioquímica de moluscos para alunos de pós-graduação do CPGCV-UFRRJ e do Curso de Medicina Tropical e Biodiversidade – FIOCRUZ-RJ. No período de março a setembro de 2015 esteve em estágio de treinamento e aperfeiçoamento em biologia molecular, especialmente em proteômica e transcriptômica, especialmente na relação resistência/susceptibilidade entre parasitos e hospedeiro nos modelos de *B. glabrata*/*S. mansoni*, no Laboratório de Ecologia e Evolução das Interações Parasito-Hospedeiro, Université de Perpignan Via Domitia, França; sob a orientação do Dr Benjamin Gourbal, Dr. Guillaume Tetreau e Dr. Guillaume Mitta.

RESUMO

LIMA, Mariana Gomes. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): Estudo comparativo dos efeitos da infecção sobre o metabolismo de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca). 2016. 87p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* tem ganhado notoriedade sob o ponto de vista da saúde pública fora de sua área endêmica na Ásia, uma vez que nos últimos anos casos de meningoencefalite eosinofílica vêm sendo reportados em outros continentes, como nas Américas. No Brasil mais de trinta casos dessa zoonose já foram registrados e há relatos da presença desse nematódeo em 11 estados. Em seu ciclo de vida heteroxeno *A. cantonensis* tem, ao longo do seu desenvolvimento, a necessidade de hospedeiro intermediário e definitivo, envolvendo predominantemente, moluscos e roedores, respectivamente, além de vários hospedeiros paratênicos, sendo o homem um hospedeiro acidental. Pode infectar uma rica variedade de moluscos terrestres e aquáticos e neste estudo, foram utilizadas para infecção experimental populações nascidas e criadas em laboratório de duas espécies de planorbídeos neotropicais transmissores da esquistossomose mansônica, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*. Com a finalidade de caracterizar o perfil fisiológico resultante dessa relação hospedeiro-parasito, os moluscos hospedeiros foram separados em grupos de infectados e não infectados, contendo trinta moluscos por grupo, todos feitos em triplicatas. A investigação durou 21 dias, ao fim do período pré-patente os moluscos foram dissecados para a coleta de hemolinfa, retirada de tecidos e utilização da concha para verificação de concentração de cálcio. A oviposição dos moluscos de ambas as espécies foi observada quanto à viabilidade dos ovos, assim como (A) Número de massas ovíferas/molusco; (B) Número de ovos/molusco; (C) Número de ovos/massa ovífera e (D) Número de moluscos eclodidos/molusco. Na hemolinfa foram quantificadas as proteínas totais, glicose, ácido úrico, ureia, a atividade das transaminases ALT e AST, lactato desidrogenase - LDH, e os ácidos orgânicos (oxálico, pirúvico, succínico e láctico). Na massa cefalopodia e glândula digestiva, foram mensurados os conteúdos de glicogênio e na glândula de albúmen, foi mensurado o galactogênio. Os resultados obtidos mostraram que os moluscos infectados, de ambas as espécies, apresentaram redução significativa na viabilidade dos ovos, de 50% para *B. straminea* e de 10% para *B. tenagophila*. O estado energético também foi vigorosamente afetado, com mobilização das reservas de glicogênio, e queda da glicemia de 68% para *B. straminea* e de 6,48% para *B. tenagophila*, seguida de uma elevação na atividade da LDH de 518,25% para *B. straminea* e 320,14% para *B. tenagophila*, bem como na concentração do ácido láctico, 5,7mM para *B. straminea* e 0,34 mM para *B. tenagophila*, e redução na concentração dos ácidos pirúvico e succínico. A intensa liberação de aminoácidos gliconeogênicos a partir do catabolismo proteico inverteu o padrão excretor de uricotélico para ureotélico tanto em *B. tenagophila* quanto em *B. straminea*. A lesão tecidual mostrou elevação de 69% na concentração das proteínas totais na hemolinfa de *B. straminea*, bem como a intensa atividade das aminotransferases, AST e ALT, com aumento de 241,26% e 360%, respectivamente, em relação ao grupo controle. A infecção reduziu em 51,57% a concentração de proteínas totais circulantes para *B. tenagophila*, e elevou a atividade de ALT e AST em 310% e

280% em comparação com os moluscos não infectados. Os resultados observados neste estudo indicam que o metabolismo energético e estrutural de ambas as espécies foi vigorosamente afetado pela infecção, mostrando a ativação de uma via anaeróbia para compensar a exaustão das reservas glicídicas, assim como a mudança no padrão excretor em função da utilização de substratos proteicos para produção de ATP. Embora, estudos sobre aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos da angiostrongilíase neural têm sido extensivamente realizados, dados acerca do perfil metabólico e reprodutivo de moluscos infectados por *A. cantonensis* são escassos. Este estudo pioneiro na relação parasito-hospedeiro das espécies focadas seguramente contribuirá tanto para o conhecimento dessa interação, quanto da epidemiologia da transmissão de *A. cantonensis*, além de fornecer novos subsídios que poderão ser utilizados em medidas de prevenção e controle da meningite eosinofílica, zoonose considerada emergente no Brasil.

Palavras-chaves: Planorbídeos, *Biomphalaria* spp., hospedeiros intermediários, *Angiostrongylus cantonensis*, perfil metabólico, relação parasito-hospedeiro, meningite eosinofílica.

ABSTRACT

LIMA, Mariana Gomes. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): Comparative study of infection effects on the metabolism of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca). 2016. 124p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The nematode *Angiostrongylus cantonensis* has gained notoriety under the public health point of view out of its endemic area in Asia, since in recent years cases of eosinophilic meningoencephalitis have been reported in other continents, such as in the Americas. In Brazil over thirty cases of this zoonotic disease have been recorded and there are reports of the presence of this nematode in 11 states. In its life cycle *A. cantonensis* has, along their development, need for intermediate and final host, involving predominantly molluscs and rodents, respectively, and different paratenic hosts, humans are accidental hosts. They can also infect a rich variety of terrestrial and aquatic molluscs and in this study, there were used specimens of neotropical planorbids transmitters of schistosomiasis, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila*, born and reared in the laboratory for experimental infection by *A. cantonensis*. In order to characterize the resulting physiological profile that host-parasite relationship, the host molluscs were separated into groups of infected and uninfected containing thirty molluscs per group, all made in triplicates. The investigation lasted 21 days, after the pre-patent period molluscs were dissected to collect hemolymph, removal of tissues and use the shell for calcium concentration check. The reproductive biology of both species was observed on the viability of the eggs, as well as (A) Number of eggs/eggs mass; (B) Number of eggs/mollusc; (C) Number of eggs mass/mollusc and (D) Number of hatched molluscs/mollusc. In the hemolymph there were quantified total protein, glucose, uric acid, urea, the activity of transaminases AST and ALT, lactate dehydrogenase - LDH, and organic acids (oxalic, pyruvic, succinic and lactic). In the cephalopodal mass and digestive gland the glycogen content was measured and in the albumen gland, it was measured the galactogen. The results showed that the snails infected, of both species showed significant reduction in the viability of eggs, 50% for *B. straminea* and 10% for *B. tenagophila*. The metabolic status was also strongly affected, with mobilization of glycogen and hemolymph glucose reduction of 68% to *B. straminea* and 6.48% for *B. tenagophila*, followed by an increase of LDH activity of 518.25% to 320.14% *B. straminea* and to *B. tenagophila* as well as the concentration of lactic acid, 5,7mM to *B. straminea* and 0.34 mM for *B. tenagophila*, and reduction in the concentration of pyruvic and succinic acids. The intense release of gluconeogenic amino acids from protein catabolism reversed the excretory pattern from uricotelic to ureotelic in both *B. tenagophila* and *B. straminea*. The tissue injury showed increase of 69% in the concentration of total proteins in the hemolymph of *B. straminea* and the intense activity of aminotransferases, ALT and AST, an increase of 241.26% and 360%, respectively, compared to the control group. The infection reduced by 51.57% the concentration of total circulating proteins to *B. tenagophila*, and increased ALT and AST activity at 310% and 280% compared to uninfected snails. The results of this study indicate that the energetic and structural metabolism of both species is strongly affected by the infection, showing the activation of an anaerobic to compensate for the depletion of glicidics stores as well as the change in the excretory pattern depending on the use of substrates protein for the production of ATP. Although studies on clinical, pathological and epidemiological neural angiostrongyliasis have been extensively carried

out, data on the metabolic and reproductive profile of snails infected by *A. cantonensis* are scarce. This pioneering study focused on species of host-parasite relationship certainly contribute to the knowledge of this interaction, as well as to the epidemiology of transmission *A. cantonensis* in addition to providing new subsidies which can be used in prevention and control of eosinophilic meningitis, zoonosis considered emerging in Brazil.

Key words: Planorbid, *Angiostrongylus cantonensis*, metabolism, host-parasite relationship, neural angiostrongyliasis, intermediate host.

RÉSUMÉ

LIMA, Mariana Gomes. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): Etude comparative des effets de l'infection sur le métabolisme de *B. straminea* et *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca). 2016. 124p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Le nématode du *Angiostrongylus cantonensis* a acquis une certaine notoriété dans le point de vue de la santé publique de sa zone d'endémie en Asie, puisque dans les cas de méningo-encéphalite à éosinophiles ont été signalés dans d'autres continents, comme dans les Amériques ces dernières années. Au Brésil plus de trente cas de cette maladie zoonotique ont été enregistrés et il ya des rapports de la présence de ce nématode dans 11 états. Dans son cycle de vie heteroxeno *A. cantonensis* ont, le long de leur développement, le besoin de l'hôte intermédiaire et finale, impliquant principalement des mollusques et des rongeurs, respectivement, et divers hôtes paraténiques, l'homme étant un hôte accidentel. Peut infecter une riche variété de mollusques terrestres et aquatiques et dans cette étude, ont été utilisées pour les populations d'infection expérimentale nés et élevés dans le laboratoire de deux espèces de planorbidés néotropicaux émetteurs de la schistosomiase, *Biomphalaria straminea* et *Biomphalaria tenagophila*. Afin de caractériser le profil physiologique résultant de cette relation hôte-parasite, les mollusques hôtes ont été séparés en groupes de infectés et non infectés contenant trente mollusques par groupe, tous réalisés en triple. L'enquête a duré 21 jours, après la période de pré-brevet mollusques ont été disséqués pour recueillir hémolymphe, enlèvement des tissus et utiliser le shell pour le contrôle de la concentration en calcium. La ponte de palourdes des deux espèces a été observé sur la viabilité des oeufs, ainsi que (A) Nombre de masse ovigères/mollusques; (B) Nombre d'œufs/mollusques; (C) Nombre d'œufs/masse ovigères et (d) Nombre de éclos mollusques/mollusques. Dans l'hémolymphe ont été quantifiés protéines totales, de glucose, l'acide urique, urée, l'activité des transaminases AST et d'ALT, lactate déshydrogénase LDH -, et des acides organiques (acides oxalique, pyruvique, succinique et lactique). Dans cefalopédiosa et la masse de la glande digestive, la teneur en glycogène ont été mesurés et de l'albumine glande, il a été mesuré le galactogen. Les résultats ont montré que les mollusques infectés, des deux espèces ont montré une réduction significative de la viabilité des oeufs, de 50% pour *B. straminea* et 10% pour *B. tenagophila*. L'état énergétique a également été fortement touchée, avec la mobilisation de glycogène et de la glycémie chute de 68% à *B. straminea* et 6,48% pour *B. tenagophila*, suivie d'une hausse de l'activité de la LDH de 518,25% à 320,14% pour *B. straminea* et *B. tenagophila* ainsi que la concentration de l'acide lactique, 5,7mM à *B. straminea* et 0,34 mM pour *B. tenagophila*, et la réduction de la concentration des acides pyruvique et succinique. La libération intense d'acides aminés de la protéine gluconéogéniques catabolisme inversé la tendance uricotélico excréteur à la fois ureotélico *B. tenagophila* comme dans *B. straminea*. La blessure de tissu montré une augmentation de 69% de la concentration de protéines totales dans l'hémolymphe de *B. straminea* et l'intense activité des aminotransférases, ALAT et ASAT,

soit une augmentation de 241,26% et 360%, respectivement, comparativement au groupe de contrôle . L'infection réduite de 51,57% la concentration en protéines totales circulant à *B. tenagophila*, et augmente l'activité d'AST et ALT à 310% et 280% par rapport à mollusques non infectées. Les résultats de cette étude indiquent que le métabolisme énergétique et de structure des deux espèces est fortement affectée par l'infection, indiquant l'activation d'une anaérobie pour compenser l'appauvrissement des réserves de glicídicas ainsi que la modification de la conFig.tion d'excrétion en fonction de l'utilisation de substrats protéine pour la production d'ATP. Bien que les études sur clinique, pathologique et épidémiologique de neurones angiostrongylose ont été largement réalisée, les données sur le profil métabolique et reproductrice des mollusques infectés par *A. cantonensis* sont rares. Cette étude novatrice axée sur les espèces de la relation hôte-parasite contribue certainement beaucoup à la connaissance de cette interaction, comme l'épidémiologie de la transmission du *A. cantonensis* en plus de fournir de nouvelles subventions qui peut être utilisé dans la prévention et le contrôle de la méningite à éosinophiles, zoonose considéré comme émergent au Brésil.

Mots-clés: Planorbidés, *Biomphalaria* spp, hôtes intermédiaires, *A. cantonensis*, profil métabolique, relation hôte-parasite, méningite à éosinophiles.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1-** Concentração de glicose (mg/dl) e atividade da lactato desidrogenase (UI) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*, após 21 dia da exposição às larvas L₁. **44**
- Tabela 2-** Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*, após 21 dia da exposição às larvas L₁. **46**
- Tabela 3-** Conteúdo de ácidos orgânicos (mM) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*, durante o período pré-patente da infecção, expresso em dias. **47**
- Tabela 4 –** Concentração de cálcio concha (mg de CaCO₃/g de cinzas) e na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*, expresso em dias pós-infecção. **59**

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** -Microscopia de luz da larva de 3º estágio (L3) de *Angiostrongylus cantonensis*. **5**
(a) extremidade anterior mostrando extremidade similar a um botão (KT), estrutura similar a haste (RS), esôfago (E), poro secretor (EP); (b) extremidade posterior mostrando a ponta da cauda (TPT) e ânus (A).
- Figura 2** -Microscopia de luz de *Angiostrongylus cantonensis*. Barra de escala: 25_μm. (6) **6**
Macho, vista ventral da bursa caudal. Detalhe mostrando a espessura do raio dorsal, com 3 pequenos braços (→). (7) Macho, vista lateral da bursa caudal, mostrando o gubernaculum.
- Figura 3** -Ciclo de vida ilustrativo do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: **9**
Wang et al., 2008 e Maldonado et al., 2012.
- Figura 4** -Mapa da distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* e casos de **12**
angiostrongilíase no Brasil. AL: Alagoas; AM: Amazonas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; adaptado de Morassutti *et al.* (2014).
- Figura 5** -(A) *Biomphalaria glabrata*; (B) *Biomphalaria tenagophila*; (C) *Biomphalaria* **28**
straminea. Escala: 1cm.
- Figura 6** -Aspectos do comportamento reprodutivo de *Biomphalaria straminea* ao longo de **34**
21 dias de infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis*. (A) Número de massas ovíferas/molusco; (B) Número de ovos/molusco; (C) Número de ovos/massa ovígera e (D) Número de moluscos eclodidos/molusco.
- Figura 7** -Aspectos do comportamento reprodutivo de *Biomphalaria tenagophila* ao longo **35**
de 21 dias de infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis*. (A) Número de massas ovíferas/molusco; (B) Número de ovos/molusco; (C) Número de ovos/massa ovígera e (D) Número de moluscos eclodidos/molusco.
- Figura 8** - Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Biomphalaria* **37**

straminea em sobre o número de ovos viáveis (A) e a viabilidade dos moluscos (B) no período de 6, 11 e 21 dias de infecção.

Figura 9 - Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Biomphalaria tenagophila* em sobre o número de ovos viáveis (A) e a viabilidade dos moluscos (B) no período de 6, 11 e 21 dias de infecção. **38**

Figura 10 - Concentração de galactose (mg de glicose/ mg de tecido) em glândula de albúmen de *Biomphalaria straminea* (A) e *Biomphalaria tenagophila* (B) infectadas por *Angiostrongylus cantonensis* no período de 6, 11 e 21 dias de infecção. **39**

Figura 11 - Corte histológico da região do ovotestis de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*. **Biomphalaria tenagophila: A (6 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis funcionalmente ativo, com a estrutura do ácino (ác), com espermatozóides com caudas longas e agrupados pela porção anterior (sptz) e ovócito (c). **B (11 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis com intenso processo de desorganização celular e presença de área vacuolizada. E região granulomatosa (gr) com deposição concêntrica de hemócitos. **Biomphalaria straminea: C (11 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis em processo de desorganização celular e presença de área vacuolizada. Ácinos contendo ovócitos na área central (ov) e espermatozóides agrupados pela região anterior (cabeça) e com caudas alongadas direcionadas para região do lúmen (sptz). **D (21 dias pós-infecção)** mostrando região com ácinos contendo ovócitos (ov), espermatozóides (sptz) e com maior preservação tecidual. **41**

Figura 12 -Relação entre o conteúdo de glicose (●) (mg/dL) e a atividade da lactato desidrogenase (■) (UI) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* (A) e *Biomphalaria tenagophila* (B) experimentalmente infectadas com larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*. Teste de regressão polinomial de 3ª ordem. **43**

Figura 13 -Relação entre o conteúdo de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na glândula digestiva(●) e na massa cefalopediosa (▲) de *Biomphalaria straminea* (A). Teste de regressão de 1ª ordem. E em *Biomphalaria tenagophila* (B) experimentalmente infectadas com larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*. Teste de regressão polinomial de 3ª ordem. **45**

Figura 14 -10- Secções histológicas da glândula digestiva de *Biomphalaria straminea* **48** infectada e não infectada com *Angiostrongylus cantonensis*. **A (não infectados)** mostra região funcionalmente ativa da glândula digestiva com células estruturalmente intactas. **B (6 dias pós-infecção)** apresenta tecido da glândula digestiva com intenso processo de desorganização celular, exibindo lúmen contendo material amorfo (**lu**) e presença de áreas vacuolizadas (**va**). **C** Região granulomatosa na massa cefalopediosa (**gr**) e fibras colágenas (**cf**). **D** Região periférica da glândula digestiva mostrando área vacuolizada e região granulomatosa evidenciada pela coloração de Tricômico de Gomori (**gr**). Barra de escala = 100 µm A, B; Barra de escala = 50 µm C, D.

Figura 15 -Secções histológicas da glândula digestiva de *Biomphalaria tenagophila* **49** infectada com *Angiostrongylus cantonensis* com coloração por Eosina-hematoxilina (**A, B, D**) e por Tricômico de Gomori (**C**). **A (6 dias pós-infecção)** apresenta a funcionalidade e integridade do tecido da glândula digestiva, exibindo um processo de desorganização tecidual com presença de material amorfo no lúmen celular (**lu**). **B, C and D (21 dias pós-infecção)** mostra a região da glândula digestiva com intenso processo de desorganização tecidual, presença de áreas vacuolizadas e região granulomatosa (**gr**) e perfil larval (→). Barra de escala = 100 µm A, D; Barra de escala = 50 µm B,C.

Figura 16 -Relação entre a concentração hemolinfática de proteínas totais, expresso em **51** mg/dl, das espécies *Biomphalaria straminea* (**A**) e *Biomphalaria tenagophila* (**B**) experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis* e o tempo, expresso em dias pós-infecção.

Figura 17 -Relação entre a atividade da alanina aminotransferase (ALT) (◆) e da aspartato **52** aminotransferase (AST) (■), expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria straminea*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* após 6, 11 e 21 dias de infecção.

Figura 18 -Relação entre a atividade da alanina aminotransferase (ALT) (◆) e da aspartato **53** aminotransferase (AST) (■), expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* após 6, 11 e 21 dias de infecção.

Figura 19 -Relação entre a concentração de ácido úrico (◆) e Ureia (■), expressa em **55**

mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria straminea*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, 21 pós-infecção.

Figura 20 -Relação entre a concentração de ácido úrico (◆) e Ureia (■), expressa em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, 21 pós-infecção. 56

Figura 21 -Concentração de cálcio na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, expresso em dias pós-infecção. 58

Figura 22 - Esquema geral das alterações no metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. 63

Figura 23 - Esquema geral das alterações no metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. 64

Figura 24 - Esquema geral das alterações dos ácidos orgânicos de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*. 65

Figura 25- Esquema geral das alterações dos ácidos orgânicos de *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*. 66

Figura 26 - Esquema geral das alterações no metabolismo de produtos nitrogenados de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*. 68

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1-. <i>Angiostrongylus cantonensis</i> Chen, 1935	4
2.2- Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	7
2.3- Relação de moluscos e nematódeos	10
2.4- Relação <i>Biomphalaria</i> spp. – <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	10
2.5- Metabolismo de carboidratos de gastrópodes	14
2.5.1- Alterações no metabolismo de carboidratos de moluscos hospedeiros de helmintos	15
2.6- Alterações no comportamento reprodutivo de moluscos infectados por helmintos	18
2.7- Alterações no metabolismo de proteínas totais e da atividade das aminotransferases de moluscos hospedeiros de helmintos	20
2.8- Alterações no metabolismo de produtos nitrogenados de excreção de moluscos hospedeiros de helmintos	22
2.9- Alterações no metabolismo de cálcio de moluscos hospedeiros de helmintos	23
3- OBJETIVOS	25
3.1- Objetivo geral	25
3.2- Objetivos específicos	25
4- MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1- Material	26
4.2- Infecção experimental dos moluscos e formação dos grupos	26
4.3- Manutenção dos moluscos	26
4.4- Aspectos da biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados com <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	29
4.5- Dissecção e coleta de hemolinfa	29
4.6- Parâmetros bioquímicos	29
4.6.1- Análise do perfil metabólico dos moluscos, <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectadas com <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .	29
4.6.2- Determinação dos ácidos orgânicos hemolinfáticos	30
4.6.3- Determinação de ácido úrico e uréia	31

4.6.4-Determinação da atividade enzimática da alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST)	31
4.6.5- Dosagem de proteínas	31
4.6.6- Determinação de cálcio na concha e na hemolinfa	31
4.7- Microanatomia do ovotestis e da glândula digestiva de <i>Biomphalaria straminea</i> e de <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectadas por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	31
4.8- Análises estatísticas	32
5- RESULTADOS	33
5.1- Aspectos da biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	33
5.2- Metabolismo de carboidratos de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	42
5.3- Metabolismo de produtos nitrogenados de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	50
5.4- Metabolismo de cálcio de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	57
6- DISCUSSÃO	60
6.1- Aspectos da biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	60
6.2- Metabolismo de carboidratos de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	61
6.3- Metabolismo de produtos nitrogenados de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	67
6.4- Metabolismo de cálcio de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	69
7- CONCLUSÕES	72
8- CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
9- PERSPECTIVAS	74
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1- INTRODUÇÃO

O metastrongilídeo *Angiostrongylus cantonensis* (CHEN, 1935) que parasita a artéria pulmonar e o ventrículo direito de roedores, conhecido como “verme do pulmão de ratos”, é endêmico na Ásia e nas Ilhas do Pacífico onde muitos casos de infecção humana ocorrem (Eamsobhana, 2014). Porém, tanto o parasito quanto casos de meningite eosinofílica humanos causadas pelo nematódeo, têm sido registrados em diversos países, como Austrália (PROCIV, 1990), Brasil (CALDEIRA et al., 2007; LIMA et al., 2009), Cuba (AGUIAR et al. 1981), Equador (WANG, 2008, PINCAY et al. 2009), Estados Unidos (SLOM et al. 2002), Jamaica (KIM et al. 2002), Reino Unido (JONES, 2007) e Suíça (BARTSCHI, 2004).

O ciclo de vida desse nematódeo envolve roedores, como hospedeiros definitivos, especialmente do gênero *Rattus* Fisher Waldheim, 1803 que se infectam através da ingestão dos hospedeiros intermediários (gastrópodes) e dos hospedeiros paratênicos (crustáceos, lagartos, planárias e sapos) contendo o estágio larval infectante de terceiro estágio (L₃). Uma vez dentro dos hospedeiros definitivos, as larvas irão se desenvolver até atingirem a maturidade e o verme adulto se reproduzirá, produzindo ovos, os quais eclodem liberando as larvas de primeiro estágio (L₁). Estas são liberadas nas fezes dos ratos e, em seguida serão ingeridas e/ou penetrarão ativamente nos moluscos hospedeiros intermediários. Os humanos são hospedeiros acidentais que adquirem a infecção após a ingestão de vegetais ou hospedeiros intermediários e/ou paratênicos contendo as larvas L₃ (WANG, 2008). Contudo, nesses hospedeiros acidentais, ao atingirem o sistema nervoso central as larvas morrem, primariamente no cérebro, levando a um quadro de meningoencefalite eosinofílica (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 2009; KIM, 2014).

Angiostrongylus cantonensis é reconhecido mundialmente como um patógeno zoonótico emergente, responsável por milhares de casos de meningite eosinofílica desde que o primeiro caso foi descrito em Taiwan em 1945 (WANG, 2012). Dessa forma, tem chamado atenção das agências de saúde pública em função dos surtos e dos casos esporádicos que ocorrem em curtos intervalos de tempo em vários países, inclusive naqueles fora de sua área de origem. Os dados mais recentes apontam que cerca de 2.877 casos de meningite eosinofílica causados pelo nematódeo já foram notificados em mais de 30 países (WANG, 2012). Além disso, muitos casos não são notificados, ou até mesmo são diagnosticados erroneamente por falta de preparo e alerta da comunidade médica e do público em geral. A infecção está emergindo por conta da mudança dos hábitos alimentares das pessoas, também pela dinâmica do comércio alimentício e viagens de lazer e comerciais de pessoas de diferentes origens (EAMSOBHANA, 2014). Assim, a zoonose representa um risco, não só para as pessoas que vivem nas regiões afetadas, mas também para aquelas que entram nessas áreas (WANG, 2008; KIM, 2014).

No Brasil, os dados mais recentes indicam que dos 84 casos de meningoencefalite eosinofílica investigados, pelo menos 34 foram causadas por *A. cantonensis* (MORASSUTTI et al. 2014), os quais ocorreram nos seguintes estados: Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Paraná, Pernambuco e no Distrito Federal. O primeiro registro de moluscos naturalmente infectados no Brasil ocorreu no estado do Espírito Santo (CALDEIRA et al., 2007), onde diferentes espécies de moluscos, tais como *Sarasinula marginata* (Semper, 1885), *Subulina octona* (Bruguière, 1792), *Achatina fulica* Bowdich, 1822 e *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) foram coletadas e

submetidas à técnica de PCR-RFPL para confirmação da identificação do parasito. Posteriormente, o caramujo exótico invasor *A. fulica*, associado à dispersão da meningite eosinofílica em vários países, foi encontrado infectado por *A. cantonensis* juntamente com outras espécies nos seguintes estados: (a) *B. similis* na Bahia, Espírito Santo, Santa Catarina, São Paulo; (b) *Pomacea lineata* (Spix in Wagner, 1827) em Pernambuco; (c) *Sarasinula linguiformis* (Semper, 1885) em São Paulo; (d) *Sarasinula marginata* na Bahia, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo; (e) *Subulina octona* (Bruguière, 1792) na Bahia, Espírito Santo, Pará, Pernambuco e São Paulo (MORASSUTTI et al. 2014).

De acordo com Kim (2014) a distribuição de *A. cantonensis* tem sido direcionada pelas atividades humanas, através da dispersão dos hospedeiros definitivos e intermediários. A movimentação dos hospedeiros definitivos está associada, principalmente, às viagens humanas e ao comércio, e se infectados com o parasito tornam-se uma fonte de introdução nas áreas onde ocorrem os moluscos. No caso dos hospedeiros intermediários, a dispersão também se dá pela ação humana, intencional ou acidentalmente por diferentes vias, principalmente através da agricultura (COWIE, 2003a). Além disso, as mudanças climáticas também são responsáveis pelo aumento dos habitats viáveis e as condições de transmissão podem expandir.

Estudos ecológicos e biológicos indicam que moluscos terrestres são claramente os principais hospedeiros utilizados, porém em condições naturais os moluscos aquáticos atuam como hospedeiros auxiliares (MORLEY, 2010). Entretanto, o gastrópode de água doce *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), nativo da América do Sul e introduzido na Ásia para alimentação humana, além de ter se tornado praga de arrozais, é atualmente considerado um dos principais transmissores da meningite eosinofílica em países como a China, onde têm ocorrido vários surtos de meningite eosinofílica (LV, 2009; 2011). No Brasil a espécie congênica, *Pomacea lineata* foi o único molusco encontrado infectado no município de Escada, PE, no peridomicílio onde uma criança diagnosticada com meningite eosinofílica (THIENGO et al., 2010).

Muitos nematódeos terrestres são caracterizados pelo grande número de moluscos hospedeiros (GREWAL et al. 2003; CALDEIRA et al. 2007), e um destes aspectos generalistas é a capacidade de utilizar moluscos aquáticos como hospedeiros sob ambas condições, natural e experimental (MORLEY, 2010). De fato, a alta compatibilidade fisiológica demonstrada entre moluscos aquáticos e nematódeos terrestres, somada à criação de algumas espécies em laboratório já bem estabelecida, fez este modelo ser amplamente utilizado em estudos da relação parasito-hospedeiro de importância em saúde pública e veterinária (WANG, 2008; 2012; MORLEY, 2010).

Desta forma, o estudo desta relação a partir de modelos experimentais tem sido uma ótima estratégia para o entendimento de como os estádios de desenvolvimento dos parasitos podem afetar e interagir com os hospedeiros intermediários. Adicionalmente, a criação em condições laboratoriais nos assegura a origem e condições nutricionais dos hospedeiros, bem como a idade e ausência de infecções concorrentes.

O uso de espécies do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 infectadas com *A. cantonensis* em laboratório já está muito bem estabelecido (WANG, 2008) e tem permitido o avanço nos estudos da biologia deste parasito (CHENG, 2011a; WANG, 2012; COWIE, 2013a). A utilização de espécies de *Biomphalaria* é uma decisão acertada, pois muito já foi estudado sobre a biologia destes planorbídeos, especialmente *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Fig. 5A). Além do mais, espécies deste gênero são amplamente distribuídas pelas

regiões tropicais e subtropicais da África e Américas e estão intimamente relacionadas com a transmissão de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, dentre outros helmintos. No Brasil, cerca de 11 espécies do gênero já foram identificadas, dentre estas *B. glabrata*, *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Fig. 5B-C), as quais são as responsáveis pela manutenção e transmissão de *S. mansoni* (BRASIL, 2008).

O relacionamento parasito e moluscos hospedeiros é um sistema complexo e sofre inúmeras influências bióticas e abióticas no seu curso. Ao se estabelecer e iniciada a fase de desenvolvimento intramolusco, o parasito desencadeia uma intensa alteração na homeostasia do hospedeiro. O parasito ganha um novo habitat e nicho ecológico, e com este ambiente restrito ele tem que, obrigatoriamente, lidar com as fontes energéticas do hospedeiro e com os espaços disponíveis para seu estabelecimento (BECKER, 1980). O entendimento desse cenário é a base para o desenvolvimento de estratégias de controle, e também fundamental para o avanço do conhecimento da biologia do parasito.

Além disso, o número de estudos relacionados ao desenvolvimento de *A. cantonensis* em moluscos hospedeiros ainda é muito escasso e pouco se sabe sobre suas interações com diferentes espécies. Assim, com o objetivo de ampliar o conhecimento a respeito desta relação *A. cantonensis*/hospedeiros moluscos, o presente estudo analisou aspectos referentes à biologia reprodutiva, ao metabolismo de carboidratos, de produtos nitrogenados de excreção e cálcio dos planorbídeos *B. straminea* e *B. tenagophila*, no decorrer do período pré-patente e patente da infecção.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Angiostrongylus cantonensis*.

A primeira descrição de *Angiostrongylus cantonensis* foi feita na cidade chinesa de Canton por Chen em 1935, durante uma investigação parasitológica em roedores, e o nome dado ao parasito foi *Pulmonema cantonensis* (HUNG; CHEN, 1988; PROCIV et al., 2000). Mais tarde, Nomura e Lin (1944) foram os primeiros a recuperar um nematódeo adulto, que identificaram como *Haemostromylus ratti* Yokogna, 1937 de um paciente tailandês com sintomas de meningite. A princípio os especialistas não relacionaram o parasito com a doença, pois não consideravam que houvesse alguma relação entre o alimento cru ingerido pelo paciente e uma contaminação prévia por moluscos (NOMURA e LIN, 1945). O manuscrito feito por Nomura e Lin, escrito em japonês, permaneceu sem tradução para o inglês até a suspeita de um caso de meningite eosinofílica por *A. cantonensis*, em 1964 no Thaiti. Somente nesta década foi proposta uma relação entre esse novo tipo de meningite, caracterizada por uma forte inflamação eosinofílica, registrada no Pacífico e o parasito *A. cantonensis*. Atualmente, a classificação de espécies do gênero *Angiostrongylus* baseia-se nas características morfológicas, principalmente nas características dos raios da bursa copulatória, especificidade dos grupos de hospedeiros e/ou a localização dos vermes adultos nos hospedeiros (MALDONADO et al., 2012) (Fig. 1A e B, Fig. 2 C e D).

A primeira descrição do ciclo foi em 1955 por Mackerras e Sandars, que verificaram que o parasito passa em seu início de estágio evolutivo por moluscos como hospedeiros intermediários, e que ao atingirem o hospedeiro definitivo, a larva obrigatoriamente migra para o cérebro, onde produz uma severa inflamação eosinofílica e por fim, migra para os pulmões, onde os adultos alcançam a maturidade sexual (MACKERRAS, 1955) (Fig.3).

Um dos pesquisadores pioneiros nestes estudos foi o patologista Joseph Alicata que ao realizar estudos epidemiológicos no Havaí em 1961, considerou que os casos de meningite estavam relacionados com a presença de *A. cantonensis*. Em um de seus registros há o relato de um trabalhador japonês que após ingerir lesmas, em função das suas presumidas propriedades medicinais, desenvolveu um quadro de paralisia de ombros e braços, e surdez. Uma coleta do fluido cérebro-espinhal do paciente revelou uma moderada pleocitose eosinofílica. A fim de confirmar a relação da doença, com a ingestão das lesmas e a presença de *A. cantonensis*, uma coleta de moluscos foi realizada no peridomicílio do paciente e a presença das larvas do parasito foi confirmada (ALICATA, 1966). No mesmo ano, o médico R. Chappel reportou que ao analisar secções do cérebro de um paciente Filipino, que havia ido a óbito com vários sintomas, incluindo meningite, no Hospital do Estado do Havaí em 1960; observou a presença de um nematódeo preservado. Posteriormente, as seções preservadas foram encaminhadas para o médico Leon Rosen que confirmou a presença de *A. cantonensis* (ROSEN et al., 1962).

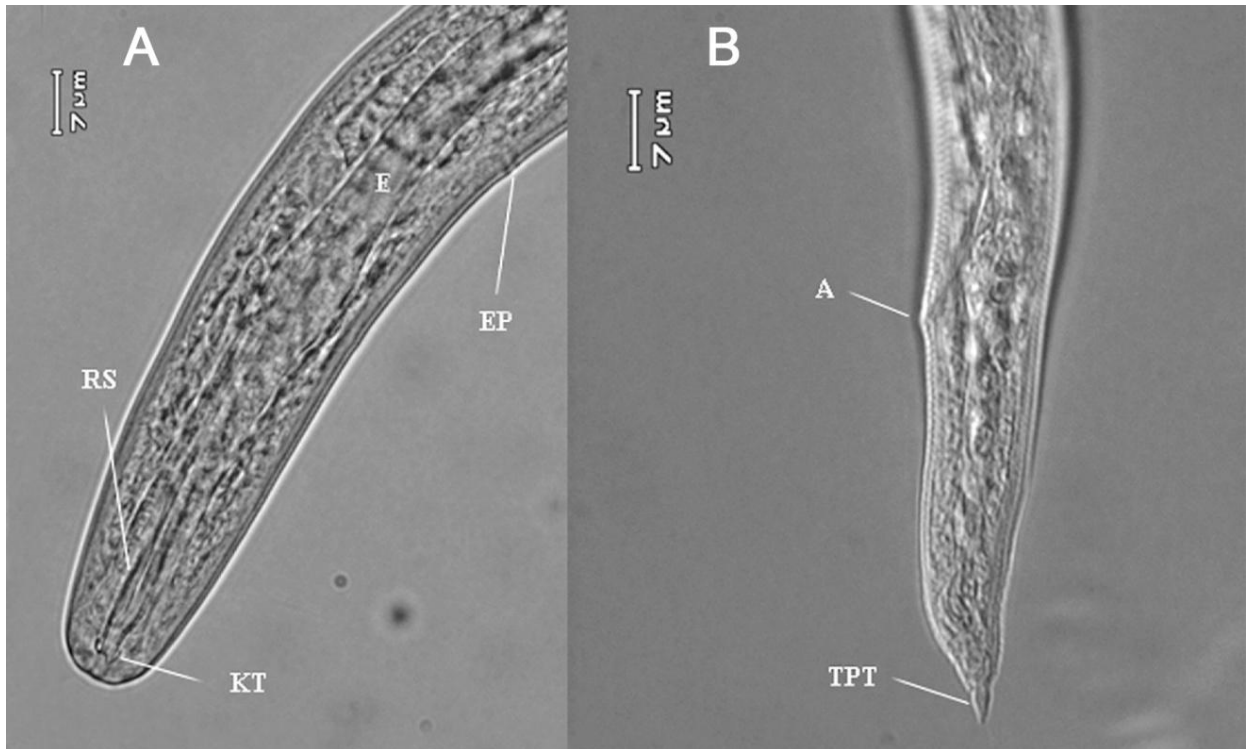


Figura 1A e B - Microscopia de luz da larva de 3º estágio (L3) de *Angiostrongylus cantonensis*. (a) extremidade anterior mostrando a extremidade distal similar a um botão (KT), estrutura em forma de haste (RS), esôfago (E), poro secretor (EP); (b) extremidade posterior mostrando a ponta da cauda (TPT) e ânus (A). Fonte: Maldonado et al., 2010.

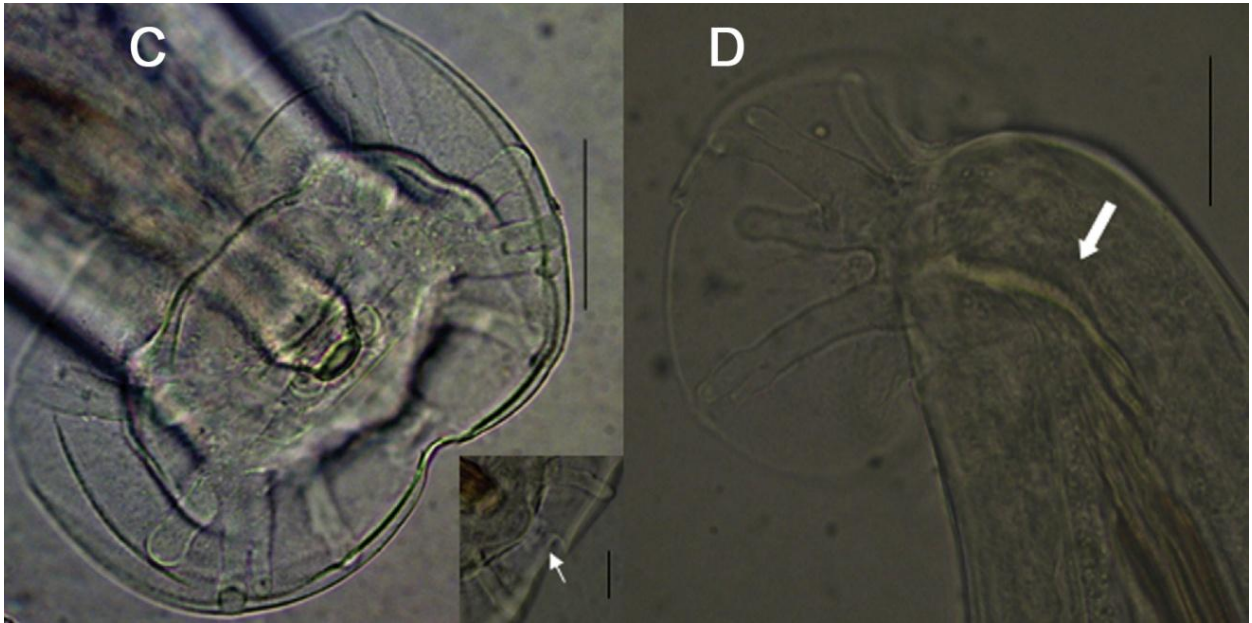


Figura 2C e D - Microscopia de luz de *Angiostrongylus cantonensis*. Barra de escala: 25_μm. (C) Macho, vista ventral da *bursa* copuladora. Detalhe mostrando a espessura do raio dorsal, com 3 pequenas digitações (→). (D) Macho, vista lateral da *bursa* copuladora, mostrando o gubernaculum. Fonte: Maldonado et al., 2010.

De certo, os primeiros registros da presença de *A. cantonensis* estão restritos aos países do Sudeste Asiático e as Ilhas do Pacífico, porém esse cenário começa a mudar no início da década de 1980, com os primeiros relatos de ratos e moluscos infectados em Cuba (AGUIAR et al., 1981), seguido dos registros no Estados Unidos, Jamaica, Equador (KIM et al. 2002, SLOM et al. 2002, WANG et al. 2008, PINCAY et al. 2009) Brasil, Reino Unido, Suíça e Nova Zelândia (CALDEIRA et al. 2007, LIMA et al. 2009, JONES 2007, ESPÍRITO-SANTO et al. 2013).

Inicialmente, Alicata (1966) defendeu que o parasito, *Angiostrongylus sandarsae* Alicata, 1968, evoluiu de um ancestral comum de roedores, de Moçambique e Madagascar, e apresentava como hospedeiro intermediário o molusco *Achatina fulica*. De forma que a rápida dispersão do molusco foi a responsável pela ampla distribuição do parasito. Por outro lado, autores como Drozd et al. (1975) defendem 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 *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758, está relacionada ao fato desses animais albergarem uma alta carga infectante, sem manifestar distúrbios relacionados aos sistema nervoso central. Estudos recentes já indicam que o parasito tem ampla compatibilidade genética com hospedeiro molusco, e que a rota mais possível de dispersão tenha sido através dos portos em função do grande tráfego de navios, contendo os 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, o deslocamento de pessoas e animais, somados à 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).

2.2. Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis*

O ciclo de vida completo de *A. cantonensis* requer ambos os hospedeiros intermediário e definitivo (Fig. 1). Os roedores, como hospedeiros definitivos, são infectados com *A. cantonensis* após a ingestão de larvas de terceiro estágio (L_3). A larva migra para o sistema nervoso central (SNC), onde através de duas mudas alcança os estágios L_4 e L_5 , e finalmente desenvolvem-se em parasitos adultos (ALICATA, 1970). Contudo, a maturidade sexual e a postura dos ovos ocorrem na artéria pulmonar. Após a eclosão, as larvas L_1 migram através dos brônquios, são deglutidas e excretadas pelas fezes (WU, 2006). As larvas L_1 nas fezes são ingeridas ou penetram ativamente nos moluscos hospedeiros intermediários (aquáticos e terrestres), em *B. galabrata* as larvas L_1 desenvolvem-se e mudam para L_2 cerca de 11 dias após a infecção, a segunda muda ocorre entre 20 e 21 dias após a infecção, onde o parasito atinge a forma infectante L_3 (HARRIS E CHENG, 1975), que pode ser transmitida para um hospedeiro paratênico (transportador) como camarões, siris, lagartos e planárias (CHAO, 1987; HOLLINGWORTH, 2006; PANACKEL, 2006; CROSS, 2007). Os humanos não são hospedeiros definitivos naturais de *A. cantonensis*, mas adquirem o parasito através da ingestão de água e alimentos contaminados, como vegetais e/ou hospedeiros intermediários/paratênicos contendo as larvas L_3 . O parasito não completa o ciclo no homem, mas permanecem no sistema nervoso

central, assim causando a meningoencefalite eosinofílica ou migra para outros sítios, como o globo ocular e causa a angiostrongilíase ocular (WANG et al., 2012).

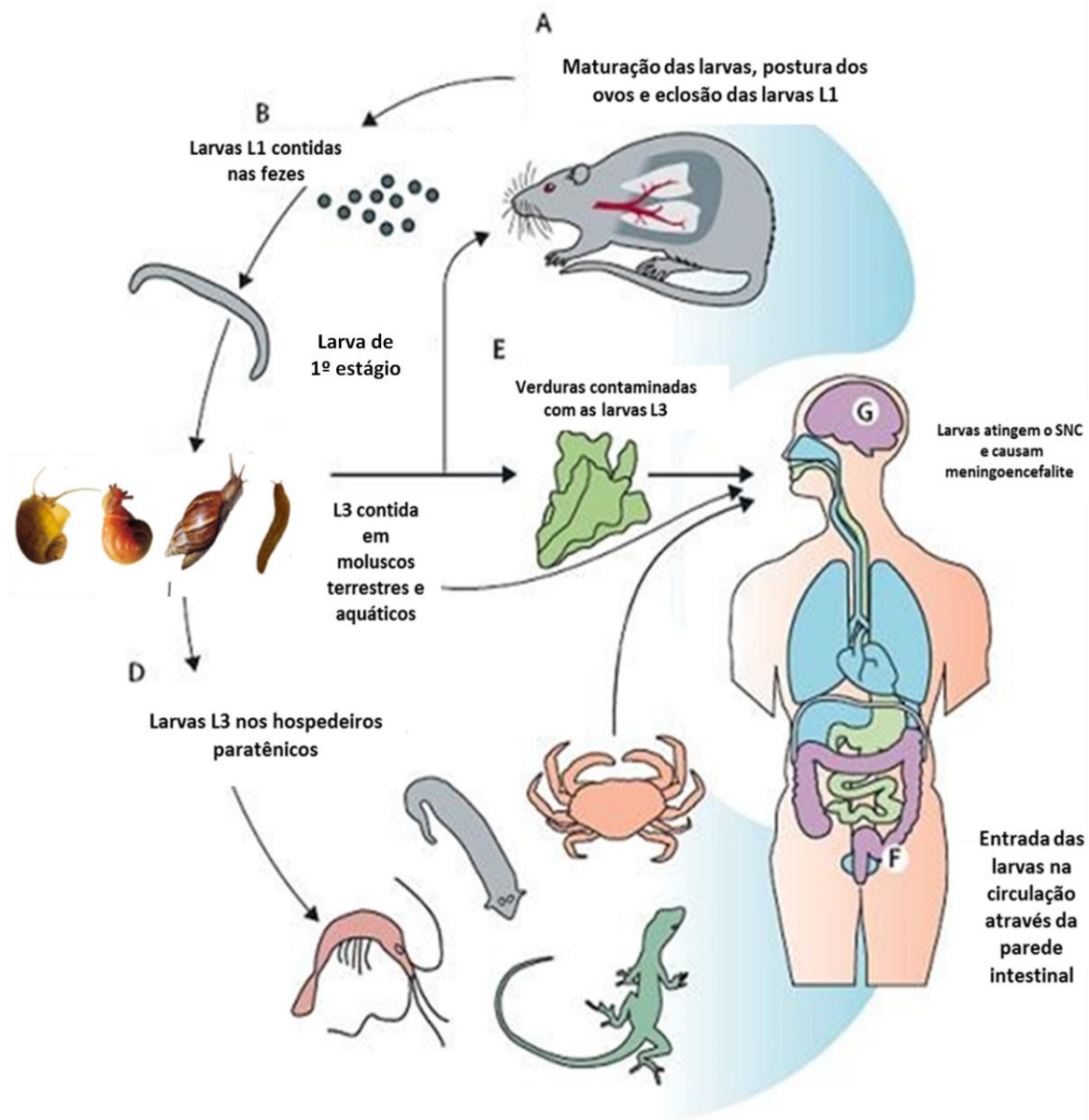


Figura3- Ciclo de vida ilustrativo do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: Wang *et al.*, (2008) e Maldonado *et al.*, (2012).

2.3- Relação moluscos-nematódeos

As associações estabelecidas entre moluscos e nematódeos podem variar desde uma relação paratênica, com poucas requisições por parte do parasito, até uma relação de parasitismo, com um custo elevado para o hospedeiro, culminando em um quadro patológico em função do desenvolvimento dos estádios evolutivos dentro do molusco (GREWAL et al., 2003). No hospedeiro paratênico, o parasito mantém sua forma infectante viável, embora não receba condições que favoreçam seu desenvolvimento evolutivo; neste caso o molusco atua somente como um abrigo temporário até alcançar o hospedeiro final. Esta é uma estratégia frequentemente encontrada na natureza e esse tipo de associação é vista em algumas espécies de nematódeos que acabam utilizando moluscos como hospedeiros temporários, fazendo disso uma alternativa para aumentar as possibilidades de sobrevivência, e conseqüentemente, de transmissão (ANDERSON, 2000).

Os nematódeos, quando associados aos moluscos, em sua maioria utilizam-os como hospedeiros intermediários. Segundo Grewal et al. (2003) grande parte dos estrombilídeos o fazem, enquanto os rabditídeos os usam como hospedeiros definitivos. Ainda conforme esses autores uma lista de um pouco mais de 108 espécies de nematódeos têm algum tipo de associação com moluscos. As formas juvenis da maioria dos nematódeos penetram em caramujos e lesmas para desenvolver parte de seus processos evolutivos. Normalmente, a larva de primeiro estágio entra no molusco hospedeiro e completa seu desenvolvimento até a fase infectante (L₃), que posteriormente será adquirida pelo hospedeiro vertebrado, acidental ou intencionalmente. A maior parte da transmissão da larva de terceiro estágio é feita pela predação do hospedeiro intermediário, porém algumas espécies de parasitos apresentam suas larvas L₃ capazes de viverem livres e viáveis no ambiente por um determinado período de tempo, até serem ingeridas por seus hospedeiros definitivos (KUTZ et al., 2001).

A utilização do molusco como hospedeiro definitivo também é uma possibilidade, e neste caso, segundo Grewal et al. (2003) existem três possíveis relações: (a) os nematódeos desenvolvem-se dentro da cavidade corporal do hospedeiro, mas suas formas adultas também podem ser encontradas no ambiente, como acontece com *Mermis nigrescens* Dujardin, 1842/*Deroceras agrestis* Linnaeus, 1758, cujo desenvolvimento evolutivo até alcançar a maturidade sexual ocorre dentro do molusco, mas o processo reprodutivo acontece no ambiente (CHITWOOD E CHITWOOD, 1937); (b) Os nematódeos completam todo o ciclo evolutivo dentro do hospedeiro, no entanto sem qualquer alteração patológica para o molusco, e seguem atuando como únicos hospedeiros, como ocorre na interação *Rhabditis axei*/*A. fulica* (ODAIBO et al., 2000); (c) Por fim, neste caso os nematódeos completam todo seu ciclo biológico dentro do molusco hospedeiro, porém causando-lhe sérias alterações patológicas que resultam em sua morte, como acontece na infecção por *Phasmarhabditis hermafrodita* que auxiliam na liberação de bactérias, as quais produzem endotoxinas ao multiplicarem-se resultando na morte do hospedeiro (TAN E GREWAL, 2001b).

2.4- Relação *Biomphalaria* spp – *Angiostrongylus cantonensis*

Um dos aspectos generalistas de nematódeos como *A. cantonensis* é a habilidade de usar moluscos aquáticos como hospedeiros, em condições naturais e experimentais, especialmente *B. glabrata*, que apresenta alto grau de compatibilidade comparáveis aos

apresentados por *A. fulica* (AZZAM E BELAL, 2006). Isto porque, alguns moluscos aquáticos apresentam uma alta compatibilidade fisiológica com nematódeos terrestres (MORLEY, 2010), apesar dos moluscos terrestres serem considerados os principais hospedeiros. De acordo com Morley (2010) caracóis e lesmas apresentam níveis de infecção, referentes à prevalência, a intensidade e a abundância, maiores do que os hospedeiros aquáticos. Alguns autores como Poulin (2005) afirmam que esta relação pode variar entre hospedeiros auxiliares, o que está mais ligado às características ecológicas do que filogenéticas.

A sobreposição da distribuição territorial de todos os participantes da interação molusco-*A.cantonensis* é decisiva para que esse evento ocorra. No Brasil, a distribuição de *A. cantonensis* e casos de meningoencefalite eosinofílica se estendem por grande parte do litoral, da região Sul ao Nordeste, e na região Norte, nas principais coleções hídricas da Amazônia, estando intimamente ligada à distribuição de *A. fulica*, o seu principal hospedeiro intermediário terrestre (MORASSUTTI et al., 2014) (Fig. 2).



Figura 4 – Mapa da distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* e casos de angiostrongilíase no Brasil. AL: Alagoas; AM: Amazonas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; adaptado de Morassutti *et al.* (2014).

As áreas colonizadas pelos gastrópodes aquáticos podem variar de habitats lóticos e lênticos, sendo heterogêneas quanto ao clima, vegetação e topografia; e quando associados à transmissão de patógenos estão especialmente localizados em peridomicílios de regiões urbanas ou rurais desprovidas de água encanada ou saneamento (BRASIL, 2008). Está bem definido que muitas espécies de caramujos e lesmas têm uma alta afinidade por solo úmido e que podem ser encontradas facilmente e em grande densidade próximos de rios, lagoas e em coleções de água ainda menores (BOYCOTT, 1934; HORSACK E CERNOHORSKY, 2008). Logo, essa associação direta traça uma rota de transferência das larvas do nematódeo, estejam elas no solo ou no cadáver de algum molusco, para dentro da água nos períodos de chuva (MORLEY, 2010). Essa transferência das formas livres dos nematódeos presentes no solo para dentro dos habitats aquáticos está bem documentada. De acordo com Croll (1975) as larvas depositadas no solo são carregadas a longas distâncias pela água. Enchentes e chuvas fortes vão depositar estas larvas em uma variedade de ambientes aquáticos, grandes ou pequenos, mas particularmente em locais de água corrente, rios e canais de irrigação/drenagem (FAULNER E BOLANDER, 1970; MOTT E HARRISON, 1983).

As larvas L₁ apresentam alta taxa de sobrevivência, podendo permanecer até por 4 meses dentro de um ambiente aquático (BOEV, 1975; KONTRIMAVICHUS et al., 1976). A infecção dos moluscos aquáticos pode ser por ingestão pelo molusco ou por penetração direta no tegumento (YOUSSIF E LAMMLER, 1977). Desta maneira, a aquisição da infecção é principalmente por contato acidental, favorecida pelo comportamento de “saída da água” pelos moluscos aquáticos (GREEN et al., 1992), o que possibilita que estes moluscos sejam infectados diretamente sob condições naturais.

Assim, tendo penetrado no molusco aquático e completado seu desenvolvimento, o próximo passo do ciclo do nematódeo torna-se prioridade para o parasito. Em *Biomphalaria* spp. o registro mais completo deste processo foi feito em *B. glabrata* (HARRIS E CHENG, 1975; YOUSSIF E LAMMLER, 1977), sendo capaz de apresentar larvas L₃ viáveis, esta espécie é muito utilizada na manutenção do ciclo experimental de *A. cantonensis* (WANG et al., 1989, 2008, 2012). A emergência de L₃ está associada às condições ambientais que causem algum estresse no hospedeiro (BOEV, 1975; BARCANTE et al., 2003), como a dessecação ou morte do mesmo, que desencadeia uma emergência em larga escala (CROOK et al., 1971).

A transmissão de L₃ livre em ambiente aquático para roedores pode ser através da ingestão de água ou das plantas localizadas na margem da coleção contaminadas com L₃. Além disso, as larvas podem penetrar através da pele lesionada com solução de continuidade, pois a infecção patente em ratos tem sido demonstrada através da penetração percutânea, subcutânea e intramuscular ou intraperitoneal. O que pode ser uma ameaça de infecção por contato direto ou por perfurações acidentais em trabalhadores laboratoriais e rurais. Nestes casos de ratos expostos a *A. cantonensis*, a infecção ocorreu com sucesso através da pele não lesionada, da mucosa vaginal, anal e conjuntiva (WANG et al., 1991). A penetração ativa por L₃ está sendo investigada através da ação de proteases secretadas pela larva infectante, testando sua capacidade de perfurar o tecido íntegro (LEE E YEN, 2005; HWANG et al., 2010; CHANG et al., 2011). A infecção do hospedeiro definitivo pode ainda ocorrer através da ingestão de hospedeiros paratênicos, como sapos, répteis, peixes e crustáceos crus (ANDERSON, 1962; WALLACE E ROSEN, 1966, 1967; ASH, 1968, 1972; BOLT et al., 1993).

Alguns autores reforçam a ideia que mudanças climáticas extremas, em larga ou pequena escala, podem favorecer o uso de hospedeiros auxiliares por nematódeos terrestres. De acordo com Hoberg et al., (2008) uma grande variedade de fatores que estruturam o complexo sistema parasito-hospedeiro pode ser alterada sobre pressão das mudanças climáticas. Estes podem ser numéricos (densidade, prevalência e abundância, tanto para parasitos como para hospedeiros) ou funcionais (alteração na estrutura ecológica, distribuição espacial, fenologia ou associação de hospedeiros), ou microevolucionário, através da adaptação local.

Mudanças climáticas extremas ainda podem ter efeito profundo sobre a relação parasito-hospedeiro, resultando em perturbações ecológicas que alterarão a dinâmica de transmissão do parasito, aumentando o potencial de troca de hospedeiro ou facilitação de novas associações entre parasito-hospedeiro (BROOK E HOBERG, 2007). Morley (2010) reafirma que os moluscos aquáticos são hospedeiros dominantes para *A. cantonensis* em condições adversas como secas e enchentes.

Ao reunirmos todos os pontos abordados, podemos discutir a possibilidade da participação de *Biomphalaria* spp. na ocorrência de meningite eosinofílica no Brasil, talvez não como o hospedeiro principal, mas como hospedeiro auxiliar; capaz de ampliar a interação de *A. cantonensis* com hospedeiro definitivo, paratênico e acidental, como os seres humanos. Dessa forma, poderia desempenhar papel relevante no cenário da saúde pública, considerando a ampla distribuição do parasito no Brasil.

2.5- Metabolismo de carboidratos de gastrópodes.

A via bioquímica de degradação da glicose foi a primeira rota metabólica a ser descrita e minuciosamente compreendida. Os primeiros estudos formais do processo glicolítico foram feitos em 1860, por Louis Pasteur, ao desvendar a fermentação nos microrganismos. A via glicolítica detalhada foi determinada em 1940, com as contribuições de Otto Meyerhof (Nobel da Medicina ou Fisiologia em 1922) e alguns anos depois por Louis Leloir (Nobel da Química em 1970) (NELSON E COX, 2011).

A via clássica de degradação completa da glicose, que converte glicose 6-fosfato à piruvato está presente em todos os tecidos dos gastrópodes (LIVINGSTONE et al., 1983) e a molécula de D-glicose é o monossacarídeo mais comum detectado na hemolinfa destes moluscos (LIVINGSTONE et al., 1987). A presença ou mensuração da glicólise começou a ser demonstrada a partir da atividade de enzimas reguladoras (BENNET E NAKADA, 1968; GOUDSMIT, 1972; AVELAR et al., 1978); intermediários glicolíticos (GOUDSMIT, 1972), ácido láctico e produtos finais do metabolismo anaeróbico, bem como experimentos com marcadores radioativos (BRYANT et al., 1964).

Em gastrópodes, os carboidratos estão estocados em moléculas de glicogênio e galactogênio, que por sua vez, estão localizados em dois tipos principais de células do tecido conjuntivo: as células granulares e as do tecido conectivo vesicular. Em 1972, Sminia, a partir de um estudo detalhado de *Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758 observou que as células granulares medem de 20-30µm e são caracterizadas pelo alto número de grânulos que medem 4 µm e são fundamentalmente compostos por glicoproteínas ricas em cisteína. Estas células estão dispersas por todo o corpo. Em contrapartida, as células do tecido conectivo vesicular foram identificadas como o principal estoque de glicogênio com importante papel na nutrição celular. Estas células são grandes medindo 60 µm, contendo glicogênio empacotados em vesículas, com citoplasma e organelas presentes como uma

fina borda contra a membrana plasmática. Sua distribuição não é uniforme ao longo do corpo, mas estão concentradas no manto, nos ácinos da glândula digestiva e no ovotestis. Em 1977, Chiang comprovou que estruturalmente as moléculas de glicogênio de *B. glabrata* não diferem daquelas apresentadas por vertebrados, sendo também um polissacarídeo de D-glicose α -1,4 com ramificações α -1,6.

O galactogênio está restrito à glândula de albúmen, situada na porção feminina do trato reprodutivo dos adultos pulmonados. A sua síntese é destinada aos ovos, sendo a reserva mais nutritiva para os embriões. Esta fonte energética também pode ser requisitada como um recurso de emergência, uma vez que as reservas de glicogênio estejam esgotadas. A glândula de albúmen é responsável pela produção do fluido perivitelínico, rico em galactogênio e proteínas (GOUDSMIT, 1972, 1973). A secreção do galactogênio é do tipo apócrina, de acordo com Nieland e Goudsmit, (1969). O fluido perivitelínico envolve cada ovo, conforme ele passa ao longo do ducto hermafrodita formando uma camada perivitelínica que também é absorvida pelas células do embrião (GOUDSMIT, 1972, 1973).

Essas moléculas energéticas são amplamente estocadas e disponibilizadas para consumo imediato na hemolinfa na forma de D-glicose e sua concentração varia de acordo com a disponibilidade de alimentos, sazonalidade, das condições ambientais e das interações biológicas. A concentração de glicose hemolinfática também pode estar relacionada com a qualidade e quantidade do alimento assimilado. Em 1934, Schwarz realizou uns dos primeiros experimentos voltados a esta observação, ao verificar que uma dieta, a partir de alface ou de alface mais glicose para *H. pomatia* apresentou diferenças apreciáveis nas concentrações hemolinfáticas. Mas esses resultados não podem ser padronizados, pois em um estudo em 1979, Stanislawski e Becker, analisaram os níveis glicídicos de *B. glabrata* quando submetidas a uma dieta a base de carboidratos quando confrontadas com uma dieta balanceada, por um período de 12 dias; e constataram que não houve alterações nos níveis hemolinfáticos. Esses resultados foram criticados por estudiosos da época, que questionaram sobre a composição da dieta usada e, até mesmo da dieta anterior ao experimento, a qual os moluscos foram submetidos. Porém, a ocorrência de queda da atividade ovipositória dos moluscos alimentados somente com carboidratos, sal e vitaminas, durante o período estudado; permitiu a constatação de que a presença de substratos como lipídios e proteínas é indispensável para normalização do comportamento reprodutivo. Os autores também observaram que a normalidade desta atividade foi mantida em animais alimentados ricamente com proteínas e lipídios, porém seus níveis glicídicos hemolinfáticos permaneceram baixos.

A síntese de glicogênio foi ratificada por Chiang, em 1977, ao verificar a atividade da enzima glicogênio sintetase (EC 2.4.1.1.1) na via anabólica de *B. glabrata*. O autor constatou que a concentração intracelular da glicose-6-fosfato está intimamente controlada pela atividade desta enzima. Por sua vez, a síntese de galactogênio quando estudada por van Elk e Joosse, (1981) apresentou a utilização da molécula de glicose, tanto para a síntese de glicogênio quanto para a de galactogênio, nos tecidos da glândula de albúmen. Os autores afirmaram que existem mecanismos de regulação das vias para controlar o fluxo de carbono entre elas. Uma enzima chave nessas vias anabólicas é a UDP-D-galactose-4-epimerase (EC 5.1.3.2), que atua na conversão da glicose em galactose. Os dois açúcares podem ser interconvertidos através da via galactose 1-fosfato uridiltransferase (EC 2.7.7.1.2), este sistema de reversibilidade foi demonstrado por Bennett e Nakada, (1968) através da incorporação de C¹⁴ a partir de [¹⁴C] galactose dentro da molécula de glicogênio.

A síntese de glicose a partir de substratos de moncarboidratos já foi amplamente demonstrada, em 1967, quando Morán e Gonzáles confirmaram a síntese de glicose-6-fosfato a partir de lactato, piruvato, frutose 1,6 bifosfato, succinato, α -cetoglutarato, L-ornitina, L-arginina, L-alanina, e L-glutamato, todos oriundo de extratos de *Concholepa concholepa* (BRUGUIERE, 1789). E no decorrer da década de 1970, a presença da Glicose 6-fosfatase (EC 3.1.3.9) foi confirmada na glândula digestiva de *Littorina saxatilis rudis* (Olivi, 1792) por Marshall et al., (1974), da enzima málica (EC 1.1.1.40) na massa cefalopediosa de *B. glabrata* por Bacila (1970), da Fosfoenolpiruvato carboxilase (EC 4.1.1.31) na musculatura de *L. saxatilis rudis* por Zammit e Newsholme, (1976a).

A elucidação das rotas bioquímicas de formação e degradação de moléculas energéticas de resíduos glicosídicos em moluscos possibilitou uma miríade de estudos, em função das interações biológicas e ambientais destes animais; e conseqüentemente, as diferentes alterações resultantes destas relações. Segundo Becker (1980), ao invadir o hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos são responsáveis pela retiradas de substâncias nutritivas, que além de repercutir em danos, também deixam o hospedeiro em um estado metabólico equivalente ao de um curto período de jejum. Assim, além da retirada de substratos utilizados pelo molusco para manutenção de seu metabolismo basal e, também destinados aos processos de crescimento e reprodutivos, estas larvas são responsáveis pela eliminação de produtos secundários de excreção que interferem de maneira nociva no metabolismo normal do animal hospedeiro.

2.5.1. Alterações no metabolismo de carboidratos de moluscos hospedeiros de helmintos.

As interações estabelecidas entre hospedeiros intermediários e helmintos parasitos são uma das principais causas do desequilíbrio metabólico observado nestes moluscos, especialmente em suas reservas glicídicas. Os gastrópodes pulmonados têm seu metabolismo energético baseado em carboidratos, os quais são armazenados sob a forma de polissacarídeos (JOOSSE, 1988; JOOSSE E VAN ELK, 1986), sendo que as moléculas de glicogênio e galactogênio são as suas centrais de armazenamento (GERAERTS, 1992).

A localização destas reservas energéticas está estrategicamente relacionada com as rotas migratórias dos principais trematódeos e nematódeos de importância em saúde pública e veterinária. Um fato estabelecido é que a glândula digestiva dos moluscos é o principal sítio para o desenvolvimento das larvas de diferentes parasitos. E isso pode estar seguramente ligado ao fato desta região ser ricamente irrigada por hemolinfa (PINHEIRO et al. 2009).

Os estudos de Thompson e Lee (1986) constataram que o conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. glabrata* é precisamente regulado. O que confirma a forte relação da drenagem de moléculas energéticas dos sítios de armazenamento quando o hospedeiro está infectado. Este fenômeno foi comprovado por Pinheiro e Amato (1994) em um estudo sobre o modelo *B. similis* infectado com *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1882), quando observaram uma acentuada redução no conteúdo de glicose hemolinfática do molusco parasitado. Concomitantemente, houve uma redução nos depósitos de carboidratos da massa cefalopediosa e glândula digestiva, os quais ao final do período pré-patente apresentaram reduções de 96,70% e 99,14%, respectivamente. Visto isso, os autores propuseram que os esporocistos que ficam aderidos à superfície externa da glândula digestiva do hospedeiro são banhados pela hemolinfa, de onde retiram os monômeros de glicose necessários para a manutenção dos intensos processos plásticos, durante o

desenvolvimento intramolusco. O desequilíbrio causado na composição glicídica da hemolinfa leva o molusco a dispor de suas reservas de carboidratos, o que causa a depleção dos seus estoques de glicogênio.

Esse comportamento já havia sido estudado por meio da avaliação da atividade de enzimas catalíticas, como as fosfatases alcalina e ácida, que são marcadores lisossomais, que indicam a aceleração do processo de glicogenólise, na interação entre larvas de trematódeos e moluscos (READER, 1971; MOORE E HALTON, 1973). E também, sob outra ótica Ishak et al. (1975) foram os primeiros autores a questionarem se ao invés das larvas estarem, de alguma forma, acelerando a glicogenólise em seus hospedeiro, poderiam estar reduzindo a taxa de glicogênese.

Assim como as reservas de glicogênio, o sítio de estoque das moléculas de galactogênio, também é um forte indicador do *status* metabólico do molusco em função do parasitismo. O primeiro registro da presença de galactogênio na glândula de albúmen foi feito por Hammarstein et al. (1885) quando os autores avaliaram a presença de glicoproteínas em extratos da glândula de albúmen de *Helix pomatia* Linnaeus, 1758, e ao observarem que a fração glicídica apresentava características semelhantes às do glicogênio, porém possuía propriedades levorrotatórias, por isso a denominaram sinistrina. Anos depois, em 1925, Levene, ao trabalhar com extratos obtidos de *H. pomatia* e *Helix aspersa* Muller, 1774 demonstrou que a substância classificada como sinistrina por Hammarstein, era na realidade, um polissacarídeo composto por galactose ou por derivados acetilados deste monossacarídeo e que a fração protéica obtida previamente, era de fato, uma impureza. Mas somente em 1931, May confirmou as observações feitas por Levene e propôs o nome de galactogênio para este polissacarídeo.

Nos moluscos pulmonados adultos, o galactogênio está restrito à glândula de albúmen e aos ovos, servindo como uma fonte especializada de energia no processo de reprodução animal. Este órgão está localizado na altura do ducto hermafrodita, envolvendo sua porção distal, sendo uma estrutura tubular constituída por um único tipo de células secretoras, cujo produto, o galactogênio envolve cada ovo fertilizado e o fluido perivitelínico (PLESH et al., 1971).

Registros de alterações no funcionamento da glândula de albúmen de moluscos parasitados vêm sendo reportados há muitos anos. Em 1981, van Elk e Joosse, realizaram um estudo no modelo *L. stagnalis/Tricobillarzi ocellata* (La Valette, 1855) das propriedades cinéticas da enzima UDP-D-galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.20), enzima reguladora, que converte a UDP-glicose em UDP-galactose em um dos passos iniciais da formação do galactogênio. Os autores constataram uma significativa redução da atividade catalítica da epimerase para um valor próximo de 2 mmol/g/min., em comparação com os moluscos controle, 7 mmol/g/min sendo a capacidade epimerásica reduzida de 0,55 mmol/g/min., para 0,025 mmol/g/min. Esse autores registraram ainda uma apreciável redução no peso desta glândula e nenhum registro de atividade ovipositória ao longo de todo período de infecção.

Sob uma nova perspectiva, el-Saadany e Mohamed (1989) realizaram um estudo ultraestrutural e descreveram a presença de dois tipos de células secretoras na glândula de albúmen de *L. stagnalis*, células de aspecto claro, as quais eles identificaram com sendo ativas, e um segundo tipo de aspecto escuro, identificadas como inativas, além de dois tipos de células de suporte, as centroacinares e as mioepiteliais. Porém, quando estes autores avaliaram o tecido de *B. glabrata* identificaram apenas um tipo de célula secretora e um tipo de célula de suporte. Durante a avaliação do modelo *L. stagnalis/T. ocellata*, as células

secretoras apresentavam complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso inativos e no período de emergência cercarial, as células secretoras apresentavam-se completamente inativas, com redução da altura do epitélio, crinofagia, organelas inativas e ausência de grânulos secretores. Em *B. glabrata/S. mansoni*, alterações na função secretora somente foram significativas no período de emergência de cercárias.

Diferentes perfis bioquímicos podem ser montados para melhor investigar as alterações do metabolismo energético dos moluscos infectados por helmintos. Em Tunholi-Alves et al., (2013), os autores avaliaram as possíveis alterações no metabolismo de carboidratos no modelo *B. glabrata/A. cantonensis*, e observaram mudanças na glicemia dos moluscos durante o período pré-patente da infecção, alterações também foram vistas na atividade da lactato desidrogenase (EC 1.1.1.2.7), que apresentou valores significativamente maiores para os moluscos infectados. Ao passo que as reservas de glicogênio nos tecidos de massa cefalopédica e glândula digestiva apresentaram uma drástica redução dentro deste sistema de interação. De fato, a ocorrência do parasitismo desencadeou um comportamento diferenciado em termo de maior mobilização das vias aeróbias e anaeróbias de metabolização energética.

Existe uma vasta cadeia de perspectivas para avaliações das relações mantidas entre moluscos hospedeiros e helmintos parasitos. Atualmente, entretanto a bibliografia revela uma série de investigações feitas entre moluscos e larvas de trematódeos, em detrimento à relação molusco-nematódeo, apesar da inegável e crescente relevância dos nematódeos tanto na saúde pública e animal, quanto no cenário econômico, considerando os moluscos vetores e ou pragas na agricultura no Brasil e em toda a América Latina.

2.6. Alterações na biologia reprodutiva de moluscos hospedeiros de helmintos.

Há pouco mais de dois séculos pesquisadores observaram que a infecção por parasitos em invertebrados poderia resultar em alterações extremas no comportamento reprodutivo dos hospedeiros (McCRADY, 1874 e MALN, 1881). Dentre diversas possibilidades, a castração ou esterilização do hospedeiro em função do parasitismo é a característica mais marcante desta interação. O termo “castração parasitária” foi usado pela primeira vez por Giard (1911-1913) para descrever este fenômeno e, segundo este autor, a verdadeira castração é a irreversível destruição dos tecidos reprodutivos. Contudo, o termo “castração parasitária” foi conceituado por Noble e Noble (1971) como a destruição ou alteração dos tecidos gonadais por parasitos; e de maneira similar por Malek e Cheng (1974) como a inibição total ou parcial da formação dos gametas no hospedeiro pelo parasito. Assim, os tecidos reprodutivos embora não funcionem, permanecem presentes no hospedeiro.

Em um sentido mais amplo, este fenômeno foi visto por Baudoin (1975) como uma estratégia evolutiva, onde o parasito induz a manipulação dos recursos reprodutivos do hospedeiro, possibilitando um prolongamento no tempo de vida do mesmo, resultando no aumento da capacidade do parasito em função do melhoramento do ambiente.

Ao longo dos anos, as pesquisas relacionadas a este aspecto permitiram estender o conceito do termo, assim, durante a infecção os efeitos negativos sobre o sucesso reprodutivo do hospedeiro, também podem ser entendidos como um meio de castração. À vista disso, o parasito que induz injúrias nos tecidos gonadais produzindo esterilidade ou reduzindo a fecundidade, associados com alterações comportamentais, conduzindo a uma redução na atividade reprodutiva, ou jovialidade por redução das características sexuais secundárias, ou reversão sexual do hospedeiro, ou alterações na funcionalidade das

glândulas acessórias ou do sistema endócrino também são entendidos como uma forma de castração (HURD, 2001).

A castração parasitária em moluscos foi descrita pela primeira vez em 1874 por McCrady, ao discorrer sobre a destruição dos tecidos gonadais de *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 por esporocistos do trematódeo *Bucephalus* sp.. A partir daí diversos trabalhos descreveram aspectos patológicos, bioquímicos e fisiológicos que são os pilares das pesquisas atuais.

No início da década de 1980, Sluiter et al. (1980) fizeram um intenso estudo fisiopatológico do modelo *Lymnaea stagnalis/T. ocellata* e relataram que a maturação dos órgãos sexuais, tais como glândula de albúmen e prostática, foi severamente atrasada nos animais infectados (SLUITERS et al., 1980, 1981). Os resultados observados por Sluiter e colaboradores foram minuciosamente confirmados por Joosse e van Elk (1986) ao demonstrarem que na glândula de albúmen dos moluscos infectados a concentração do ácido desoxirribonucleico (DNA) não aumentava com a idade dos moluscos e o galactogênio não se acumulava, como nos moluscos do grupo controle. O que foi explicado pelo efeito adverso da infecção sobre a UDP-D-galactose-4-epimerase (E.C. 5.1.3.2), enzima essencial para a síntese de galactogênio. Nenhum dano mecânico foi observado nos tecidos, contudo o peso fresco da glândula reduziu ao longo da infecção. Os resultados também mostraram que não houve inibição da gametogênese, embora nenhuma postura tenha ocorrido. O efeito da infecção foi mais por uma consequência da redução das gônadas e da gametogênese do que pela completa inibição. Em função disto os autores sugeriram a hipótese de que os hormônios envolvidos na regulação da reprodução estariam sendo afetados pela infecção. No caso, os hormônios envolvidos seriam: o hormônio do corpo dorsal, responsável pelo estímulo da vitelogênese, crescimento e diferenciação das glândulas femininas acessórias; e o hormônio das células caudo-dorsais ou de ovulação, que devem estar presentes nos moluscos infectados, embora o parasitismo possivelmente tenha causado uma redução na secreção ou uma redução na sensibilidade dos tecidos alvos.

Ainda na década de 1980 outras pesquisas envolvendo o perfil reprodutivo de moluscos infectados por trematódeos abriram novos caminhos para o entendimento desta relação. de John-Brink e colaboradores (1987; 1988) usaram a porcentagem de Ca^{2+} nas células mitocondriais da glândula de albúmen de *L. stagnalis* como um medidor para avaliar o efeito do hormônio gonadotrópico calfluxina (CaFl) e sua interação com a schistosomina, uma proteína presente na hemolinfa de moluscos infectados com *T. ocellata*. Após três semanas de exposição, as glândulas dos animais infectados mostraram uma baixa resposta a CaFl em comparação com os moluscos do grupo controle e a resposta reduziu com o tempo de infecção. Os autores concluíram que a glândula foi afetada pelos estágios iniciais do parasito. As glândulas dos animais não infectados foram incubadas no soro dos moluscos infectados, e subsequentemente incubadas em CaFl, o resultado foi uma redução na resposta, em relação aos animais do grupo controle. Os autores afirmam que a schistosomina liga-se fortemente à glândula de albúmen, provavelmente a um complexo receptor. Os resultados indicaram que um baixo número de receptores para CaFl permanece presente em animais infectados. E para as glândulas dos animais primeiramente expostas à schistosomina e depois à CaFl, a inibição dos efeitos da CaFl foram mais fortes quando a glândula de albúmen foi exposta a ambos simultaneamente. Por fim, os autores sugeriram que ambas as moléculas atuam sobre um complexo de receptores da glândula de albúmen de forma antagônica.

Ao ser avaliada a expressão e o envolvimento da schistosomina na castração de *B. glabrata*, Zhang et al. (2009), mostraram que a expressão ontogênica da proteína e os níveis de mRNA foram mais abundantes nos embriões e nos jovens do que nos moluscos maduros, sugerindo que a schistosomina está possivelmente mais envolvida no processo de desenvolvimento do que na reprodução. Além disso, a infecção por duas espécies de trematódeos, *S. mansoni* e *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967, não provocou a elevação na expressão da schistosomina durante os estágios iniciais até a fase patente da infecção. Com isso, os autores concluíram que a infecção pelos patógenos não foi capaz de estabelecer um processo de castração em função da ação da schistosomina. Por outro lado, estudos envolvendo *B. glabrata* infectadas por *E. paraensei* (TUNHOLI et al., 2010) e por *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011) mostraram que alterações significativas nos aspectos reprodutivos do hospedeiro puderam sim indicar um processo parcial de castração. Mudanças nos padrões reprodutivos de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011) foram observadas em relação ao grupo controle. A infecção induziu uma redução no número de massas ovíferas e na taxa ovipositória com o progresso da infecção, além da queda da viabilidade dos ovos. O conteúdo de galactogênio também foi alterado pela infecção, tendo sua queda mais proeminente na segunda semana de infecção. Os autores concluíram que as mudanças nos parâmetros reprodutivos estão intimamente relacionadas com a redução do conteúdo de galactogênio. Ao considerarem a galactogênese uma via análoga a glicogênese, uma via anabólica, na qual, termodinamicamente, o consumo de energia livre (ATP e UTP) é essencial. Assim, qualquer comprometimento da mesma resultará no decréscimo de reservas no interior dos ovos, diminuindo sua viabilidade, bem como alterações nos demais aspectos observados. Por outro lado, a infecção de *B. glabrata* com diferentes cargas miracidiais de *E. paraensei* (TUNHOLI et al., 2011) resultou num aumento do desempenho reprodutivo dos organismos infectados. De forma que as cargas miracidiais não afetaram estes parâmetros, somente o progresso da infecção. Os autores justificaram que parcialmente a compensação da fecundidade pode ser explicada pela idade e estágio de desenvolvimento reprodutivo dos moluscos no momento da infecção com o trematódeo.

De fato é possível perceber que a relação entre o parasito e seu hospedeiro deixa uma variedade de mudanças na sua biologia reprodutiva, que pode ser avaliada por diferentes faces. Estas relações podem subsidiar descobertas chaves para o desenvolvimento de estratégias de controle, uma vez que a maior parte dos modelos estudados está relacionada a doenças de alto impacto em saúde pública e veterinária, com grandes custos econômico-sociais, além de extremamente importantes sob o aspecto biológico, pois estes estudos seguramente enriquecem o conhecimento sobre as relações mantidas entre hospedeiros e parasitos ao longo de suas histórias evolutivas.

2.7- Alterações no metabolismo de proteínas totais e da atividade das aminotransferases de moluscos hospedeiros de helmintos.

A maior parte dos organismos pode obter aminoácidos a partir do ambiente e utilizá-los como combustível quando suas condições metabólicas assim o determinarem. Nos animais, os aminoácidos sofrem degradação oxidativa em algumas circunstâncias metabólicas, tais como: (a) durante a síntese e a degradação normais de proteínas celulares; (b) em uma dieta rica em proteínas e os aminoácidos ingeridos excedem as necessidades do organismo para síntese proteica, o excesso, então, é catabolizado (NELSON E COX, 2011). Porém, no caso de moluscos infectados por trematódeos ou nematódeos, o estabelecimento

da infecção promove severas alterações no organismo do hospedeiro que mudam esse comportamento padrão de utilização energética por substratos proteicos. Uma vez exauridos os depósitos de carboidratos, em função da contínua drenagem destes pelas larvas em desenvolvimento no interior do organismo do molusco, o hospedeiro é levado a um estado de inanição, onde seu equilíbrio metabólico tenta ser restabelecido por meio da metabolização de proteínas e aminoácidos (BECKER, 1980). Nessas condições metabólicas, os aminoácidos perdem seu grupo amino para formar α -cetoácidos, os quais sofrem oxidação a CO_2 e H_2O , ou fornecem unidades carbônicas que podem ser utilizados para a síntese *de novo* de glicose, pela gliconeogênese (NELSON E COX, 2011).

A ativação do catabolismo proteico foi observada por Pinheiro et al., (2009) quando um significativo decréscimo deste substrato foi constatado na hemolinfa e glândula digestiva, principal tecido de estoque, dos animais infectados. Em modelos de infecção, tais como os estudados por Tunholi e colaboradores, (2013), *B. glabrata*/*E. paraensei*, os moluscos infectados com diferentes cargas miracidiais, apresentaram uma queda nas concentrações hemolinfáticas ao longo do período pré-patente da infecção. O mesmo cenário foi observado por Tunholi-Alves e colaboradores, (2013) no modelo *B. glabrata*/*A. cantonensis*, onde o conteúdo protéico hemolinfático permaneceu em constante queda ao longo do período observado pelos autores. Essa forte requisição de substratos protéicos pelos parasitos em desenvolvimento está relacionada ao seu intenso processo de multiplicação assexuada, no ciclo dos trematódeos, combinados com a alta demanda de proteínas para síntese de membrana celular de suas organelas (PINHEIRO, 2003).

No entanto, é importante ressaltar que as alterações na concentração de proteínas e aminoácidos circulantes podem apresentar-se de maneira distinta em função do modelo investigado. Por exemplo, em 1994, Pokora e colaboradores, observaram que *L. stagnalis* infectados com larvas de trematódeos, apresentou elevação apreciável nas concentrações de proteínas hemolinfáticas quando confrontados com o grupo controle. Esse fenômeno foi explicado pelos autores como uma consequência do nível de dano celular, em especial, dos tecidos da glândula digestiva, em função da ação mecânica das larvas sobre este tecido, resultando num extravasamento proteico.

A elevação hemolinfática proteica consequente do extravasamento celular, resultante da lise, pode ser constatada pela atividade de enzimas como as aminotransferases. Essas enzimas, também denominadas de transaminases, realizam a transferência de um grupo α -amino para o carbono α de um cetoácido, liberando um α -cetoácido, análogo ao aminoácido, ou vice-versa. As células contêm diferentes tipos de aminotransferases, muitas específicas para o α -cetoglutarato, essas enzimas são designadas em função do doador dos grupos amino (p. ex. alanina-aminotransferase ALT; ou aspartato-aminotransferase - AST). O efeito das reações de transaminação, sobre o α -cetoglutarato, é a coleta de grupos amino, a partir de diferentes aminoácidos, na forma de L-glutamato. O glutamato então funciona como doador de grupos amino para vias biossintéticas ou para vias de excreção.

As atividades das aminotransferases têm sido analisadas por muitos autores, como indicadores do estresse desencadeado pela infecção de larvas de helmintos e o aumento na atividade dessas enzimas é verificado, especialmente, em relação à mobilização de fontes energéticas do hospedeiro (PINHEIRO et al., 2001). No modelo *B. glabrata*/*A. cantonensis* os autores observaram que os grupos infectados apresentaram valores significativamente maiores, nas atividades de ALT e AST presentes na hemolinfa, em relação ao grupo controle (TUNHOLI-ALVES et al. 2013). Em contrapartida, quando analisado o complexo

gônada-glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, houve um decréscimo na atividade das mesmas enzimas. De acordo com os autores, esse declínio poderia estar associado à disponibilidade de proteínas solúveis nas amostras (CHRISTIE E MICHELSON, 1975).

2.8- Alterações no metabolismo de produtos nitrogenados de excreção de moluscos hospedeiros de helmintos.

Alterações nos padrões metabólicos dos produtos nitrogenados de excreção são reflexos de uma sequência de eventos que se revelam pela ação espoliativa das larvas de helmintos no interior de seus hospedeiros moluscos (BECKER, 1980). Ao competir pelas fontes glicídicas disponíveis na hemolinfa, as larvas de trematódeos ou de nematódeos, desencadeiam uma série de ações emergenciais, tais como a utilização de proteínas como substrato energético, consequência da exaustão das reservas de carboidratos e contínua redução dos níveis glicêmicos hemolinfáticos. Essa ação é resultante da busca de um equilíbrio homeostático por parte do hospedeiro a fim de manter suas funções fisiológicas mais próximas dos níveis normais. Logo, o efeito da utilização do esqueleto carbônico de aminoácidos como substrato energético obriga o molusco a lidar com elevações dos conteúdos de ureia, ácido úrico e amônia, que são seus produtos nitrogenados de excreção (PINHEIRO et al., 2009).

Quando utilizados como fonte energética, os aminoácidos são desmembrados em um esqueleto carbônico, que segue como um α -cetoácido, e em um grupo NH_4^+ . A amônia produzida neste processo pode ser destinada à formação de novos aminoácidos, aminas biológicas e nucleotídeos; ou ainda ser desviada para formação de carbamil fosfato e entrar no ciclo da ornitina. Caso o grupamento NH_4^+ seja endereçado para formação de nucleotídeos, esta síntese ocorre pela via das purinas, tendo como um dos seus produtos o ácido úrico. Porém, se o destino for à formação de carbamil fosfato, o grupamento nitrogenado entra no ciclo da ornitina e é excretado na forma de ureia (NELSON E COX, 2011).

O ácido úrico é o principal produto de excreção dos moluscos aquáticos e apresenta a vantagem de ter pouca perda de água vinculada a sua produção. A via metabólica pela qual os moluscos podem detoxificar seus produtos nitrogenados de excreção pode variar de acordo com o habitat por ele ocupado. Desta forma, dependendo dos estímulos do meio ou de alguma situação de estresse, um molusco que vive em um ambiente aquático pode favorecer a excreção de ureia, uma vez que sua eliminação dispõe de significativa perda de água, porém com menor gasto energético, atrelado ao menor consumo de NADPH. As inversões do perfil uricotélico para ureotélico podem estar vinculadas a uma vasta lista de razões.

Os primeiros trabalhos voltados para observação do perfil nitrogenado de excreção dos moluscos infectados ou sob qualquer condição adversa foram desenvolvidos entre as décadas de 1970 e 1990. Autores como Schmale e Becker (1977; 1978); Meyer e Becker (1980) e Becker (1980; 1983) estudaram o modelo *B. glabrata/S. mansoni* e observaram que durante a infecção com larvas de trematódeos há um aumento apreciável da proteólise, e que a maioria dos produtos nitrogenados tem sua excreção realizada pelo ciclo da ornitina. Neste momento a produção de ureia atinge seu auge na concentração hemolinfática, sinalizando uma saturação da via e, conseqüentemente, estimulando a ativação da via das purinas, onde a produção de ácido úrico começa a compensar o processo de detoxificação. Apesar de mais dispendioso energeticamente, a produção de

ácido úrico desloca o equilíbrio para via das purinas e tenta restabelecer o equilíbrio homeostático do hospedeiro infectado.

A alternância do comportamento excretor dos moluscos infectados pode estar atrelada não só ao restabelecimento da sua homeostase, mas também a um comportamento modulador por parte do parasito. Em 1975, ao estudar a via catabólica da arginina e a regeneração do NAD em *Fasciola hepatica* L., Kurelec observou que durante o período de reprodução assexuada, as larvas requisitaram uma quantidade significativa de arginina. E no decorrer da infecção, de acordo com o autor, o parasito induziu um aumento na produção de ureia, através do estímulo do ciclo da ornitina.

A observação das mudanças dos perfis de excreção é destacada em estudos no modelo de *L. columela/E. paraensei*, de Pinheiro et al., (2009) onde o acúmulo de ácido úrico, leva a formação de cristais, causando danos teciduais. Resultando na excreção de ureia, que tem a característica de ser menos tóxica e mais econômica energeticamente. Já no modelo, *B. glabrata/E. paraensei*, estudado pro Tunholi e colaboradores (2013), os autores propuseram um cenário de diferentes dose miracidiais sob o perfil bioquímico do hospedeiro, e verificaram aumentos significativos no conteúdo de ureia na hemolinfa em ambas cargas parasitárias, tendo seu auge na quarta semana de infecção. Segundo os mesmos, relação similar foi também observada sobre os conteúdos de ácido úrico. Sugerindo que os parasitos sejam capazes de estimular o molusco a alternar as vias de formação de produtos nitrogenados de excreção durante o curso da infecção.

2.9- Alterações no metabolismo de cálcio de moluscos hospedeiros de helmintos.

Dentre as suas muitas funções biológicas, o cálcio é um metal que atua como mediador intracelular, cumprindo uma função de segundo mensageiro, que intervém na contração dos músculos. Também está implicado no controle de algumas quinases que realizam funções de fosforilação como, por exemplo, na proteína quinase C (PKC). O cálcio participa de funções enzimáticas de maneira similar à do magnésio em processos de transferência do fosfato como, por exemplo, a enzima fosfolipase. Ainda interfere nos processos de transcrição, ativação de genes e apoptose, e está armazenado no retículo endoplasmático rugoso (NELSON E COX, 2011). Nos moluscos o cálcio é considerado indispensável, sendo um dos componentes inorgânicos que compõe as conchas. Também é considerado um fator limitante para a distribuição destes animais, assim como na sua capacidade ovipositória e desenvolvimento embrionário (THOMAS et al., 1974; DAWIES E ERASMUS, 1984).

Uma das principais descrições do papel do cálcio na fisiologia dos moluscos foirealizada por de John-Brink e colaboradores (1987; 1988) que usaram a porcentagem de Ca^{2+} nas células mitocondriais da glândula de albúmen de *L. stagnalis* como um medidor para avaliar o efeito do hormônio gonadotrópico calfluxina (CaFl) e sua interação com a schistosomina, uma proteína presente na hemolinfa de moluscos infectados com *T. ocellata*. Após 3 semanas de exposição, as glândulas dos animais infectados mostraram uma baixa resposta a CaFl em comparação com os moluscos do grupo controle. A resposta reduziu com o tempo de infecção e os autores concluíram que a glândula foi afetada pelos estádios iniciais do parasito. As glândulas dos animais não infectados foram incubadas no soro dos moluscos infectados, e subsequentemente incubadas em CaFl e o resultado foi uma redução na resposta, em relação aos animais do controle. Os autores afirmam que a schistosomina liga-se fortemente a glândula de albúmen, provavelmente a um complexo receptor. Os

resultados indicaram que um baixo número de receptores para CaFl permanece presente em animais infectados. Para as glândulas dos animais primeiramente expostas a schistosomina e depois a CaFl, a inibição dos efeitos da CaFl foram mais fortes quando a glândula de albúmen foi exposta a ambos ao mesmo tempo. Por fim, os autores sugeriram que ambas as moléculas atuam sobre um complexo de receptores da glândula de albúmen de forma antagônica.

Este íon ainda está envolvido no processo metabólico do equilíbrio ácido-base da hemolinfa dos moluscos, sendo mobilizado da concha na forma de carbonato de cálcio (CaCO_3) para formação do tampão bicarbonato, e também atua como co-fator enzimático especialmente nas reações relativas à fosforilação oxidativa (De WITT E SMINIA et al., 1980). Adicionalmente, o íon cálcio está envolvido na resposta imunológica de moluscos hospedeiros, uma vez que a atividade fagocitária dos hemócitos é cálcio dependente (ZELCK et al., 1995). Além do processo de reconhecimento celular de substratos antigênicos, desempenhados pelas lectinas que são cálcio-dependentes e agem diretamente sobre a resposta imune, pois são capazes de aumentar a fagocitose e a opsonização (OLAFSEN et al., 1992).

A infecção por *S. mansoni* em *B. glabrata*, realizada por Ong e colaboradores (2004), alterou marcadamente a concentração de cálcio na glândula digestiva, com uma elevação de duas vezes ao conteúdo verificado nos moluscos não infectados. Segundo os autores, a calcificação da glândula digestiva nos animais infectados foi em resposta ao processo inflamatório desencadeado a partir da presença e migração das larvas do parasito no tecido.

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar os parâmetros, e identificar as possíveis alterações em relação ao grupo controle, fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e na biologia reprodutiva de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* infectadas experimentalmente com *Angiostrongylus cantonensis*.

3.2. Objetivos específicos:

- ✓ Realizar infecções experimentais de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* com as larvas L₁ de *Angiostrongylus cantonensis*.
- ✓ Avaliar o conteúdo de polissacarídeos de glicogênio, nos tecidos de reserva da massa cefalopediosa e glândula digestivae de galactogênio na glândula de albúmen;
- ✓ Determinar as concentrações hemolinfáticas de glicose, proteínas totais, ácido úrico, ureia, e dos ácidos carboxílicos, succínico, oxálico, láctico e pirúvico; assim como avaliar a atividade da enzima lactato desidrogenase e das aminotransferases ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase);
- ✓ Avaliar o metabolismo inorgânico através da determinação do conteúdo de cálcio na hemolinfa e na concha;
- ✓ Avaliar biologia reprodutiva de *B. straminea* e *B. tenagophila* quando infectadas por *A. cantonensis*, considerando os aspectos referentes às relações: número de massas ovíferas/molusco, número de ovos/massa ovígera, número de ovos/molusco e a porcentagem de viabilidade destes ovos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Exemplares de *Biomphalaria straminea* e de *Biomphalaria tenagophila* nascidos e criados em laboratório, provenientes dos municípios de Jaguarari, Rio grande do Norte e de Andorinhas, Espírito Santo, respectivamente, foram usados como matrizes para os experimentos subsequentes.

4.2. Manutenção dos moluscos

Os moluscos colocados em aquários de vidro transparente, num volume de 1500 ml de água desclorada acrescida de argila e 0,5g de CaCO₃, foram mantidos em sala com temperatura (25° C), luminosidade (fotoperíodo de 12 horas em luz branca) e umidade (70% UR) controladas, no Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. Semanalmente, em dias alternados, os aquários eram lavados e os animais alimentados com folhas frescas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum*.

4.3. Infecção experimental dos moluscos e formação dos grupos

Os espécimes de *Angiostrongylus cantonensis* utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz – LBPMR, o qual mantém o ciclo biológico do parasito desde 2011. Esta cepa foi obtida a partir de moluscos da espécie *Achatina fulica* Bowdich, 1822 naturalmente infectados, capturados no município de São Gonçalo, Rio de Janeiro (22°48'26.7''S, 43°00'49.1''W). O ciclo do parasito tem sido mantido utilizando *Rattus norvegicus* como hospedeiro definitivo e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como hospedeiro intermediário, com o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (Licença LW 47/14).

As larvas de primeiro estágio (L₁) foram obtidas a partir do processamento das fezes dos roedores infectados, de acordo com a técnica de Baermann (Willcox e Coura, 1989). Em seguida espécimes de *B. straminea* (6-8 mm de diâmetro de concha) e *B. tenagophila* (8-12 mm de diâmetro de concha) com 90 dias de idade, colocadas em placas de 24 poços, foram expostas individualmente a aproximadamente 1200 larvas L₁. Estes planorbídeos, como os demais moluscos, apresentam padrões de crescimento distinto (Fig. 5), e por isso utilizamos a padronização dos indivíduos pela idade. Após 24 horas as placas foram observadas em microscópio estereoscópio para detecção das larvas L₁. Na sequência os moluscos foram removidos das placas e transferidos para aquários, preparados conforme descrito no item 4.1, e ordenados conforme os grupos experimentais. Esses grupos foram classificados conforme o estágio de infecção (6, 11 e 21 dias após exposição). O estudo foi feito até 21 dias após a infecção, que corresponde ao período pré-patente do desenvolvimento de *A. cantonensis* em *B. glabrata* descrito por Harris e Cheng (1975a). Após o período pré-patente, 5 indivíduos de cada espécie foram escolhidos aleatoriamente para recuperação das larvas L₃.

Seis grupos foram formados: três grupos controle (não infectados) e três grupos de moluscos infectados, para cada espécie estudada. Cada aquário composto por 30 indivíduos foi mantido sob as mesmas condições laboratoriais das matrizes. O experimento foi

conduzido em triplicata, utilizando um total de 180 moluscos, 90 moluscos para o grupo controle e 90 moluscos para os infectados.

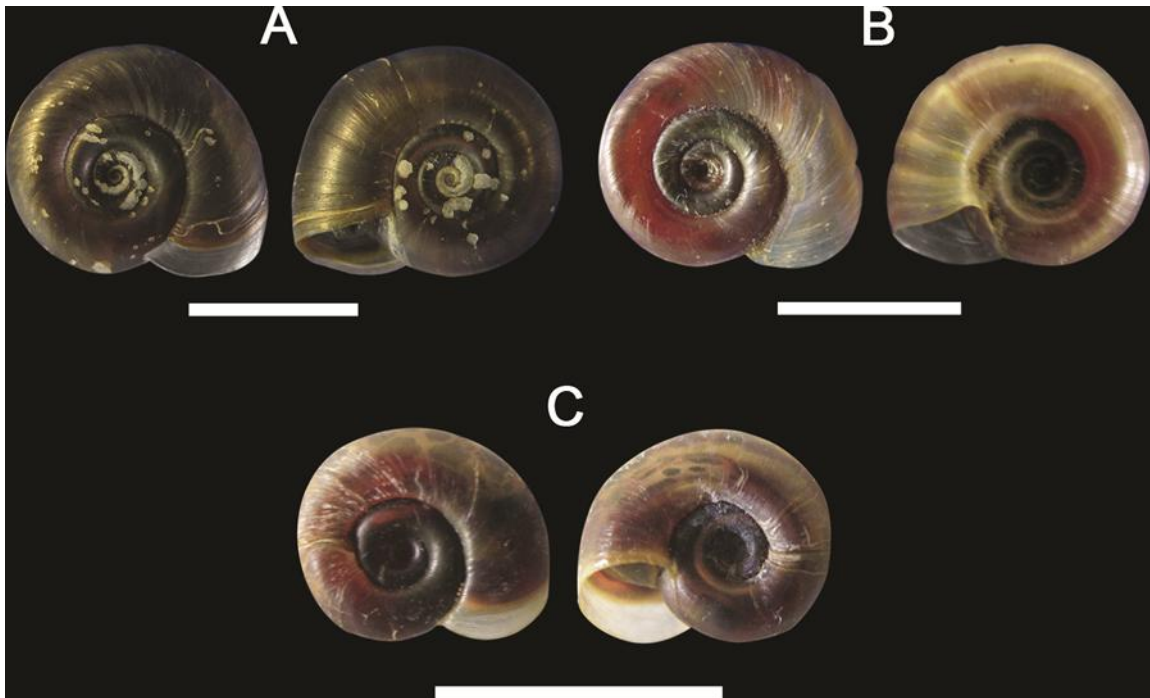


Figura 5A, B e C - (A) *Biomphalaria glabrata*; (B) *Biomphalaria tenagophila*; (C) *Biomphalaria straminea*. Escala: 1cm.

4.4. Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados com *Angiostrongylus cantonensis*.

Aspectos da biologia reprodutiva dos moluscos infectados (n=90) e não infectados (n=90) foram observados no decorrer dos 21 dias pós-infecção. Os aquários contendo os moluscos do grupo controle e os infectados foram monitorados diariamente; placas de isopor (5x7cm) foram utilizadas como substratos para oviposição. Ressaltamos que este estudo não considerou as massas ovíferas colocadas nas paredes dos aquários, pois não haveria possibilidade de contagem de ovos e acompanhamento da viabilidade das mesmas. A densidade dos aquários foi mantida ao longo do estudo através de um grupo de moluscos que foram submetidos às mesmas condições e tempos de infecção e criação, chamado grupo de reposição. As placas de isopor contendo as massas de ovos eram identificadas adequadamente e transferidas para aquários mantidos sob as mesmas condições laboratoriais, porém livre de moluscos. Os parâmetros avaliados foram o número de massas ovíferas e o número de ovos, e fizemos as seguintes relações: (a) número de massas ovíferas/molusco; (b) número de ovos/massa ovífera e (c) número de ovos/molusco. A viabilidade dos ovos foi avaliada através da formação do embrião e a eclodibilidade também foi contabilizada, assim como a sobrevivência dos moluscos eclodidos.

4.5. Dissecção e coleta de hemolinfa

De acordo com os dias estabelecidos após a infecção, trinta espécimes de cada grupo experimental foram dissecados e tiveram sua hemolinfa coletada através de punção cardíaca. A hemolinfa que foi extraída da cavidade cardíaca foi imediatamente posta em gelo e posteriormente, estas amostras foram congeladas a -80°C até o dia de uso, sendo armazenadas em alíquotas de 500µl para que ao longo do uso permanecessem preservadas. Os tecidos de massa cefalopédica, glândula digestiva e glândula de albúmen, também coletados em gelo, foram envoltos em Parafilm[®], pesados e acondicionados em recipientes apropriados, e em seguida armazenados em freezer -20°C.

4.6. Parâmetros bioquímicos

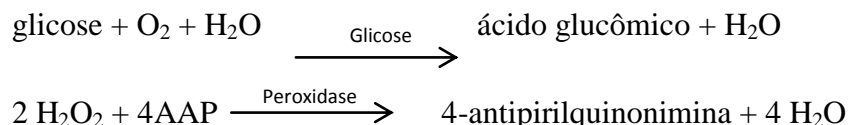
4.6.1-Análise do perfil metabólico dos moluscos, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*.

Os conteúdos de glicogênio e galactogênio dos tecidos da massa cefalopédica (MC) e glândula digestiva (GD), e glândula de albúmen (GA), respectivamente, foram determinados através do método 3,5 dinitro salicilato (DNS) descrito por Pinheiro e Gomes (1994), tendo seus resultados expressos em mg de glicose/g de tecido (peso fresco).

As análises da concentração hemolinfática da molécula de glicose e a atividade da LDH foram feitas por meio de *kits* para diagnóstico laboratorial (Doles[®]).

Para determinação da glicose, uma alíquota de 10µl foi retirada de cada amostra e a elas adicionadas 1 ml do reagente de cor, composto por: solução tampão de fosfato 0,05M, pH 7,45±0,1; aminoantipirina 0,03mM e 15mM de p-hidroxibenzoato de sódio; um mínimo de 12kU de glicose oxidase e 0,8 kU de peroxidase por litro.

Neste cenário a reação desencadeada é a que se segue:



Sequencialmente, a concentração de glicose é medida por meio da leitura em espectrofotômetro, com absorvância máxima em 510 nm, utilizando uma solução aquosa de 100mg/dl. Essa leitura é possível por que a coloração da 4-antipirilquinonimina é avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose.

A atividade da lactato desidrogenase foi medida por meio de uma sequência de reações pontuadas a seguir:

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

Para que essas reações ocorressem foram misturados 1ml de solução de substrato (solução 0,1M de lactato, 0,005M de o-fenantrolina em Tris 0,2M pH 8,8) adicionados a uma gota de solução 0,012M de sulfato de ferro amoniacal (alúmen férrico) e 25µl de amostra. A solução resultante foi incubada por 2 minutos a 37°C, em seguida foi acrescentada uma gota de solução contendo NAD (15,82 mmol de nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FMS (3,73mmol de fazina metassulfato), novamente homogeneizada e incubada por 5 minutos a 37°C. Por fim, a absorvância foi lida em espectrofotômetro em 510nm, padronizada por uma solução de LDH 350 U./l.

4.6.2- Determinação dos ácidos orgânicos hemolinfáticos

Os ácidos orgânicos foram extraídos usando colunas Bond-Elut[®] (SAX) como descrito por Bezerra et al. (1997). Sob vácuo, as colunas foram ativas com 1 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,5M, 1 ml de metanol absoluto e 2 ml de água, consecutivamente. As colunas foram então, preenchidas com 200µl de hemolinfa desproteinizada e 2 ml de água. Para a dissociação, as colunas foram removidas da bomba de vácuo e 250µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5M foi aplicado para desagregar os ácidos orgânicos retidos na matriz da coluna. O material assim tratado foi centrifugado a 1.200g por 5 minutos e estocado a -10°C até terem sido analisados.

A CLAE foi realizada em temperatura ambiente usando colunas de exclusão de íons específica para a separação de ácidos orgânicos (BIORAD – Aminex Ion Exclusion HPX87H) (300 x 78 mm). A fase móvel foi H₂SO₄ 0,5mM, em fluxo de 0,8ml/min. O perfil de eluição foi determinado em 210nm e o volume injetado foi de 100µl.

O sistema CLAE foi separadamente calibrado com os padrões dos ácidos que foram estudados - lactato, piruvato, oxaloacetato, e succinato - e uma curva analítica foi criada para a mistura de ácidos em solução padrão aquosa. A recuperação dos ácidos da coluna de extração Bond-Elut[®] e a coluna de separação cromatográfica foi calculada para permitir a obtenção da concentração final nas amostras analisadas (BEZERRA et al. 1997; 1999).

4.6.3- Determinação das concentrações de ácido úrico e ureia

Para que a concentração de ácido úrico fosse determinada, uma alíquota de 50 µl da amostra (hemolinfa) foi misturada a 2ml da solução do reagente de cor, que é composta por tampão fosfato de sódio 100mmol/l (pH 7,8) contendo 4mmol/l diclorofenol-sulfonato, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/l, 120U≤ uricase, 4,980U≤ ascorbato oxidase, 1.080U≤ peroxidase.

Em seguida foi feita uma homogeneização e incubação da solução resultante a 37°C durante 5 minutos. Por fim, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em 520nm (BISHOP et al., 1996), com os resultados expressos mg/dl.

A determinação da ureia foi feita pela adição de 2 ml de solução composta por 60 mmol de salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio, 34 mmol, mais EDTA dissódico 1,35 mmol. Em seguida foram adicionados 2 µl de urease e 20 µl de hemolinfa. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 600nm, tendo os resultados expressos em mg/dl (CONNERTY et al., 1955).

4.6.4- Determinação da atividade enzimática da alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST).

A determinação das aminotransferases, ALT e AST, foram feitas a partir da incubação prévia a 37°C durante 5 minutos da solução reagente composta por L-alanina a 0,2M ou L-aspartato a 0,2M, mais α-cetoglutarato e tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,4. Logo em seguida, 100µl (para ALT) e 200µL (para AST) de hemolinfa foram adicionados, homogeneizados e novamente incubados a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 50µl de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001M foram adicionados e mantidos a 25°C por 20 minutos. Finalizando com a adição de 5mL de NaOH 0,4M, seguida da leitura em espectrofotômetro em 505 nm (KAPLAN; PESCE, 1996), tendo os resultados expressos em URF/ml.

4.6.5- Dosagem de proteínas totais.

A dosagem proteica foi feita de acordo com a técnica do Biureto (WEICHSELBAUM, 1946): uma alíquota de 50 µl da amostra é misturada a 2,5 ml do reagente Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M). Posteriormente homogeneizados e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 550 nm e os resultados expressos em g/dl.

4.6.6- Determinação de cálcio na concha e na hemolinfa

Após a dissecação dos moluscos, as conchas foram removidas, lavadas em água destilada, deixadas para secar a temperatura ambiente e guardadas secas em temperatura ambiente. 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 CaCO₃/g de cinza e a concentração hemolinfática expressa em mg/dl.

4.7- Microanatomia do ovotestis e da glândula digestiva de *Biomphalaria straminea* e de *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*

De acordo com cada período de análise durante a infecção cinco moluscos foram dissecados e fixados em Duboscq-Brasil (FERNANDES, 1949) e seus tecidos moles foram

processados de acordo com técnicas de rotinas histológicas, descritas por Humason (1979). Foram feitas secções seriadas de 5 μm , coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscópio de luz ZeissAxioplan. As imagens geradas foram capturadas com câmara digital MRc5AxioCam e processadas com software Axiovision.

4.8- Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão de média, submetidos a ANOVA tow-way com pós-teste de Tukey-Kramer ($\alpha= 5\%$) para comparação das médias. (Prism, GraphPad, v. 5.00, Prism Inc.).

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

Alterações significativas na relação de massas ovígeras postas por *B. straminea* infectada com larvas de *A. cantonensis* já podem ser notadas aos 6 dias após a infecção (Fig. 6A), pois apresentam uma redução de 56% em relação aos moluscos não infectados mantidos sob as mesmas condições. Em relação ao número de ovos postos por moluscos infectados, observamos uma elevação contínua do número de ovos produzidos pelos moluscos infectados com *A. cantonensis* em relação aos animais não infectados (Fig. 6B), chegando a um valor acima ($9,65 \pm 0,30$) daquele observado para o grupo controle ($9,5 \pm 0,22$) ao final do período de análise. Em consequência destas respostas, quando observamos a relação entre o número médio de ovos por massas ovígeras, é possível constatar uma redução progressiva nesta relação, alcançando 46,53% em relação ao grupo controle. Fica evidente uma economia do hospedeiro infectado, reduzindo a produção de massas ovígeras e, simultaneamente, ocorre um processo de compensação da fecundidade com uma redução progressiva do número de ovos postos pelos mesmos, havendo assim uma maior produção de massas ovígeras contendo um número menor de ovos (Fig. 6C).

O número de ovos viáveis (Fig. 7A e B) e o número de moluscos eclodidos (Fig. 6D) foram significativamente reduzido, alcançando valores 74,88% e 76,43%, respectivamente, e menores que aqueles apresentados pelos moluscos não infectados, aos 6 dias de infecção. Com o progresso da infecção observamos um aumento destes valores, os quais chegam a 51,33% e 49,55%, respectivamente, no final do período pré-patente (21 dias de infecção), mas permanecendo significativamente menor do que aqueles valores obtidos para estes parâmetros nos moluscos não infectados (controle), o que caracteriza o processo de castração parasitária.

Observamos que os moluscos que tiveram sucesso em seu desenvolvimento embrionário e eclodiram (Fig. 6D), apresentaram um percentual de viabilidade sempre 50% abaixo dos observados para os animais não infectados (Fig. 7B), porém estes valores se mantiveram constantes ao longo de todo o período de análise. Esta observação é confirmada pela redução no conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen dos moluscos infectados durante todos os períodos analisados. Os estoques de galactogênio nos moluscos infectados ficam permanentemente abaixo de 50% do valor observado para os moluscos sem infecção, chegando a uma redução de 66% aos 21 dias após a infecção (Fig.10). Mais uma vez ressaltando que o processo de castração é decorrente de disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento do molusco em face da drenagem destes substratos para o desenvolvimento larval intramolusco.

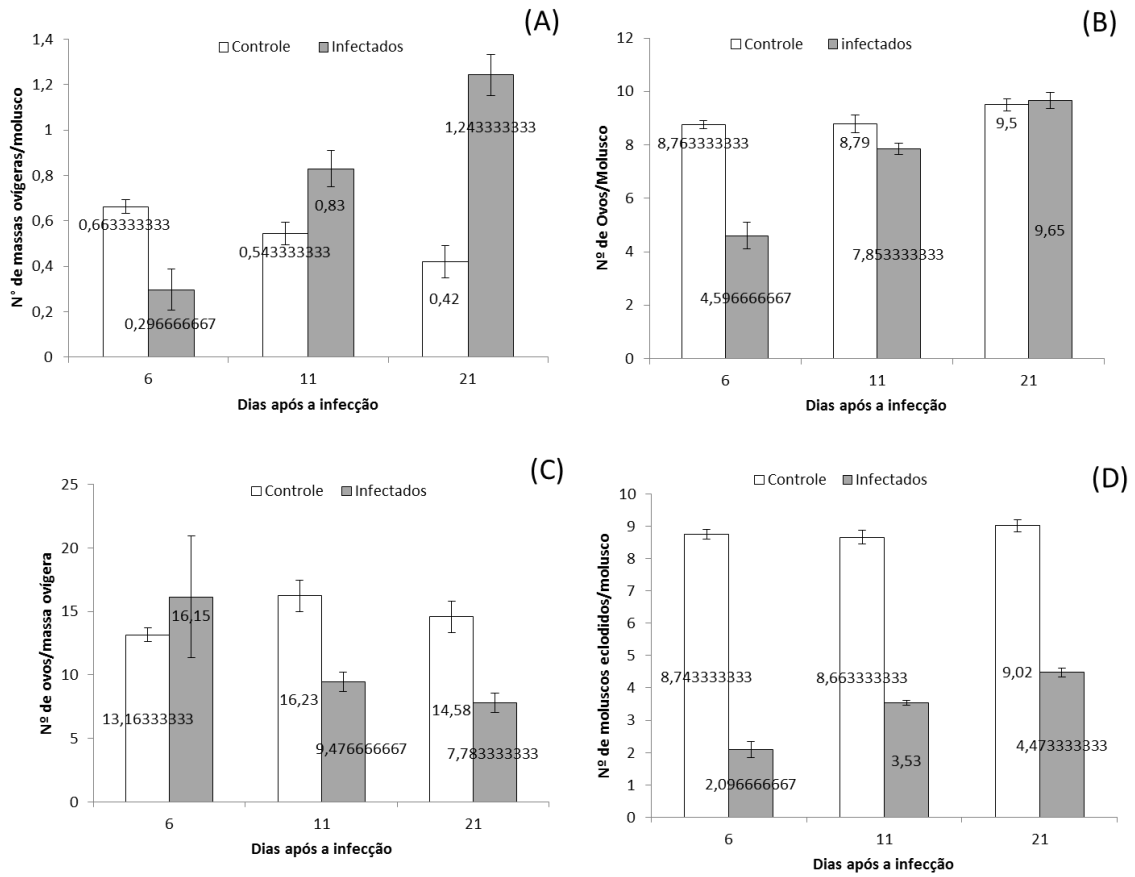


Figura 6- Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* durante 21 dias pós-infecção. (A) Número de massas ovíferas/molusco; (B) Número de ovos/molusco; (C) Número de ovos/massa ovífera e (D) Número de moluscos eclodidos/molusco.

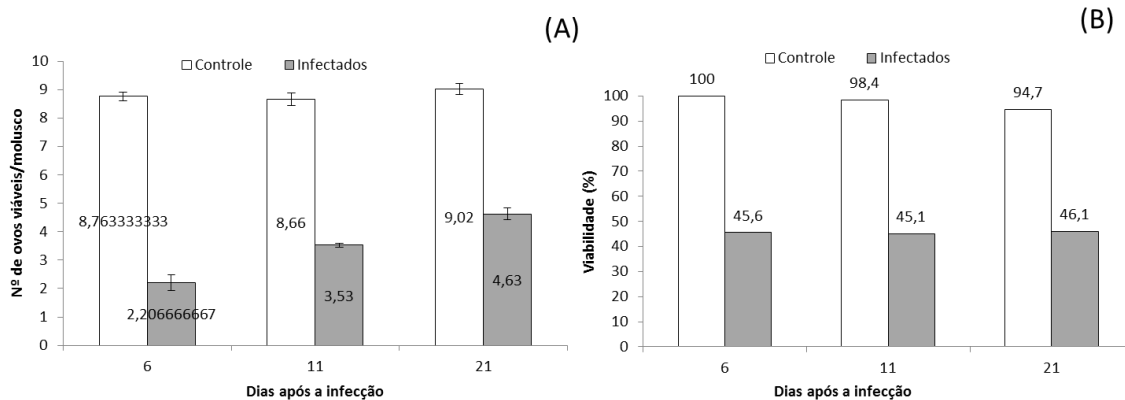


Figura 7 - Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Biomphalaria straminea* em relação ao número de ovos viáveis (A) e a viabilidade dos moluscos (B) no período de 6, 11 e 21 dias pós-infecção.

A histologia do ovotestis de *B. straminea* experimentalmente infectada com *A. cantonensis* evidenciou uma estrutura tecidual bem preservada, com poucas áreas apresentando danos (Fig. 11C e D), com presença de regiões com formação de espermatozoides e ovócitos. Este fato reforça a proposta de que o processo de gametogênese não é diretamente afetado pela infecção com as larvas do nematódeo, não devendo ser, portanto considerada como causa do processo de castração observado.

As respostas de *B. tenagophila* à infecção com *A. cantonensis* apresentaram-se de forma bastante diversificada em relação ao modelo anterior. Aos 6 dias de infecção todos os parâmetros analisados foram aumentados, sendo superiores àqueles obtidos para o grupo controle, exceto aqueles parâmetros associados à viabilidade (Figs. 8-9). O número de ovos postos por moluscos foi gradualmente reduzido ao longo do período pré-patente, se tornando 15,59% menor do que os valores do grupo controle (Fig. 8B). Este aumento foi acompanhado por uma elevação inicial na produção de massas ovíferas pelos hospedeiros infectados, que sempre apresentaram valores maiores do que os observados para os animais não infectados, tendo um pico aos 11 dias de infecção quando este valor foi 79,3% maior do que o grupo controle. Tais resultados revelam um aumento na oviposição pelos moluscos parasitados, porém com um aumento ainda maior na produção das massas ovíferas, resultando em uma relação massas ovíferas por molusco menor do que aquela observada no modelo *B. straminea/A. cantonensis*.

Observamos que, apesar de haver uma redução gradual na produção de ovos, esta é também acompanhada por uma redução mais expressiva na produção de massas ovíferas, o que resultou em um aumento na relação entre o número de ovos presentes por massa ovígera no final do período pré-patente (Fig. 8C). Desta forma, no modelo de estudo *B. tenagophila/A. cantonensis* o processo de restrição energética é observado no final do período de desenvolvimento larval intramolusco, ao contrário do que foi observado para *B. straminea/A. cantonensis*, no qual um padrão de resposta semelhante foi observado aos 6 dias de infecção (Fig. 6C).

A observação da Fig. 2D evidencia que o número de moluscos eclodidos não é influenciado pela relação quantitativa entre o número de ovos por massa ovígera, uma vez que aos 11 dias de infecção, quando havia ainda uma quantidade menor de ovos por massa ovígera em relação ao valor observado aos 21 dias, foi alcançado o menor valor de eclodibilidade em todo o período de desenvolvimento larval intramolusco. Esta evidência é reforçada pelos resultados acerca do número de ovos viáveis e da viabilidade dos moluscos nascidos destes ovos, os quais foram reduzidos em 29,67% e 90%, respectivamente (Fig. 9A e B). Nem mesmo o conteúdo de galactogênio pareceu ser responsável pela redução da eclodibilidade e viabilidade dos ovos, uma vez que, mesmo havendo uma redução de 49,71% aos 11 dias de infecção, o conteúdo deste polissacarídeo na glândula de albúmen dos moluscos permanece com poucas alterações no final do período de análises (21 dias). Neste último período de análise, mesmo com o conteúdo reduzido de galactogênio houve um elevado percentual de eclosão e viabilidade independente da redução no conteúdo deste carboidrato (Fig. 10).

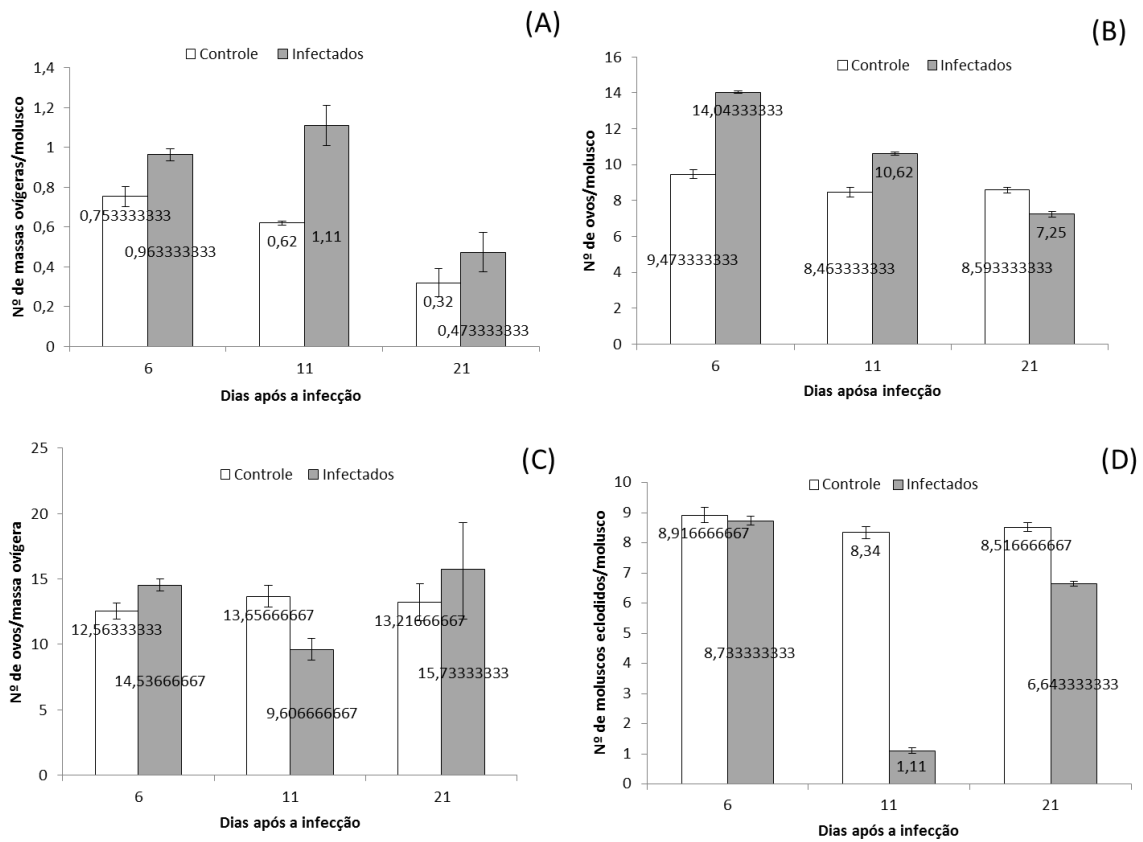


Figura8- Aspectos do comportamento reprodutivo de *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* durante 21 dias pós-infecção. (A) Número de massas ovíferas/molusco; (B) Número de ovos/molusco; (C) Número de ovos/massa ovígera e (D) Número de moluscos eclodidos/molusco.

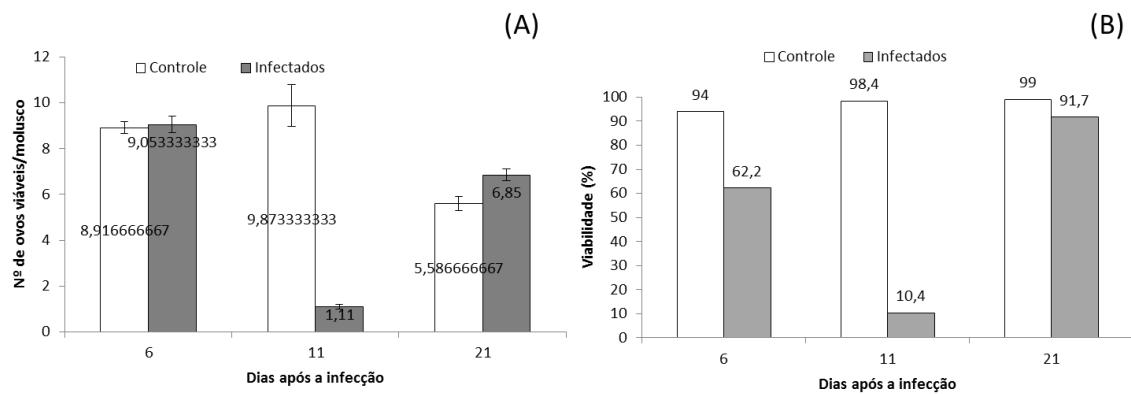


Figura 9 – Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Biomphalaria tenagophila* em relação ao número de ovos viáveis (A) e a viabilidade dos moluscos (B) no período de 6, 11 e 21 dias pós-infecção.

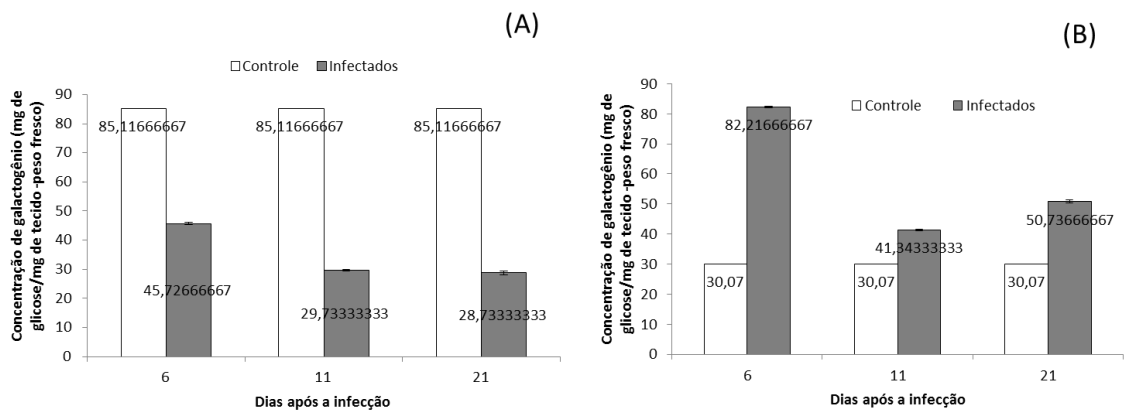


Figura 10- Concentração de galactose (mg de glicose/ mg de tecido) em glândula de albúmen de *Biomphalaria straminea* (A) e *Biomphalaria tenagophila* (B) infectada por *Angiostrongylus cantonensis* no período de 6, 11 e 21 dias pós-infecção.

A histologia do ovotestis de *B. tenagophila* quando infectada com *A. cantonensis*, revelou a preservação da estrutura tecidual do molusco no início da infecção (6 dias) (Fig. 11A), mas aos 11 dias de infecção já apresenta desorganização de sua estrutura histológica, assim como regiões próximas a este órgão, inclusive com a formação de um granuloma (Fig. 11B), apesar de evidenciar regiões com um processo de gametogênese ativo, o que corrobora a observação de atividade reprodutiva, mesmo reduzida, neste período da infecção. Porém, com o progresso da infecção e finalização do desenvolvimento do período pré-patente, as larvas de *A. cantonensis* tendem a se concentrar em tecidos como o da massa cefalopediosa, o que permite uma recuperação dos tecidos da região do ovotestis e, conseqüentemente, da atividade reprodutiva dos moluscos.

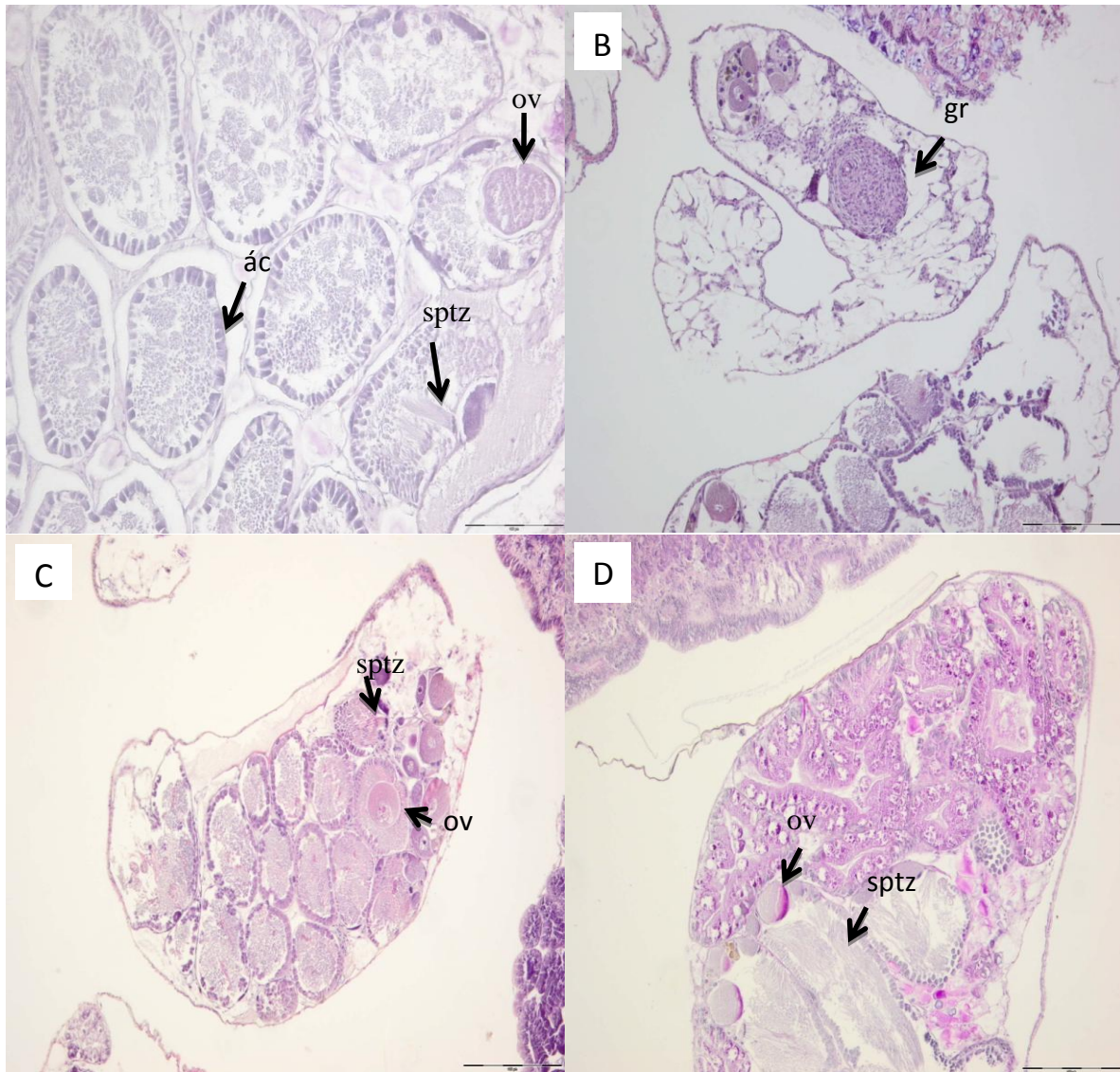


Figura 11 – Corte histológico da região do ovotestis de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*. ***Biomphalaria tenagophila***: Seção **A (6 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis funcionalmente ativo, com a estrutura do ácino (ác), com espermatozoides com caudas longas e agrupados pela porção anterior (sptz) e ovócito (c). Seção **B (11 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis com intenso processo de desorganização celular e presença de área vacuolizada. E região granulomatosa (gr) com deposição concêntrica de hemócitos. ***Biomphalaria straminea***: Seção **C (11 dias pós-infecção)** mostrando a região do ovotestis em processo de desorganização celular e presença de área vacuolizada. Ácinos contendo ovócitos na área central (ov) e espermatozoides agrupados pela região anterior (cabeça) e com caudas alongadas direcionadas para região do lúmen (sptz). Seção **D (21 dias pós-infecção)** mostrando região com ácinos contendo ovócitos (ov), espermatozoides (sptz) e com maior preservação tecidual. Barra de escala = 50 e 100 μ m.

5.2. Metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

O conteúdo de glicose em *B. straminea*, após 6 dias de infecção, apresentou uma redução de 69,83% em relação ao grupo controle (351.33mg/dL), e essa redução atingiu 96,38% no fim do período estudado. Um padrão invertido foi observado na atividade da LDH que aumentou 518,25% após 6 dias, alcançando 1,082.47% no fim do período pré-patente em relação aos moluscos não infectados (16,66UI) (Tab. 2, Fig.12A).

A resposta metabólica de *B. tenagophila* a infecção por *A. cantonensis* foi diferente daquela observada em *B. straminea*, pois nesta espécie somente 11 dias após a infecção foi possível observar uma redução de 6,48% da glicemia em função do grupo controle (92.60mg/dL), porém sem diferir estatisticamente. Curiosamente, o conteúdo de glicose de *B. tenagophila* não variou significativamente como visto em *B. straminea*. No entanto quando observada a atividade da LDH, nota-se uma grande e significativa variação para os animais infectados (Fig. 12B). A atividade enzimática da LDH mostrou um modelo recíproco de variação, com redução de 52,24% após 6 dias, seguido de um aumento 11 dias após a infecção, atingindo um valor médio que não diferiu estatisticamente dos moluscos não infectados (Tab. 1).

Na glândula digestiva de *B. straminea* o conteúdo de glicogênio permaneceu constantemente reduzido ao longo de todo período estudado (Tab. 2; Fig. 13A), atingindo um valor 51,67% menor do que os apresentados pelo grupo controle. Quando o conteúdo deste carboidrato foi analisado no tecido da massa cefalopediosa, o período de maior redução foi registrado aos 21 dias com uma queda de 46,84% em relação aos não infectados. Porém ao contrário da glândula digestiva, não houve uma redução permanente, aos 11 dias pós-infecção registrou-se uma aumento de 3,11% em comparação com o observado no 6° dia pós-infecção (5.46mg glicose/ g tecido, peso fresco) (Tab. 2).

Para *B. tenagophila*, outro padrão foi observado como mostram a Tabela 2 e a Figura 13B. Claramente, o conteúdo de glicogênio da GD variou nos moluscos infectados, com um aumento significativo de 49,59% após 6 dias de infecção, seguido de uma redução de 5,79% aos 11 dias e finalizando com uma elevação de 69,54%. Contudo todos esses valores estão acima dos observados nos moluscos não infectados. Uma resposta similar foi vista na concentração de glicogênio da massa cefalopediosa, que 6 dias após a infecção aumentou 16,19% em comparação com o grupo controle (3,83 mg de glicose/mg de tecido, peso fresco). Porém deste ponto adiante o conteúdo de carboidrato foi significativamente reduzido, atingindo 28,20% a menos do que os moluscos livres da infecção.

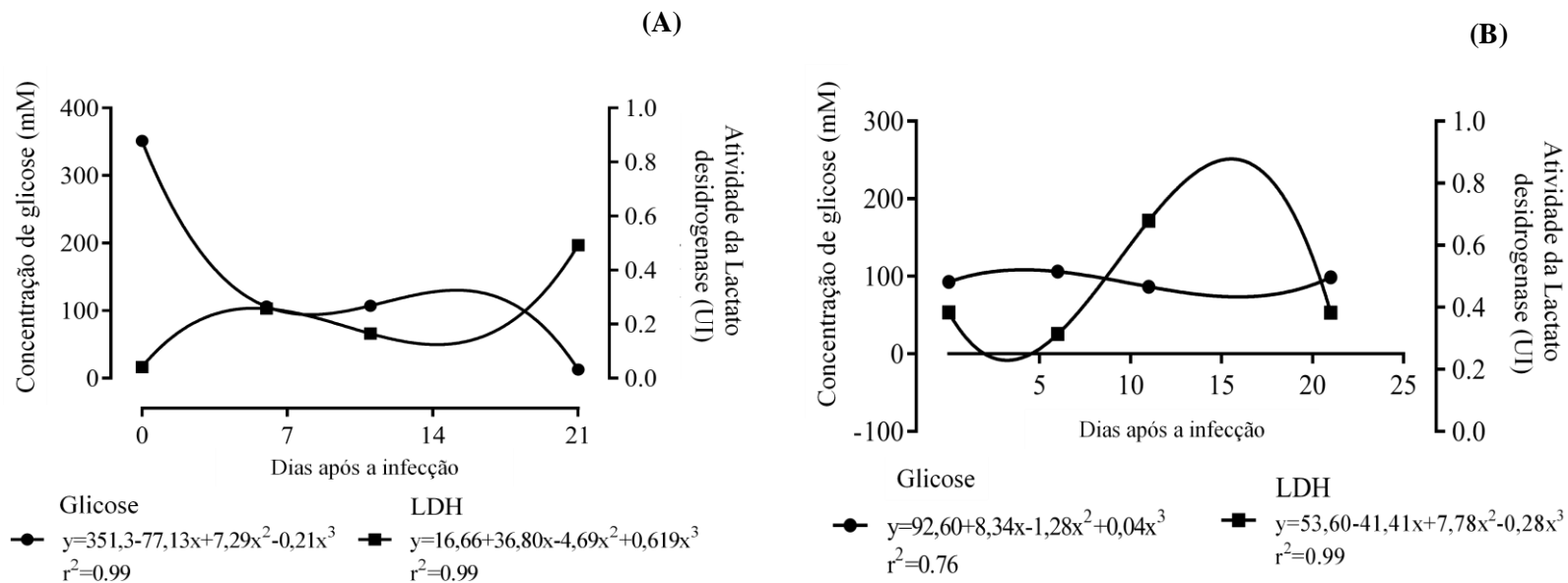


Figura 12 A e B- Relação entre o conteúdo de glicose (●) (mg/dL) e a atividade da lactato desidrogenase (■) (UI) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* (A) e *Biomphalaria tenagophila* (B) experimentalmente infectadas com larvas L₁ de *Angiostrogylus cantonensis*. Teste de regressão polinomial de 3a ordem.

Tabela 1- Concentração de glicose (mg/dl) e atividade da lactato desidrogenase (UI) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*, após 21 dia da exposição as larvas L₁.

Dias após a infecção	Concentração de glicose (mg/dl)		Atividade da lactato desidrogenase (UI)	
	<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Controle	351.33 ± 1.54 a	92.60 ± 3.78 a	16.66 ± 4.61 a	53.6 ± 2.3 a
6	106.00 ± 1.73 b	106.00 ± 1.73 b	103.00 ± 2.0 b	25.6 ± 0.8 b
11	107.33 ± 1.54 b	86.60 ± 4.01 a	66.00 ± 6.92 c	171.6 ± 2.3 c
21	12.73 ± 0.23 c	98.60 ± 5.88 a	197.00 ± 4.61 d	53.3 ± 2.3 d
P valor	0.0001	0.0046	0.0001	0.0001

^{a, b, c, d} = Letras distintas significam diferença significativa entre os grupos controle e infectados (P<0.05).

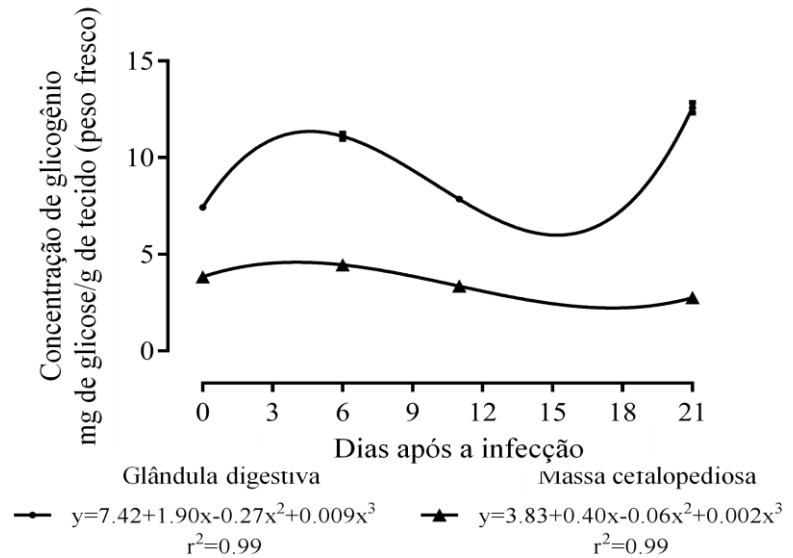
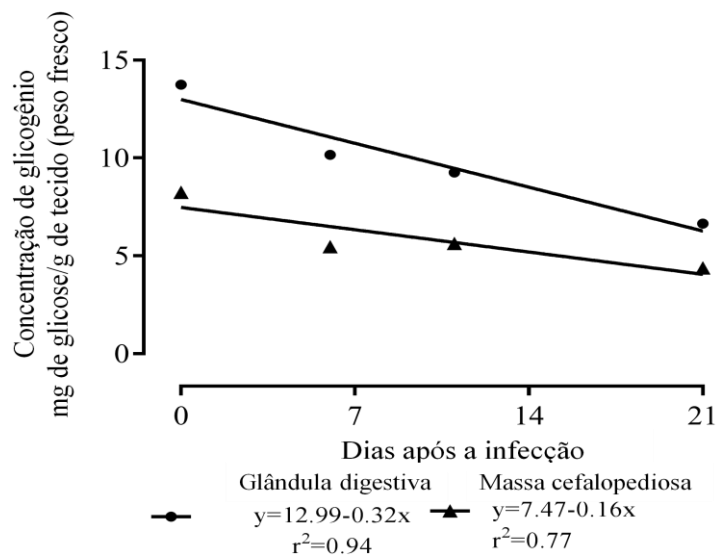


Figura 13A e B- Relação entre o conteúdo de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na glândula digestiva(●) e na massa cefalopediosa (▲) de *Biomphalaria straminea* (A). Teste de regressão de 1ª ordem; e em *B. tenagophila* (B), experimentalmente infectadas com larvas L₁ de *Angiostrogylus cantonensis*. Teste de regressão polinomial de 3ª ordem.

Tabela 2- Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*, após 21 dia da exposição as larvas L₁.

Dias após a infecção	Conteúdo de glicogênio(mg glicose/g tecido, peso fresco)			
	Glândula digestiva		Massa cefalopediosa	
	<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Controle	13.74 ± 0.13 a	7.42 ± 0.08 a	8.24 ± 0.11 a	3.83 ± 0.06 a
6	10.16 ± 0.18 b	11.10 ± 0.17 b	5.46 ± 0.06 b	4.45 ± 0.02 b
11	9.26 ± 0.12 c	7.85 ± 0.13 a	5.63 ± 0.02 c	3.35 ± 0.06 c
21	6.64 ± 0.08 d	12.58 ± 0.28 d	4.38 ± 0.08 d	2.75 ± 0.03 d
P valor	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

a, b, c, d = Letras distintas significam diferença significativa entre os grupos controle e infectados (P<0.05).

Os ácidos oxálico, succínico, pirúvico e lático foram identificados na hemolinfa dos animais infectados de ambas as espécies, embora, somente o ácido oxálico tenha sido identificado em todos os períodos analisados. Em *B. straminea* este conteúdo aumentou 560,87% na primeira semana, seguido de uma redução de 53,91% após 11 dias e com um novo aumento de 28,69% quando comparados ao grupo controle (Tab. 3), seguindo o padrão de regressão apresentado na Figura 3A. O ácido pirúvico foi somente determinado nos moluscos não infectados, por outro lado, o ácido lático não foi detectado nas amostras destes animais (Tab. 3, Fig.14C). Da mesma maneira, o ácido succínico só foi detectado nos animais do grupo controle, mas nos moluscos infectados apresentou uma redução de 94,54% após 11 dias de infecção.

As análises hemolinfáticas de *B. tenagophila* mostraram que o ácido oxálico e succínico foram detectados em todas as amostras, enquanto, o conteúdo do ácido oxálico permaneceu reduzido durante todo o tempo analisado (Fig.13B). O conteúdo de ácido pirúvico apresentou uma variação em função dos períodos, com um aumento de 93,15% aos 21 dias pós-infecção. O ácido succínico foi somente detectado nas amostras do grupo controle e nos moluscos após 6 dias de infecção, com uma redução de 14,91%. A detecção do ácido lático foi feita somente nos moluscos após 11 dias de infecção, apresentando uma tendência de redução deste ponto adiante.

A histologia de *B. straminea* não infectada apresentou a região da glândula digestiva com morfologia preservada, mostrando uma organização epitelial acinar típica do órgão, com o lúmen dos ácinos preenchidos por material amorfo ou vazio, e com algumas células apresentando grânulos de glicogênio (Fig. 14A). Nos moluscos infectados a histologia mostrou uma intensa desorganização celular e perda da

estrutura acinar da glândula digestiva (Fig. 14B), sendo também observada a formação de um granuloma, com a deposição concêntrica de hemócitos ao redor da larva (Fig. 14D). A histologia da glândula digestiva de *B. tenagophila* apresentou um padrão similar ao visto em *B. straminea*. Também foi possível observar área vacuolizadas (Fig. 15A), células com tamanho reduzido e formação granulomatosa, também com deposição concêntrica de hemócitos (Fig. 15B,C).

Tabela 3- Conteúdo de ácidos orgânicos (mM) na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*, durante o período pré-patente da infecção, expresso em dias.

Dias após a infecção	<i>Biomphalaria straminea</i>			
	Ác. Oxálico	Pirúvico	Succínico	Lático
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Controle	0.115 ± 0.002a	0.156 ± 0.002	0.879 ± 0.007a	ND
6	0.760 ± 0b	ND	ND	5.738 ± 0.025a
11	0.053 ± 0c	ND	0.048 ± 0b	0.312 ± 0.006b
21	0.148 ± 0.002d	ND	ND	0.644 ± 0
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>			
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Controle	0.055 ± 0a	0.052 ± 0a	1.033 ± 0.008a	ND
6	0.054 ± 0b	0.059 ± 0b	0.879 ± 0.005b	ND
11	0.052 ± 0c	0.036 ± 0c	ND	0.347 ± 0.006a
21	0.045 ± 0.001d	0.102 ± 0d	ND	0.097 ± 0.001b

^{a, b} = Letras distintas significam diferença significativa entre os grupos controle e infectados (P<0.05). ND= ácido orgânico não detectado.

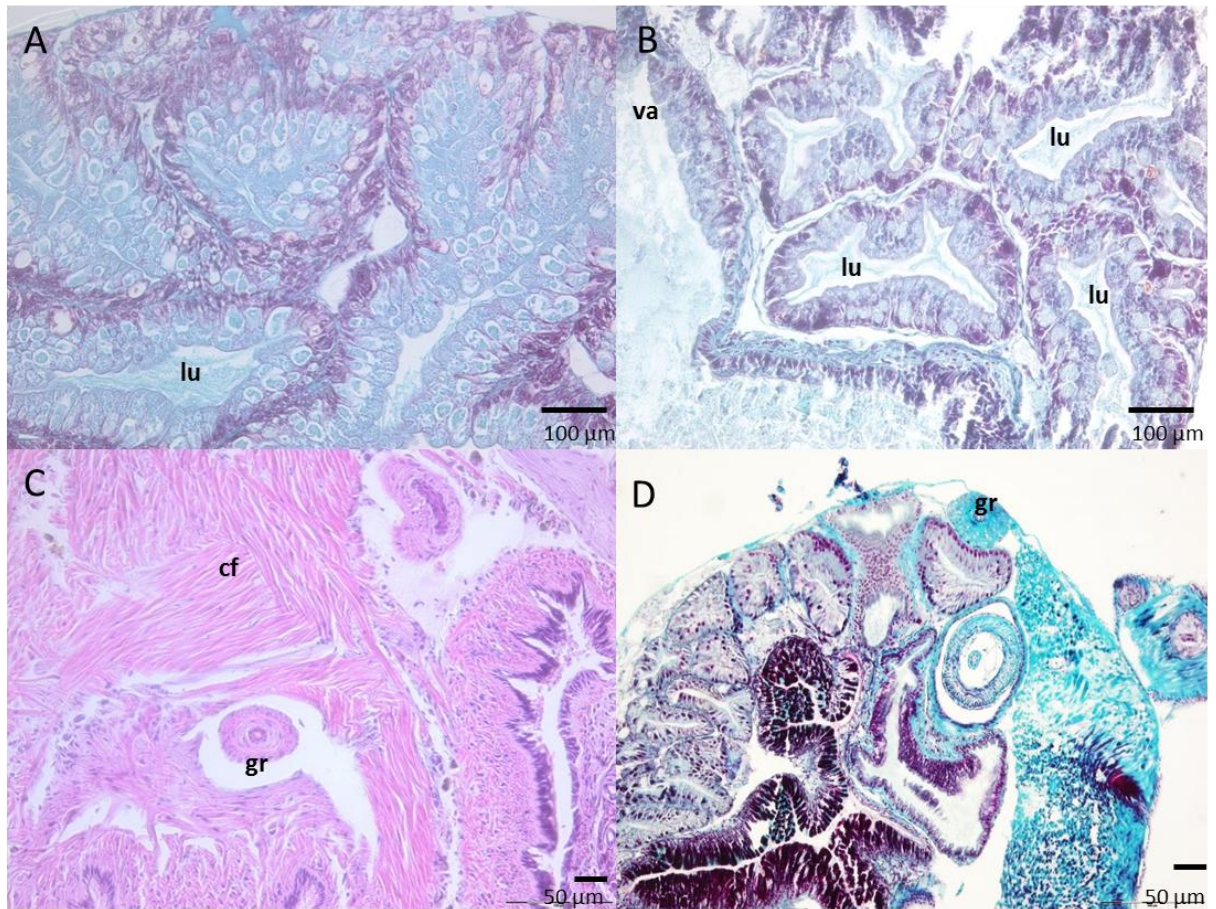


Figura 14- Seções histológicas da glândula digestiva de *Biomphalaria straminea* infectada e não infectada com *Angiostrongylus cantonensis*. **A (não infectados)** mostra região funcionalmente ativa da glândula digestiva com células estruturalmente intactas. **B (6pós-infecção)** apresenta tecido da glândula digestiva com intenso processo de desorganização celular, exibindo lúmen contendo material amorfo (**lu**) e presença de áreas vacuolizadas (**va**). **C** Região granulomatosa na massa cefalopediosa (**gr**) e fibras colágenas (**cf**). **D** Região periférica da glândula digestiva mostrando área vacuolizada e região granulomatosa evidenciada pela coloração de Tricômico de Gomori (**gr**). Barra de escala = 100 µm A, B and 50 µm C, D.

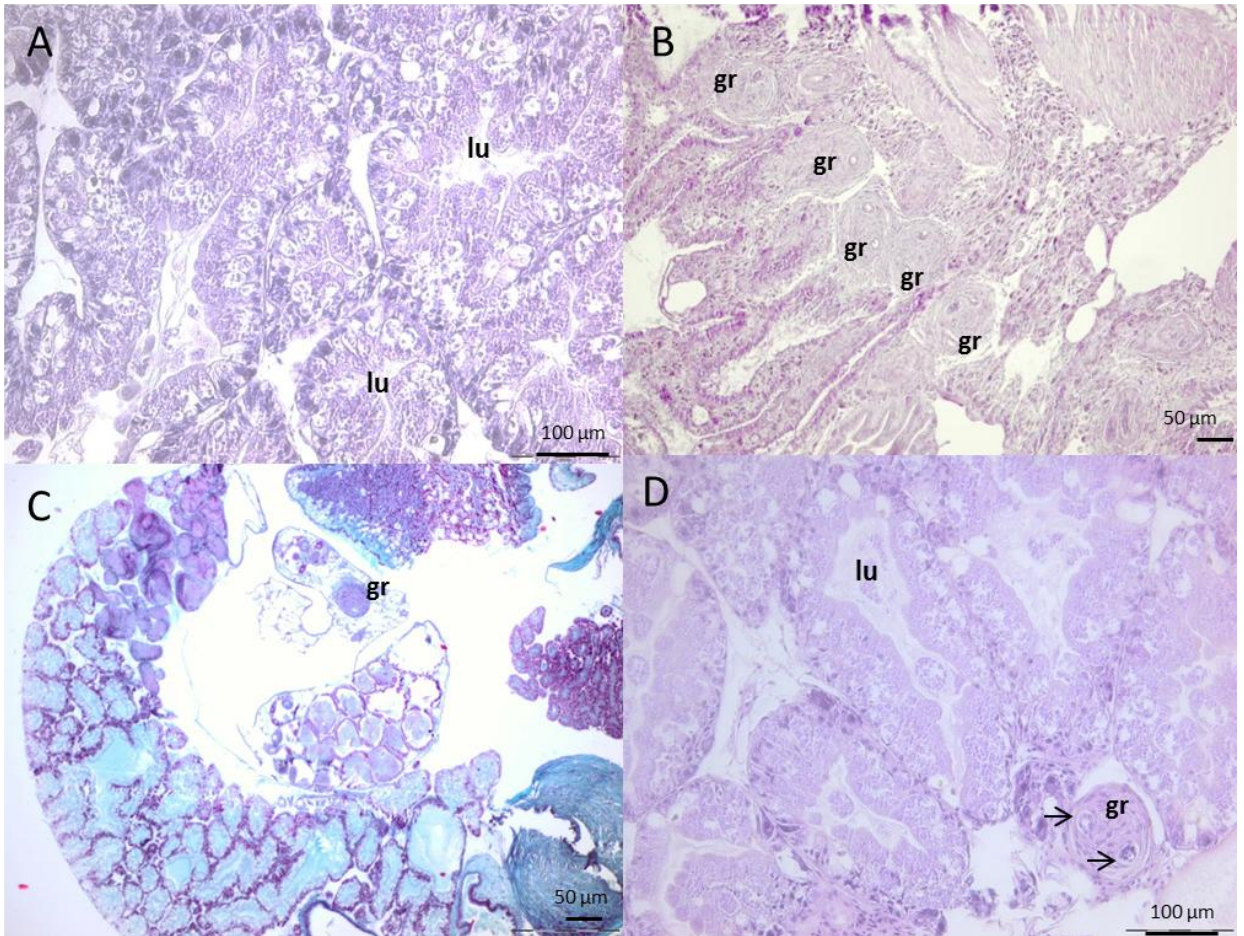


Figura 15– Seções histológicas da glândula digestiva de *Biomphalaria tenagophila* infectada com *Angiostrongylus cantonensis* com coloração por Eosina-hematoxilina (**A, B, D**) e por Tricômico de Gomori (**C**). **A (6 dias pós-infecção)** apresenta a funcionalidade e integridade do tecido da glândula digestiva, exibindo um processo de desorganização tecidual com presença de material amorfo no lúmen celular (**lu**). **B, C and D (21 dias pós-infecção)** mostra a região da glândula digestiva com intenso processo de desorganização tecidual, presença de áreas vacuolizadas e região granulomatosa (**gr**) e perfil larval (→). Barra de escala = 100 µm A, D and 50 µm B,C.

5.3. Metabolismo de produtos nitrogenados de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

Em *B. straminea* foi observada uma forte relação positiva entre o período pós-infecção e a concentração proteica hemolinfática ($r^2 = 0,90$). Houve uma elevação na concentração das proteínas circulantes após 11 dias da infecção ($22,0 \pm 1,73$ mg/dl) em relação com os moluscos não infectados ($13,0 \pm 1,0$ mg/dl). Já, *B. tenagophila* apresentou uma queda ao longo de todo o período observado, principalmente após 6 dias da infecção ($3,39 \pm 0,04$ mg/dl) sendo esta a menor concentração proteica hemolinfática quando comparada ao grupo controle ($7,0 \pm 0,51$ mg/dl) (Fig. 16).

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, indicada pelos valores elevados de r^2 para ambas as enzimas ($r^2 = 0,99$ para AST e $r^2 = 0,98$ para ALT). A atividade das enzimas atingiu seu auge 11 dias pós-infecção com valores médios para ALT ($1069,66 \pm 101,07$ UFR/ml) e para AST ($885 \pm 30,31$ UFR/ml) e seus respectivos controles ($232,33 \pm 7,5$ URF/ml) para ALT e ($259,33 \pm 8,5$ URF/ml) para AST (Figs. 17A, B).

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 ($203,0 \pm 6,24$), quando comparados com os moluscos não infectados ($65,33 \pm 2,5$). Semelhantemente, a atividade da AST apresentou aumento significativo em função do tempo de infecção, com o valor máximo observado na primeira semana de infecção ($196,33 \pm 2,51$) enquanto o grupo controle ($70,0 \pm 2,82$) (Fig. 18A, B).

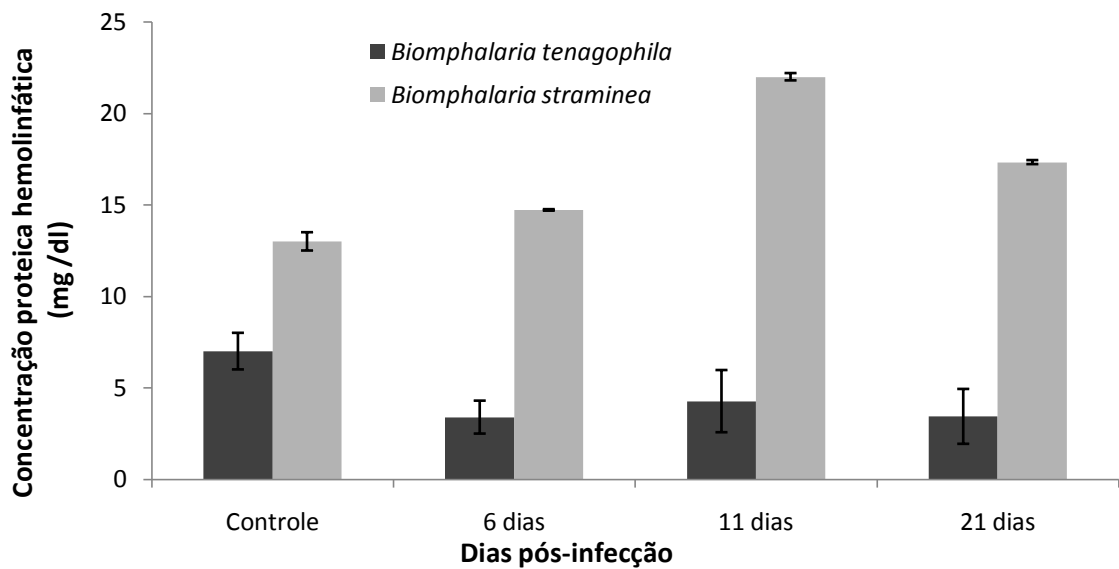


Figura 16 A e B – Relação entre a concentração hemolinfática de proteínas totais, expresso em mg/dl, das espécies *Biomphalaria straminea* (A) e *Biomphalaria tenagophila* (B) experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis* e o tempo, expresso em dias pós-infecção.

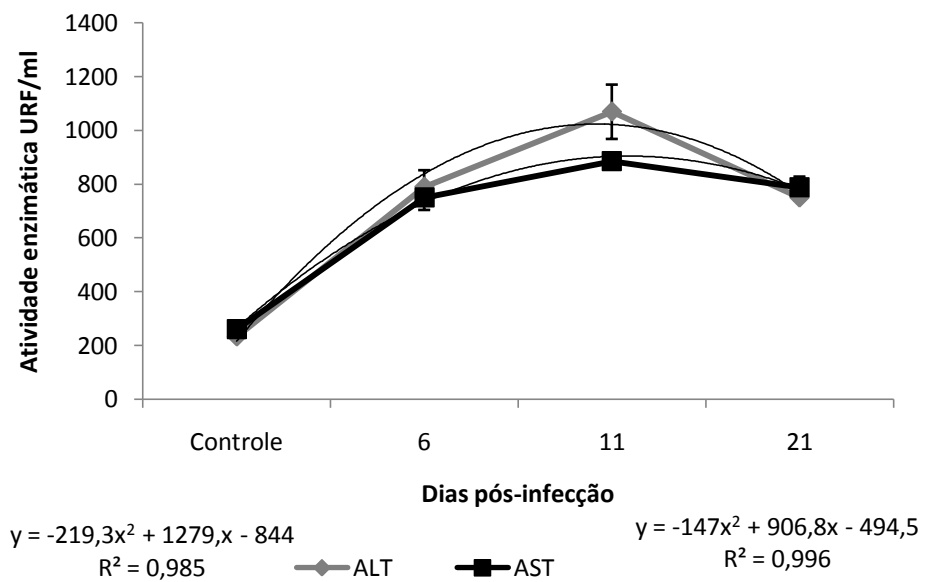


Figura 17 – Relação entre a atividade da alanina aminotransferase (◆) e da aspartato aminotransferase (■), expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria straminea*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* após 6, 11 e 21 dias de infecção.

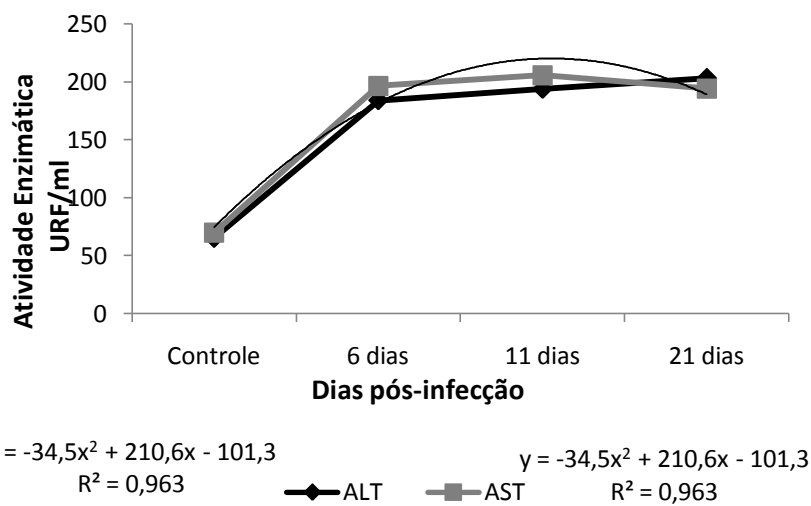


Figura 18 – Relação entre a atividade da alanina aminotransferase (◆) e da aspartato aminotransferase (■), expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis* após 6, 11 e 21 dias de infecção.

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. Essa transição apresentou uma redução de 47,58% para os moluscos infectados ($46,0 \pm 2,0$ mg/dl) em relação ao grupo controle ($96,66 \pm 1,15$ mg/dl). Em contrapartida, as concentrações de ureia mostram uma elevação de 570,17% para os moluscos infectados ($58,5 \pm 3,1$ mg/dl) em função dos não infectados ($10,26 \pm 1,76$ mg/dl). Logo em seguida, 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 ureia entram em queda e permanecem reduzidas até aos 21 dias pós-infecção (Figs. 19A, B).

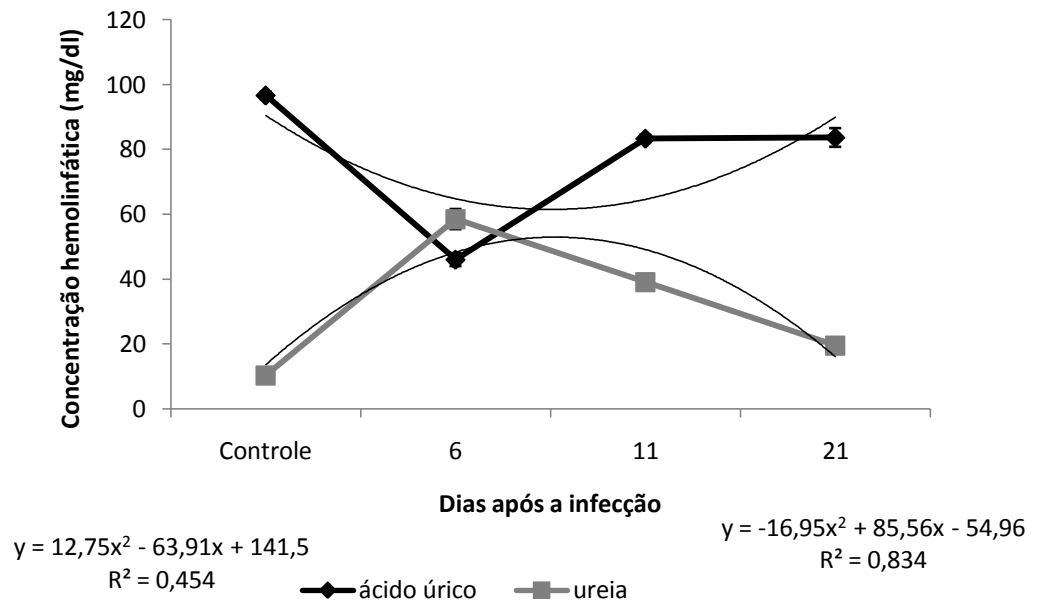


Figura 19 – Relação entre a concentração de ácido úrico (◆) e Ureia (■), expressa em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria straminea*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, 21 pós-infecção.

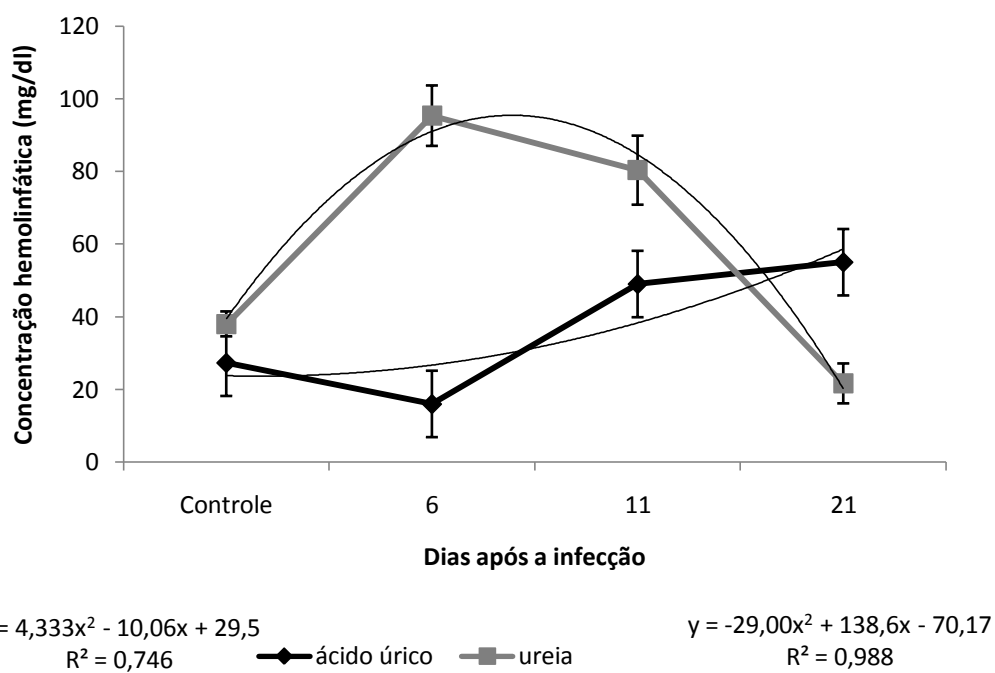


Figura 20 – Relação entre a concentração de ácido úrico (◆) e Ureia (■), expressa em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*, 21 pós-infecção

Para *B. tenagophila* esse perfil também apresenta 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 ($16,0 \pm 3,0$) em contraste com o grupo controle ($27,33 \pm 0,57$), com 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 ($95,33 \pm 8,32$) confrontado com o grupo controle ($38,0 \pm 3,46$). 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 ureia (Figs.20 A, B).

5.4. Metabolismo de cálcio de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

A infecção por *A. cantonensis* afetou a regulação do metabolismo de cálcio de ambas as espécies estudadas. Observou-se uma relação negativa entre o período pós-infecção e a concentração de cálcio na hemolinfa de *B. straminea* [$r^2=0,99$] e de *B. tenagophila* [$r^2=0,98$]. A menor concentração hemolinfática foi registrada 6 dias pós-infecção para *B. tenagophila* ($12,14 \pm 0,2$ mg/dl) e 11 dias pós-infecção para *B. straminea* ($9,64 \pm 0,25$ mg/dl). Esses valores são menores do que os observados para os respectivos grupos de moluscos não infectados, ($34,5 \pm 0,15$ mg/dl) e ($29,25 \pm 0,25$ mg/dl). As alterações observadas nos caramujos infectados representam uma redução de 64,8% e 67,0%, para *B. tenagophila* e *B. straminea*, respectivamente (Tab.4, Fig.21).

O conteúdo de CaCO_3 avaliado nas conchas de *B. straminea* apresentou uma redução no primeiro momento de avaliação ($276,67 \pm 12,38$ mg de CaCO_3/g) em função do observado nos moluscos não infectados ($424,35 \pm 5,11$ mg de CaCO_3/g). Ao contrário do que foi visto em *B. tenagophila* no mesmo período, que registrou um aumento ($745,04 \pm 35,48$ mg de CaCO_3/g) em relação ao grupo controle ($512,31 \pm 18,52$ mg de CaCO_3/g).

Em seguida, nos períodos de 11 e 21 pós-infecção *B. tenagophila* infectada apresenta um quadro de hipocalcificação da concha, registrando uma queda de 7,49% e 13,07%, respectivamente, em relação aos moluscos não infectados. Já *B. straminea*, ao contrário, apresenta um perfil de hipercalcificação, com uma elevação de 17,19% e 12,34% na concentração de CaCO_3 (Tab.4, Fig.21).

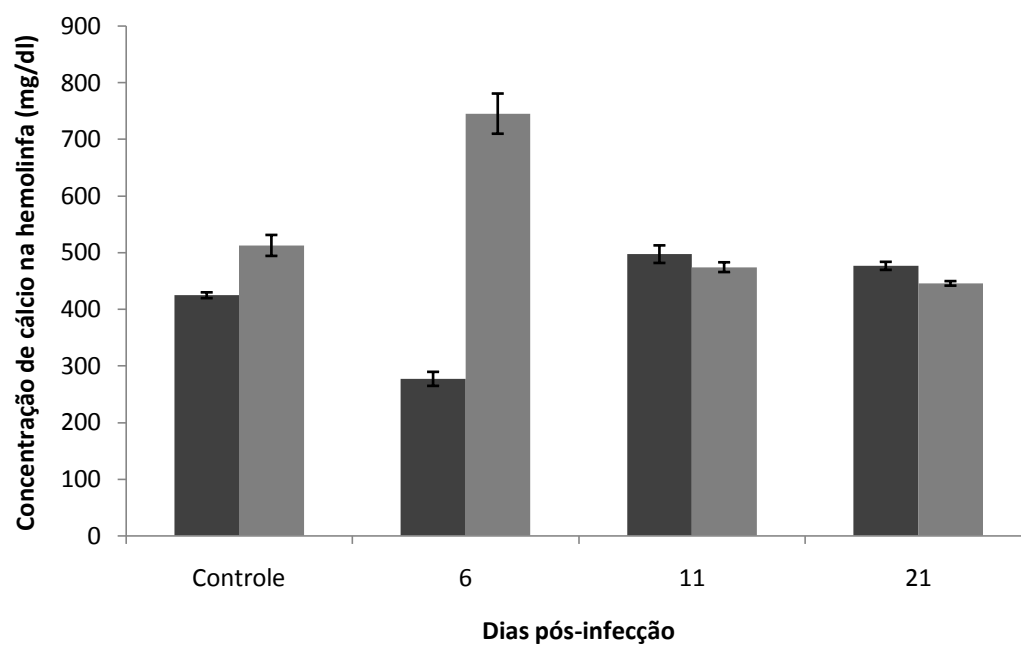


Figura 21 – Concentração de cálcio na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, expresso em dias pós-infecção.

Tabela 4 – Concentração de Cálcio concha (mg de CaCO₃/g de cinzas) e na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas com *Angiostrongylus cantonensis*, expresso em dias pós-infecção.

Dias pós- infecção	Concha	Hemolinfa	Concha	Hemolinfa
	(mg de CaCO ₃ /g de cinzas)	(mg/dl)	(mg de CaCO ₃ /g de cinzas)	(mg/dl)
	<i>Biomphalaria straminea</i>		<i>Biomphalaria tenagophila</i>	
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Controle	424 ± 5,11 a	29,25 ± 0,25a	512,31 ± 18,52a	34,5 ± 0,15a
6	276,67 ± 12,35 b	16,6 ± 0,30 b	745,04 ± 35,48b	12,14 ± 0,12b
11	496,89 ± 15,5 c	9,64 ± 0,25 c	473,91 ± 8,61c	22,23 ± 0,11c
21	476,36 ± 7,11 d	10,16 ± 0,18 c	445,30 ± 4,0 d	21,19 ± 0,05c
r²	+0,99	+0,99	+0,98	+0,98

^{a, b, c, d} = Letras distintas significam diferença significativa entre os grupos controle e infectados (P<0.05).

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

O processo de castração parasitária pode se estabelecer por meio de uma série de acontecimentos, como a destruição ou alteração das gônadas desencadeando diferentes efeitos, tais como mudanças no padrão de secreção hormonal, caracteres sexuais secundários, viabilidade e crescimento (BAUDOIN, 1975). Em outros casos, a castração pode ser resultado da drenagem dos nutrientes ou pela secreção de hormônios reguladores (ZHANG, 2009).

No presente estudo, inicialmente observamos que a infecção por *A. cantonensis* em *B. straminea* apresentou uma significativa redução no número de massas ovíferas e do número de ovos postos por moluscos, porém com uma elevada relação de ovos por massas ovíferas. Estes resultados reforçam a proposta de que a infecção leva a um aumento do esforço reprodutivo do hospedeiro, com a elevação da produção de ovos por massas ovíferas, o que resulta em uma disponibilidade reduzida de substratos a serem utilizados pelos embriões e moluscos recém-eclodidos para o seu desenvolvimento. No entanto, no decorrer do período de observação, constatamos que essa relação se inverte, com menor número de ovos por massa ovígera. O comportamento de compensação reprodutiva aqui verificado nos remete ao que foi descrito por Minchela et al. (1985) que destacam essa estratégia usada pelo hospedeiro a fim de aumentar o desempenho reprodutivo em decorrência da infecção. Porém, vale ressaltar que esse esforço foi inicial, ao passo que ao longo do período pré-patente, o que verdadeiramente observamos foi a redução do conteúdo de ovos por massa ovígera. Essa mudança de comportamento tem reflexo na viabilidade dos ovos (aqui considerados ovos embrionados) e, conseqüentemente, na eclodibilidade dos moluscos. Verificamos que ambos os valores crescem de maneira gradual, correspondendo à redução da relação ovos/massa de ovos.

De fato, o que temos é uma tentativa de maior disponibilidade de substrato energético para o desenvolvimento dos embriões e a eclosão dos moluscos. Essa mudança de estratégia está relacionada ao conteúdo de galactogênio presente na glândula de albúmen dos moluscos infectados. Nota-se que ao longo dos dias pós-infecção o nível de galactogênio nos animais infectados manteve-se consideravelmente abaixo daqueles apresentados pelos moluscos não infectados. A disponibilidade de galactogênio reflete diretamente sobre a viabilidade dos embriões em formação, isso porque, este polissacarídeo é constituinte do fluído polivitelínico, e atua como fonte energética para o desenvolvimento do embrião (GOUDSMIT; ASHWEEL, 1965; GOMOT et al., 1989). O galactogênio estocado na glândula de albúmen é resultado da interconversão da glicose em galactose pela ação enzimática da UDP-glicose-4-epimerase (E.C. 5.1.3.2) (ELK E JOOSSE, 1981) e uma vez infectados os hospedeiros contam com a competição direta das larvas em desenvolvimento pelo substrato energético (SHIS & CHEN, 1982), indicando que a redução no conteúdo de galactogênio está ligada a não conversão da glicose em galactose. Dessa forma, o fenômeno de castração, do modelo estudado, provavelmente se deu através de um

processo nutricional, onde a mobilização de moléculas chaves das vias de formação embrionária pelas larvas do parasito alterou o perfil reprodutivo do hospedeiro.

As observações histológicas do ovotestis mostram que a formação dos gametas femininos e masculinos ocorre de maneira normal, tais resultados nos levam a postular que o processo de castração reprodutiva em *B. straminea* está em função do dispêndio energético (maior neste processo devido à produção de massas ovíferas) e não à gametogênese, corroborando os dados apresentados por autores que têm demonstrado uma gametogênese preservada em moluscos infectados (TUNHOLI-ALVES et al. 2011).

A infecção por *A. cantonensis* em *B. tenagophila* apresentou um perfil inicial de altas taxas de posturas de massas ovíferas, sugerindo que a infecção desencadeou em um primeiro momento, aumento do esforço reprodutivo pelo hospedeiro. Porém, no período de transição das larvas L₁ para L₂, aos 11 dias após a infecção, observamos que há uma redução do número de ovos por massa ovífera. Indicando que há uma tentativa por parte do hospedeiro em aumentar a disponibilidade energética para o desenvolvimento dos ovos. Estes hospedeiros também apresentaram redução de viabilidade e eclodibilidade dos moluscos, no mesmo período. Em contrapartida, os conteúdos de galactogênio mantiveram-se significativamente elevados em relação aos animais não infectados.

Essa contradição que envolve a redução da relação ovos/massa de ovos, elevadas concentrações de galactogênio na glândula de albúmen e redução da viabilidade dos ovos, indica que possivelmente os danos teciduais causados pela migração e desenvolvimento larval foram os principais responsáveis pela queda apresentada. A drástica redução dos parâmetros observados 11 dias após a infecção estão de acordo com Sullivan et al. (1985), que postulam que a castração parasitária pode ser um efeito primário, em função da ingestão e/ou destruição de tecidos gonadais pelas larvas do parasito; ou através da atuação de substâncias neuroendócrinas que modulam a atividade reprodutiva dos moluscos hospedeiros.

As observações histológicas no ovotestis de *B. tenagophila* e os dados fisiológicos juntamente com o comportamento reprodutivo apresentado pelos moluscos mostram que as alterações na biologia reprodutiva dos hospedeiros foram, principalmente, através dos danos teciduais e desorganização estrutural do ovotestis. De fato, a perda da funcionalidade do órgão está intimamente ligada com a não mobilização dos carboidratos estocados. Sugerindo mesmo com elevadas concentrações deste polissacarídeo, foi observado um declínio na viabilidade dos ovos e na eclosão dos moluscos.

Ao reunirmos todos os aspectos analisados conclui-se que a alteração na biologia reprodutiva dos moluscos hospedeiros, *B. straminea* e *B. tenagophila*, frente à infecção por *A. cantonensis* confirmamos um fenômeno de castração parcial e indireta. Esta ocorre pela redução da viabilidade dos ovos, somado às alterações nas vias anabólicas ou catabólicas de substratos energéticos, bem como na organização tecidual dos órgãos reprodutivos.

6.2. Metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

O metabolismo de carboidratos desempenha papel importante na fisiologia e manutenção do estado energético de quase todos os organismos vivos, sendo prontamente oxidado para a produção de ATP. Entretanto, quando organismos são expostos a condições fisiológicas adversas como privação alimentar, ou mesmo parasitismo (TUNHOLI et al. 2011), passam a utilizar de substratos alternativos, tais como proteínas (BONFIM et al., 2014) e lipídios (TUNHOLI-ALVES et al., 2011a), para a produção de energia, alterando notavelmente sua composição hemolinfática. Nessa circunstância, moluscos exibem um balanço energético negativo, resultando na mobilização de reservas polissacarídicas, tais como o glicogênio e o galactogênio, principalmente a partir da glândula digestiva, massa cefalopédica e glândula de albúmen, como tentativa em restabelecer seu estado normoglicêmico, edificando a presença de mecanismos homeostáticos precisamente regulados (DE SOUZA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI-ALVES et al., 2011). No presente estudo, uma diminuição significativa nos conteúdos de glicose foi observada após a infecção por *A. cantonensis* em *B. straminea*, permanecendo com níveis hemolinfáticos reduzidos durante toda etapa de desenvolvimento larval. Shih e Chen (1982) utilizando de métodos cromatográficos confirmaram a presença de vias oxidativas em estágios juvenis de *A. cantonensis*, destacando a participação de centros enzimáticos relacionados à via glicolítica. Tais resultados sugerem que a glicose é uma fonte de energia imediata utilizada pelo parasito, que passa a ser absorvido diretamente da hemolinfa do seu hospedeiro, como subsídio ao seu desenvolvimento, alterando os níveis desse açúcar no meio. No entanto, quando analisado esse perfil na interface *B. tenagophila/A. cantonensis*, um aumento significativo nos conteúdos de glicose foi demonstrado no sexto dia de infecção, retornando aos seus valores basais com o avançar do desenvolvimento parasitário. Este cenário metabólico aponta para aceleração da gliconeogênese em resposta aos distúrbios ocasionados durante a infecção (TUNHOLI-ALVES et al., 2011a), resultando no redirecionamento de vias metabólicas. Esta tendência relatada em outros modelos de infecção assegura a geração de glicose a partir de substratos não glicêmicos, mantendo a glicemia do hospedeiro (ISHAK et al. 1975; PINHEIRO et al. 2009).

A infecção por *A. cantonensis* também resultou em variações nos conteúdos de glicogênio na GD e na MC em ambas as espécies estudadas. Na interface *B. straminea/A. cantonensis*, concomitantemente ao decréscimo nos conteúdos de glicose hemolinfática, uma depleção nas concentrações de glicogênio, tanto na GD quanto na MC foi observado, com os menores valores apresentados a partir de 21 dias de infecção. Os resultados apresentados, além de indicarem a existência de mecanismos homeostáticos estabelecidos entre tecido e hemolinfa, ressaltam ser este o período mais crítico nessa interface, justificado por uma maior competição de nutrientes entre o nematódeo e o molusco, o qual resulta na quebra da homeostase glicêmica do hospedeiro. Esta etapa é marcada pela presença de larvas L₃ em tecidos do molusco, principalmente na MC (HEXIANG et al., 2009), onde passam a armazenar grânulos de glicogênio (HAJA E KOJIMA, 1990), contribuindo para as alterações aqui registradas.

Perfil contrário de variação foi demonstrado na interface *B. tenagophila/A. cantonensis*. De acordo com os resultados, a infecção não resultou na depleção dessa reserva na DG do hospedeiro, com o acúmulo de glicogênio demonstrado no final da 1^a e 3^a semana de infecção. Tais resultados sugerem que a mobilização de glicogênio neste sítio ocorre secundariamente ao redirecionamento de vias metabólicas, além de

indicar melhor adaptação fisiológica dessa espécie à infecção, uma vez que, o restabelecimento da normoglicemia ocorreu sem a mobilização e decréscimo nas concentrações de glicogênio, diferindo do padrão observado para a espécie *B. straminea* (Esquema 1 e 2).

Figura 22- Esquema geral das alterações no metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*.

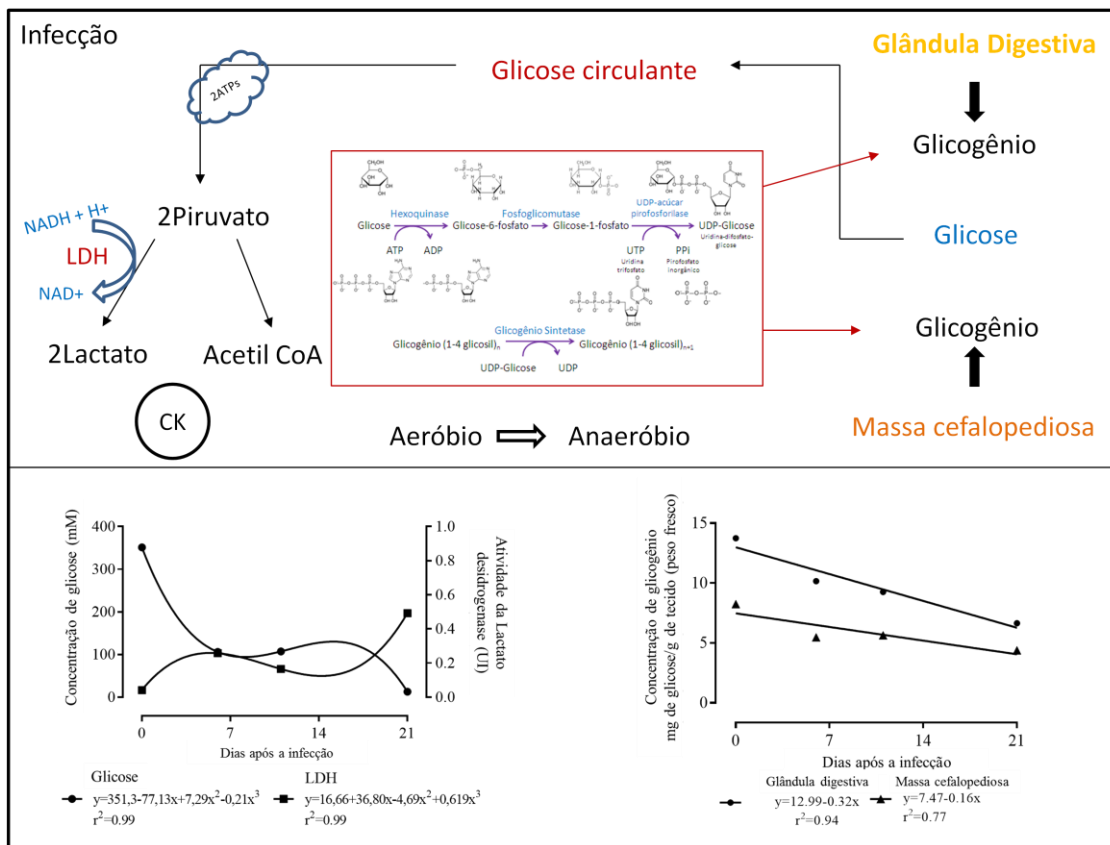
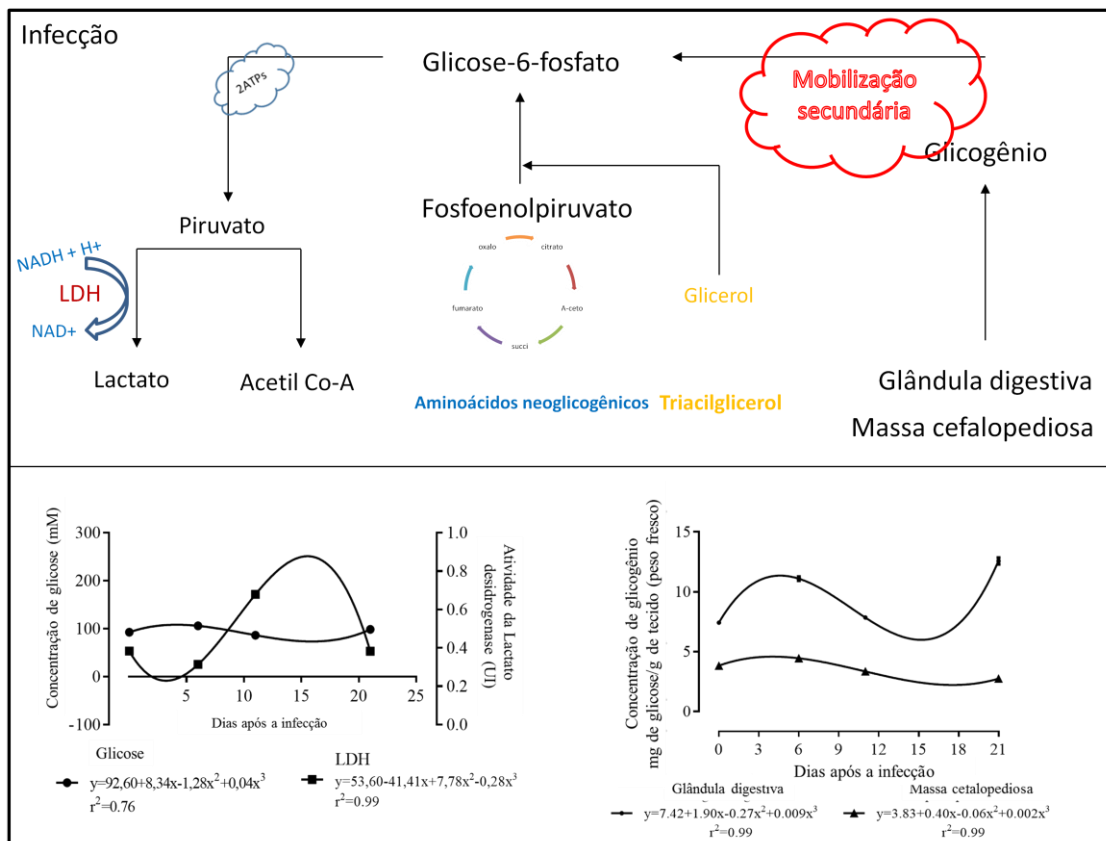


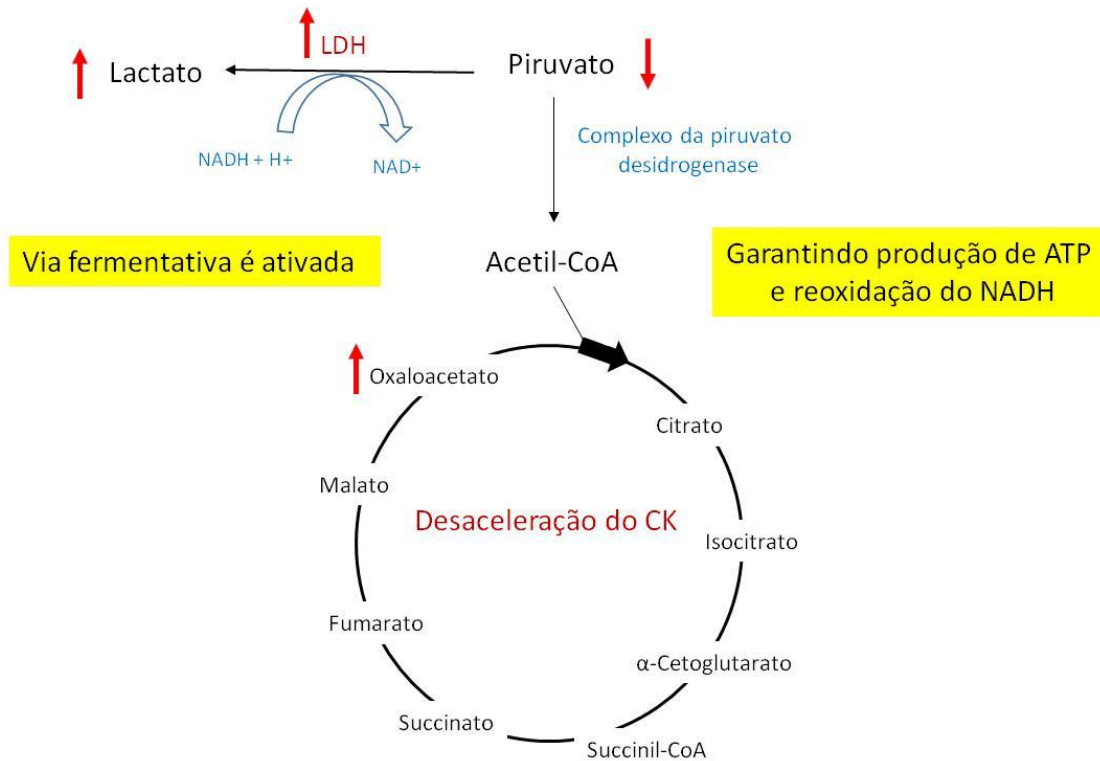
Figura 23- Esquema geral das alterações no metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectada por *Angiostrongylus cantonensis*.



A partir dessas alterações e na ordem de melhor entender o efeito da infecção de *A. cantonensis* sobre o metabolismo oxidativo de *B. straminea* e *B. tenagophila*, as concentrações de alguns ácidos orgânicos relacionados com o metabolismo aeróbio do hospedeiro durante a infecção foram analisados, como base para a interpretação dos dados. Os resultados apresentados confirmam que a infecção resulta no aumento da atividade do metabolismo anaeróbio em ambas as espécies de moluscos estudadas, possivelmente, como meio alternativo que garante não apenas a produção de energia, mas também a formação de intermediários, fundamentais a sobrevivência do molusco e ao desenvolvimento parasitário. Na interface *B. straminea/A. cantonensis*, além da diminuição dos níveis hemolinfáticos de ácido pirúvico a infecção induziu acúmulo de ácido lático em relação ao grupo controle diferindo significativamente. Este cenário metabólico ocorre simultaneamente ao aumento na atividade da LDH, indicando a transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio. Nessa circunstância, o ácido pirúvico não é oxidado a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase favorecendo o acúmulo nos conteúdos de ácido oxálico, em resposta a desaceleração do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa nos grupos infectados. Nesta condição vias fermentativas são ativadas, permitindo o hospedeiro obter ATP pela redução do ácido

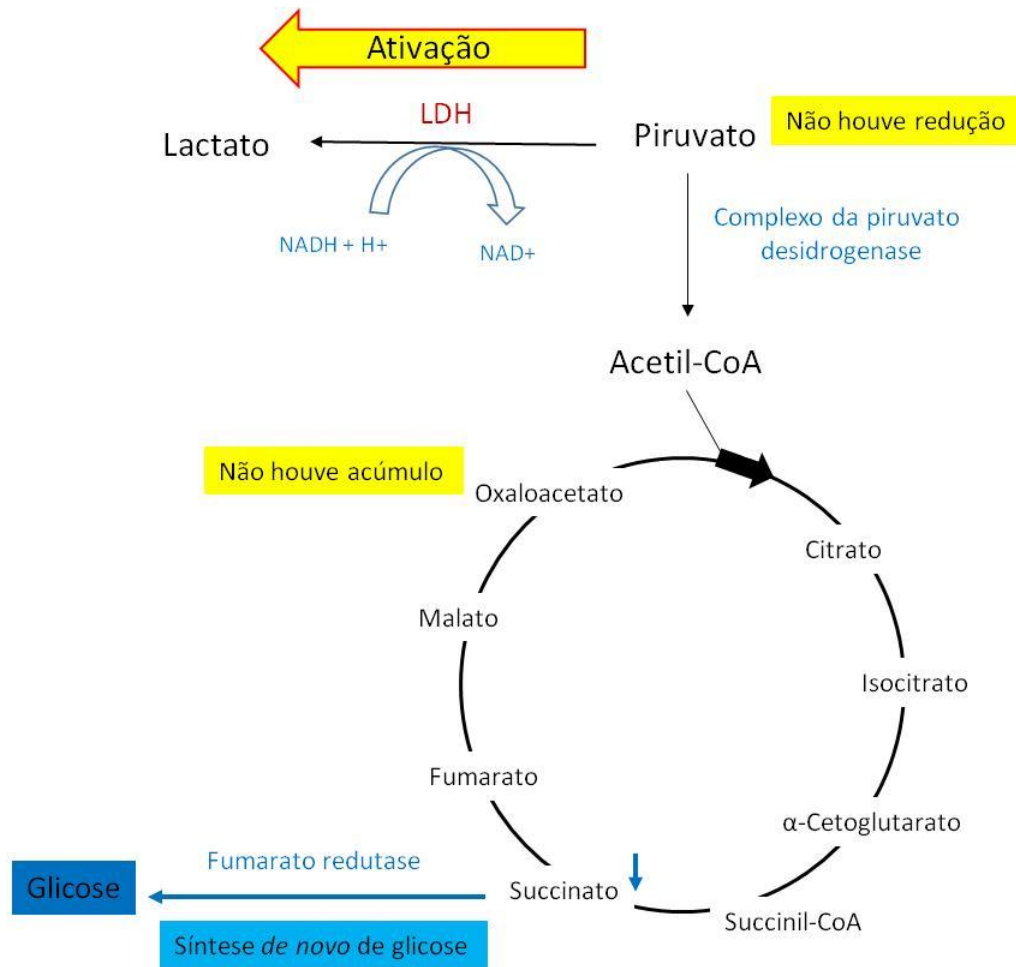
pirúvico em ácido láctico, ao mesmo tempo em que garante a reoxidação do NADH, fundamental para a manutenção do seu balanço redox (Esquema 3).

Figura 24- Esquema geral das alterações dos ácidos orgânicos de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*.



Em *B. tenagophila*, o ácido pirúvico foi detectado ao longo de todo o período analisado, sendo sua concentração reduzida quando os níveis de ácido láctico aumentavam. Tais resultados indicam o aumento da degradação anaeróbia da glicose, uma vez que, tais variações foram acompanhadas pelo aumento na atividade da LDH (11 dias após a infecção). Durante todo o período pré-patente não foi possível detectar os níveis de ácido succínico, indicando a possibilidade da transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio, além da ação da fumarato redutase envolvida no processo de síntese *de novo* de glicose a partir do ácido succínico, através da via neoglicogênica. Os dados observados para as concentrações dos ácidos orgânicos hemolinfáticos são corroborados por aqueles apresentados por Ishak et al. (1975) e Mohamed et al. (1982), que também observaram a ação de mecanismos compensatórios para manutenção da homeostase ao longo da infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* (Esquema 4).

Figura 25 - Esquema geral das alterações dos ácidos orgânicos de *Biomphalaria straminea* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*.



A recuperação das larvas L_3 a partir da maceração dos tecidos e a constatação de sua viabilidade através da infecção de hospedeiros definitivos com estas larvas confirmaram o sucesso da infecção dos moluscos utilizados no presente estudo. Além disso, as análises histológicas mostraram o estabelecimento da infecção, e também a resposta do sistema de defesa dos hospedeiros no processo de encapsulamento das larvas com a formação dos granulomas teciduais. Embora sem a ocorrência de reprodução assexuada dentro do molusco, a migração e a transição dos estágios larvais foram responsáveis pela desorganização tecidual observada. Esses resultados são corroborados por Tunholi-Alves et al. (2014) que mostraram alterações histológicas e histoquímica em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis*. A presença das larvas na glândula digestiva é registrada no presente estudo, representando uma característica importante para as larvas em desenvolvimento, uma vez que a região é ricamente banhada pela hemolinfa repleta de nutrientes. A localização de larvas nesta região indica uma estratégia de estabelecimento, porém já amplamente conhecida para o

desenvolvimento larval intramolusco de trematódeos como *S. mansoni* (BECKER, 1980).

Pela primeira vez, alterações no metabolismo de carboidratos de *B. straminea* e *B. tenagophila* infectadas por *A. cantonensis* foram demonstradas. Os resultados apresentados indicam padrões diferentes de variação entre as espécies, confirmando a perda da homeostase glicêmica apenas em *B. straminea*. Adicionalmente, os resultados da HPLC confirmam que a infecção por *A. cantonensis* induz a aceleração do metabolismo anaeróbico em ambas as espécies estudadas, uma vez que o aumento da atividade da LDH ocorreu concomitantemente à redução dos níveis de piruvato e acúmulo de lactato na hemolinfa, condição essencial à sobrevivência do hospedeiro e ao desenvolvimento parasitário.

6.3. Metabolismo de produtos nitrogenados de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

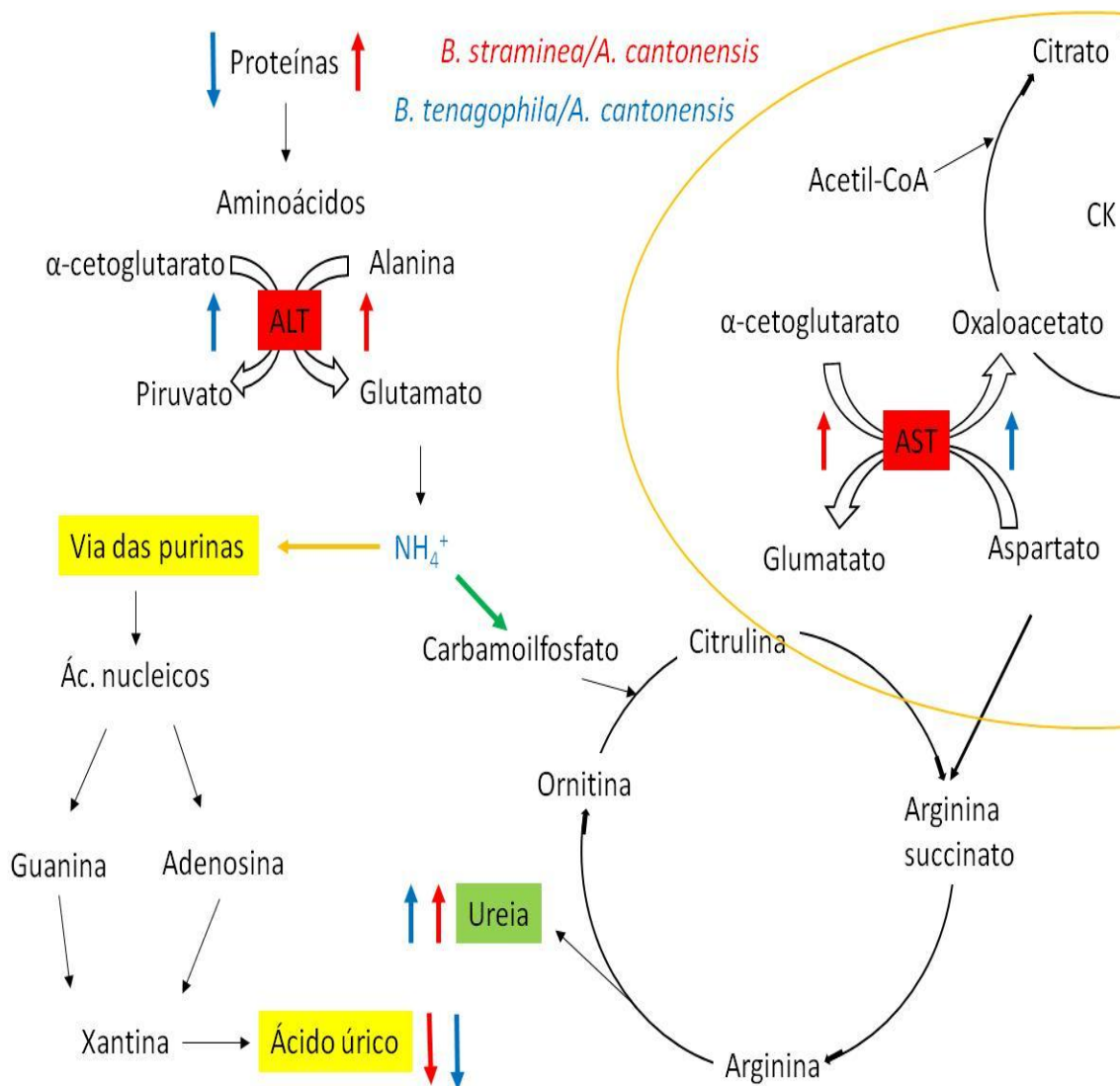
A utilização do esqueleto carbônico de proteínas e aminoácidos para formação de substratos intermediários das vias oxidativas é uma das estratégias utilizadas pelos hospedeiros para manter o equilíbrio homeostático, desestabilizado pelo desenvolvimento intramolusco do parasito. A exaustão dos depósitos de carboidratos, resultado da drenagem feita pelas larvas em desenvolvimento no interior do molusco, causa um estado de estivação que impulsiona o molusco a utilizar substratos alternativos para obtenção de energia, a fim de manter os seus processos metabólicos (BECKER, 1980).

Biomphalaria straminea apresentou uma elevação permanente dos níveis proteicos hemolinfáticos, especialmente após 11 dias de infecção, sugerindo que o desenvolvimento intramolusco do parasito, que nesta fase encontra-se em pleno processo de transição das larvas L₁ para as larvas L₂, pode ter causado danos teciduais (BROCKELMAN, et al., 1976). O aumento no conteúdo proteico hemolinfático por conta de lesões teciduais pode ser confirmado pela análise da atividade das aminotransferases, ALT e AST, que são marcadores de injúrias teciduais (BLASCO E PUPPO, 1999; LIRA et al., 2000). Assim como no modelo *B. straminea/A. cantonensis*, em 1993, Pokora e colaboradores, em suas investigações sobre o conteúdo de proteínas totais e atividades das enzimas α -amilase, fosfatase alcalina e aminotransferases ALT e AST, em *L. stagnalis*, verificaram que nos moluscos infectados com furcocercárias, a concentração de proteínas totais e a atividade de todas as enzimas analisadas estavam aumentadas, e os autores confirmam a relação dos resultados com o grau de injúria nos tecidos de glândula digestiva. De acordo com vários autores, dentre eles, Guillon e Cens (1973) a glândula digestiva é o principal sítio de agregação das larvas em desenvolvimento, especialmente trematódeos, pela rica disponibilidade de hemolinfa que banha o tecido (Esquema 5).

Biomphalaria tenagophila apresentou uma redução da concentração de proteínas totais, o que sugere a utilização das estruturas de carbono obtidas a partir de aminoácidos para formação de precursores energéticos. O mesmo comportamento foi visto por Tunholi-Alves et al. (2012), no modelo *B. glabrata/A. cantonensis*, pois observaram uma redução contínua dos níveis de proteínas totais circulantes, e atribuíram a este processo a mobilização de reservas não glicídicas do hospedeiro necessárias para atender suas necessidades basais, somada à absorção direta de

aminoácidos a partir da hemolinfa pelos parasitos para o seu desenvolvimento ontogenético. Estudos similares realizados com larvas de trematódeos também apresentaram comportamento semelhante e ratificam os resultados aqui observados (PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011; BONFIM et al., 2013) (Esquema 5).

Figura 26 – Esquema geral das alterações no metabolismo de produtos nitrogenados de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis*.



Para esta espécie de molusco, a atividade das aminotransferases também se mostrou elevada. Além de envolvidas na marcação de lesão tecidual, as aminotransferases desempenham um papel fundamental no metabolismo energético do molusco hospedeiro. Pois constituem uma categoria de enzimas responsáveis pela transferência reversível do grupamento amino de um aminoácido para um α-ceto ácido,

e vice-versa, assim formando precursores que podem ser utilizados na gliconeogênese (NELSON & COX, 2011). O aumento da atividade enzimática, da ALT e da AST, combinado com a redução da concentração de proteínas disponíveis na hemolinfa indica que o organismo do hospedeiro pode estar lançando mão de estruturas carbônicas de aminoácidos para síntese de glicose, tentando um balanceamento energético, até então negativado pela infecção. Esse cenário sugere que assim como os trematódeos, o nematódeo *A. cantonensis* também desencadeia condições de estresse para o molusco.

Em consequência de todo o panorama anterior foram observadas alterações semelhantes para ambas as espécies em relação aos produtos nitrogenados de excreção, com uma significativa queda nas concentrações de ácido úrico acompanhado de um aumento substancial nos conteúdos de ureia na hemolinfa dos moluscos infectados, nos momentos iniciais da infecção, especialmente aos 6 dias de infecção. Essa troca de padrão excretor pode estar ligada a metabolização de aminoácidos, especialmente, no processo de desaminação, para síntese *de novo* de glicose.

O ácido úrico é o principal produto de excreção dos moluscos aquáticos e apresenta a vantagem de ter pouca perda de água vinculada à sua eliminação. No caso dos moluscos estudados, a infecção representa as suas maiores situações de estresse, e em um ambiente aquático podem favorecer a excreção de ureia, uma vez que sua eliminação dispõe de significativa perda de água, porém com menor gasto energético, atrelado ao menor consumo de NADPH (BECKER & SCHMALE, 1978). A alternância do padrão excretor dos moluscos infectados pode estar atrelado não só ao restabelecimento da sua homeostase, mas também a um comportamento modulador por parte do parasito. Isto, porque a ativação do ciclo da ureia resulta no aumento da produção de arginina que pode ser adquirida pelo parasito e auxiliar no seu desenvolvimento (KURELEC, 1975).

As alterações dos padrões de excreção por parte dos hospedeiros quando infectados por trematódeos estão ricamente descritas na literatura (BECKER, 1983; 2009; TUNHOLI et al. 2011). No entanto, somente recentemente alguns autores vêm trazendo essa perspectiva por meio da infecção por nematódeos (TUNOLI-ALVES et al., 2012, BONFIM et al., 2013). Com isso, o presente estudo vem reafirmar a importância da utilização de modelos de infecções experimentais para entender a interação das larvas em desenvolvimento de *A. cantonensis* e o hospedeiro intermediário.

6.4. Metabolismo de cálcio de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* infectados por *Angiostrongylus cantonensis*

Em geral, a infecção por larvas de helmintos está associada à depleção de estoques de carboidratos dos hospedeiros intermediários. Moluscos expostos a esta situação de estresse aceleram o seu metabolismo energético. Consequentemente, o uso de substrato proteico como fonte alternativa de energia torna-se uma opção, causando um balanço negativo em função do alto consumo de nutrientes pelas larvas em desenvolvimento e levando a um aumento no consumo de ácidos orgânicos, seguido da redução do pH hemolinfático (PINHEIRO & AMATO, 1994). Nestas condições, o carbonato de cálcio (CaCO_3) existente na concha destes moluscos é mobilizado, auxiliando no equilíbrio ácido-base (DE WITT & SMINIA, 1980; PINHEIRO &

AMATO, 1995, MOREIRA et al., 2003). Os nossos resultados indicam que a infecção por *A. cantonensis* induziu uma redução significativa da concentração de cálcio na hemolinfa de ambas as espécies ao longo do período estudado, o que pode estar relacionado ao uso do cálcio, tanto pelos hospedeiros como pelas larvas em crescimento, para as demandas energéticas, já que este íon é utilizado em diversas reações como co-fator enzimático.

O presente estudo mostrou alterações significantivas na concentração de cálcio na hemolinfa dos hospedeiros no decorrer da infecção, podendo ser associado às lesões teciduais causadas pelas larvas L₁ durante a penetração ativa no tecido, bem como nos períodos de transição L₁-L₂-L₃. Mostafa et al. (2007) ao estudarem *B. glabrata*/*S. mansoni* observaram este fenômeno e relacionaram o decréscimo de cálcio hemolinfático à deposição do íon nos tecidos em função da resposta inflamatória. Este comportamento também foi descrito por Tunholi-Alves et al. (2014) no estudo do modelo *B. glabrata*/*A. cantonensis*, onde os autores observaram uma queda significativa na concentração do cálcio hemolinfático e na concha no decorrer de 7 dias pós-infecção.

Os íons de cálcio são fundamentais dentro da resposta imunológica, pois participam da atividade fagocítica dos hemócitos, além de serem indispensáveis para outras células do sistema de defesa (GUILLOU et al. 2007). Por exemplo, o processo de encapsulamento em *B. glabrata* infectada pelas larvas de *A. cantonensis* descrito por Harris e Cheng (1975b) que inicialmente envolve a participação de basófilos, e subsequentemente ocorre a transformação desse agregado celular em nódulos fibrosos. Nesse aspecto, o nosso estudo corrobora com os achados dos autores, pela deposição concêntrica de hemócitos ao redor das larvas, localizadas na glândula digestiva, ovotestis e massa cefalopediosa. Destacando que pela primeira vez é descrita a ocorrência das larvas nos tecidos de glândula digestiva e ovotestis, especialmente 11 dias após a infecção. As descrições da rota de migração das larvas L₁ em *B. glabrata* relatam que os principais sítios de localização são a massa cefalopediosa e o colar do manto, embora a ocorrência da penetração ativa e passiva (pela ingestão, principal via de infecção) as larvas alcançariam estes sítios após 3 horas de infecção (HARRIS & CHENG, 1975b).

Os hemócitos circulantes em *Biomphalaria* são conhecidos como os principais efetores da resposta imune contra larvas de trematódeos (VAN DER KNAAP et al., 1990). Em conjunto com os fatores humorais essas células são responsáveis pelo reconhecimento e adesão à superfície do parasito, formação da cápsula e morte do parasito após a ativação citotóxica (DAVIDS et al., 1999). Em sua maior parte os genes de potencial imunorrelevante em *B. glabrata* estão documentados como aqueles também envolvidos com a transcrição de proteínas de adesão, estresse oxidativo, proteases e inibidores de proteases, e ligação de cálcio. De forma que os íons de cálcio são cruciais para a atividade de imunoenzimas, auxiliando na ligação e precipitação dos antígenos solúveis do parasito (GUILLOU et al., 2007).

Biomphalaria tenagophila infectada mostrou um aumento na concentração de cálcio hemolinfático a partir do 11º dia em diante, e uma redução na concentração de CaCO₃ da concha, o que pode está ligado à resposta imunológica do hospedeiro visto que neste período ocorre a transição das larvas L₁ em L₂ e também a migração para tecidos periféricos. Por outro lado, *B. straminea* apresentou uma elevação na deposição de cálcio na concha, no mesmo período, sugerindo que os produtos de

excreção/secreção dos parasitos puderam regular esse processo de hipercalcificação da concha. Sendo assim, concluímos que frente à infecção ambos os hospedeiros desenvolvem diferentes respostas para a manutenção do equilíbrio homeostático.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que a infecção de *B. tenagophila* e *B. straminea* com as larvas L₁ de *A. cantonensis* alterou:

- O conteúdo de glicogênio e galactogênio, nos tecidos de reserva da massa cefalopédiosa, glândula digestiva e glândula de albúmen, respectivamente.
- A determinação das concentrações hemolinfáticas de glicose, e dos ácidos carboxílicos, succínico, oxálico, láctico e pirúvico; assim como a atividade da enzima lactato desidrogenase mostraram que em ambos os hospedeiros houve uma transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio ao longo do período pré patente da infecção.
- A excreção dos produtos nitrogenados de uricotélico para ureotélico em ambas as espécies infectadas.
- A lesão tecidual causou elevação na concentração das proteínas totais na hemolinfa de *B. straminea*, bem como a intensa atividade das aminotransferases, AST e ALT. A infecção reduziu a concentração de proteínas totais circulantes para *B. tenagophila*, e elevou a atividade de ALT e AST.
- O metabolismo inorgânico através da determinação do conteúdo de cálcio na hemolinfa e na concha mostrou uma hipocalcificação da concha em *B. straminea* e hipercalcificação em *B. tenagophila*.

A infecção desencadeou um comportamento de compensação reprodutiva em ambos os hospedeiros, em diferentes momentos do período estudado. Alterando a relação de ovos por massa ovígera e com redução da viabilidade dos ovos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante as etapas de desenvolvimento intramolusco, as larvas de *A. cantonensis* puderam alterar significativamente a composição hemolinfática tanto em *B. straminea* quanto em *B. tenagophila*. Este período foi caracterizado por um aumento na demanda energética e no redirecionamento de rotas metabólicas, assegurando não apenas a sobrevivência do molusco, mas o completo desenvolvimento parasitário. Uma das alterações mais frequentes observadas durante a interface moluscos/helmintos parasitos é a depleção de reservas polissacarídicas em resposta ao aumento drástico na utilização de glicose hemolinfática. Esta condição conduz para uma maior taxa de desaminação de aminoácidos favorecendo o acúmulo de produtos nitrogenados de degradação, como ureia e ácido úrico, os quais se mostram associados a quadros de intoxicação e morte de seus hospedeiros em longo prazo. Tais alterações ocorreram concomitantemente à sobreposição de importantes centros enzimáticos, tais como as aminotransferases e LDH, indicando que a infecção induziu além do catabolismo proteico, a aceleração do metabolismo anaeróbico. A transição do metabolismo aeróbico para anaeróbico em hospedeiros infectados e as variações observadas nas concentrações de alguns ácidos carboxílicos (oxálico, pirúvico e succínico), tanto na hemolinfa quanto na glândula digestiva, foram fundamentais para assegurar a completa evolução do parasito em seu hospedeiro. Este cenário metabólico salienta não apenas uma adaptação fisiológica do molusco a infecção por larvas de helmintos, mas também maior susceptibilidade, uma vez que, os metabólitos gerados nesta etapa passam a ser incorporados pelo parasito em benefício ao seu desenvolvimento. Adicionalmente, todos os processos referenciados se refletem na biologia reprodutiva dos hospedeiros, que em função da drenagem energética, somados aos danos teciduais causados pelo desenvolvimento e migração das larvas no interior dos moluscos, acabam por alterar a quantidade de ovos postos, a sua viabilidade e o desenvolvimento dos moluscos eclodidos. Sendo assim, a análise da relação parasito-hospedeiro feita neste estudo nos abre outras faces de investigação. Assim como, nas investigações das regulações gênicas, que podem estar envolvidas, na hipo- ou hiper-regulação hormonal, em especial na biologia reprodutiva. Também, no que diz respeito ao sistema de defesa do hospedeiro, assim como os mecanismos de evasão do parasito. Certamente, desvendar o cenário imunológico transcorrido das interações parasito-hospedeiro é um desafio, e muito pode nos dizer a respeito da história evolutiva por de trás destas relações, além de nos permitir avançar em medidas efetivas de controle.

9. PERSPECTIVAS

Apartir dos nossos estudos podemos prosseguir nas análises entre *A. cantonensis* e seus hospedeiros intermediários. Através da investigação dos principais centros enzimáticos reguladores nas vias bioquímicas abordadas, atrelado à regulação gênica, nas diferentes fases de desenvolvimento intramolusco do parasito. Assim como, podemos avançar a nossa compreensão sobre a capacidade de defesa do hospedeiro, especialmente no processo de encapsulamento e destruição das larvas tanto nos momentos iniciais da penetração ativa e/ou ingestão, quanto na migração ao longo do período pré-patente. Também avaliara capacidade do parasito em modular a resposta do hospedeiro e no caso dos modelos *A. cantonensis*/*B. straminea* (linhagem Jaguarari-RN) e *B. tenagophila* (linhagem Andorinhas-ES) se as diferentes capacidades de adaptação metabólica são correspondentes com o sistema de defesa. Desta forma, poderemos investigar o grau de compatibilidade de polimorfismo entre o nematódeo e os hospedeiros estudados, considerando isto como o resultado do estado de equilíbrio entre a virulência do parasito e a capacidade de defesa do hospedeiro. Os estudos das interações parasito-hospedeiro formam um complexo mapeamento da história evolutiva das partes envolvidas nesta relação e são de extrema relevância para o avanço do conhecimento no que tange o delineamento de estratégias de controle, tratamento, diagnóstico das enfermidades atreladas a elas e da própria biologia dos organismos envolvidos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALICATA, J.E.; JINDRAK, K. Angiostrongylosis in the Pacific and Southeast Asia. **Springfield, Illinois: Charles C. Thomas**, 1970.

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

ANDERSON, R. C. The systematics and transmission of new and previously described Metastrongyles (Nematoda: Metastrongylidae) from *Mustela vison*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, p. 893–920, 1962.

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

AGUIAR, P.H.; MORERA , P; PASCUAL, J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 963-965, 1981.

ASH, L. R. The occurrence of *Angiostrongylus cantonensis* in frogs of New Caledonia with observations on paratenic host of metastrongyles. **Journal of Parasitology**, v. 54, p. 432–436, 1968.

ASH, L. R. Observations on the role of mollusks and planarians in the transmission of *Angiostrongylus cantonensis* infection to man in New Caledonia. **Reviews of Biological and Tropical**, v. 24, p. 163-174, 1976

AVELAR, P.M.F.; GIACOMETTI, D.; BACILA, M. Comparative levels of muscle glycolytic enzymes in mammals, fish, echinoderm and molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 60B, p. 143-148, 1978.

AZZAM, K. M.; BELAL, M. H. Survey on the nematodes isolated from aquatic snails and their potential as biocontrol agents of snails. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Cairo University**, v. 57, p. 185–198, 2006.

BACILA, M. Anapleptropic mechanisms and metabolic regulation in *Biomphalaria glabrata*. **Anais Acadêmico Brasileiro de Ciência**, v 42, 161-169, 1970.

BARCANTE, T. A.; BARCANTE, J. M. P.; DIAS, S. R. C.; LIMA, W. S. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: Emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Parasitology Research**, v. 91, p. 471–475, 2003.

BARTSCHI E, BORDMANN G, BLUM J, et al. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Switzerland. **Infection**, v 32, p.116-118, 2004.

BAUDOIN, M. Host Castration as a Parasitic Strategy. **Evolution**, v.29, p. 335-353, 1975.

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

BECKER, W. Purinemetabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.76B, p.215-219, 1983.

BECKER, W., SCHMALE, H. The ammonia and urea excretion of *Biomphalaria glabrata* under different physiological conditions: starvation, infection with *Schistosoma mansoni*, dry keeping. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.59B, p. 75-79, 1978.

BENNET, R. Jr.; NAKADA, H.I. Comparative carbohydrate metabolism of marine mollusk. The intermediary metabolism of *Mytilus Californians* and *Haliotis rufescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 24, p. 787-797, 1968.

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

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

BOEV, S. N. Protostrongylids. Fundamentals of Nematology 25, **Academy of Science of the USSR**. (Translated by Amerind Publishing Co., New Delhi, 1984), 1975.

BOLT, G.; MONRAD, J.; FRANDBSEN, F.; HENRIKSEN, P.; DIETZ, H. H. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v. 79, p. 428-430, 1993.

BOYCOTT, A. E. The habitats of land mollusca in Britain. **Journal of Ecology**, v. 22, p. 1-38, 1934.

BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. How will global climate change affect parasite-host assemblages. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 571-574, 2007.

BRYANT, C.; HINES, W.J.W.; SMITH, M.J.H. Intermediary metabolism in some terrestrial molluscs (*Pomatia*, *Helix* and *Cepaea*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 11, p. 147-153, 1964.

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

CARVALHO, O.S.; SCHOLTE, R.G.; MENDONÇA, C.L.F.; JANNOTTI-PASSOS, L.K. CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongylidae) in molluscs from harbor areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 740-746, 2012.

CHANG, S. H.; TANG, P.; WANG, L.C. A transcriptomic study on the pepsine-activated infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 179, p. 47-50, 2011.

CHIANG, P.K. Glycogen metabolism in the snail, *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 58B, p. 9-12, 1977.

CHITWOOD, J.D; CHITWOOD, M.B. Snails as host and carries of nematodes and Nematomorpha. **The Nautilus**, v. 50, p. 130-135, 1937.

CHEN HT. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g., n.sp., des rats de Canton. **Annales de Parasitologie Humaine**, v. 13, p. 312-370, 1935.

CHEN, S.N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 80, p. 398-405, 1986.

CHEN D, ZHANG Y, SHEN H, WEI Y, HUANG D, et al. Epidemiological survey of *Angiostrongylus cantonensis* in the west-central region of Guangdong Province, China. **Parasitology Research**, v. 10, p. 305–314, 2011a.

COWIE, R.H.; ROBINSON, D.G. Pathways of introduction of nonindigenous land and freshwater snails and slugs. In: RUIZ GM, CARLTON JT, editors. **Invasive species: Vectors and Management Strategies**. Washington (DC): Island Press. pp. 93–122, 2003a.

COWIE, R.H. Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. **Hawaii Journal of Medical and Public Health**, v. 72 (Supplement 2): 6–9, 2013a.

ROLL, N. A. Behavioural analysis of nematode movement. **Advances in Parasitology**, v. 13, p. 71–122, 1975.

CROOK, J. R.; FULTON, S. E.; SUPANWONG, K. The infectivity of third stage *Angiostrongylus cantonensis* larvae shed from drowned *Achatina fulica* snails and the effect of chemical agents on infectivity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 65, p. 602–605.

CROSS, J.H.; CHEN, E.R. Angiostrongyliasis. In: Murrell KD, Fried B, eds. **Food-borne Parasitic Zoonoses: Fish and Plant-borne Parasites**. New York: Springer, p. 263-290, 2007.

de JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M.M.; BOER, H.H. *Trichobilharzia ocellata* interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.65, p.91-100, 1988.

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.

EAMSOMBHANA, P. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* – a neglected disease with escalating importance. **Tropical Biomedicine**, v 31, p. 569-578, 2014.

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

el-SAADANY, M.M.; MOHAMED, A.M. Effect of infection with *Thricobilharzia ocellata* and *Schistosoma mansoni* on the ultrastructure of the albumen gland of their respective host, *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria glabrata*. **Folia Morphologica**, v. 37, p. 264-273, 1989.

FAULKNER, L. R.; BOLANDER, W. J. Acquisition and distribution of nematodes in irrigation waterways of the Columbia basin in eastern Washington. **Journal of Nematology**, v. 2, p. 362–367, 1970.

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

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

FRIED, B.; SCHATER, S.; KIM, S. Effects of *Echinostoma caproni* infection on the lipid composition of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Parasitology**, v. 19, p.53–354, 1989.

GARAERTS, W.P. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.86, p. 433-444, 1972.

GOUDSMIT, E.M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in molluscs, p. 219-243. In: FLORKIN, M.; SCHEER, B.T. (ed). **Chemical Zoology, Mollusca**, v. 7. Academic Press, New York, 567 p. 1972.

GOUDSMIT, E.M. The role of galactogen in pulmonate snails. **Malacology**, v. 6, p. 58-59, 1973.

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

GREEN, P.; DUSSART, G. B. J.; GIBSON, C. Surfacing and water leaving behaviour of the freshwater pulmonate snails *Lymnaea peregra* (Muller), *Biomphalaria glabrata* (Say) and *Bulinus jousseaumei* (Dautzenberg). **Journal of Molluscan Studies**, v. 58, p. 169-179, 1992.

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

GUILHON, J.; GAALON, A. Évolution larvaire d'un nematode parasite de l'appareil circulatoire du chien dans l'organisme de mollusques dulçaquicoles. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.268, p.612-615, 1969.

HAMMARSTEIN, O. Studies über Mucin und mucinähnliche Substanzen. **Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 36, p. 373, 1885.

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

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

HINKLE, P.C.; MCCARTHY, R.E. How cells make ATP. **Scientific American**, v. 238, p. 104-123, 1978.

HOBERG, E. P.; POLLEY, L.; JENKINS, E. J.; KUTZ, S. J. Pathogens of domestic and free-ranging ungulates: global climate change in temperate to boreal latitudes across North America. **OIE Revue de Scientifique et Technique**, v. 27, p. 511-528, 2008.

HOLLINGSWORTH, R.G.; COWIE, R.H. Apple snails as disease vectors. In: Joshi RC, Sebastian LC, eds. **Global Advances in Ecology and Management of Golden**

AppleSnails. Muñoz, Nueva Ecija, Philippines: Philippine Rice Research Institute, p. 121-132, 2006.

HORSAK, M.; CERNOHORSKY, N. Molluscdiversity patterns in Central European fens: hotspots and conservation priorities. **Journal of Biogeography**, v. 35, p. 1215–1225, 2008.

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

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

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 193-197, 2001.

HWANG, K.P.; CHANG, S.H.; WANG, L.C. Alterations in the expression level of a putative aspartic protease in the development of *Angiostrongylus cantonensis*. **Acta Tropica**, v.113, p. 289–94, 2010.

ISHAK M.M.; MOHAMED A.M.; SHRAF A. A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v53B, p.499-505, 1975.

JONES, M.; MOHANRAJ, R.; SHAUNAK, S. Eosinophilic Meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*: First Reported Case in the UK. **Advances in Clinical Neurosciences and Rehabilitation**, v 6, p. 20-21, 2007.

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.

JOOSSE, J., van ELK, R. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snails host, *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.62, p. 1-16, 1986.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. Clinical chemistry, Third ed. Mosby, St. Louis, 1996.

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

KIM, D.Y.; STEWART, T.B.; BAUER, R.W.; MITCHELL, M. *Parastrongylus*(= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. **Journal of Parasitology**, v88, p. 1024-1026, 2002.

KIM, S.; FRIED, B. Pathology effects of *Echinostma caproni* (Trematoda) in the domestic chick. **Journal of Helminthology**, v.63, p. 227-230, 2007.

KIM, J.R., HAYES, K.A., YEUNG, N.W., COWIE, R.H.. Diverse Gastropod Host of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm, Globally and with a Focus on the Hawaiian Island. **PLoS ONE** 9(5): e94969. doi:10.1371/journal.pone.0094969, 2014.

KONTRIMAVICHUS, V. L.; DELYAMURE, S. L.; BOEV, S. N. Metastrongyloids of Domestic and Wild Animals. **Fundamentals of Nematology, Academy of Science of the USSR**. (Translated by Amerind Publishing Co., New Delhi, India, 1985), 1976.

KURELEC, B. Catabolic Path of Arginine and NAD Regeneration in the Parasite *Fasciola hepatica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 51B, p. 151-156, 1975.

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

LEE, J.D.; YEN, C.M. Protease secreted by the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis* and its role in the penetration of mouse intestine. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.72, p. 831-6, 2005.

LEVENE, P.A. The mucoproteins of the snail *Helix aspersa* and *Helix pomatia*. **The Journal of Biological Chemistry**, v65, p. 638, 1925.

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

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

LIVINGSTONE, D.R.; de ZWAAN, A. Carbohydrate Metabolism of Gastropods, p. 177-242. In: HOCHACHKA, P.W. (Ed). **The Mollusca Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics**, v. 1. Academic Press, New York, 510p., 1983.

LV, S.; ZHANG, Y.; STEINMANN, P; ZHOU, X.N. Emerging angiostrongyliasis in mainland China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 161-164, 2009.

LV, S. Epidemiology of *Angiostrongylus cantonensis* and eosinophilic meningitis in the People's Republic of China. **PhD Thesis**. Basel: University of Basel, 2011.

MACKERRAS, M.J.; SANDARS, D.F. The life-history of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 1-21, pls 1-6, 1955.

MALEK, E.A.; CHENG, T.C. Medical and economic malacology. **Academic Press**, New York, 398pp., 1974.

MALDONADO, A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.; MOTA, E.M.; FERNADEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1-4, 2010.

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

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

MARSHALL, I.; Mc MANUS, D.P.; JAMES, B.L. Glycolysis in the digestive gland of health and parasitized *Littorina saxatilis* (maton) and in the daughter sporocysts of *Microphallus similis* (Jäg) (digenea: Microphallidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.49, p. 291-299, 1974.

MAY, F. Beitrage zur Kenntnis des tierschen Sinistrins. **Zeitschrift fur biologia**, v. 91, p. 215, 1931.

MINCHELA, D. J. Host-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, V. 90, P. 205-216. 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. 2ª Edição. Eitora MS – Brasília –Distrito Federal, 178 pp., 2008.

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

MOLL, A.; ZANINI, G.; RAEFF-TEIXEIRA, C. Primeiro caso de meningite eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. In: V Congresso Paulista de Infectologia, Resumo ID:CI.20, Brasil P 2006.

MORÁN, A.; GONZÁLEZ, R. Exploration of the carbohydrate metabolism in *Concholepas concholepa*. II – Glyconeogenesis and utilization of some glucidic metabolites and amino acid. **Archives of Biological and Medical Experiment**, v.4, p. 219, 1967.

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

MORLEY, N.J. Aquatic molluscs as auxiliary hosts for terrestrial nematode parasites: implications for pathogen transmission in a changing climate. **Parasitology**, v. 137, p. 1041-1056, 2010

MOTT, J. B.; HARRISON, A. D. Nematodes from river drift and surface water supplies in southern Ontario. **Hydrobiologia**, v. 102, p. 27–38, 1983.

NIELAND, M.L.; GOUDSMIT, E.M. Ultrastructural observations on galactogen formation and secretion in the albumin gland of *Helix pomatia*. **Journal of Investigation of dermatology**, v. 52, p. 392, 1969.

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

ODAIBO, A.B.; DEHINBO, A.J.; OLOFINTOYE, L.K.; FALODE, A.O. Occurrence and distribution of *Rhabditis axei* (Rhabdita: Rhabdidae) in African giant snails in southwestern Nigeria. **Helminthology**, v. 37, p. 233-235, 2000.

PARAENSE, W.L. Apertural lamellae in *Australobis glabratus*. **Proceedings of Malacology Society of London**, v. 32, p. 175-179, 1957.

PARAENSE, W.L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C.S.; BARUZZI, R.G.; SIQUEIRA, JR. W. Introdução à Geografia Médica do Brasil. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1972.

PARAENSE, W.L. A natural population of *Helisoma duryi* in Brazil. **Malacology**, v.15, p. 369-376, 1976.

PARAENSE, W.L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: CARVALHO, O.S.; ZECH-COELHO, P.M.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1 (ed) Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 285-308, 2008.

PÉREZ, M.K.; FRIED, B.; SHERMA, J. Comparison of mobile phase and HPTLC qualitative and quantitative analyses, on preadsorbent silica gel plates, of phospholipids in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) infected with *Echinostoma caproni* (Trematoda). **Journal of Planar Chromatograph**, v. 7, p. 340–343, 1995.

PILSBRY, H.A. Review of Plarnobidae of Florida, with notes on other members of the family. **Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia**, v. 86 p. 29-66, 1934.

PINCAI, T.; GARCIA, L.; DECKER, O.; MARTINI, L.; MOREIRA, J.M. Angiostrongyliasis por *Parastrongylus* (*Angiostrongylus*) *cantonensis* em Ecuador. **Biological Epidemiology Ecuador**, v.6, p. 25-32, 2009.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JUNIOR, A. ; LANFREDI, R. M. . Light and Scanning Electron Microscopy of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) (Trematoda, Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 265-275, 2003.

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

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

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

PLESH, B.; de JOHN-BRINK, M.; BOER, H.H. Histological and histochemical observations on the reproductive tract of the hermaphrodite pond snail host, *Bradybaena stagnalis*. **Netherlands Journal of Zoology**, v.21, p. 180-201, 1971.

POKORA, Z.; SZILMAN, P.; POKORA, I. Level of total protein and activities of selected enzymes in hemolymph of *Lymnaea stagnalis* (L.) (gastropoda: Pulmonata) naturally infected with digenetic fluke larvae. **Wiadomosci Parazytologiczne**, v. 39, p. 179-188, 1993.

POULIN, R. Relative infection levels and taxonomic distances among the host species used by a parasite: insights into parasite specialization. **Parasitology**, v. 130, p. 109-115, 2005.

PROCIV, P. *Angiostrongyliasis in Australia*. **Reviews of Infected Diseases**, v. 12, p. 160-161, 1990.

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

READER, T.A.J. The pathological effect of sporocysts, redia and metacercariae on the digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology**, v.63, p. 483-489, 1971.

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

SCHMALE, H.; BECKER, W. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity in starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 51B, p. 321-330, 1978.

SCHWART, K. Uber den Blutzucker der Weinbergschenecke. **Biochemistry**, v. 275, p. 262-269, 1934.

SMINIA, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studies by electron microscopy and enzyme histochemistry. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 139, p. 497-526, 1972.

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

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

SNYDER, Jr. R.; CHENG, T.C. The effect of the larvae of *Glythelminths pennsylvaniensis* (Trematoda: Brachycoeliidae) on glycogen deposition in the hepatopancreas of *Helisoma trivolvis*. **Journal of Parasitology**, v. 47, p. 52, 1961.

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

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

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

THIENGO, S. Mode of infection of Molluscs with *Angiostrongylus costaricensis* larvae (Nematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V.91, p. 277-288, 1996.

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

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

THOMPSON, S.N.; MEJIA-SCALES, V.; BORCHARDT, D.B. Physiologic studies of snail-schistosome interactions and potential for improvement of in vitro culture of schistosomes. **In Vitro Cell Development Biology**, v. 27A, p.497–504, 1991.

TUNHOLI, V. M. A.; LUSTRINO, D.; TUNHOLII-ALVES, V.M.; GARCIA, J. S.; MÊLLO-SILVA, C. C.; MALDONADO JR., A.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. . Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) infection on calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 222-226, 2011.

TUNHOLI, V. M. A.; TUNHOLII-ALVES, V.M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J.; MALDONADO JR., A.; SANTOS, M. A ; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* by High-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 403-410, 2013.

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

TUNHOLI-ALVES, VM.; TUNHOLI, V. M. A.; GÔLO, P.; LIMA, M.G.; GARCIA, J.; GUEDES, E.; MALDONADO JR., A.; 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, p. 2111-2116, 2013.

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

van ELK, R.; JOOSSE, J. The UDP-galactose4-epimerase of the albumen gland of *Lymnaea stagnalis* and the proteins from different snails albumin glands. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 59B, p. 285-288, 1981.

WALLACE, G. D.; ROSEN, L. Studies oneosinophilic meningitis. 2. Experimental infection of shrimp and crabs with *Angiostrongylus cantonensis*. **American Journal of Epidemiology**, v. 84, p. 120–131, 1966.

WALLACE, G. D.; ROSEN, L. Studies oneosinophilic meningitis. 4. Experimental infection of fresh-water and marine fish with *Angiostrongylus cantonensis*. **American Journal of Epidemiology**, v. 85, p.395–402, 1967.

WANG, L.C.; CHAO, D.; CHEN, E.R. Acquired immunity in rats against *Angiostrongylus cantonensis* infection. **International Journal of Parasitology**, v. 19, p.617–20, 1989.

WANG QP, DE-HUA L, XING-QUAN Z, XIAO-GUANG C, ZHAO-RONG L. Human angiostrongyliasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p621-630, 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.

WRIGHT, C.A. Genetic nomenclature of the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 183, p. 907-907, 1959.

WU Z, ZHU B. Characterization and function of CREB homologue from *Crassostrea ariakensis* stimulated by rickettsia-like organism. **Development of Comp Immunology**, v. 32, p. 1572–81, 2008.

YOUSIF, F.; LAMMLER, G. The mode of infection with and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde – Parasitology Research**, v. 53, p. 247–250, 1977.

ZAMMIT, V.A.; NEWSHOLME, E.A. The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from invertebrates. **Biochemistry Journal**, v. 160, p. 447-462, 1967a.