

Thales Augusto Barçante

**Aspectos do desenvolvimento de
Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905
em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**

Belo Horizonte
2006

Thales Augusto Barçante

**Aspectos do desenvolvimento de
Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905
em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Helminologia.

Orientador: Walter dos Santos Lima

Co-orientadora: Teofânia Helena Dutra Amorim Vidigal

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
2006

043 Barçante, Thales Augusto
B242a Aspectos do desenvolvimento de angiostrongylus vasorum
(Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em biomphalaria glabrata (Say, 1818).
[manuscrito] / Thales Augusto Barçante. – 2006.
151 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Walter dos Santos Lima. Co-orientador: Teofânia Helena
Dutra Amorim Vidigal.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Parasitologia.

1. Angiostrongylus vasorum - Teses. 2. Biomphalaria glabrata -
Teses. I. Lima, Walter dos Santos. II. Vidigal, Teofânia Helena Dutra
Amorim. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de
Parasitologia. IV. Título.

CDU:576.88/.89

Agradecimento Especial

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia,
do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, na pessoa do *Prof. Pedro Marcos Linardi*, pela oportunidade,
apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

**À minha família, minha fortaleza, meu porto seguro.
A você Jozi esposa dedicada, encantadora e maravilhosa.
À Ana Carolina que chegou ao meio desta caminhada para alegrar meus dias.**

AGRADECIMENTOS

Iniciar os agradecimentos em uma tese para mim é um ato bastante difícil e que deve ser pensado com bastante cautela. Durante a trajetória de execução deste trabalho muitas foram as pessoas que permaneceram em minha companhia e que efetivamente seriam dignas de serem lembradas. Entretanto, temo pelo esquecimento, mas prometo o máximo de esforço para não cometer injustiças.

Primeiramente, inicio por aquele que me confiou esta difícil tarefa, meu Orientador. Agradecer ao Walter não é tarefa árdua ou penosa. Não sei se atendi as expectativas depositadas em mim, mas trabalhei da melhor maneira que foi possível. Sem dúvida uma das virtudes dele é acreditar que somos profissionais e que devemos dar conta do recado. E foi assim nossa relação, muito profissional. Sendo assim, agradeço pela oportunidade, pelo incentivo e apoio na hora de tomar as decisões e de me ensinar que é preciso saber caminhar com as próprias pernas mesmo que isso possa parecer cansativo.

O papel do Dr. Lenzi, sem dúvida alguma foi fundamental. Aliás, foi em uma conversa com ele que definimos o rumo desta tese. Infelizmente ele não pôde acompanhar da maneira que sei que gostaria, mas mesmo assim tenho profunda gratidão por ter me encorajado a encarar este desafio. Além disso, disponibilizou a estrutura do seu laboratório para realização dos procedimentos com histologia. Sinto-me grato e profundamente honrado por ter podido conhecer e conviver mesmo que brevemente com tão sensacional figura humana. À você, meu amigo Lenzi, muito obrigado.

Aproveitando o ensejo, não posso me furtar de agradecer ao apoio e ajuda do pessoal que trabalha no laboratório supracitado. Sem eles, este e muitos outros trabalhos que passam por lá não teriam saído do papel.

Ainda agradecendo às pessoas que marcadamente atuaram junto a mim, agradeço a Dra. Teofania por ter aceitado a co-orientação. Muitos dos seus conselhos e dicas jamais serão esquecidos e com certeza fortaleceram minha formação. Em seu laboratório também com a ajuda e presteza do Daniel, muitas vezes disponível para eventuais coletas e Langia que me

ajudou a interpretar as lâminas com os cortes dos caramujos bem como a fotografar o material.

Durante a execução do trabalho, surgiu a oportunidade, por intermédio da Dra. Teofania, de conhecer o Dr. Alfredo. Sem ter qualquer relação direta com o projeto, ele disponibilizou e abriu as portas do seu laboratório para que pudéssemos capturar as imagens em seu fotomicroscópio. Agradeço pelo desprendimento e censo de solidariedade em um momento muito importante do trabalho.

Outras duas pessoas que devo minha gratidão são o Ricardo e o Helton, ou melhor, Dr. Ricardo e Dr. Helton. Ambos foram importantes discutindo alguns resultados e ajudando durante o processo de análise celular. Vocês têm um futuro brilhante e sou feliz de poder ser amigo de vocês, muito obrigado mesmo. Além disso, falamos muita bobagem juntos.

Boa parte deste trabalho, ou melhor, o material (caramujos), foi fornecido sempre que possível pelo GIDE e que sem a estrutura que possui este trabalho seria inviável. Desta forma agradeço a Profa. Déborah e aos funcionários pela contribuição. Da mesma forma agradeço a ajuda fornecida pela Cinthia durante o protocolo de coloração de células.

Gostaria de agradecer aos professores Alan Lane de Melo e Marcos Pezzi Grimarães pela avaliação do exame de qualificação e substanciais sugestões que contribuíram sobremaneira com este trabalho. Posteriormente, durante a relatoria da tese, mais uma vez fiquei surpreendido com tamanha disponibilidade do Prof. Alan que me recebeu para discutirmos alguns pontos que haviam ficado pendentes, acredito ter revisto alguns conceitos e como sempre aprendido um pouco mais com ele.

Qual é o estudante do Programa de Parasitologia que consegue desenvolver seu trabalho sem os préstimos e conselhos da Sumara. Na verdade ela é a alma administrativa e que faz os alunos andarem nos eixos, sem levantar a voz ou discutir uma única vez. Querida, você sabe mais do que ninguém o quanto sou grato pela sua ajuda, pelas matrículas e por manter nossa vida acadêmica em dia, beijão e muito obrigado.

Aproveito para agradecer aos amigos que me suportaram por este tempo de doutorado. Sei que tenho um temperamento difícil e até certo ponto agressivo, por isso agradeço por me

aturarem. Também não vou me desculpar ou pedir súplicas, vocês sabem muito bem que não é do meu feitio. Obrigado Edna, Silvio Divino, César Cavalcanti, Maria, Hudson, Leo, Renata, Sydnei, Silvia, Luiz, Sheila e Wander.

Um outro lado muito importante em qualquer etapa da nossa vida é a família. E nesse ponto acho que tenho sorte, pois, fui muito bem acolhido. Apesar de não terem a obrigação, faz 11 anos que estou infiltrado entre os Muniz de Paiva. Sei que a cada conquista que tenho, eles comemoram como se fossem deles. Para mim é uma satisfação enorme ser parte integrante desta família. Por isso obrigado Wal, Lê, Dona Zilma e Seu Valtencir por terem me acolhido como seu filho.

Partindo para o lado Barçante, apesar da distância sei que torcem por mim e que ficam felizes a cada doutor que a família produz, afinal já somos quatro. A irmandade, apesar do temperamento difícil (italiano), é sólida. Infelizmente nossa matriarca não está mais entre nós para aplaudir seus filhos. Nosso pai fez o que pôde e eu o amo incondicionalmente.

Finalizando, tenho mais duas pessoas que devo todo o meu sucesso, tanto pessoal quanto profissional. Primeiramente, minha filha Carol. Tanto me acompanhou nos momentos de escrita do trabalho que hoje aos 2 anos e sete meses já pretende defender uma tese com sapos e minhocas, tema escolhido por ela mesma. Coitada, como as crianças são influenciadas por nós. Tenho que agradecer a ela cada momento em que me interrompia no computador pedindo muitas vezes que simplesmente deixasse ela se aproximar. Filha você me alegra a cada dia e me faz sentir ainda mais realizado, obrigado pela sua companhia e desculpe-me pela ausência, papai te ama.

Finalmente ELA, minha amada, idolatrada, salve, salve, esposa. Devo minha vida à você. Meu sucesso é seu. Sua maneira tenaz de agir me estimula e faz crescer. Seu vigor em trabalhar me inveja. Seu amor por mim me surpreende. Aliás, ninguém mais do que você sabe o que é me tolerar. Esta tese com certeza é nossa. Não vou enumerar todos os pontos, pois escreveria um romance. Saiba que serei sempre grato pela cumplicidade, desprendimento e solidariedade. Sei que muitas vezes deixou de fazer suas coisas para que eu pudesse terminar este trabalho. Você é fundamental em minha vida, te amo.

Como é impossível citar todos, gostaria de neste momento, quase finalizando, fazer um agradecimento coletivo. Assim, os funcionários, estudantes e professores que estavam ao nosso lado no dia-a-dia, convivendo com nossas angústias sintam-se abraçados.

Quem é o homem que vive sem fé? Assim, agradeço à Deus por ter me iluminado e dado forças para poder finalizar esta tese. Além disso, basta olhar para minha vida e ver que sou abençoado, pois quem tem Carolina e Joziana em sua vida é agraciado por Deus.

*Não existem erros, apenas lições.
O crescimento é um processo de tentativa e erros: experimentação.
As experiências que não deram certo fazem parte do processo, assim como as bem-sucedidas.
As respostas estão dentro de você. Tudo o que tem a fazer é analisar, ouvir e acreditar.*

RESUMO

Angiostrongylus vasorum é um nematóide parasito de canídeos domésticos e silvestres, cuja forma adulta pode ser encontrada no ventrículo direito, artérias pulmonares e ramificações. O ciclo envolve uma fase no ambiente e a participação de caramujos aquáticos e terrestres como hospedeiros intermediários. No presente trabalho objetivou-se determinar os locais de penetração e a via migratória de *A. vasorum* em *Biomphalaria glabrata* e avaliar a reação perilarvar, em diferentes pontos da infecção, especificando a composição celular envolvida. Os aspectos inerentes à relação parasito-hospedeiro, tanto no que tange aos mecanismos envolvidos na penetração, como aqueles relacionados à emergência de larvas infectantes (L3) para o ambiente. Também foi elucidada a via migratória que pode ser descrita de duas maneiras distintas, dependendo da via de penetração das larvas de primeiro estágio (L1). À análise dos cortes histológicos, verificou-se que a infecção ocorre pela penetração de L1 pelas partes moles dos moluscos, atingindo a camada fibromuscular da região cefalopodal, onde completam o desenvolvimento até L3. Alternativamente, pode ocorrer a ingestão de L1, que necessariamente penetra na mucosa intestinal, podendo atingir as vísceras quer pela penetração direta ou carreadas pela hemolinfa. Verificou-se ainda que o desenvolvimento até L3 pode ocorrer em diversos órgãos e tecidos do molusco, e estes processos (infecção e desenvolvimento) são diretamente influenciados pela temperatura durante a infecção e manutenção dos moluscos. Pode-se verificar que a partir de 4h ocorrem alterações significativas na composição celular da hemolinfa, em resposta a formação de uma reação perilarvar e constituição do granuloma, com acentuada celularidade em uma das faces da larva, e se inicia às 5h, ficando bem caracterizado aos 20 dias após infecção. A partir dos 30 dias após a infecção tem início um processo de degeneração do granuloma perilarvar e o aparecimento de larvas livres nas cavidades do molusco 60 dias após a infecção.

ABSTRACT

Angiostrongylus vasorum is a nematode parasite of domestic and wild canids, which the adult stage may be found in the right heart ventricle, lung arteries and its branches. Part of the parasite cycle occurs in the environment with the involvement of aquatic and terrestrial snails as intermediate hosts. In the present study, it was aimed to determine the sites of penetration and the migratory route of *A. vasorum* in the *Biomphalaria glabrata* snail specie, evaluating the perilarval reaction in several points of infection and the cellular composition involved. In addition, some aspects of host-parasite relationship, in special those related to infective larvae (L3) release to the environment was identified. The migratory route was elucidated, which may be described in two different approaches, according to the way of penetration of first stage larvae (L1). The histological analysis showed that infection occurs by the penetration of L1 in the soft parts of the snails, reaching the fibromuscular layer of the cephalopodal region where they complete the development to L3. Alternatively, the L1 ingestion may occur, which must penetrate into intestinal mucosa reaching the internal organs by direct penetration or carried out in the hemolymph. It was also observed that L3 development may occur in several organs and tissues of the snail. Moreover, we demonstrate that infection process and larval development are influenced by the temperature during infection time and by maintenance of snails. Four hours after infection by *A. vasorum*, significative alterations in the cellular composition of the hemolymph were observed in response to the perilarval reaction and granuloma formation. A high cellularity was observed in one face of the larvae, which starts from 5 hours and it is well characterized 20 days after infection. From 30 days after infection, a degeneration process of the perilarval granuloma was initiated and free larvae were observed in the snail cavities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental sob luz natural e no escuro.....	57
Figura 2 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 25W.....	58
Figura 3 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 40W.....	60
Figura 4 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 60W.....	61
Figura 5 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 100W.....	62
Figura 6 - Temperatura da água durante o processo de exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> às larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> sob diferentes estímulos luminosos.....	64
Figura 7 – Temperatura da água das cubas de manutenção de caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> infectadas por larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	64
Figura 8 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e 10°C.....	66
Figura 9 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e 20°C.....	67
Figura 10 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e 30°C.....	68
Figura 11 – Número médio de larvas de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> trinta dias após exposição a diferentes meios de infecção.....	70
Figura 12 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 10°C.....	72
Figura 13 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 20°C.....	73
Figura 14 – Número médio de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 30°C.....	75
Figura 15 – Número médio de ovos de <i>Biomphalaria glabrata</i> contados até 30 dias após a infecção por <i>Angiostrongylus vasorum</i>	77

Figura 16 – Número médio de larvas de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas de caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> após trinta dias de contagens de seus ovos.....	78
Figura 17 – Somatório do número de L3 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> emergidas de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 30 dias de infecção com 1×10^3 L1 de <i>A. vasorum</i>	82
Figura 18 – Somatório do número de L3 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> emergidas de <i>Biomphalaria glabrata</i> , sob diferentes estímulos, após 30 dias de infecção com 1×10^3 L1 de <i>A. vasorum</i>	83
Figura 19 – Número total de L3 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> emergidas após diferentes estímulos e número total de L3 recuperadas em <i>Biomphalaria glabrata</i> pelo método de Baermann.....	84
Figura 20 – Número total médio de hemócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> até 72 horas após a exposição com larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	86
Figura 21 – Número total médio de hemócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> dos 10 aos 60 dias após a exposição com larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	87
Figura 22 – Representação gráfica por citometria de fluxo das populações de hemócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectadas por larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	89
Figura 23 – Percentual médio de células das subpopulações de hemócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> até 72 horas após a infecção por larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	90
Figura 24 – Percentual médio de células das subpopulações de hemócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> dos 10 aos 60 dias após a infecção por larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de L3 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> emergidas de <i>Biomphalaria glabrata</i> submetidas a diferentes estímulos.....	80
---	----

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1 – 0,5 hora de exposição.....	98
Prancha 2 – 0,5 hora de exposição.....	100
Prancha 3 – 1 hora de exposição.....	102
Prancha 4 – 2 horas de exposição.....	104
Prancha 5 – 2 horas de exposição.....	106
Prancha 6 – 3 horas de exposição.....	108
Prancha 7 – 3 horas de exposição.....	110
Prancha 8 – 4 horas de exposição.....	112
Prancha 9 – 5 horas de exposição.....	114
Prancha 10 – 6 horas de exposição.....	116
Prancha 11 – 8 horas de exposição.....	118
Prancha 12 – 12 horas de exposição.....	120
Prancha 13 – 24 horas de exposição.....	122
Prancha 14 – 24 horas de exposição.....	124
Prancha 15 – 48 horas de exposição.....	126
Prancha 16 – 48 horas de exposição.....	128
Prancha 17 – 6 dias após a exposição.....	130
Prancha 18 – 6 dias após a exposição.....	132
Prancha 19 – 14 dias após a exposição.....	134
Prancha 20 – 14 dias após a exposição.....	136
Prancha 21 – 20 dias após a exposição.....	138
Prancha 22 – 20 dias após a exposição.....	140
Prancha 23 – 20 dias após a exposição.....	142
Prancha 24 – 30 dias após a exposição.....	144
Prancha 25 – 60 dias após a exposição.....	146
Prancha 26 – 60 dias após a exposição.....	148
Prancha 27 – 60 dias após a exposição.....	150
Prancha 28 – Controle sem infecção.....	152

SUMÁRIO

1. Introdução -----	20
1.1 – Taxonomia	22
1.2 – Distribuição geográfica	23
1.3 – Morfologia	24
1.3.1 – Adultos	24
1.3.2 – Larvas	25
1.4 Biologia	25
1.4.1 – Hospedeiro definitivo	25
1.4.2 – Hospedeiro intermediário	26
1.5 – Classificação dos Moluscos	29
1.6 – Sistema de defesa interno dos moluscos	30
1.6.1 – Células endoteliais	30
1.6.2 – Fagócitos fixos	30
1.6.3 - Hemócitos	30
1.6.3.1 – Hemócitos residentes ou teciduais	31
1.6.3.2 – Hemócitos circulantes	31
1.7 – Fenotipagem celular	33
2. Justificativa -----	35
3. Objetivos -----	37
3.1 – Objetivo geral	38
3.2 – Objetivos específicos	38
4. Material e Métodos -----	40
4.1 – Obtenção de larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	41
4.2 – Infecção de moluscos	42
4.3 – Obtenção de larvas de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	42
4.4 - Experimentos	43
4.4.1 – Estímulo luminoso	43
4.4.2 – Estímulo térmico	44
4.4.3 – Efeito do meio	45
4.4.4 – Temperatura de manutenção na recuperação de L3 de <i>A. vasorum</i>	46
4.4.5 – Ovoposição de <i>B. glabrata</i> infectada por <i>A. vasorum</i>	47
4.4.6 – Emergência de L3 a partir de <i>B. glabrata</i>	47
4.4.6.1 – Infecção de <i>B. glabrata</i>	47
4.4.6.2 – Emergência de L3	47
4.4.6.3 – Viabilidade e infectividade de L3 de <i>A. vasorum</i>	48
4.4.7 – Resposta hemocitária de <i>B. glabrata</i> frente à infecção por <i>A. vasorum</i>	49
4.4.7.1 – Composição celular da hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectadas	49
4.4.7.1.1 – Infecção dos moluscos	49
4.4.7.1.2 – Coleta de células na hemolinfa e determinação da composição celular	49
4.4.7.1.3 – Caracterização das subpopulações de hemócitos e perfil celular na hemolinfa	50
4.4.8 – Estudo das vias de infecção, rota migratória e preparação histológica	51

4.4.8.1 – Desidratação	51
4.4.8.2 - Emblocamento	52
4.4.8.3 - Desparafinização	52
4.4.8.4 - Hidratação	52
4.4.8.5 - Coloração	52
4.4.8.6 - Montagem	52
4.4.8.7 - Documentação	53
4.5 – Delimitação estatístico	54
5. Resultados -----	55
5.1 – Parâmetros pré-infecção	56
5.1.1 – Recuperação de larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> a partir de <i>B. glabrata</i> infectadas sob diferentes condições	56
5.1.1.1 – Estímulo luminoso	56
5.1.1.2 – Estímulo térmico	65
5.1.1.3 – Influência do substrato	69
5.2 – Parâmetros pós-infecção	71
5.2.1 – Temperatura de manutenção	71
5.2.1.1 – Temperatura de 10°C	71
5.2.1.2 – Temperatura de 20°C	71
5.2.1.3 – Temperatura de 30°C	74
5.2.1.4 – Temperatura de 37°C	74
5.2.2 – Interferência da infecção por <i>A. vasorum</i> sobre a ovoposição de caramujos <i>B. glabrata</i>	76
5.3 – Emergência de L3 de <i>A. vasorum</i>	79
5.3.1 – Grupo 1	79
5.3.2 – Grupo 2	79
5.3.3 – Grupo 3	79
5.3.4 – Grupo 4	79
5.3.5 – Morfometria das larvas que emergiram	80
5.3.6 – Viabilidade e infectividade de L3 de <i>A. vasorum</i>	81
5.4 – Resposta hemocitária de <i>B. glabrata</i>	85
5.4.1 – Composição celular da hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectadas	85
5.4.2 – Caracterização das subpopulações de hemócitos e perfil celular da hemolinfa	88
5.5 – Via migratória de <i>A. vasorum</i> e resposta tecidual de <i>B. glabrata</i>	92
5.5.1 – Descrição das preparações histológicas	92
5.5.1.1 – 0,5 hora	92
5.5.1.2 – 1 hora	92
5.5.1.3 – 2 horas	92
5.5.1.4 – 3 horas	92
5.5.1.5 – 4 horas	93
5.5.1.6 – 5 horas	93
5.5.1.7 – 6 horas	93
5.5.1.8 – 8 horas	93
5.5.1.9 – 12 horas	93
5.5.1.10 – 24 horas	94
5.5.1.11 – 48 horas	94
5.5.1.12 – 6 dias	94
5.5.1.13 – 14 dias	95

5.5.1.14 – 20 dias	95
5.5.1.15 – 30 dias	95
5.5.1.16 – 60 dias	96
5.5.1.17 - Controle	96
6. Discussão -----	153
6.1 – Relação parasito-hospedeiro	154
6.2 – Emergência de larvas de terceiro estágio de <i>A. vasorum</i>	157
6.3 – Resposta hemocitária d via migratória	159
6.4 – Vias de penetração e migração	161
7. Conclusões -----	165
8. Referências Bibliográficas -----	167

1 - INTRODUÇÃO

Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, é um nematóide protostrongilídeo parasito de cães domésticos e canídeos silvestres. O parasito adulto pode ser encontrado no ventrículo direito, artérias pulmonares e suas ramificações, com conseqüências graves para o hospedeiro definitivo. A doença está associada à ocorrência de tosse, dispnéia, intolerância ao exercício, perda de peso, vômitos, sinais neurológicos, deficiências cardíacas e morte (Oliveira-Jr et al., 2005).

Desde o primeiro relato de sua ocorrência, feito na França, o parasito vem sendo registrado em diversos países da Europa, África e Américas, com regiões enzoóticas bem estabelecidas e casos esporádicos sendo registrados paralelamente. Todavia, estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de *A. vasorum* em diversas regiões antes consideradas indenes (Morgan et al., 2005).

O ciclo clássico, descrito para o parasito é do tipo heteroxeno, no qual várias espécies de moluscos aquáticos e terrestres podem servir como hospedeiro intermediário. Os moluscos se infectam pela ingestão de larvas de primeiro estágio do parasito que saem nas fezes dos hospedeiros definitivos infectados. As larvas passam por duas mudas intramolusco até atingir o terceiro estágio evolutivo (L3) que é infectante para o cão (Guilhon, 1960). Este por sua vez pode adquirir a infecção ingerindo os moluscos contendo a L3 no seu interior, ou através da ingestão do hospedeiro paratênico, como a rã (Bolt et al., 1994).

Estudos recentes têm demonstrado que existem várias dúvidas em relação ao ciclo e a transmissão do *A. vasorum* que ainda necessitam ser elucidadas (Morgan et al., 2005). Embora várias espécies de moluscos sejam susceptíveis à infecção, pouco se sabe sobre os fatores biológicos, sazonais e espaciais que interferem na infecção do hospedeiro intermediário.

Além disso, o desconhecimento dos mecanismos biológicos e temporais envolvidos na emergência de larvas infectantes de *A. vasorum* do hospedeiro intermediário, dificultam a elucidação do real papel da dispersão dos moluscos na epidemiologia da angiostrongilose canina culminando no estabelecimento de novos focos enzoóticos (Bourquet et al., 2002; Ablad et al., 2003; Morgan et al., 2005).

Desta forma, novos estudos sobre a dinâmica do *A. vasorum* no ambiente e no hospedeiro intermediário tornam-se essenciais para o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro que possam efetivamente contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle que visem o não estabelecimento de novos focos, assim como contribuir para o entendimento de fatores físicos e biológicos que possam interferir na infecção do hospedeiro intermediário e consequentemente na distribuição de *A. vasorum*.

1.1 – TAXONOMIA

O primeiro relato da ocorrência de *Angiostrongylus vasorum* foi feito por Serres em 17 de maio de 1853. Na ocasião foram encontrados alguns nematóides parasitando o coração e pulmões de um cão, que havia morrido e fora necropsiado na Escola de Veterinária de Toulouse, na França (Serres, 1854). Em estudos posteriores, Baillet (1866) fez a primeira descrição taxonômica do parasito, denominando-o *Strongylus vasorum* e, posteriormente, Kamensky (1905) ao fazer a revisão taxonômica da espécie, concluiu que o parasito descrito por Baillet em 1866, deveria ser classificado como *Angiostrongylus vasorum*.

Em uma revisão da sistemática e re-descrição do gênero *Angiostrongylus*, Costa et al., 2003 baseado em caracteres observados à microscopia óptica e eletrônica de varredura concluíram que são sinônimos para a espécie: *Strongylus vasorum* Baillet, 1866; *Entomozoa filaria cardiaca* Bossi, 1871; *Haemonchus vasorum* (Baillet, 1866) Sluiter & Swellengrebel, 1912; *Haemostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Raillet & Henry, 1907; *Haemostrongylus railletii* Travassos, 1927; *Angiostrongyllus railletii* (Travassos, 1927) Doughert, 1946; *Angiocaulus railletii* (Travassos, 1927) Grisi, 1971.

Segundo a revisão de Costa et al., (2003) e levando-se em consideração a sistemática molecular (Blaxter et al., 1998), a classificação fica então:

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Strongylida

Superfamília Metastrongyloidea

Família Protostrongylidae

Subfamília Angiostrongylinae

Gênero: *Angiostrongylus* Kamensky, 1905

Espécie: *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905

1.2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O *A. vasorum* é um parasito de ampla distribuição geográfica, sendo que as regiões do Mediterrâneo (Poli et al.,1984), oeste da Alemanha (Pallaske, 1967), sudoeste da França (Guilhon & Cens, 1973), Irlanda (Roche & Kelliher, 1968; Dodd, 1973, Jacobs & Prole, 1975; Lynch, 1977; Williams, 1985; Martin et al.,1993) sudoeste da Inglaterra (Jones et al.,1980; Simpson & Neal, 1982; Cobb & Fisher, 1990; Simpson, 1996) são consideradas as principais áreas enzoóticas deste nematóide. Casos esporádicos foram observados em cães e ou canídeos silvestres na Austrália (Roberts, 1940); Rússia (Chertkova, 1962 *apud* Bessa, 1996); África (Bwangamoi, 1972); Espanha (Tarazona, 1974; Acedo et al., 1979; Alvarez et al., 1991; Segovia et al., 2001); Itália (Poli et al.,1984); Dinamarca (Finnerup, 1983; Koch & Bolt, 1990; Koch et al., 1992; Bolt et al., 1992; Pedersen et al.,1995; Willingham, 1996; Saeed, 2005); Estados Unidos e Canadá (Williams et al.,1985; Perry et al.,1991); Suíça (Eckert&Lammler, 1972; Ribiere et al., 2001), Grécia (Diakore, 1995).

Embora não existam dados sobre a prevalência do *A. vasorum* no Brasil, trabalhos têm demonstrado sua ocorrência em alguns estados. O primeiro relato do parasitismo de canídeos por *A. vasorum*, foi realizado por Travassos (1927), quando descreveu *Haemostromylus railliet* (= *A. vasorum*) recuperado do ventrículo direito e artéria pulmonar de raposas mato (*Cerdocyon thous azarae*), provenientes do município do Rio de Janeiro - RJ.

Em 1961, Gonçalves relatou, pela primeira vez no Brasil, *A. vasorum* parasitando cães domésticos no Rio Grande do Sul. Posteriormente, foram relatados casos de infecções

naturais por: Langenegger et al. (1962) que registraram a ocorrência de *A. vasorum* em dois cães naturalmente infectados, provenientes do município do Rio de Janeiro; Fehringer & Fiedler (1977) que citaram a ocorrência de dois casos de *A. vasorum* em cães no município de Salvador-BA e Giovanonni et al. (1985) que relataram a ocorrência de *A. vasorum* em um cão adulto, procedente do interior do Estado do Paraná.

Em 1985, Lima et al. realizaram a descrição morfológica de espécimes de *A. vasorum*, recuperados das artérias pulmonares de dois cães, procedentes do município de Caratinga – MG. Na ocasião, os autores recuperaram L1 de *A. vasorum* provenientes das fezes de um dos animais e realizaram a infecção experimental de moluscos da espécie *B. glabrata*. Posteriormente, Lima et al. (1994) relataram a infecção natural por *A. vasorum* em *Dusicyon vetulus* na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

1.3 – MORFOLOGIA

1.3.1 – Adultos

Apresentam corpo delgado e alongado, ligeiramente atenuado nas extremidades, coloração esbranquiçada ou rósea quando recém-colhidos. A cutícula fina e transparente, com órgãos genitais de aspecto helicoidal em torno do tubo digestivo de coloração esbranquiçada com a tonalidade rósea ou acinzentada. Os machos apresentam variação de 11,219 a 13,912 mm de comprimento e de 0,21 a 0,29 mm de largura, apresentando a extremidade posterior levemente recurvada ventralmente. Bolsa copuladora presente e raios bursais evidentes. As fêmeas são maiores e mais robustas, variando de 14,175 à 17,696 mm de comprimento e de 0,21 à 0,35mm de largura (Lima et al., 1985; Costa, 1992).

As medidas realizadas por vários autores revelam pequenas variações quanto ao tamanho do helminto adulto (Rosen et al., 1970; Guilhon & Cens, 1973; Costa et al., 2003). Segundo Costa (1992), estas medições servem apenas para mostrar que as variações são possíveis de ocorrer e que não devem ser utilizadas como base para separação específica.

1.3.2 - Larvas

As larvas de primeiro estágio (L1) possuem a extremidade anterior arredondada, com cutícula transparente e o esôfago é do tipo filarióide (Guilhon & Cens, 1973). O limite entre o esôfago e o intestino não é muito bem definido e o tamanho da larva é variável. Entretanto, Rosen et al. (1970) relatam que o esôfago desta fase larval é do tipo rabdítóide e que o anel nervoso está na altura do poro excretor ou posterior a este. A cauda é fina e possui um entalhe dorsal e uma pequena ondulação ventral. O ânus é ventral. O primórdio genital é oval e está situado na face ventral do intestino (Guilhon & Cens, 1973).

As larvas de segundo estágio (L2) de *A. vasorum*, segundo Guilhon & Cens (1973), são pouco móveis, possuem a forma de um arco e podem ser encontradas dentro de uma reação tecidual. Estas larvas possuem grânulos que conferem a cor marron às células intestinais. Apresentam um comprimento que varia de 420 a 450 µm e largura de 42 µm. Bessa et al. (2000) relataram que em algumas larvas podem ser vistas a bainha de L1. Estes autores observaram que o comprimento das L2 variou de 418,2 a 454,5µm e a largura de 30 a 38,2 µm.

A larva de terceiro estágio (L3), que é a forma infectante para o hospedeiro definitivo, apresenta algumas diferenças. De acordo com Guilhon & Cens (1973), esta larva apresenta um par de estiletos quitinizados dispostos longitudinalmente na região anterior com comprimento de 15 a 16µm. A cauda apresenta um apêndice digitiforme com cerca de 2µm de comprimento. O esôfago é do tipo filarióide e já não apresenta mais os grânulos de reserva, fazendo então com que seu intestino seja transparente. O ânus é localizado ventralmente. O anel nervoso está localizado anterior ao poro excretor. Apresenta um primórdio genital. É uma larva bastante móvel. Rosen et al. (1970) relatam a existência de uma estriação transversal na cutícula desta larva que pode ser melhor evidenciada na cauda.

1.4 - BIOLOGIA

1.4.1 – Hospedeiro definitivo

Desde sua descrição, têm-se demonstrado a ocorrência de *A. vasorum* parasitando o ventrículo direito, artéria pulmonar e ramificações, de cães domésticos e diversos canídeos silvestres, tais como: raposa (*Cerdocyon thous azarae*) (Travassos, 1927), raposa do Saara (*Fennecus zerda*), raposa americana (*Vulpes vulpes*) (Rosen et al., 1970; Eckert & Lämmler, 1972), raposa do campo (*Dusicyon vetulus*) (Lima et al., 1994).

Além de canídeos, *A. vasorum* também foi relatado parasitando mustelídeos (*Meles meles*) (Torres et al., 2001) e (*Tayra barbara senex*) (Yamaguti, 1961), além do gato doméstico (*Felis catus*) (Dias, 2006).

Após os cães ingerirem as larvas infectantes, estas penetram na parede do trato digestivo migram até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda de L3 para larva de quarto estágio (L4), por volta do terceiro dia de infecção e a muda de L4 para larva de quinto estágio (L5), em torno do quinto dia de infecção. As L5 alcançam a corrente sanguínea e chegam ao coração. No décimo dia, os adultos imaturos podem ser encontrados no ventrículo direito e nas artérias pulmonares. Os helmintos atingem a maturidade sexual por volta do trigésimo dia de infecção nas artérias pulmonares onde ocorre a cópula e início da postura de ovos não embrionados. Nas arteríolas pulmonares ocorre o embrionamento dos ovos e formação das L1 que eclodem, passam ativamente para os alvéolos, podendo ser expelidas, intermitentemente, junto a secreções pulmonares ou então serem deglutidas e eliminadas junto às fezes a partir do vigésimo oitavo dia de infecção, caracterizando o período pré-patente (Guilhon & Cens, 1973; Bwangamoi, 1974; Mahaffey et al., 1981; Patteson et al., 1993).

1.4.2 – Hospedeiro intermediário

A demonstração da participação de moluscos no ciclo de *A. vasorum* foi verificada pela primeira vez por Guilhon (1960), ao encontrar lesmas do gênero *Arion*, naturalmente infectadas, com larvas do parasito capazes de infectar o cão. Somente em 1973, Guilhon & Cens descreveram o desenvolvimento dos estádios evolutivos de *A. vasorum* em cães e moluscos, comprovando que o molusco ao ingerir L1 do parasito que saem nas fezes de cães infectados, passa a fazer parte do ciclo como hospedeiro intermediário, no qual ocorrem as mudas de L1 para larva de segundo estágio (L2) e de L2 para L3, que é a forma infectante para o cão.

Em 1965, Guilhon infectou experimentalmente *Arion rufus* com L1 de *A. vasorum*, que foram mantidos após infecção sob temperatura variando de 18 e 23°C. O autor observou que até o quarto dia a L1 cresce em média 200 µm e são imóveis ou quase imóveis, ficando enroladas dentro da musculatura do molusco. Neste mesmo experimento, observou que a muda para L2 ocorreu após sete dias de infecção e que a muda para L3 ocorreu aos 17 dias após a infecção.

De um total de treze espécies de moluscos testadas, sete (*Helix aspersa*, *H. pomatia*, *Cepaea nemoralis*, *Arianta arbustorum*, *Euparypha pisana*, *Succinea putris* e *Cochlodina laminata*) mostraram-se suscetíveis à infecção por *A. vasorum*, sendo encontradas L3 entre 16 e 17 dias após infecção, quando os moluscos foram mantidos em temperatura entre 18 e 23°C (Guilhon & Afghahi, 1969).

Em *Biomphalaria glabrata* mantidas em temperatura entre 26 e 27°C, a muda de L1 para L2 ocorre por volta do 7º ou 8º dia após infecção e muda para L3 em torno do 14º ou 15º dia (Guilhon & Gaalon, 1969). Guilhon & Cens (1973) verificaram que em *B. glabrata* mantidas à temperatura de 25-26°C, larvas de *A. vasorum* podiam ser observadas principalmente nos músculos pediais e no manto que forra a cavidade pulmonar e que, em infecções intensas, larvas eram encontradas em outros órgãos (glândula digestiva e ovotestis).

Rosen et al. (1970) demonstraram que em *B. glabrata*, os inóculos de 3000, 1250 e 620 L1 por caramujo promovem uma mortalidade de 88%, 76% e 12% respectivamente. Após nove dias a mortalidade aumentou, chegando a 97%, 76% e 42%. O desenvolvimento até L3 durou 16 dias em temperatura de 24°C, entretanto, não foi estudado o processo de desenvolvimento larval intra-molusco. Em infecções experimentais, à temperatura de 23 a 25°C, os moluscos terrestres: *Laevicaulus alte*, *Bradybaena similaris*, *Subulina octona*, *Prosopoeas javanicum*, *Deroceras agrestes*, *Deroceras laeve* e *Vitrea diaphana* demonstraram-se suscetíveis à infecção por *A. vasorum*.

Sauerlander & Eckert (1974) demonstraram que o caramujo africano *Achatina fulica* é suscetível à infecção por *A. vasorum*, com a recuperação de L3 infectantes para cães a partir do 17º dia após exposição às L1. Segundo os autores, este caramujo quando comparado a *B. glabrata* é menos suscetível tanto para *A. vasorum* quanto para *A. cantonensis*. Entretanto, *A. fulica* é capaz de suportar, devido ao seu maior tamanho, uma infecção com até vinte mil L1, apesar de em caramujos jovens provocarem deformações das conchas e diminuição no seu crescimento. Durante o desenvolvimento das larvas no interior do molusco, observou-se que a conversão para L3 variou de 3 a 15%, ocorrendo de maneira independente da dose de larvas infectantes, sendo encontradas a partir do 17º dia após infecção com temperatura entre 24 e 26°C. Além disso, a via de infecção, seja pela exposição à suspensão de larvas, pela injeção de larvas no pé, trato gastrointestinal ou manto, não influenciou na localização das

larvas dentro dos moluscos, pois, estas foram encontradas no pulmão, pé, manto, glândula digestiva e trato gastrintestinal, independente da forma de infecção.

Com o intuito de traçar a via migratória de alguns nematóides em moluscos, Sailerlander (1976) realizou um estudo experimental envolvendo *Achatina fulica* com, aproximadamente seis semanas de idade, experimentalmente infectada pela exposição de 5000 a 20000 L1 de *A. vasorum* / *A. cantonensis*. Em exame de cortes histológicos, observou-se larvas no pulmão, manto, glândula digestiva, pé e trato gastrintestinal. Além disso, a cronologia da migração larvária neste caramujo foi descrita da seguinte forma: 1 – uma hora após a infecção, as larvas estavam presentes na região do pé do molusco; 2- duas horas após a infecção, as larvas foram observadas no trato gastrintestinal; 3 – 12h após, as larvas foram encontradas no pulmão, em um número próximo a metade do total de larvas do sistema hemolinfático; 4 – 24h após de infecção, cerca de 80 a 90% do total da população de larvas podia ser observado no pé e no pulmão.

Ao avaliar aspectos biológicos e histopatológicos da infecção do caramujo terrestre *Subulina octona* por *A. vasorum*, Bessa et al. (1996) observaram que até o sexto dia de infecção apenas L1 estava presente nos tecidos dos caramujos. A partir do sétimo dia foram detectadas L2 de *A. vasorum*. No 13º dia de infecção já era possível a recuperação de L3 em *S. octona*. No 21º dia as L3 apresentavam-se livres de suas bainhas. A porcentagem de recuperação de L3 em relação ao total de larvas recuperadas foi de 6% no 13º dia de infecção, 40% no 16º dia e ultrapassava 90% no 21º dia. Segundo os autores, o contato com fezes de cão foi letal para esse molusco. Em dois experimentos realizados com moluscos expostos a fezes de cães com L1 de *A. vasorum* e a fezes controle (livres da infecção), observou-se mortalidade de 40% no primeiro experimento e 100% no segundo experimento, nos caramujos mantidos em contato com fezes infectadas, 24h após a exposição. Os caramujos mantidos em contato com fezes de cães livres da infecção por *A. vasorum* apresentaram uma mortalidade de 100%, 24h após o contato nos dois experimentos. Nos caramujos sobreviventes foram recuperadas L3 após 21 dias da infecção e em todos os caramujos mortos foram encontradas L1 no seu interior. Outros parâmetros analisados foram: o tempo de surgimento de ovos dentro do caramujo e o crescimento da concha, após ter sido infectado com 76 e 185 L1. Com os dois inóculos não foi encontrada diferença no tempo de surgimento de ovos, entretanto foi detectada diminuição no crescimento da concha apenas nos caramujos infectado com 185 L1 quando comparados com o controle não infectado. Com relação à

influência da infecção sobre a sobrevivência do caramujo, foi detectado que em infecção com mais de 1000 L1 todos os caramujos haviam morrido com até 72 h de infecção, ao passo que em infecções com 580 L1 apenas 26,7% dos moluscos haviam morrido.

1.5 – CLASSIFICAÇÃO DOS MOLUSCOS

Biomphalaria glabrata segundo Paraense (1970) é enquadrado taxonomicamente nas seguintes categorias:

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Subclasse: Pulmonata

Ordem: Basommatophora

Família: Planorbidae

Gênero: *Biomphalaria* (Preston, 1910)

Espécie: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

O gênero *Biomphalaria* possui uma concha discoidal, podendo chegar a mais de 40mm de diâmetro. Apresenta a hemolinfa vermelha devido a presença de um pigmento análogo a hemoglobina, o tubo renal é em forma de “J”. A espécie *B. glabrata*, possui a concha com giros arredondados, o lado direito é mais escavado que o esquerdo. É a maior espécie da família, entretanto apenas as características da concha não podem ser utilizadas para confirmação da espécie, visto que, em função das condições ambientais e pressões seletivas as conchas podem sofrer alterações, fazendo com que haja confusão para identificação correta da espécie. Por isso, deve-se também considerar características de morfologia interna, como a presença da crista renal pigmentada ao longo da superfície ventral do tubo renal em indivíduos adultos e a linha pigmentada em indivíduos jovens. Além destas características, o ovoteste possui mais de 350 divertículos, presença de bolsa vaginal, porção média da bainha do pênis aproximadamente do mesmo tamanho que a porção mais larga do canal deferente (Souza & Lima, 1990).

1.6 – SISTEMA INTERNO DE DEFESA DOS MOLUSCOS

Da mesma maneira que vertebrados, os invertebrados precisam responder a todo tipo de agressão, especialmente as produzidas por algum agente infeccioso que co-habita seu ambiente. Desta forma, o sistema interno de defesa dos invertebrados tem que ser capaz de reconhecer e destruir agentes infecciosos, apesar de não apresentar elementos capazes de gerar a diversidade de reconhecimento observada durante a resposta imune adaptativa dos vertebrados (Van der Knap & Loker, 1990; Loker et al., 2004).

O primeiro relato da existência do mecanismo de defesa celular em moluscos foi feito por Metchnikoff (1892). O mecanismo de defesa interno dos moluscos é predominantemente celular (Michelson, 1975, Cheng, 1977), compreendendo tipos de células com morfologias e funções próprias, tais como: células endoteliais, fagócitos fixos, hemócitos.

1.6.1 - Células endoteliais

Constituem a primeira linha de defesa e estão localizadas nos vasos hemolinfáticos. Têm a capacidade de se aderirem em corpos estranhos por meio de receptores para carboidratos presentes em sua membrana, facilitando o reconhecimento destas pelos hemócitos circulantes (Renwrautz et al., 1981).

1.6.2 - Fagócitos fixos

Estão presentes no tecido conjuntivo e podem ser divididos em dois tipos: a) células reticulares com grande capacidade fagocitária que diferem das outras células por não apresentarem peroxidase lisossomal (Sminia et al., 1974); b) células porosas com um núcleo grande e redondo, nucléolo com numerosos grânulos pretos. Por apresentarem uma baixa taxa de digestão estas células não estão relacionadas primariamente com o ataque a substâncias estranhas (Sminia, 1972).

1.6.3 – Hemócitos

São células que circulam pelos vasos hemolinfáticos e tem capacidade de migração para o tecido conjuntivo e vice-versa. Estão diretamente envolvidas com a atividade de fagocitose e de encapsulamento de material estranho pelo fato de possuírem um sistema lisossomal

(Ottaviani, 1983; Prowse & Tait, 1969; Sminia, 1972; Sminia et al., 1974; Tripp, 1970). Estas células ainda podem ser divididas em dois tipos:

1.6.3.1 - Hemócitos residentes ou teciduais

São menos arredondados e tem maior capacidade de emitir pseudópodos. São encontrados em maior número nos tecidos do coração e pulmão e dependendo da espécie de molusco algumas áreas específicas do tecido desses órgãos são consideradas hematopoiéticas (Lie et al., 1975; Rondelaud & Barthe, 1981).

1.6.3.2 - Hemócitos circulantes

São encontrados na hemolinfa e possuem uma forma arredondada e em contato com alguma superfície sofrem espreadimento. Estas células desempenham várias funções tais como reparação de tecidos lesados, fagocitose de partículas estranhas (Sminia, 1972; Van der Knaap et al., 1983), síntese de fatores humorais (Van der Knaap et al., 1981) e encapsulamento de material estranho (Sminia et al., 1974).

As células fagocíticas são encontradas tanto na hemolinfa quanto nos tecidos dos gastrópodes, possuindo um importante papel como componente do sistema de defesa celular (Tripp, 1963; Cheng et al., 1969). Diferente dos vertebrados, os moluscos não possuem uma resposta imune humoral com um sistema de órgãos linfóides. A imunidade (pós-linfocitária ou dependente de linfócitos) dos vertebrados não está presente nos moluscos. De fato, nos vertebrados é imprescindível a presença de células com alto grau de especificidade como linfócitos T e B com a cooperação dos macrófagos. Entretanto, os hemócitos desempenham, nos moluscos, papel semelhante ao dos macrófagos nos vertebrados, no que se refere à morfologia e função (Tripp, 1970; Lie et al., 1982). Tripp (1966) demonstrou a presença de hemaglutininas na hemolinfa de ostras que atuam na opsonização e aceleração da fagocitose pelos hemócitos. Wittke & Renwants (1984) demonstraram que estes fatores estão presentes no bivalve *Mytilus edulis* e são secretados pelos seus hemócitos. Possivelmente, esse mecanismo é semelhante àquele responsável pela morte e degradação de esporocistos de *Schistosoma mansoni*, quando encapsulados pelos hemócitos dos planorbídeos (Bayne et al., 1980).

O primeiro estágio da fagocitose é o reconhecimento de material estranho ao indivíduo induzindo alguns passos subsequentes, que incluem adesão, emissão de pseudópodos, movimento e fusão. O reconhecimento de partículas estranhas inicia-se antes do contato com

o material, pelo menos em experimentos *in vitro*, em que os fagócitos se movimentam em direção ao material estranho (Fletcher & Cooper-Willis, 1986). A fagocitose, entendida como ingestão e digestão de partículas sólidas, é atributo fundamental de muitas células e tem alta relevância na vida dos moluscos (Walters & Papadimitriou, 1978). Estas células por sua vez, além da fagocitose, têm uma extensa funcionalidade, participando da digestão, excreção, reparo da concha, cicatrização de feridas, transporte de íons, estoque e transporte de glicogênio e também no processo inicial de encapsulamento (Wagge, 1955; Michelson, 1961; Tripp, 1970; Stang-Voss, 1970; Sminia, 1972; Sparks, 1972).

O encapsulamento ocorre quando o organismo estranho possui um tamanho que dificulta a fagocitose. Nesses casos, os hemócitos aderem em torno do alvo e formam uma cápsula de isolamento entre o material estranho e o tecido do molusco. O encapsulamento em gastrópodes pode ocorrer através de mecanismos dependentes do hospedeiro, natureza do iniciador ou por fatores ambientais (Michelson, 1975). Dentre os numerosos iniciadores de encapsulamento nos gastrópodes, destacam-se os provocados por infecção parasitária (Pan, 1965; Richards & Merrit, 1967; Cheng & Rifkin, 1970; Harris & Cheng, 1975; Harris, 1975, Lie & Heyneman, 1975; Rachford, 1976; Krupa et al., 1977) ou por patógenos estranhos (Mackin, 1951; Michelson, 1961). Em *A. cantonensis*, diferentemente do que ocorre com *S. mansoni*, as larvas vivas são encapsuladas logo após a invasão e se mantêm viáveis por meses (Richards & Merrit, 1967).

Além do encapsulamento local, foi descrito por Pan (1963, 1965) uma reação tecidual generalizada (Tipo II) em *B. glabrata* que está associada a uma infecção duradoura por *S. mansoni* e foi caracterizada por uma extensa proliferação de elementos do tecido conjuntivo, associada com uma aparência hipertrófica de hemócitos e fibroblastos.

Em contraste aos bivalves, a deposição de nácar para formação de pérola em resposta a um corpo estranho ou larva de helminto em gastrópode é raro (Michelson, 1975). Entretanto, *B. glabrata* é capaz de desenvolver tal processo, apesar de dentro deste grupo possuir um papel pouco expressivo na proteção (Richards, 1970; 1972).

A necrose, a atrofia e liquefação tecidual, são processos que ocorrem associados com outras reações teciduais e são difíceis de serem determinados na resposta patológica total. Estas manifestações podem ocorrer tão rapidamente que muitas vezes são consideradas ausentes em determinadas reações (Michelson, 1975). O processo necrótico em gastrópodes pode ocorrer

em associação com trematódeos (Agersborg, 1924; Pan, 1965; Wright, 1966), bactérias (Michelson, 1961) e protozoários (Michelson, 1963). A atrofia, dos tentáculos, por exemplo, pode ocorrer sob estresse ambiental ou por consequência de infecções (Michelson, 1958; Harry & Aldrich, 1963; Mead, 1956; Michelson, 1961).

As alterações bioquímicas podem ser observadas em moluscos. As células da glândula digestiva do caramujo *Helisoma trivolvis*, infectado por *Glythelmins pennsylvaniensis* ou *Echinoparyphium* sp. exibem menos glicogênio e um aumento na concentração de fosfatases ácida e alcalina (Cheng & Snyder, 1962 a, b; Cheng, 1963; 1964). Resultado similar foi encontrado na glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (Von Brand & Files, 1947; Michelson&Dubois, 1973). *Physa accidentalis* infectada por *Echinostoma revolutum* apresentou uma diminuição na concentração de glicogênio e um aumento dos lipídeos na musculatura do pé (Hurst, 1927). Apesar destes trabalhos, a questão fica em aberto, visto que os caramujos haviam sido encontrados naturalmente parasitados e nem o tempo e nem a intensidade do inóculo haviam sido controlados.

1.7 – FENOTIPAGEM CELULAR

A citometria de fluxo tem sido um instrumento importante na qualificação e quantificação de aspectos biofísicos, bioquímicos e moleculares de partículas biológicas. Esta tecnologia pode ser utilizada para executar medidas em células inteiras e também em preparações de constituintes celulares, tais como o núcleo e organelas, particularmente importantes para pesquisas biológicas. Permite análises quantitativas e qualitativas de quaisquer células ou constituintes celulares que tenham sido tratados com uma ampla variedade de reagentes disponíveis, tais como corantes e anticorpos monoclonais. Durante esta análise, a células/partículas podem ser separadas de acordo com seu tamanho e/ou granulosidade a partir de vários tipos de fluorescência (Jaroszeki & Radeliff, 1999).

O primeiro estudo que utilizou a citometria de fluxo em invertebrados foi desenvolvido para analisar os epítomos presentes na célula do molusco *Planorbarius corneus* que reagem de forma cruzada com células de humanos (Ottaviani & Cossarizza, 1990). A partir de então, esta análise de fluxo mostrou-se uma ferramenta importante para monitorar a transformação dos hemócitos do bivalve *Mya arena* durante a fagocitose de metais pesados *in vitro*

(Bousseau et al., 2000). Allam et al. (2002) demonstraram a existência de duas populações de hemócitos morfologicamente similares denominados agranulócitos e granulócitos em três espécies de moluscos.

Ao analisar os hemócitos de *B. glabrata* pela citometria de fluxo, Johnson & Yoshino (2001) caracterizaram duas subpopulações celulares. Uma delas caracterizada como células de tamanho pequeno e arredondadas, medindo entre 5 e 6µm de diâmetro e com pouca granulosidade. A outra foi caracterizada como hemócitos grande, medindo entre 6,5 e 8µm de diâmetro e com mais granulosidade, capazes de aderir fortemente a superfícies de vidro com uma extensa emissão de filópodos.

A técnica de citometria de fluxo apresenta-se como uma ferramenta valiosa para a caracterização das subpopulações de hemócitos de *B. glabrata*, objeto deste estudo. Sendo assim, permitirá analisar o comportamento destas células durante a infecção por *A. vasorum*.

2 - JUSTIFICATIVA

Diversas espécies de moluscos têm sido descritas como suscetíveis à infecção por parasitos do gênero *Angiostrongylus*. Tem-se verificado que existe uma diferença significativa na intensidade da infecção nas espécies de moluscos encontradas naturalmente parasitadas. Estas diferenças têm sido atribuídas à suscetibilidade inata de cada espécie de molusco, ao tamanho dos espécimes e a fatores comportamentais. Todavia, existem informações limitadas e incompletas sobre os fatores que influenciam a infecção de moluscos com larvas de *A. vasorum*. Na literatura consultada, a biologia da infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum* e os fatores inerentes a esta relação ainda não são conhecidos.

O entendimento da relação parasito-hospedeiro é de grande importância para o conhecimento da epidemiologia e controle de qualquer doença parasitária. Na angiostrongilose canina, existe uma grande deficiência de dados sobre essa relação, principalmente no que tange a fatores espaciais, sazonais e biológicos envolvidos na infecção do hospedeiro intermediário. Não se sabe se a larva infectante é liberada nas secreções, ou nas fezes dos moluscos infectados, ou se o hospedeiro definitivo precisaria ingerir o molusco infectado intacto (ou hospedeiro paratênico) ou se somente a ingestão das secreções dos moluscos seriam suficientes para produzir a infecção do cão.

Da mesma forma, os fatores envolvidos com uma maior ou menor eficiência/intensidade da infecção no molusco são pouco conhecidos. Também pouco se sabe sobre a relação e os efeitos destas infecções na biologia e nos mecanismos de defesa interna dos moluscos frente ao parasitismo por *A. vasorum*. Assim, o estudo das vias de infecção, da via migratória de larvas nos tecidos e órgãos internos dos moluscos, podem fornecer dados para o entendimento da relação parasito-hospedeiro, e elucidar mecanismos envolvidos no sistema de defesa de *B. glabrata*, uma vez que a origem e o funcionamento das células envolvidas na resposta ainda precisam ser completamente esclarecidos.

Neste contexto, o conhecimento da dinâmica do parasito durante a infecção dos invertebrados podem contribuir significativamente para obtenção de resultados sobre a epidemiologia da angiostrongilose, fundamentais para o entendimento da biologia do parasito e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias de controle.

3 - OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo determinar os locais de penetração, rota migratória e emergência/eliminação das larvas de *Angiostrongylus vasorum* em *Biomphalaria glabrata* e avaliar a reação perilarvar em diferentes pontos da infecção, especificando a composição celular e as alterações histológicas envolvidas na resposta do molusco frente à infecção.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de fatores externos como a luminosidade e temperatura no processo de infecção de *B. glabrata* por larvas de *A. vasorum*;
- Avaliar a influência de diferentes substratos na infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum* utilizando diferentes meios de exposição ao inóculo;
- Avaliar as alterações no desenvolvimento larvar de *A. vasorum* em *B. glabrata* mantidas em diferentes temperaturas;
- Avaliar as alterações na ovoposição de *B. glabrata* experimentalmente infectadas por *A. vasorum*;
- Avaliar a eliminação/emergência de larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* a partir de *B. glabrata* experimentalmente infectadas, mantidas sob condições naturais e sob estímulo térmico e luminoso.
- Verificar possíveis alterações na composição celular, através da contagem diferencial de hemócitos circulantes, em *B. glabrata* experimentalmente infectadas.

- Verificar possíveis alterações nas sub-populações de hemócitos circulantes de *B. glabrata* experimentalmente infectadas por *A. vasorum*, por meio da fenotipagem e leitura em citômetro de fluxo.
- Avaliar os locais de penetração de larvas de *A. vasorum* em *B. glabrata*, pela análise histológica de moluscos experimentalmente infectados.
- Verificar as características da reação perilarvar, em diferentes pontos da infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum*.
- Verificar, pela análise histológica, o trajeto percorrido por larvas de *A. vasorum* em *B. glabrata*, para determinar a via migratória do parasito, neste hospedeiro intermediário.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *Angiostrongylus vasorum* utilizada foi isolada das fezes de um cão naturalmente infectado, procedente do Município de Caratinga - MG (Lima et al., 1985) e vêm sendo mantida em laboratório, através de passagens sucessivas em cães, mantidos no Biotério de Cães do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG) e em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* mantidos no moluscário do Departamento de Parasitologia (ICB - UFMG).

4.1 - OBTENÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO DE *Angiostrongylus vasorum*

Para obtenção de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum*, amostras de fezes de cães experimentalmente infectados foram coletadas e submetidas ao método de Baermann modificado (Barçante et al., 2003), que é composto por um funil de vidro com 15 cm de diâmetro conectado a um tubo de hemólise unidos por um tubo de látex. As fezes foram enroladas em gaze dobrada quatro vezes e colocadas dentro do funil contendo água aquecida a 41°C. Em função do hidro/termo-tropismo positivo das larvas, estas saem das fezes e se depositam pela força da gravidade no fundo do tubo de hemólise. Após um período de 24h, este tubo foi retirado e centrifugado a 200g por 5min. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as larvas re-suspendido em 5ml de água de torneira. Para contagens das L1, o conteúdo foi homogeneizado e três alíquotas de 10µl do tubo com as larvas foram retiradas e depositadas sobre uma lâmina de vidro que foi levada ao microscópio estereoscópico (25X) para contagem das larvas. Em seguida foi feita a média aritmética do número de larvas vivas encontradas nas três alíquotas. Este valor foi multiplicado pelo volume total (5ml) para determinar a quantidade total de larvas.

4.2 - INFECÇÃO DE MOLUSCOS

Caramujos da espécie *B. glabrata*, com tamanho de concha variando entre 10 e 15mm, cedidos pelo Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados para as infecções com L1 de *A. vasorum*.

As infecções dos moluscos foram realizadas utilizando placas de poliestireno para cultura de células com seis poços (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 3ml de água desclorada com 1000 L1 de *A. vasorum*. As placas foram colocadas sob foco de luz com lâmpada incandescente de 60W de potência a uma distância de 50 cm, por 24 h. Após este período, os moluscos foram transferidos para cubas plásticas (25 cm comprimento x 16 cm largura x 10 cm altura) com água desclorada. As cubas foram mantidas em temperatura ambiente, no moluscário do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. Os caramujos foram alimentados todos os dias, com folhas de alface.

4.3 – OBTENÇÃO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *A. vasorum*

Com o auxílio de uma pinça anatômica, as conchas dos caramujos foram quebradas sendo retiradas do seu interior a massa visceral que foi colocada em homogeneizador de tecidos, sendo esta triturada. Em seguida, o material triturado foi transferido para tubos de vidro contendo 5 ml de solução de pepsina HCl 1%. Este material foi mantido em banho-maria 37°C por 2 h. Decorrido este período, o material foi transferido para placas de Petri, sendo examinado em microscópio estereoscópico (25X) para detecção, identificação e contagens das larvas *A. vasorum*.

4.4 – EXPERIMENTOS

4.4.1 – Estímulo luminoso

Visando avaliar a influência do estímulo luminoso sobre a infecção experimental de *B. glabrata* com larvas de *A. vasorum*, 300 moluscos, medindo em média 15,75mm de diâmetro de concha (DP = 0,91mm) foram divididos em dois experimentos constituídos por seis grupos divididos aleatoriamente. Cada grupo foi constituído por 25 moluscos que foram colocados individualmente em placas de cultura de células, com seis poços, contendo 3ml de água desclorada e 400 L1 de *A. vasorum*. A infecção ocorreu sob diferentes estímulos luminosos, conforme segue:

Grupo 1 – Foi colocada uma lâmpada de luz incandescente com 25W de potência, a uma distância de 50 cm das placas, durante 24h.

Grupo 2 - Foi utilizada uma lâmpada de luz incandescente com 40W de potência, a uma distância de 50 cm das placas, durante 24h.

Grupo 3 - Foi utilizada uma lâmpada de luz incandescente com 60W de potência; a uma distância de 50 cm das placas, durante 24h.

Grupo 4 - Foi utilizada uma lâmpada de luz incandescente com 100W de potência; a uma distância de 50 cm das placas, durante 24h.

Grupo 5 - As placas foram mantidas sob uma caixa escura, por 24h;

Grupo 6 - As placas foram mantidas à luz ambiente, sem qualquer estímulo, por 24h.

A cada 6h de exposição às larvas, a temperatura da água de cada poço de infecção foi aferida utilizando um termômetro analógico. Após o término dos estímulos, os caramujos de cada grupo foram lavados com água corrente, retirando possíveis larvas que poderiam estar sobre a concha. Após este procedimento, os moluscos de cada um dos seis grupos experimentais foram distribuídos aleatoriamente grupos de cinco, e colocados em cubas com água (1000ml), sendo alimentados com alface fresca (*Lactuca sativa*)

De cada um dos seis grupos experimentais, nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 após a exposição, foram sacrificados cinco moluscos, e estes foram processados conforme descrito no item 4.3. Objetivando verificar a taxa de recuperação e o desenvolvimento larvar, após a digestão em pepsina, todas as larvas recuperadas foram quantificadas e classificadas em larva de primeiro estágio (L1) larvas de segundo estágio (L2) e larva de terceiro estágio (L3), observando-se os caracteres morfológicos segundo Guilhon e Cens (1973).

4.4.2 – Estímulo térmico

Para avaliar a influência do estímulo térmico sobre a infecção experimental de *B. glabrata* por larvas de *A. vasorum*, 250 moluscos, medindo em média 16,46mm de diâmetro de concha (DP = 1,44mm) foram separados em dois experimentos constituídos por cinco grupos distribuídos aleatoriamente. Cada grupo foi constituído por 25 moluscos que foram colocados individualmente em placas de cultura de células, com seis poços, contendo 3 ml de água desclorada e 400 L1 de *A. vasorum*. A infecção ocorreu sob diferentes estímulos térmicos, conforme segue:

Grupo 1b – Infecção em temperatura constante de 10°C; durante 24h;

Grupo 2b – Infecção em temperatura constante de 20°C; durante 24h;

Grupo 3b – Infecção em temperatura constante de 25°C; durante 24h;

Grupo 4b – Infecção em temperatura constante de 30°C; durante 24h;

Grupo 5b – Infecção em temperatura constante de 37°C; durante 24h.

A temperatura da estufa tipo “Bio Chemical Oxygen Demand” (BOD) foi monitorada antes da realização dos experimentos para verificar a variação de temperatura em 24 h. Após o término dos estímulos, os caramujos foram lavados com água corrente para retirar as larvas que poderiam estar sobre a concha. Os moluscos de cada um dos cinco grupos experimentais foram colocados em cubas com água (1000ml), sendo alimentados com alface fresca. Os grupos foram mantidos em BOD com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

De cada um dos seis grupos experimentais, nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 após a exposição, foram sacrificados cinco moluscos, e estes foram processados conforme descrito no item 4.3.

Para se verificar a taxa de recuperação e o desenvolvimento larvar, após a digestão em pepsina, todas as larvas recuperadas foram quantificadas e classificadas em L1, L2 e L3, através da observação de caracteres morfológicos segundo Guilhon e Cens (1973).

4.4.3 - Meio de infecção

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes meios na infecção *B. glabrata* com larvas de *A. vasorum* foram utilizadas três vias para expor os moluscos ao material infectante:

Grupo A: Dez moluscos, em dois experimentos, foram colocados individualmente em placas para cultura de células com seis poços contendo 3ml de água desclorada e fragmentos de alface com 2 cm de diâmetro, sobre os quais foram colocadas 400 L1.

Grupo S: Dez moluscos, em dois experimentos, foram colocados individualmente em placas para cultura de células com seis poços contendo 400L1 ressuspensas em 3ml de água desclorada.

Grupo F: Dez moluscos, em dois experimentos, foram colocados individualmente em placas para cultura de células com seis poços contendo 400 L1 em fezes de cão diluídas em 3 ml de água desclorada (variação: 250mg, 500mg, 750mg e 1000mg de fezes).

Para os três grupos, independente do substrato utilizado, todas as placas foram colocadas sob foco de luz com lâmpada incandescente de 25 W a uma distância de 50 cm, por 24 h. Após o procedimento de infecção, os caramujos foram lavados em água corrente para retirar larvas que poderiam estar sobre a concha. Os moluscos de cada um dos três grupos experimentais foram colocados em cubas com água (1000ml), sendo alimentados com alface fresca. Os grupos foram mantidos em BOD com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Trinta dias após a infecção, os moluscos foram sacrificados e processados conforme descrito no item 4.3. Para verificar a taxa de recuperação e o desenvolvimento larvar, após a digestão em pepsina, todas as larvas recuperadas foram quantificadas e classificadas em L1, L2 e L3, através da observação de caracteres morfológicos segundo Guilhon e Cens (1973).

4.4.4 – Temperatura de manutenção na recuperação de L3 de *A. vasorum*

Duzentos e cinquenta exemplares de *B. glabrata*, medindo em média 15,75mm de diâmetro de concha (DP = 0,91mm), em dois experimentos, foram individualmente colocados em placas de poliestireno para cultura de células com seis poços contendo 3ml de água desclorada e 400 L1 de *A. vasorum*. As placas foram mantidas em estufa BOD à temperatura constante de 25°C, por 24h, com fotoperíodo de 12h. Após o procedimento de infecção, os moluscos foram lavados com água corrente para retirar as larvas que poderiam estar sobre a concha e aleatoriamente divididos em cinco grupos:

Grupo 1c - 25 caramujos mantidos em estufa BOD à temperatura constante de 10°C;

Grupo 2c - 25 caramujos mantidos em estufa BOD à temperatura constante de 20°C;

Grupo 3c - 25 caramujos mantidos em estufa BOD à temperatura constante de 25°C;

Grupo 4c - 25 caramujos mantidos em estufa BOD à temperatura constante de 30°C;

Grupo 5c - 25 caramujos mantidos em estufa BOD à temperatura constante de 37°C.

Os moluscos de cada um dos cinco grupos experimentais foram colocados em cubas com água (1000ml), sendo alimentados com alface fresca. Para cada um dos grupos experimentais, nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 após a exposição, foram sacrificados cinco moluscos, e estes foram processados conforme descrito no item 4.3. Visando verificar a taxa de recuperação e o desenvolvimento larvar, após a digestão em pepsina, todas as larvas recuperadas foram quantificadas e classificadas em L1, L2 e L3, pela da observação de caracteres morfológicos segundo Guilhon e Cens (1973).

4.4.5 – Ovipostua de *B. glabrata* infectada por *A. vasorum*

Grupo 1: Dez caramujos, em dois experimentos, com tamanho médio de concha de 15 mm (DP = 1mm) foram infectados por 400 L1 de *A. vasorum* conforme descrito no item 5.2.

Grupo 2: Dez caramujos, em dois experimentos, com tamanho médio de concha de 15 mm (DP = 1mm) foram mantidos sob as mesmas condições do grupo anterior, exceto pelo fato de não serem adicionada as larvas de *A. vasorum* na água.

Após o procedimento anterior os moluscos de cada um dos grupos experimentais foram colocados em cubas com água (1000ml), sendo alimentados com alface fresca. Durante trinta dias, as posturas realizada por caramujos de cada um dos grupos foi coletada e o número de ovos foram contadas em microscópio estereoscópico. No final do experimento (trinta dias) os caramujos do Grupo 1 foram sacrificados e as larvas recuperadas conforme descrito no item 4.3.

4.4.6 – Emergência de L3 a partir de *B. glabrata*

4.4.6.1 – Infecção de *B. glabrata*

Quarenta caramujos foram colocados individualmente, em placas de cultura com seis poços e expostos a 3ml de água desclorada contendo com 1000 L1 de *A. vasorum*. As placas contendo os caramujos foram mantidas sob foco de luz incandescente com 60W de potência a uma distância de 20 cm por 24 h. Em seguida, os caramujos foram colocados em cubas plásticas com 1 litro de água desclorada, sendo alimentados com alface fresca.

4.4.6.2 – Emergência de L3

Trinta dias após a infecção, os 120 caramujos foram divididos em quatro grupos com 10 exemplares cada. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os caramujos foram colocados em placas de poliestireno para cultura de células com seis poços contendo 3ml de água desclorada. Cada grupo recebeu um estímulo diferente:

Grupo 1 – Dez caramujos colocados sob foco de luz com lâmpada de 60W a uma distância de 20 cm, por 24 h;

Grupo 2 – Dez caramujos foram colocados em banho-maria 37°C, por 24 h;

Grupo 3 – Dez caramujos foram mantidos a temperatura ambiente, variando entre 23 e 25°C, por 24 h;

Grupo 4 – Dez caramujos foram mantidos em placas de cultura de células de seis poços, à temperatura ambiente, por 15 dias.

Durante as primeiras duas horas, a cada 15 minutos e às 4, 6, 12 e 24h após o início da estimulação, os caramujos foram transferidos para outras placas nas mesmas condições pré-estabelecidas para cada grupo. O conteúdo das placas foi analisado em microscópio estereoscópico (25x), para avaliação e contagens das L3 presentes.

Após o período de 24h, todos os moluscos (Grupos 1, 2 e 3) foram sacrificados e submetidos a técnica de Baermann, por 24h, para recuperar as L3 que ainda estivessem nos tecidos dos caramujos. Para o Grupo 4, as placas foram analisadas novamente aos 3, 7 e 15 dias após o início do experimento.

4.4.6.3 – Viabilidade e Infectividade de L3 de *A. vasorum*

A viabilidade das larvas recuperadas em cada um dos três grupos foi determinada através de observação direta da movimentação destas sob microscópio estereoscópio (25X). Larvas em movimento foram classificadas como ativas e larvas imóveis e na posição “C”, foram consideradas inativas (Richinitti et al. 1999).

Para confirmar a infectividade das larvas liberadas por moluscos experimentalmente infectados, as L3 recuperadas no Grupo 1 e no Grupo 2 foram utilizadas para infectar dois cães sem raça definida. Os dois animais foram previamente submetidos a exame de fezes, Para certificar a ausência de qualquer infecção parasitária. Na sequência, os animais receberam por via oral 100 L3 de *A. vasorum* / kg de peso vivo, ressuspensas em 5 ml de tampão fosfato (PBS - NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 10 mM, pH 7.4).

O cão 1 foi inoculado com 550 L3 recuperadas a partir de caramujos pertencentes ao Grupo 1. O cão 2 foi inoculado com 1000 L3 recuperadas a partir de caramujos do Grupo 2.

Trinta dias após a infecção dos cães, fezes destes animais foram coletadas diariamente e submetidas ao exame parasitológico pelo método de Baermann modificado, Para comprovar a infectividade das larvas inoculadas e determinar o período pré-patente.

4.4.7 - Resposta hemocitária de *B. glabrata* frente a infecção por *A. vasorum*

4.4.7.1 – Composição celular da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas

4.4.7.1.1 – Infecção dos moluscos

Foram infectados 45 moluscos, individualmente, distribuídos em placas de poliestireno para cultura de células com seis poços contendo 3ml de água desclorada e 1000 L1 de *A. vasorum* ressuspensas em 3 ml de água desclorada. As placas foram colocadas sob foco de luz com lâmpada incandescente com 25W de potência a uma distância de 50 cm, por 24 horas.

4.4.7.1.2 – Coleta de células na hemolinfa e determinação da composição celular

A série de experimentos foi realizada em triplicata.

Para coleta de hemolinfa três caramujos foram sacrificados em cada um dos pontos determinados: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a infecção e 10, 20 30 e 60 dias após a infecção. As conchas foram limpas com álcool 70% na sua superfície e depois secas com papel de filtro. Em seguida, foi realizado um furo com agulha 21G na região cardíaca, coletando-se a hemolinfa extravasada com a seringa acoplada nesta agulha. Após recolhida, a hemolinfa foi transferida para tubos cônicos de poliestireno e mantida no gelo. Em seguida, foram feitas as contagens totais e diferenciais dos hemócitos utilizando 10µL de hemolinfa diluída 1/10 em solução salina Hanks, contendo 0,5% de vermelho neutro (Sigma). As células foram contadas em câmara de Neubauer com base na atividade fagocitária, ou seja, as células fagocitárias incorporam o corante, apresentando-se coradas em vermelho (granulócitos) ao passo que as células não fagocitárias não coram (Pereira, et al., 2006).

4.4.7.1.3 – Caracterização das subpopulações de hemócitos e perfil celular na hemolinfa

Para análise das subpopulações de hemócitos circulantes por citometria de fluxo foram coletadas as hemolinfas de caramujos não infectados por *A. vasorum* e de caramujos infectados por *A. vasorum* nos seguintes pontos: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72 h após a infecção e também 10, 20, 30 e 60 dias após a infecção. A hemolinfa total dos caramujos em cada ponto de coleta foi agrupada e colocada em um único tubo, mantido em banho de gelo. Em cada ponto foram analisadas triplicatas das amostras de hemolinfa, sendo que cada ponto continha a hemolinfa de três caramujos.

Para calibragem do citômetro (FACSCAN, Becton, Dickinson and Company) e determinação de um padrão fenotípico normal para a espécie *B. glabrata*, células de caramujos *B. glabrata* livres da infecção por *A. vasorum* foram utilizadas. Amostras de hemolinfa foram diluída na proporção de uma parte de solução salina Hanks para duas partes de hemolinfa. Para evitar a aglutinação celular, à solução salina de Hanks foi adicionado Citrato/EDTA (50mM Citrato de sódio, 10nM EDTA e 25 mM de sacarose) ajustando o pH para 7,2. A amostra diluída foi colocada em descanso em banho de gelo por cinco minutos para sedimentação de partículas pesadas, sendo então o sobrenadante transferido para outro tubo e mantido em banho de gelo.

Na seqüência, as amostras de hemolinfa de caramujos infectados foram analisadas, com o intuito de avaliar alterações no padrão fenotípico normal da população de hemócitos circulantes em diferentes pontos da infecção do hospedeiro intermediário pelo *A. vasorum*.

O protocolo de marcação partiu de uma solução estoque de Brometo de etídio (BE) 25mg/ml e Laranja de acridina (LA) 7,5mg/ml, diluídos em álcool 95%, posteriormente diluídos 1:1000 em Hanks e adicionada nas amostras de hemolinfa na proporção 1:1, sendo mantidas em banho de gelo, incubando por 1 hora. Posteriormente foi adicionado um volume igual ao de hemolinfa da solução fixadora (10 g/l paraformaldeído; 10,2 g/l cacodilato de sódio; 6,65 g/l cloreto de sódio; pH 7,2) e as amostras foram submetidas à análise no Citômetro de Fluxo, FACSCAN. A marcação pelo BE e LA permite a determinação de perfis com interferência mínima por debris. O corante BE atravessa uma membrana polarizada, mas só se liga às cadeias de DNA quando a célula não possui um sistema de transporte ativo que expulsa fluorocromo, ou seja, quando a célula está morta. Em contrapartida, o LA é um corante específico de DNA de

células viáveis. Assim, segundo Liegler, 1995, populações de células vivas são LA^{forte}BE^{fraco}, ao passo que células mortas e debris seriam LA^{fraco}BE^{forte}.

Os parâmetros de fluorescência e de Forward Scatter (tamanho) e Side Scatter (granulosidade) foram ajustados de acordo com os dias de experimento, de forma a permitir uma melhor separação entre as populações fluorescentes marcadas com LA e BE. Após aquisição dos perfis, estes foram analisados pelo software Cell Quest® (Becton, Dickinson and Company).

4.4.8 – Estudo das vias de infecção, rota migratória e preparação histológica

Para determinar os locais de penetração das larvas nos moluscos, a rota migratória e as alterações histológicas provocadas pelas larvas de *A. vasorum* em *B. glabrata*, foram realizados estudos por meio de cortes histológicos.

Caramujos da espécie *B. glabrata* foram distribuídos individualmente em placas de poliestireno para cultura de células com seis poços (Falcon) contendo 3ml de água desclorada com o total de 1000L1. Dois caramujos livres da infecção e dois caramujos infectados e em diferentes pontos: 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 h após a infecção e 2, 3, 4, 5, 6, 8, 14, 20, 30 e 60 dias após a infecção, foram fixados em formalina de Milloning modificada (Carson et al., 1973). Os caramujos permaneceram na solução fixadora por 72h em geladeira. Após fixação, os caramujos foram lavados em água corrente por 2 h e transferidos para uma solução de EDTA 10% para promover a desmineralização da concha. Após este processo, as partes moles do molusco foram separadas das conchas e colocadas em processador automático de tecidos (Marca Shandon) de acordo com o seguinte protocolo:

4.4.8.1 - Desidratação:

- Álcool 70% - 1h;
- Álcool 95% - 1:30 h;
- Álcool absoluto - 1:30 h;
- Álcool absoluto - 1:30 h;
- Álcool absoluto - 2 h;
- Álcool absoluto - 2 h;
- Álcool absoluto - 2:30 h;

4.4.8.2 - Emblocamento:

- Xilol - 1:00 h;
- Xilol – 1:30 h;
- Xilol - 1:30 h;
- Parafina – 2:00 h;
- Parafina (no vácuo) 2:30 h.

Os cortes (cerca de 150/caramujo) foram realizados no sentido longitudinal do molusco em micrótomo da marca Leica, na espessura de 5µm por toda a extensão do material. Em seguida a primeira lâmina de cada ponto de infecção foi corada e desta em diante com uma distância de seis cortes. A coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina como segue:

4.4.8.3 - Desparafinização:

- três banhos de xilol – 3 minutos cada.

4.4.8.4 - Hidratação:

- Dois banhos de álcool absoluto por 3 min cada banho, com uma passagem de 3 min em álcool 95% e 70%. Por fim água destilada dois banhos de 2 min.

4.4.8.5 - Coloração:

Hematoxilina de Mayer 25 minutos. Lavagem em água corrente por 15 minutos; Passagem em álcool 70% por 2 minutos. Coloração pela Eosina-Floxina por 3 minutos. Desidratação pelo álcool 95% por 3 minutos + 3 banhos de álcool Absoluto com duração de 3 minutos cada. Clarificação em três banhos de xilol com 3 minutos cada banho.

4.4.8.6 - Montagem:

Foi realizada usando lamínulas com goma de Damar.

4.4.8.7 - Documentação:

As lâminas selecionadas foram analisadas em LSM-410 ou Fotomicroscópio III (Zeiss) e as imagens transferidas para o Microsoft PhotoshopTM para ajuste de contraste, brilho e correção gama sendo impressos em impressora Epson Multifuncional 4100TM.

4.5 – DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Dados de eliminação larvária e viabilidade foram analisados utilizando “one-way analysis of variance” (ANOVA) seguido pela análise utilizando o teste Tukey’s Multiple Comparison.

Os resultados das alterações celulares na hemolinfa foram avaliados utilizando análise de variância por meio do teste de Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 95%, utilizando um delineamento inteiramente casualizado. Também foi realizada uma análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, para avaliar os resultados de eliminação, através do pacote Kruskal, em domínio público no LCC da UFMG, em linguagem Fortran descrito por Sampaio (1998).

Para dados envolvendo somente duas variáveis foi utilizado o teste “t” de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

5 - RESULTADOS

5.1 – PARÂMETROS PRÉ-INFECCÃO

5.1.1 – Recuperação de larvas de *Angiostrongylus vasorum* a partir de *Biomphalaria glabrata* infectadas sob diferentes condições

5.1.1.1 – Estímulo luminoso

A - Escuro

Na Figura 1, encontram-se apresentados os dados de recuperação de larvas de *A. vasorum* a partir de caramujos infectados sob luz ambiente (controle) (Fig. 1A) e caramujos infectados no escuro (Fig. 1B). A partir do quinto dia de infecção foi possível recuperar larvas de segundo estágio de *A. vasorum*, nos dois grupos. Larvas de terceiro estágio (L3) foram recuperadas a partir de 15 dias após a infecção (dai), sendo que aos 30 dai, 32,65% das larvas recuperadas eram L3, para ambos os grupos.

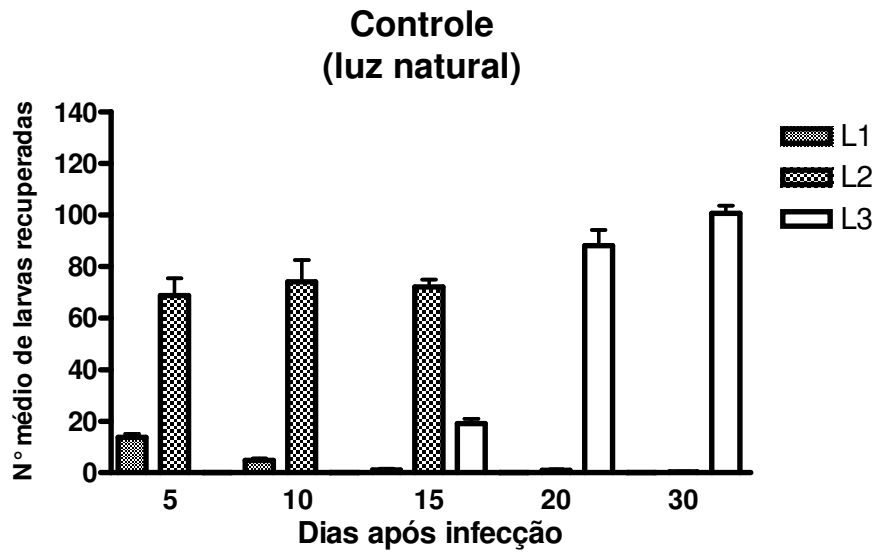
Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos em relação ao número total de larvas recuperadas, nem em relação ao tempo de desenvolvimento das larvas ($p > 0,05$).

B – Fonte luminosa de 25W

Na Figura 2, encontram-se apresentados os dados de recuperação de larvas de *A. vasorum* a partir de caramujos controle (Fig. 2A) e caramujos submetidos à infecção utilizando fonte luminosa de 25W (Fig. 2B). Não foi verificada diferença significativa no tempo de desenvolvimento larvar. Para os dois grupos foi possível a recuperação de L2 a partir dos 5 dai e a recuperação de L3, já a partir do 15 dai.

Com relação ao número total de larvas recuperadas, foram verificadas diferenças significativas entre os dois grupos, em todos os pontos de observação (Fig. 2A e B).

A



B

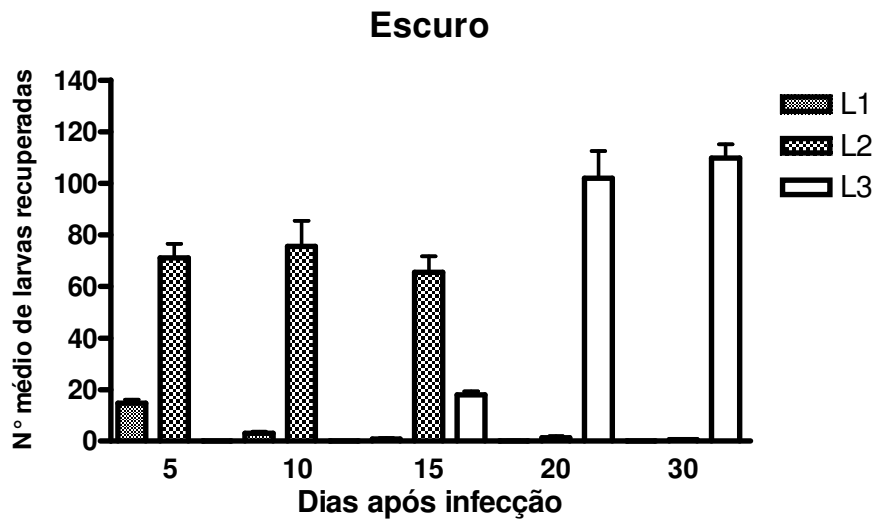


Figura 1 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental sob luz natural e no escuro.

A = infecção realizada sob luz natural (controle); B = infecção realizada em ausência de luz. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio, para cada ponto. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

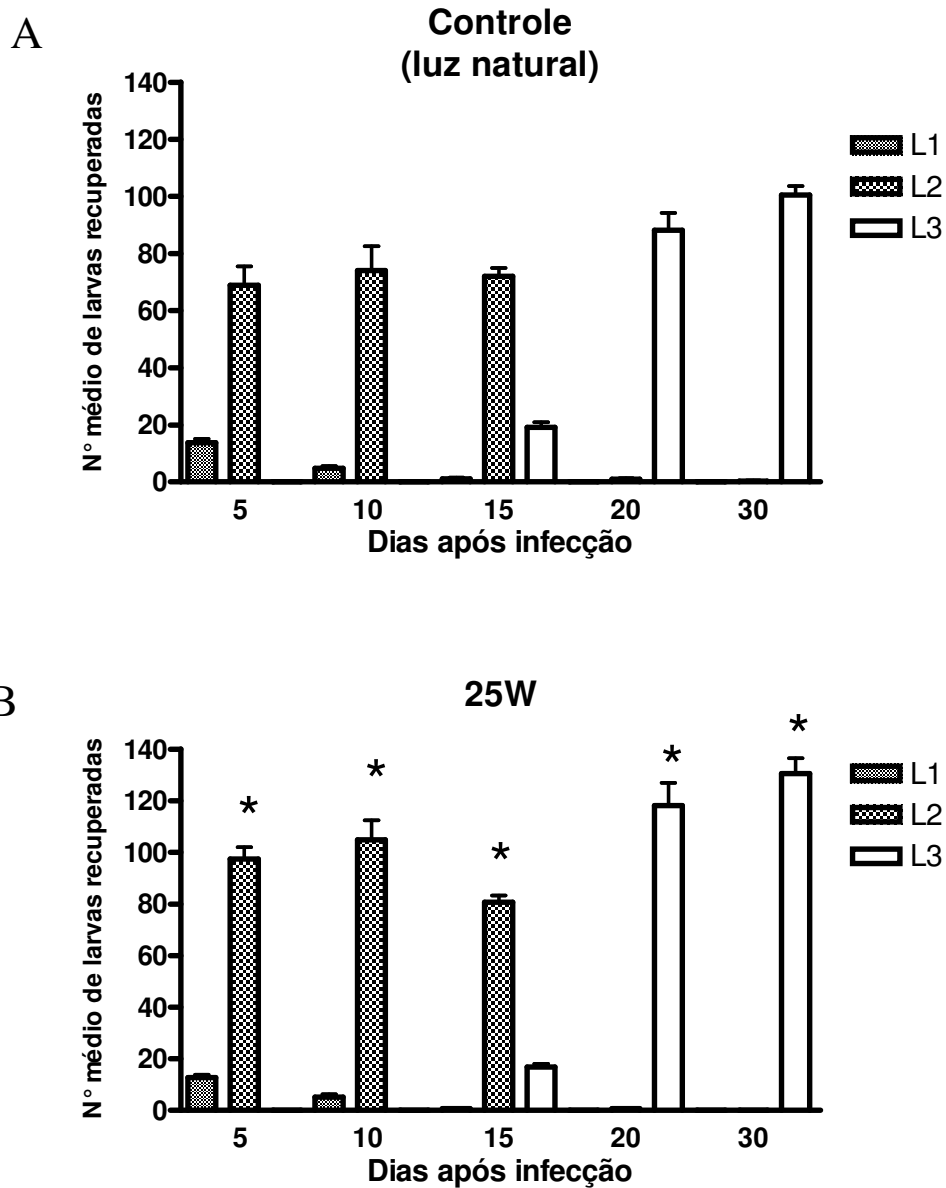


Figura 2 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 25W.

A = infecção realizada sob luz natural (controle); B = infecção realizada com lâmpada incandescente 25W. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

C – Fonte luminosa de 40W

Na Figura 3, encontram-se apresentados os dados de recuperação de larvas de *A. vasorum* a partir de caramujos controle (Fig. 3A) e caramujos submetidos à infecção utilizando fonte luminosa de 40W (Fig. 3B). Não foi verificada diferença significativa no tempo de desenvolvimento larvar. Para os dois grupos foi possível a recuperação de L2 a partir dos 5 dai e a recuperação de L3, já a partir do 15 dai.

Com relação ao número total de larvas recuperadas, pode-se verificar que o número de L3 recuperadas foi significativamente maior no grupo controle, aos 30 dai ($p<0,05$) (Figura 3A e B).

D – Fonte luminosa de 60W

Na Figura 4, encontram-se apresentados os dados de recuperação de larvas de *A. vasorum* a partir de caramujos controle (Fig. 4A) e caramujos submetidos à infecção utilizando fonte luminosa de 60W (Fig. 4B). Não foi verificada diferença significativa no tempo de desenvolvimento larvar. Para os dois grupos foi possível a recuperação de L2 a partir dos 5 dai e a recuperação de L3, já a partir do 15 dai.

Com relação ao número total de larvas recuperadas, verificou-se que o número de L1, L2 e L3 recuperadas foi significativamente maior no grupo controle, em todos os pontos de observação ($p<0,05$) (Fig. 4A e B).

E – Fonte luminosa de 100W

Na Figura 5, encontram-se apresentados os dados de recuperação de larvas de *A. vasorum* a partir de caramujos controle (Fig. 5A) e caramujos submetidos à infecção utilizando fonte luminosa de 100W (Fig. 5B). Não foi verificada diferença significativa no tempo de desenvolvimento larvar. Para os dois grupos foi possível a recuperação de L2 a partir dos 5 dai e a recuperação de L3, já a partir do 15 dai. Com relação ao número total de larvas recuperadas, verificou-se que o número de L1, L2 e L3 recuperadas foi significativamente maior no grupo controle, em todos os pontos de observação ($p<0,05$) (Fig. 5A e B).

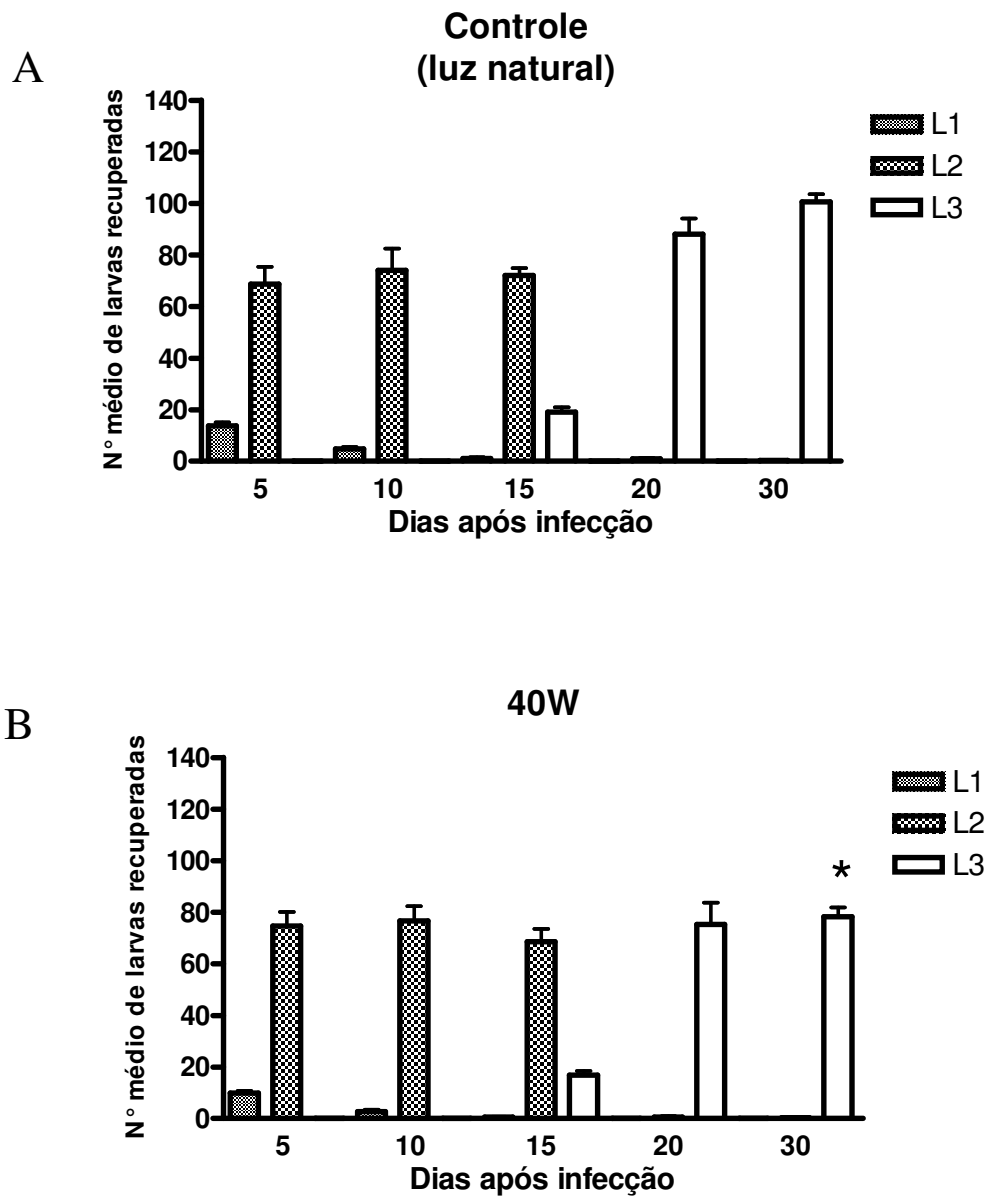


Figura 3 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 40W.

A = infecção realizada em luz natural (controle); B = infecção realizada com lâmpada incandescente 40W. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

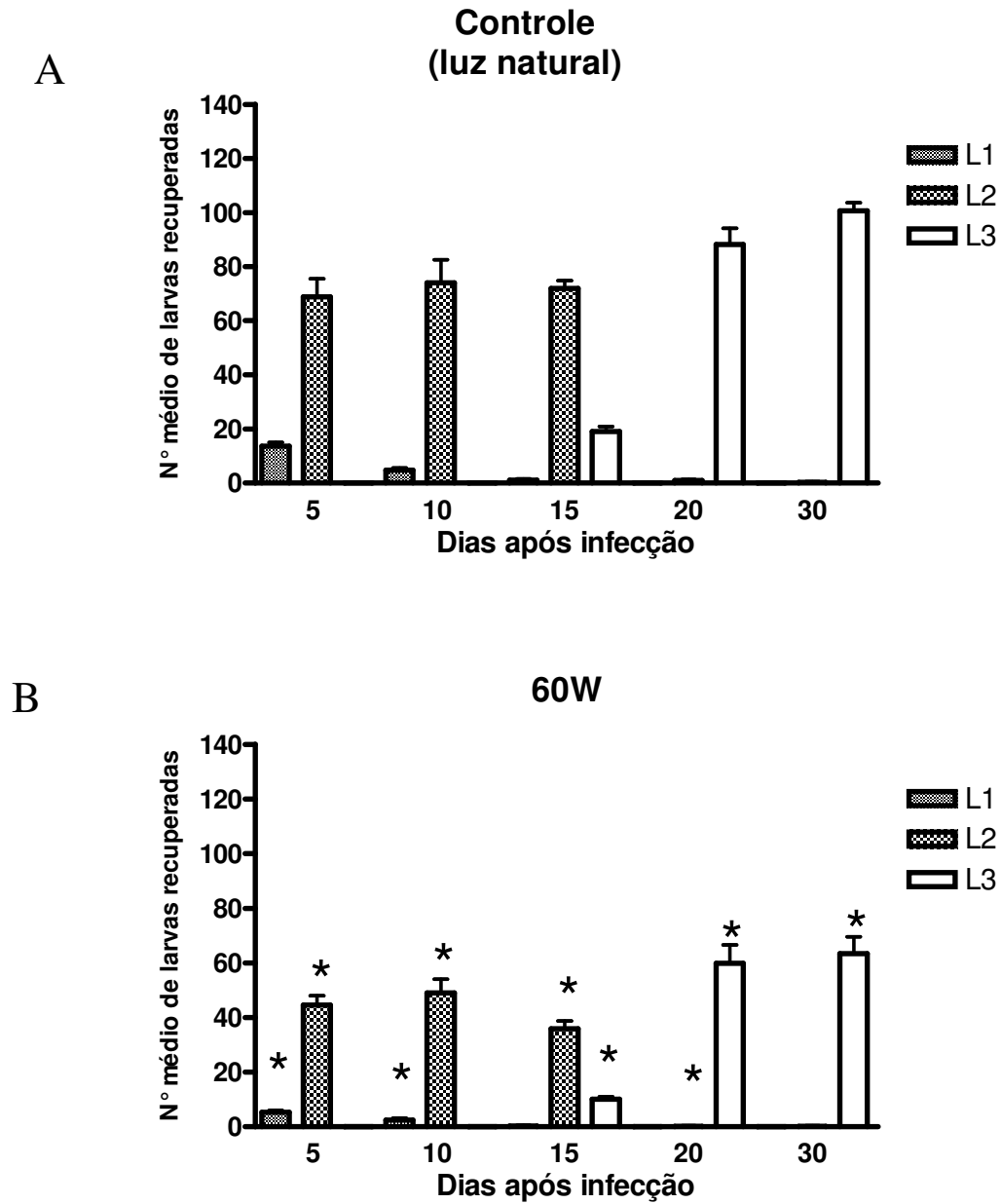


Figura 4 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 60W.

A = infecção realizada em luz natural (controle); B = infecção realizada com lâmpada incandescente 60W. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

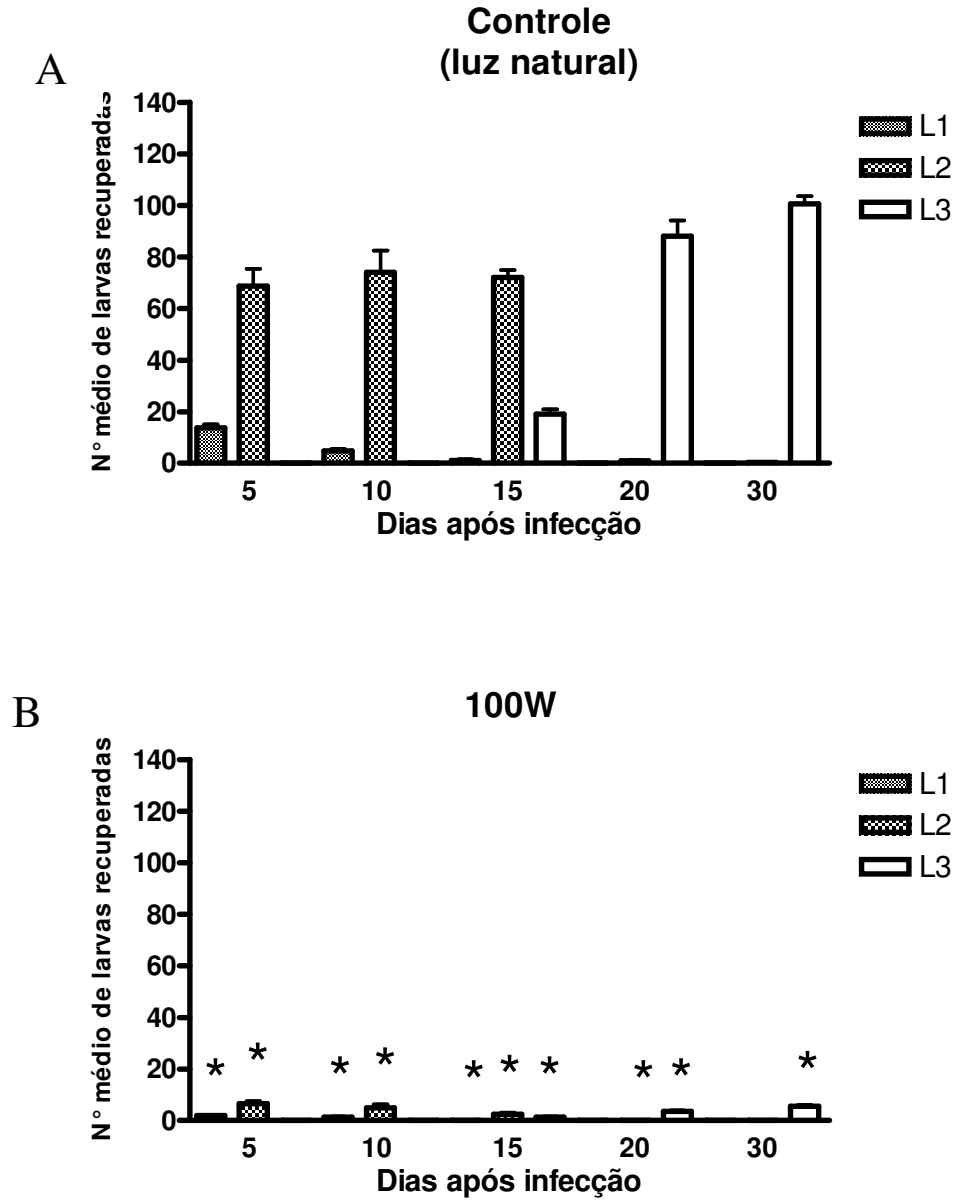


Figura 5 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental sob luz natural e com lâmpada incandescente de 100W.

A = infecção realizada em luz natural (controle); B = infecção realizada com lâmpada incandescente 100W. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

Para verificar alterações na temperatura da água durante o processo de infecção dos caramujos, utilizando estímulos luminosos com lâmpadas incandescentes de diferentes potências, a temperatura foi aferida após 24h e os resultados encontram-se apresentados na Figura 6. Verificou-se que a temperatura mais elevada foi aquela utilizando fonte luminosa de 100W (38°C), ao passo que nas infecções no escuro e controle (luz ambiente) a temperatura foi de 21,5°C.

Os dados referentes à aferição diária na temperatura da água das cubas de manutenção dos caramujos infectados encontram-se apresentados na Figura 7. A variação ao longo de todo o período experimental foi de 18° a 28°C, com médias de 21,5° para a mínima e 26,9°C para a máxima.

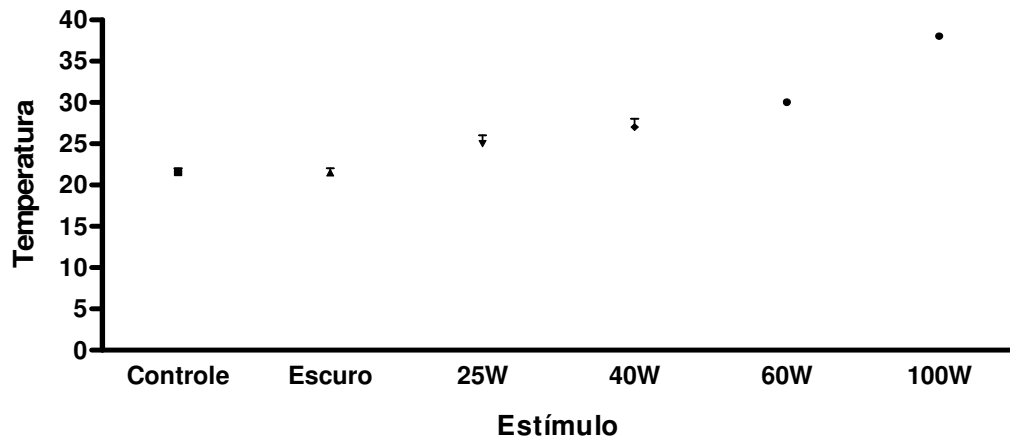


Figura 6 - Temperatura da água durante o processo de exposição de *Biomphalaria glabrata* às larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* sob diferentes estímulos luminosos.

Cada ponto representa à média da temperatura de dois experimentos independentes. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio, para cada ponto.

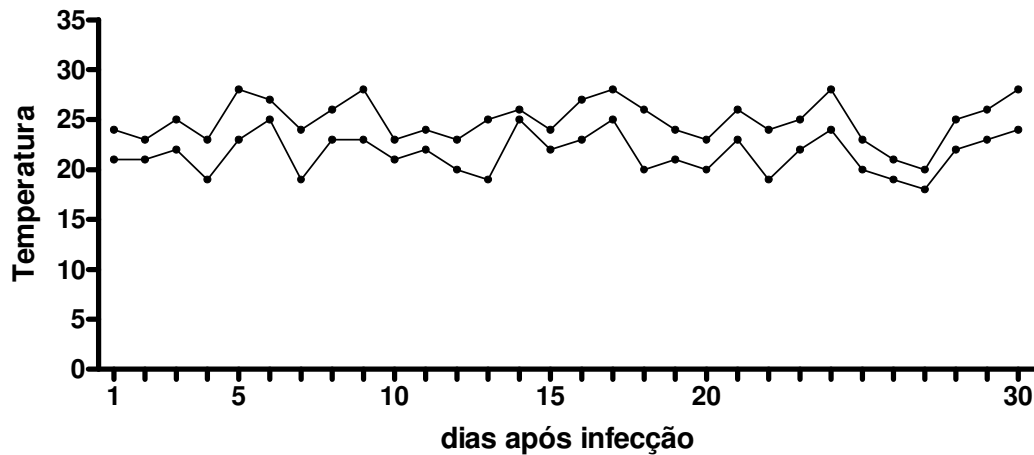


Figura 7 – Temperatura da água das cubas de manutenção de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectadas por larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*.

Cada ponto representa a temperatura máxima e mínima da água em cada dia em dois experimentos independentes.

5.1.1.2 – Estímulo Térmico

A – Infecção a temperatura de 10°C

Na Figura 8 pode-se observar que a quantidade de larvas recuperadas no grupo com infecção realizada à 10°C é muito inferior à quantidade recuperada no grupo controle, com diferenças estatísticas significativas em todos os pontos de observação ($p < 0,05$)

B – Infecção a temperatura de 20°C e a temperatura de 30°C

Nas Figuras 9 e 10 pode-se verificar que tanto à temperatura de 20°C quanto à temperatura de 30°C, respectivamente, o número de larvas recuperadas no grupo controle foi significativamente superior, em todos os pontos de observação ($p < 0,05$). Não foram verificadas diferenças significativas no tempo de desenvolvimento larvar dos grupos testes para o grupo controle.

C – Infecção a temperatura de 37°C

À temperatura de 37°C todos os caramujos morreram durante a infecção.

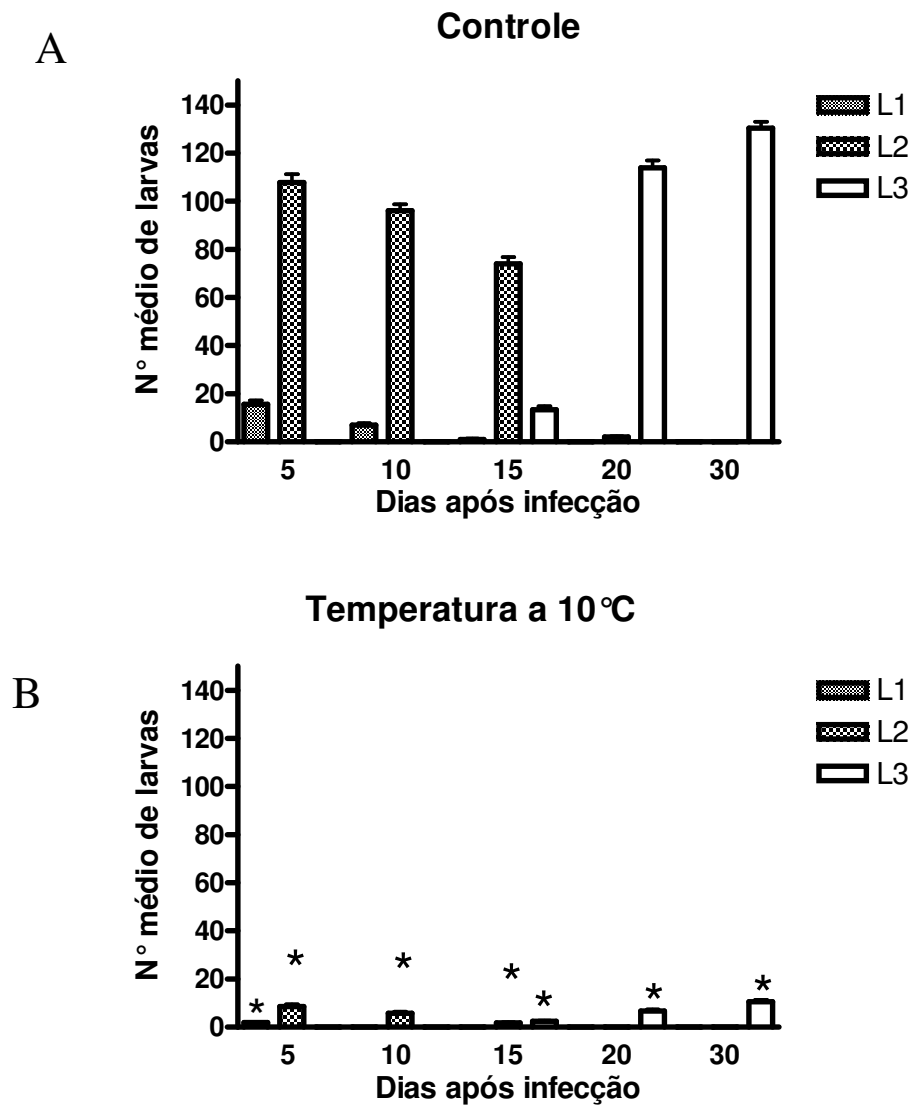


Figura 8 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e 10°C.
 A = infecção realizada à temperatura de 25°C e mantidos à 25°C (controle); B = infecção realizada em 10°C e mantidos em 25°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

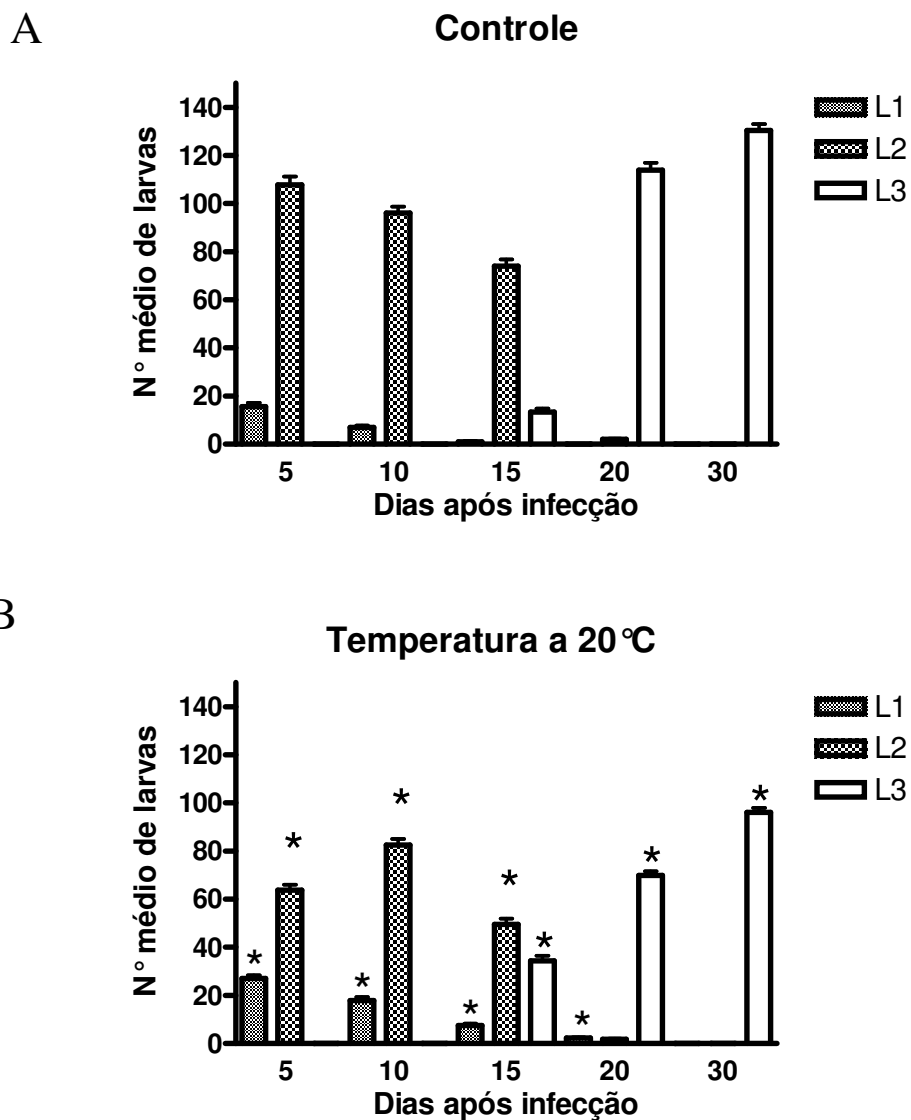


Figura 9 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e 20°C. A = infecção realizada à temperatura de 25°C e mantidos em 25°C (controle); B = infecção realizada em 20°C e mantidos em 25°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

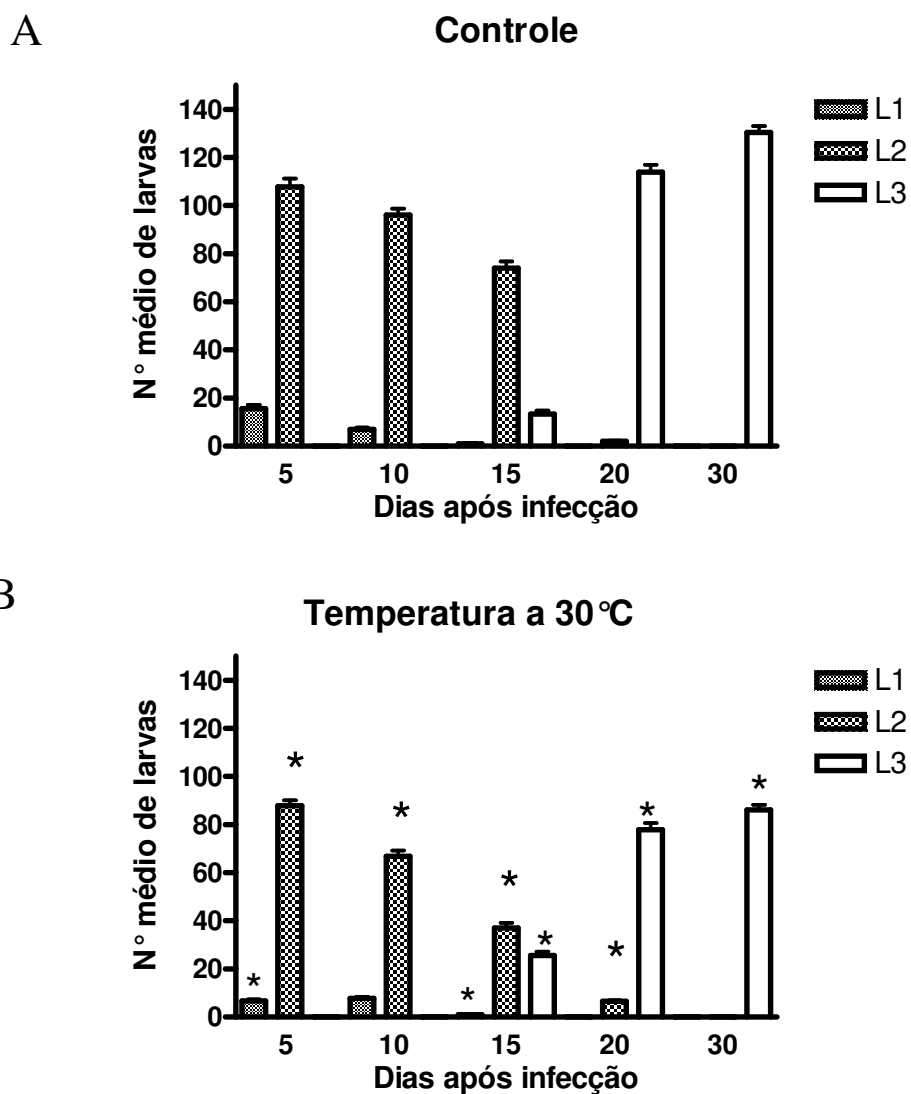


Figura 10 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e 30°C. A = infecção realizada à temperatura de 25°C e mantidos em 25°C (controle); B = infecção realizada em 30°C e mantidos em 25°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

6.1.1.3 – Influência do meio de infecção

A Figura 11 representa a quantidade de larvas de *A. vasorum* recuperadas, utilizando diferentes meios para exposição das L1. Pôde-se verificar que 30 daí, o número de L3 recuperadas foi significativamente maior nos caramujos que receberam o inóculo de 400 L1 diluídas em água (Média \pm SD: $108,9 \pm 7,3$) ou junto a fragmentos de alface ($113,1 \pm 4,5$) ($p < 0,05$). A quantidade de larvas recuperadas a partir de caramujos que receberam como inóculo L1 adicionadas às fezes de cão foi consideravelmente baixo, independente da concentração de fezes utilizada ($2,3 - 4,3 \pm 1,3 - 3,05$) ($p \leq 0,05$). Embora a taxa de recuperação larvar nos grupos submetidos ao procedimento de infecção utilizando fezes tenha sido consideravelmente baixo, essas não foram letais para os moluscos, uma vez que não foi verificada mortalidade dos mesmos.

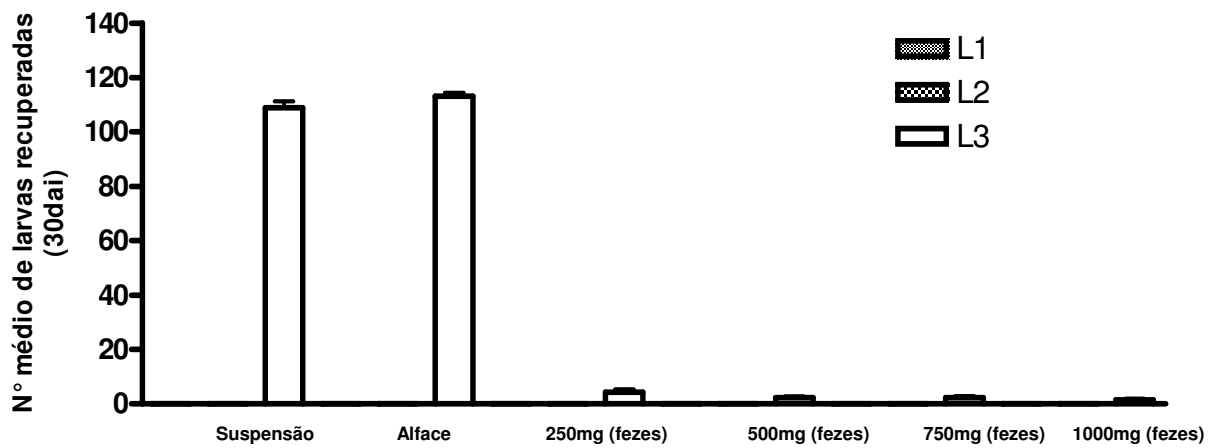


Figura 11 – Número médio de larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* trinta dias após exposição a diferentes meios de infecção.

Os caramujos foram expostos individualmente à 400L1: diluídas em 3mL de água (Suspensão); sobre fragmentos de alface (Alface); diluídas em 250mg de fezes de cão (250mg); diluídas em 500mg de fezes de cão (500mg); diluídas em 750mg de fezes de cão (750mg); diluídas em 1000mg de fezes de cão (1000mg). Dai (dias após a infecção). As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto.

5.2 – PARÂMETROS PÓS-INFECCÃO

5.2.1 – Temperatura de manutenção

A fim de avaliar o efeito da temperatura de manutenção dos caramujos infectados sobre o tempo de desenvolvimento larvar e sobre a taxa de recuperação de cada estágio, foram testadas diferentes temperaturas de manutenção (10°C, 20°C, 30°C e 37°C) em relação ao grupo controle, cuja temperatura de manutenção foi a média da temperatura ambiente local (25°C).

5.2.1.1 – Temperatura de 10°C

Na Figura 12 pode-se verificar que à temperatura de 10°C ocorre um atraso no tempo de desenvolvimento larvar, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 8). À temperatura de 10°C, aos cinco dai, todas as larvas recuperadas estavam no primeiro estágio de evolução, somente a partir do 10º daí teve início o aparecimento das primeiras L2, enquanto que a recuperação de L3 só foi possível a partir dos 20 daí. Com relação as L1, estas foram predominantes no grupo em 10°C, tendo sido observadas até os 30 daí ($p < 0,05$). Com relação as L2 e L3, estas foram recuperadas em quantidades significativamente superiores no grupo controle, respectivamente a partir dos cinco e 15dai ($p < 0,05$).

5.2.1.2 – Temperatura de 20°C

À temperatura de manutenção de 20°C, verificou-se que também uma menor recuperação de larvas em relação ao grupo controle (Fig. 13). Para todos os pontos, verificou-se diferenças estatisticamente significativas na quantidade recuperada de L1, L2 e L3 entre os dois grupos. Todavia, ao contrário do verificado à temperatura de 10°C, quando os caramujos foram mantidos em temperatura de 20°C, não houve atraso do tempo de desenvolvimento larvar, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

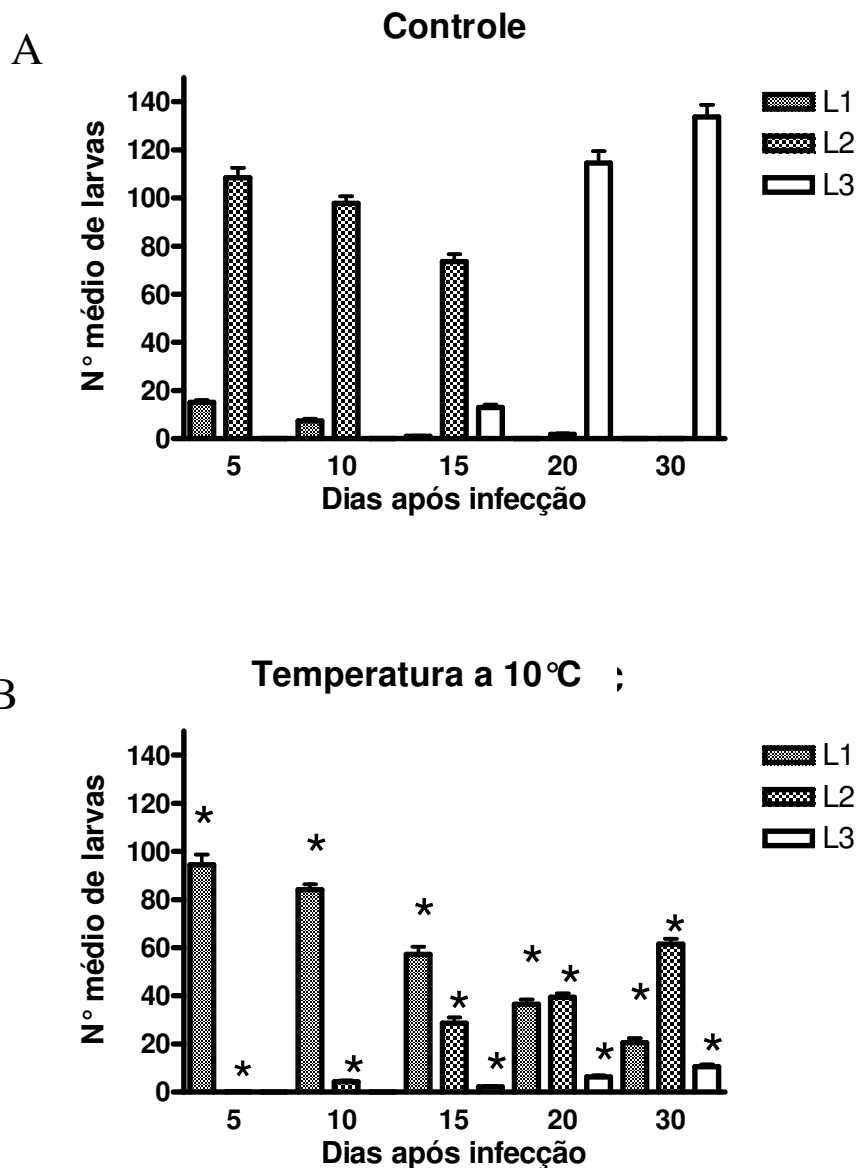


Figura 12 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 10°C.

A = infecção realizada à temperatura de 25°C e mantidos em 25°C (controle); B = infecção realizada em 25°C e mantidos em 10°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

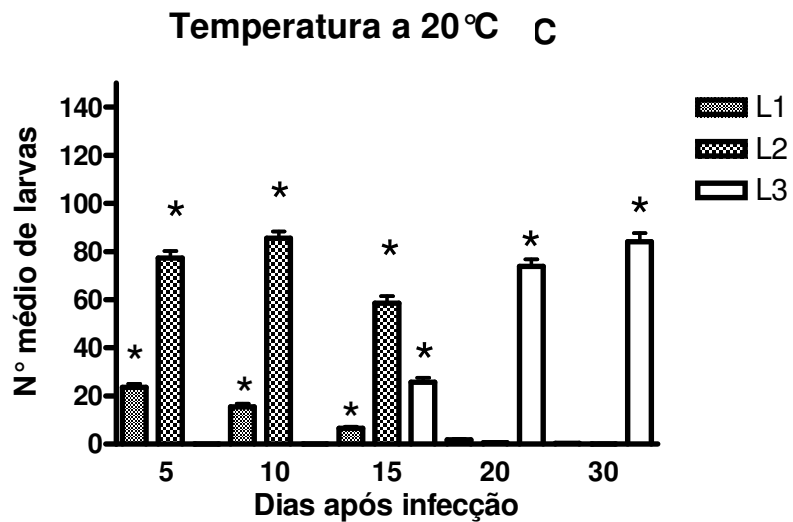
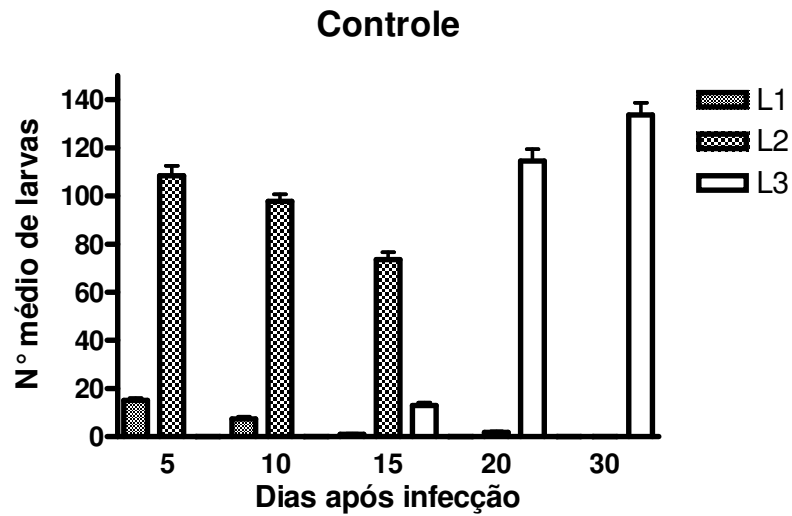


Figura 13 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 20°C.

A = infecção realizada em 25°C e mantidos em 25°C (controle); B = infecção realizada em 25°C e mantidos em 20°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

5.2.1.3 – Temperatura de 30°C

A Figura 14 apresenta os resultados de caramujos infectados mantidos a temperatura de 30°C e caramujos controle (25°C). Foi possível verificar à temperatura de 30°C, que o desenvolvimento larvar ocorreu mais de forma mais rápida do que no grupo controle. Aos 15 daí foi possível recuperar uma quantidade de L3, significativamente maior do que no grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, nos 20 e 30 daí houve menor recuperação de L3, estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.2.1.4 – Temperatura de 37°C

À temperatura de 37°C todos os caramujos morreram após a exposição às larvas de *A. vasorum*. Não sendo possível a manutenção de caramujos a essa temperatura.

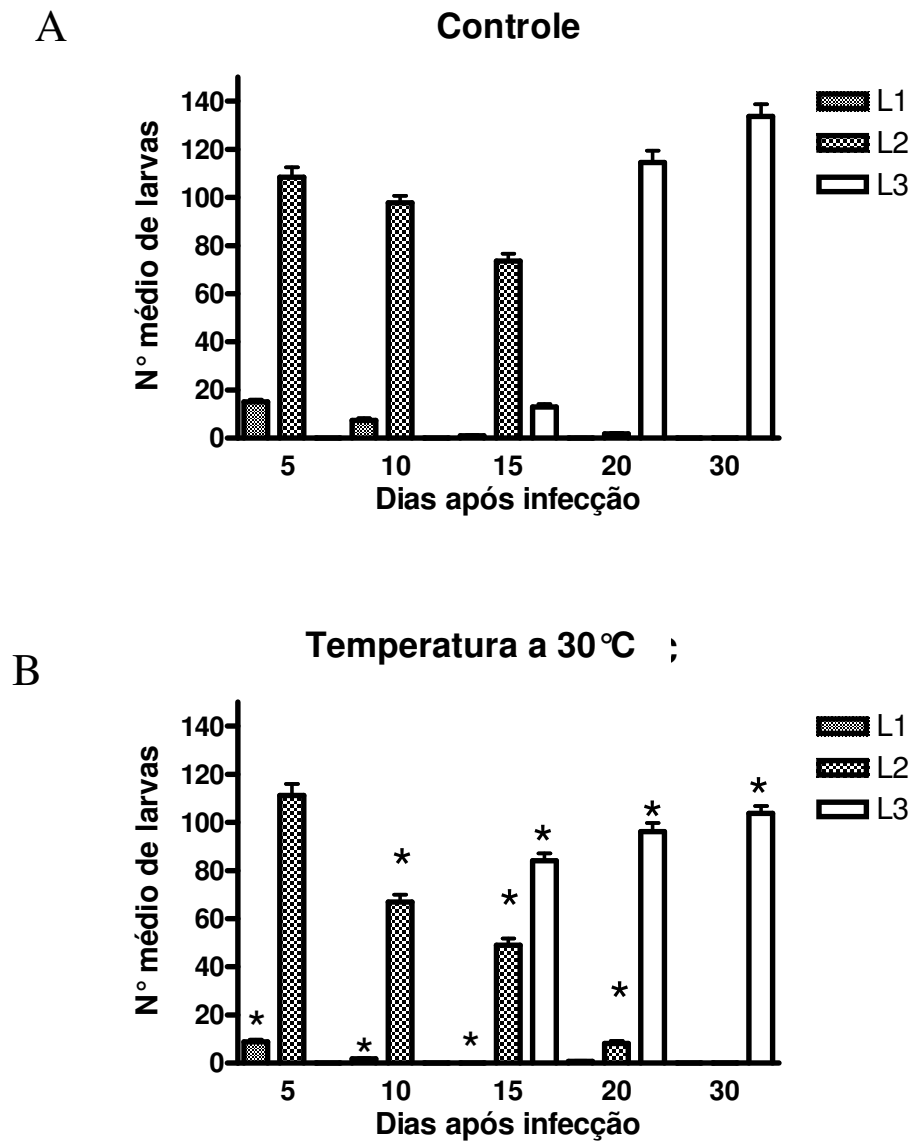


Figura 14 – Número médio de larvas de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após infecção experimental em temperatura de 25°C e posterior manutenção dos caramujos em temperatura constante de 25°C e 30°C.

A = infecção realizada em 25°C e mantidos em 25°C (controle); B = infecção realizada em 25°C e mantidos em 30°C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

5.2.2 – Interferência da infecção por *A. vasorum* sobre a ovipostura de caramujos *B. glabrata*

O número médio diário de ovos colocados por caramujos *B. glabrata* infectados por *A. vasorum* (Infectado) e não infectados (Controle), durante o período de 30 dias encontra-se apresentado na Figura 15.

Nos primeiros dias após a infecção, o número médio de ovos produzidos por caramujos infectados foi estatisticamente menor que o controle sem infecção ($p < 0,05$). Nos dois primeiros dias, no grupo infectado, não foi observada a postura de ovos, ao passo que no grupo controle a postura de ovos permaneceu inalterada. Até o quinto dia o número de ovos produzidos pelo grupo controle foi sempre maior e depois novamente aos oito dias após infecção. Dos nove até os 30 dias não foram observadas diferenças significativas na postura de ovos entre os grupos.

Após o período de acompanhamento de 30 dias, os moluscos do grupo infectado foram mortos para confirmar a presença de larvas de terceiro estágio, confirmando a infecção, o que pode ser observado na Figura 16.

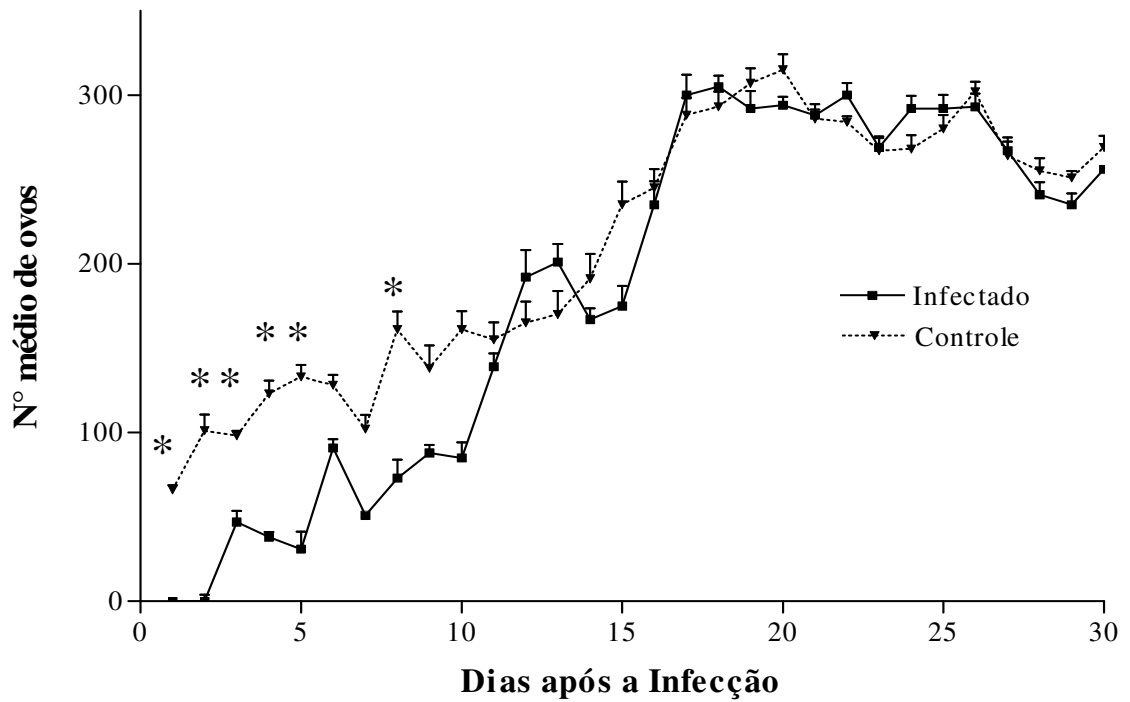


Figura 15 – Número médio de ovos de *Biomphalaria glabrata* contados até 30 dias após a infecção por *Angiostrongylus vasorum*.

Cada ponto representa a média e desvio padrão da contagem de ovos após exposição em dez caramujos de dois experimentos independentes.

Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

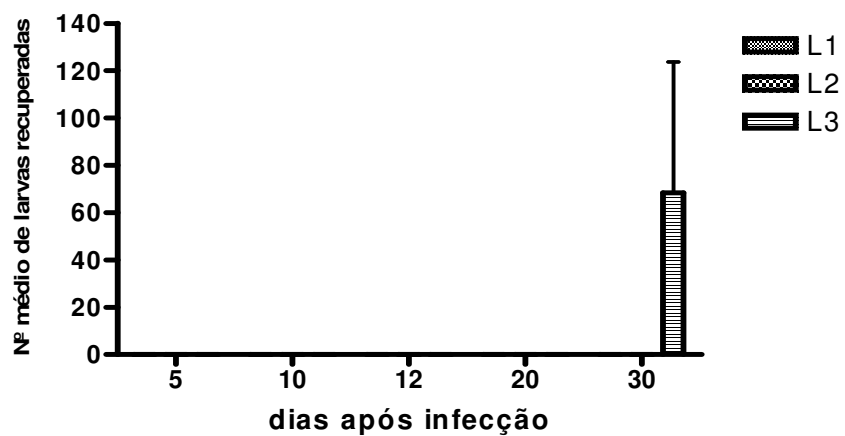


Figura 16 – Número médio de larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas de caramujos *Biomphalaria glabrata* após trinta dias de contagens de seus ovos.

Número médio de L3 recuperadas aos 30 dias no grupo que foi exposto às larvas infectantes de *A. vasorum*. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

5.3 - EMERGÊNCIA DE L3 DE *A. vasorum*

5.3.1 – Grupo 1 (60W)

Durante 24h de observação, a temperatura da água nas placas que continham caramujos pertencentes ao Grupo 1 (60W), variou de 23-26°C. Verificou-se que a partir de 15 min de exposição a uma fonte luminosa de 60W foram observadas as primeiras L3 de *A. vasorum*. Durante 24h de observação, as larvas continuavam a emergir, apresentando-se ativas. O número de L3 que emergiram por caramujo variou de 1-70, com um total de recuperação de 512 L3, após 24 h de observação (Tabela 1).

5.3.2 – Grupo 2 (Banho-maria)

Com relação aos caramujos mantidos em banho-maria à temperatura de 37°C (Grupo 2), as larvas de *A. vasorum* emergiram a partir de 15 min de exposição o que se manteve, durante as 24h de observação. O número de L3 que emergiram por caramujo variou de 1-272, com um total de 2.446 L3 emergidas após 24h de observação (Tabela 1).

5.3.3 – Grupo 3 (Temperatura ambiente)

Cinco L3 emergiram dos caramujos pertencentes ao Grupo 3, mantidos a temperatura ambiente, que se manteve entre 23-25°C, durante as primeiras 24h de observação (Tabela 1).

5.3.4 – Grupo 4 (Temperatura ambiente – 15 dias)

Nos caramujos pertencentes ao Grupo 4 emergiram um total de 44 L3 de *A. vasorum* vivas e ativas, durante 15 dias de observação. Para o Grupo 4 verificou-se uma tendência ao aumento do número de L3 emergidas com o aumento do tempo de observação (Figura 17).

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram uma tendência comum entre os Grupos 1, 2 e 3: o número de L3 emergidas por caramujo aumenta a medida que aumenta o tempo de exposição a cada um dos estímulos ou ambientes. A análise estatística confirma que existe diferença entre as médias das contagens entre os três grupos ($F = 446.7$; $P < 0.0001$).

O desenvolvimento larvar de L1 a L3 ocorreu de forma semelhante entre os três grupos ($F = 1.155$, $P = 0.3476$). Não foi verificada diferença significativa com relação ao número de total de L3 emergidas dos caramujos pertencentes aos grupos 1,2 e 3. Conforme mostrado na Figura 19, estes resultados podem ser confirmados pelo somatório do número de L3 liberadas pelos caramujos submetidos a diferentes estímulos (Grupo 1 = 512 L3; Grupo 2 = 2.446 L3; Grupo 3 = 5 L3) ao número de L3 que permaneceram nos tecidos destes caramujos e recuperadas pelo método de Baermann (Grupo 1= 2.170 L3; Grupo 2 = 125 L3; Grupo 3 = 2.490 L3) (Tabela1).

Tabela 1 – Número de L3 de *A. vasorum* emergidas por *B. glabrata* submetidas a diferentes estímulos

Grupos	Tempo de exposição (h)					L3 ¹ liberadas (%)	L3 ² no Baermann (%)	Total de L3 ³
	2	4	6	12	24			
	L3 emergidas e contadas							
Grupo 1 (60W)	177 (20)	77 (14)	87 (16)	101 (15)	70 (9)	512 (19.1)	2.170 (80.9)	2.682
Grupo 2 (banho-maria)	252 (22)	54 (6)	153 (6)	593 (17)	1.394 (21)	2.446 (95.14)	125 (5.86)	2.571
Grupo 3 (temperatura ambiente)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (3)	5 (0,2)	2.490 (99,8)	2.495

1 – Somatório de L3 emergidas por 30 *B. glabrata* infectadas, durante 24 h de observação. A porcentagem de L3 liberadas em relação ao total de L3 recuperadas encontra-se apresentada entre parênteses.

2 – Somatório de L3 emergidas em 30 *B. glabrata* infectadas, após o período experimental de 24 h, utilizando o aparelho de Baermann modificado. A porcentagem de L3 recuperadas com a realização do Baermann em relação ao total de L3 recuperadas encontra-se apresentada entre parênteses.

3 – Somatório de 1 e 2.

5.3.5 – Morfometria das larvas que emergiram

As características morfológicas das larvas que emergiram a partir de caramujos *B. glabrata* submetidos a diferentes estímulos confirmam que estas eram L3 de *A. vasorum*. À morfometria verificou-se que as L3 recuperadas nos grupos 1-4 não apresentavam diferenças estatísticas com relação ao comprimento ($F = 1.130$, $P = 0.325$) e largura ($F = 0.312$, $P = 0.732$).

5.3.6 – Viabilidade e infectividade de L3 de *A. vasorum*

As L3 emergidas de cada grupo foram examinadas ao microscópio estereoscópio (25X), e verificou-se que 100% destas apresentavam-se vivas e ativas. Para o Grupo 4, as L3 emergidas no primeiro dia de observação, mantiveram-se vivas e ativas durante os 15 de observação.

A presença de L1 de *A. vasorum* nas fezes dos cães inoculados com as L3 provenientes dos grupos 1 e 2 demonstra que as larvas emergidas dos caramujos eram viáveis e capazes de promover a infecção do hospedeiro definitivo. O período pré-patente (PPP) para o cão inoculado com as larvas provenientes do Grupo 1, foi de 39 dias, enquanto que o PPP para o cão inoculado com as L3 provenientes do Grupo 2 foi de 65 dias.

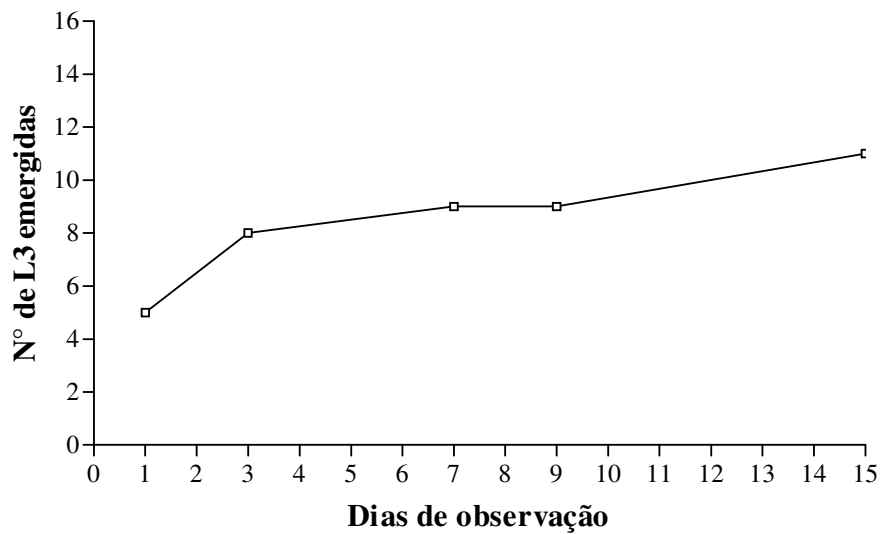


Figura 17 – Somatório do número de L3 de *Angiostrongylus vasorum* emergidas de *Biomphalaria glabrata* após 30 dias de infecção com 1×10^3 L1 de *A. vasorum*.

Trinta caramujos infectados foram mantidos a temperatura ambiente, sem qualquer estímulo externo, durante 15 dias. O número de larvas liberadas foi acessado nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 15. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes.

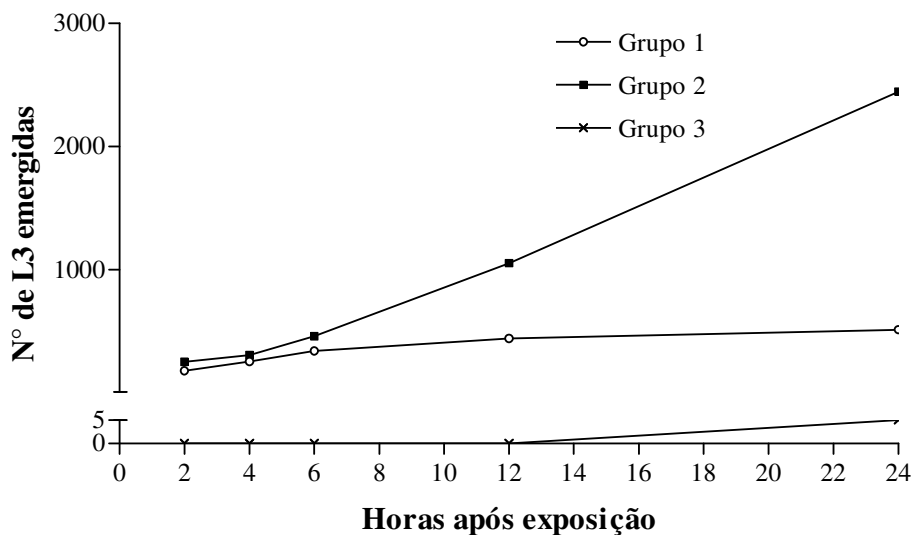


Figura 18 – Somatório do número de L3 de *Angiostrongylus vasorum* emergidas de *Biomphalaria glabrata*, sob diferentes estímulos, após 30 dias de infecção com 1×10^3 L1 de *A. vasorum*.

Grupo 1 – caramujos infectados expostos a uma fonte luminosa de 60 watts, Grupo 2 - caramujos infectados expostos a uma temperatura constante de 37°C em banho-maria, Grupo 3 caramujos infectados mantidos a temperatura ambiente, sem qualquer estímulo externo. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes.

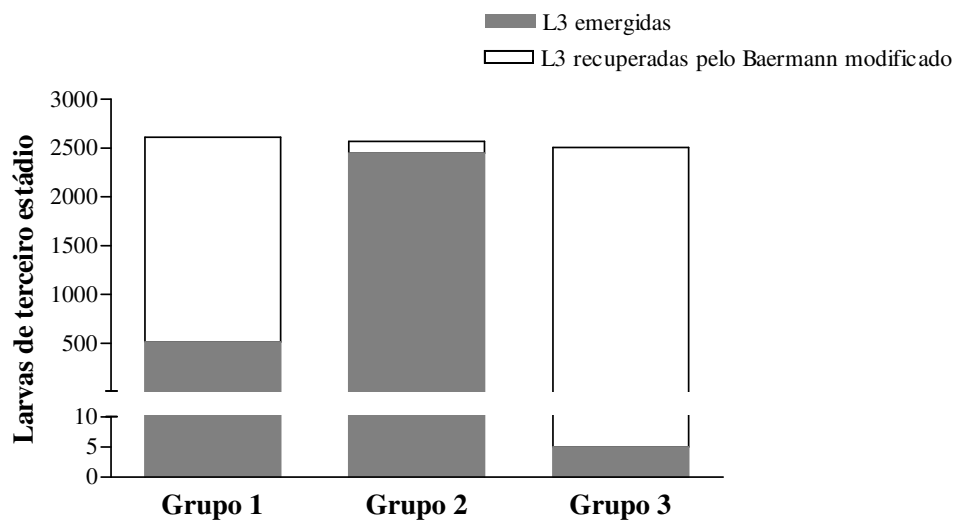


Figura 19 – Número total de L3 de *Angiostrongylus vasorum* emergidas após diferentes estímulos e número total de L3 recuperadas em *Biomphalaria glabrata* pelo método de Baermann.

As L3 foram contadas após os estímulos recebidos por 24h e com o término do experimento os caramujos foram sacrificados e colocados no Baermann modificado para recuperar o restante de larvas que não haviam sido liberadas.

5.4 – RESPOSTA HEMOCITÁRIA DE *B. glabrata*

5.4.1 – Composição celular da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas

A Figura 20 apresenta os dados de contagem diferencial de células na hemolinfa de caramujos infectados, durante o período de 0,5 à 72h de exposição às larvas infectante de *A. vasorum*.

Durante o curso da infecção, verificou-se uma redução significativa no número de hemócitos circulantes das 4 – 72h após exposição ($p < 0,05$).

A Figura 21 apresenta os dados de contagens diferenciais de células na hemolinfa de caramujos infectados, durante o período de 10 – 60 dias após a exposição. Não foram verificadas diferenças significativas entre o grupo controle e os infectados dos 10 aos 60 daí ($p > 0,05$).

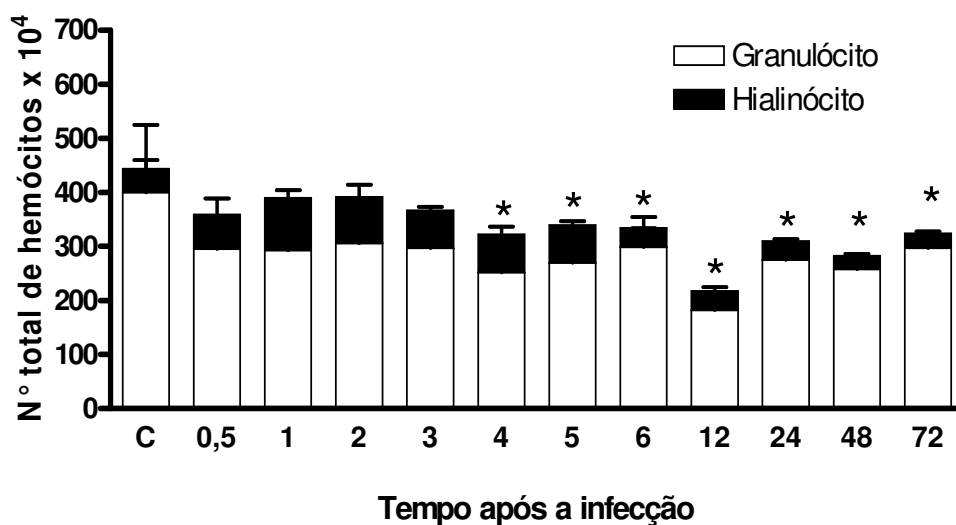


Figura 20 – Número total médio de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* até 72 horas após a exposição com larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. C: grupo controle não infectado. Cada ponto representa a média e desvio padrão da contagem de hemócitos totais e a proporção entre granulócitos e hialinócitos de três caramujos. Experimentos realizados em triplicata, de forma independente. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

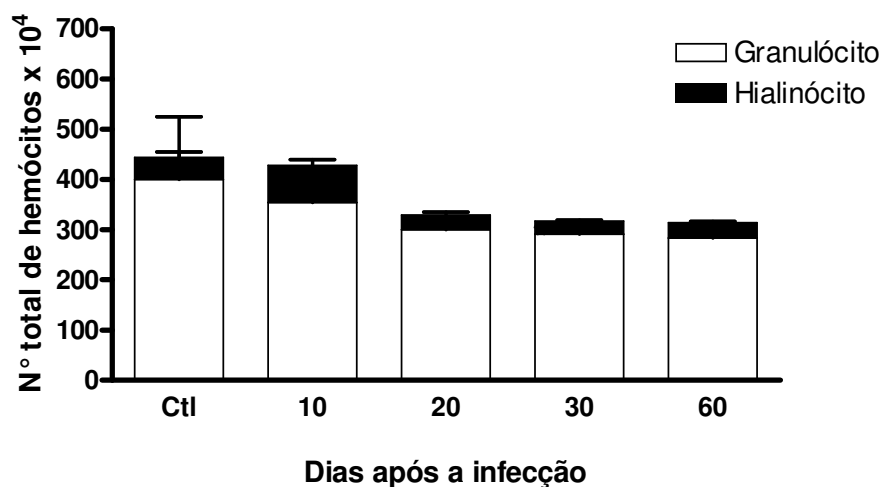


Figura 21 – Número total médio de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* dos 10 aos 60 dias após a exposição com larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*.

Ctl: grupo controle não infectado. Cada ponto representa a média e desvio padrão da contagem de hemócitos totais e a proporção entre granulócitos e hialinócitos de três caramujos. Experimentos realizados em triplicata, de forma independente. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto.

5.4.2 - Caracterização das subpopulações de hemócitos e perfil celular na hemolinfa

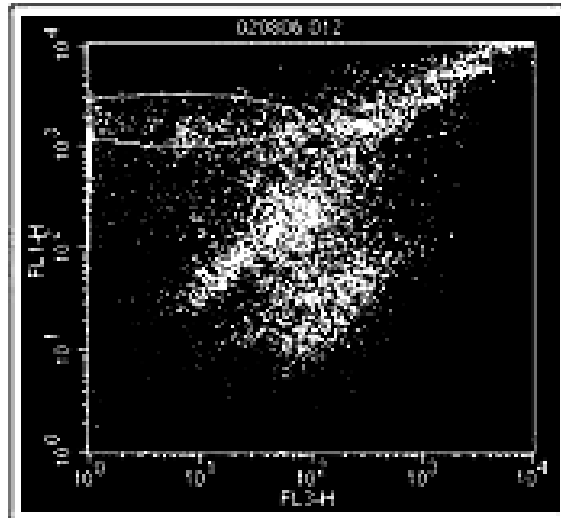
A Figura 22A representa a população de hemócitos circulantes recuperados na hemolinfa de *B. glabrata*, separados pela coloração por laranja de acridina (fluorescência 1) e brometo de etídio (fluorescência 3), dos debrís e células mortas.

A partir da análise de tamanho e granulosidade foram observados duas subpopulações, denominadas hemócitos pequenos e hemócitos grandes (Figura 22B). A população de hemócitos pequenos foi caracterizada por células com tamanho entre 200 e 500 em relação ao eixo x do gráfico e com menor granulosidade (eixo y). Os grandes hemócitos foram considerados como sendo o tipo celular com tamanho entre 500 e 1000 em relação ao eixo x do gráfico e maior granulosidade (eixo y).

Na Figura 23 percebe-se que a proporção entre células grandes e pequenas no controle é de 41% para hemócitos pequenos e de 59% para hemócitos grandes. Trinta minutos após a infecção verificou-se uma redução significativa no número de hemócitos pequenos. Este perfil fenotípico foi observado às 2, 3 e 4h após a infecção.

Em seguida ocorre a inversão de quantidade em relação ao controle, mostrando um valor significativamente maior no grupo exposto. Entretanto horas seguintes apesar de não haver diferença significativa, o número de células pequenas mostra uma tendência de diminuição até atingir valores significativamente menores que o controle às 48 e 72h (Fig. 23) e posteriormente dos 10 aos 60 dai (Fig. 24) ($p < 0,05$).

A



B

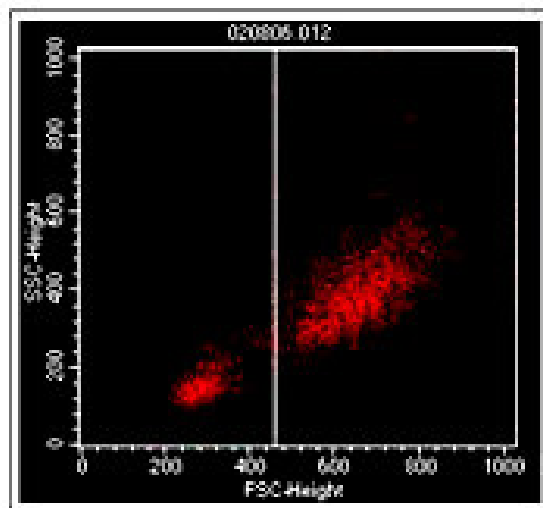


Figura 22 – Representação gráfica por citometria de fluxo das populações de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas por larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*.

A = representa a leitura feita na hemolinfa total

B = representa a leitura feita após a eliminação de células mortas e debris.

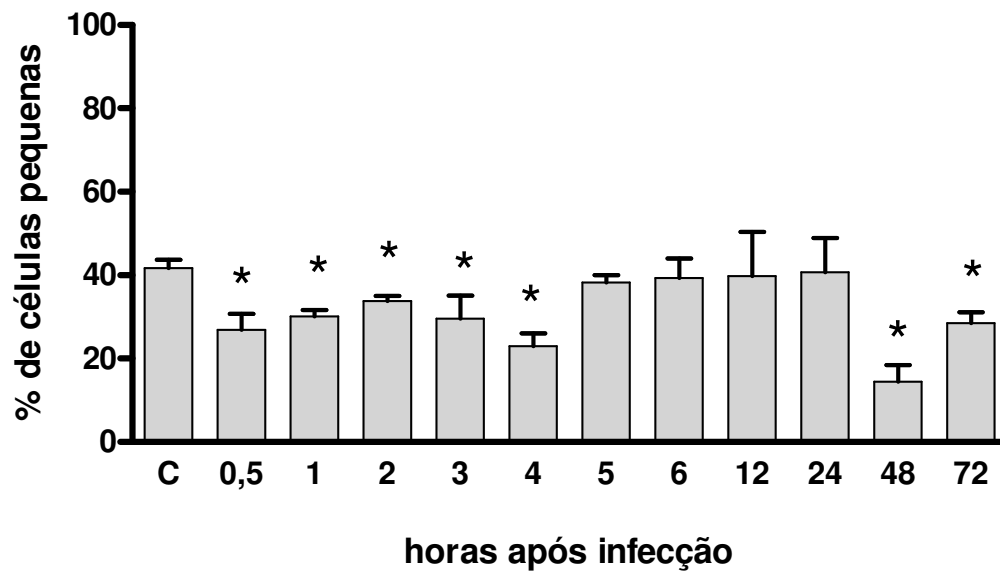


Figura 23 – Percentual médio de células das subpopulações de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* até 72 horas após a infecção por larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*.

C = controle sem infecção. Experimentos realizados em triplicata, de forma independente. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

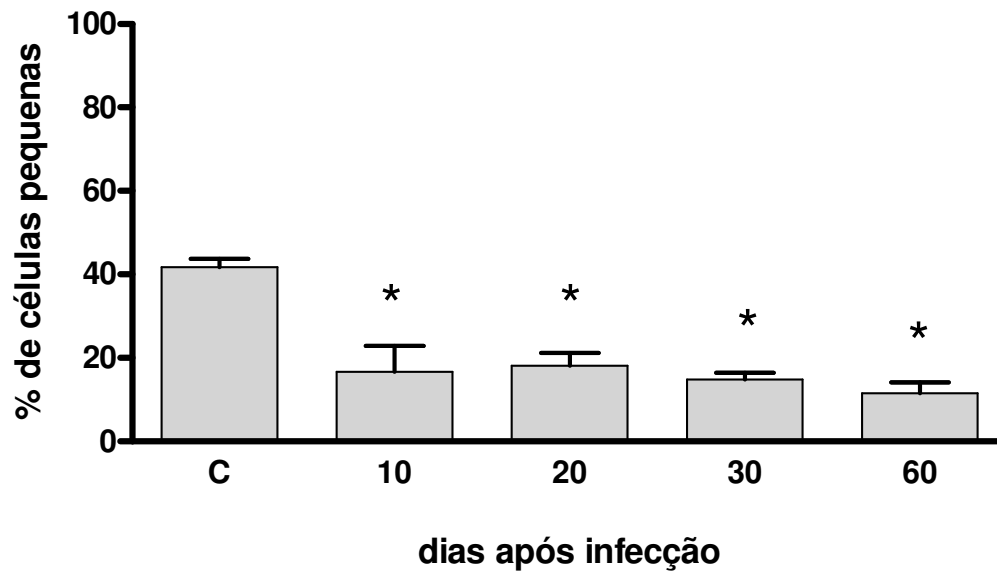


Figura 24 – Percentual médio de células das subpopulações de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* dos 10 aos 60 dias após a infecção por larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*.

C – Grupo controle sem infecção. Experimentos realizados em triplicata, de forma independente. As barras verticais correspondem ao desvio padrão médio de cada ponto. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos são representadas por *.

5.5 – VIA MIGRATÓRIA DE *A. vasorum* E RESPOSTA TECIDUAL DE *B. glabrata*

5.5.1 – Descrição das preparações histológicas

5.5.1.1 – 0,5 hora (Prancha 1 e 2)

A partir do início da observação, verificou-se a presença de maior número de L1 no esôfago, intestino anterior e posterior. Também foram observadas larvas penetrando pela epiderme, próximas ao tecido fibromuscular.

As larvas já aproximavam da mucosa do trato digestivo. Entretanto, não foram observadas larvas penetrando no epitélio e não foi observada reação celular contra as larvas.

5.5.1.2 - 1 hora (Prancha 3)

Com 1h de exposição as L1 foram encontradas, no esôfago, próximas à mucosa do intestino anterior e estômago. Neste último foram observadas larvas aderidas à mucosa e também intra-epiteliais, chegando a alguns casos a atingir a membrana basal desse órgão. Neste período ainda não é possível observar reação celular.

5.5.1.3 - 2 horas (Pranchas 4 e 5)

Após 2h de exposição foram observadas as primeiras larvas na glândula digestiva, no interior dos divertículos, onde não foi observado qualquer tipo de resposta celular perilarvar. Também foram observadas L1 penetrando no epitélio do intestino médio e também algumas já atingiam a camada conjuntiva sub-epitelial entre este órgão e a glândula digestiva. Neste local já era observada uma discreta reação celular local, formando uma única camada de células ao redor da larva. Também pode ser observada a penetração de larvas no epitélio do intestino anterior.

5.5.1.4 - 3 horas (Pranchas 6 e 7)

Até 3h após a exposição ainda era possível verificar a presença de L1 no esôfago, na luz do intestino posterior e nos divertículos da glândula digestiva, ainda sem reação celular perilarvar. Pôde-se observar larvas adjacentes à glândula digestiva e livres na hemocele apresentando uma discreta reação celular. No estômago, o padrão encontrado foram larvas intra-epiteliais e outras já ultrapassando a membrana basal atingindo o tecido conjuntivo adjacente, apresentado um infiltrado celular discreto.

5.5.1.5 - 4 horas (Prancha 8)

As larvas ainda podiam ser encontradas no tubo digestivo, tanto no esôfago quanto na luz do intestino médio. Pode-se observar uma larva na cavidade do manto e pela primeira vez larvas no interior do sistema circulatório, em um vaso entre a glândula de albumem e o rim.

5.5.1.6 - 5 horas (Prancha 9)

Pode ser observado que as larvas encontradas estavam presentes na região pedial e envolvidas por uma reação pré-granulomatosa, com várias camadas de células (hemócitos) mais bem dispostas e organizadas. Foi observado que entre a cutícula da larva e as células que constituem a reação existia um espaço claro, não havendo contato entre ambos.

5.5.1.7 - 6 horas (Prancha 10)

Neste ponto, foram observadas larvas no tecido fibromuscular, sendo que algumas ainda não apresentavam reação celular perilarvar, larvas na luz do intestino anterior e penetrando na mucosa. Também foram encontradas larvas no tecido adjacente ao bulbo bucal com uma reação celular local. Ainda foi observada uma larva no interior do músculo columelar, apresentando neste uma reação celular e um afastamento das fibras musculares.

5.5.1.8 - 8 horas (Prancha 11)

O exemplar processado neste ponto apresentava poucas larvas. Entretanto foram encontradas larvas no tecido fibromuscular com infiltrado celular evidente. Outras larvas foram encontradas no tecido do pé e na pseudobrânquia. Ainda foram encontradas larvas no tubo digestivo, tanto na luz quanto na mucosa.

5.5.1.9 - 12 horas (Prancha 12)

Foram observadas larvas no tecido fibromuscular do pé, apresentando uma reação celular perilarvar, mantendo o padrão de ocorrência do espaço claro. Pela primeira vez foram observadas larvas no epitélio de revestimento da cavidade pulmonar e no tecido que constitui os divertículos pulmonares. Nestes não foi observada reação celular frente à presença da larva.

5.5.1.10 - 24 horas (Pranchas 13 e 14)

Apesar de escassas, foram observadas larvas na luz do intestino, do reto e na glândula digestiva. A maioria das larvas encontradas neste período estava situada no tecido fibromuscular da massa pediosa. Em todos os achados, as larvas encontravam-se circundadas com uma reação celular mais intensa e com formação de pré-granuloma. Mesmo assim, em certos pontos a reação ainda não caracterizava uma reação organizada e concentrada. Nas reações foi observada a manutenção do espaço claro entre a larva e a reação celular. Em certas formações já mais organizadas foi possível observar a presença de um botão celular em uma das faces da larva. Neste ponto também foram encontradas larvas no espaço entre o estômago e a glândula de albumem. A reação celular formada ao redor da larva manteve o padrão de formação do espaço claro.

5.5.1.11 - 48 horas (Pranchas 15 e 16)

As reações encontradas na massa pediosa mantiveram o padrão encontrado nas observações anteriores. Foi observada a presença de larvas no epitélio de revestimento da cavidade do manto, no qual apesar de não apresentar uma reação celular intensa verificou-se o padrão de espaço claro. Também foram encontradas larvas no tecido pulmonar. Em alguns casos, as larvas já estavam com uma reação celular perilarvar organizada, ao passo que em outros, apresentava completa ausência de reatividade. Verificou-se ainda a presença de uma larva penetrando no epitélio do intestino posterior. Uma larva foi encontrada no tecido conjuntivo sem reação celular característica.

5.5.1.12 - 6 dias (Pranchas 17 e 18)

As larvas encontradas estavam localizadas na região pediosa em diversos granulomas típicos. Os granulomas eram constituídos por uma camada interna e espessa, composta por várias camadas concêntricas de amebócitos com ou sem formação epitelióide com alguns amebócitos contendo pigmento melânico, e outra externa formada por células tipo fibroblástica, constituindo uma pseudo-cápsula. Em alguns granulomas foram encontradas as formações de botão celular, desta vez bem definidos, em uma das faces da larva. Também foram encontradas pela primeira vez larvas no interstício da glândula de albúmen, com uma reação celular bem definida, provocando o descolamento das células do órgão.

5.5.1.13 - 14 dias (*Pranchas 19 e 20*)

Os granulomas encontrados estavam bem formados, grandes e em atividade, visto que suas células apresentavam vacúolos intracitoplasmáticos. Neste ponto as larvas encontradas estavam localizadas na região pediosa em diversos granulomas típicos. Em alguns casos pode-se notar o adelgaçamento do epitélio de revestimento em função da pressão exercida pelo granuloma. Larvas também foram encontradas no sistema circulatório renal e na hemocele, também envoltas em forte reação celular. Outras localizavam-se no tecido conjuntivo entre os órgãos. Foram também encontradas larvas na pseudobrânquia, entre os divertículos da glândula digestiva e no tecido de revestimento da hemocele.

5.5.1.14 - 20 dias (*Pranchas 21, 22 e 23*)

O padrão de distribuição das larvas foi semelhante ao encontrado com 14 dias. Entretanto a aspecto das reações teciduais foi diferente. Muitos granulomas estavam reduzidos em tamanho e quantidade menor de células, não apresentando mais o padrão de duas camadas. As larvas foram encontradas no músculo columelar, no tecido de revestimento da cavidade pulmonar, no interior de células de muco, na hemocele, no tecido conjuntivo entre os órgãos, na glândula pediosa, no rim e no tecido fibromuscular, que apresentavam larvas próximas ao epitélio de revestimento. Em certos cortes, foi possível encontrar grandes reações em forma de botão em uma das faces da larva, sem apresentar no entanto a conformação de granuloma. Em alguns casos foi evidente o adelgaçamento do epitélio pela pressão causada pelo granuloma. Também foram encontradas larvas próximas ao tecido subepitelial do reto, com e sem reação granulomatosa.

5.5.1.15 - 30 dias (*Prancha 24*)

Foram encontrados granulomas, porém, não apresentando mais a pseudocápsula. Além disso, mais interessante do que a localização das larvas, pode-se perceber um afrouxamento da reação, com um leve aspecto esponjoso, com menor infiltrado celular. As larvas foram encontradas na massa pediosa, no rim, na pseudobrânquia, no tecido conjuntivo justa-retal e no tecido conjuntivo próximo ao músculo columelar. Pode-se notar depósito de pigmento melânico em alguns destes granulomas.

5.5.1.16 - 60 dias (*Pranchas 25, 26 e 27*)

Neste momento, não foram mais encontrados granulomas com aparência normal. O aspecto frouxo se torna mais evidente e a aparência esponjosa é nítida. O espaço claro é claramente mais amplo e o infiltrado celular praticamente não existe mais. Nas reações teciduais foi encontrado muito depósito melânico. Ainda assim, as larvas foram encontradas na massa pediosa e na hemocele em reações muito fracas e frouxas. Neste trabalho foram encontradas larvas totalmente livres. Uma estava na hemolinfa, entre os divertículos da glândula digestiva, outra na cavidade do rim e várias no espaço abaixo do intestino posterior, na hemolinfa.

5.5.1.17 - Controle (*Prancha 28*)

Exemplo de alguns tecidos de *B. glabrata* não infectado. Vale chamar a atenção para as células de muco presentes no tecido fibromuscular do pé. Também se pode perceber a celularidade normal ao redor do intestino. O tecido renal não apresenta um infiltrado celular.

Prancha 1 – 0,5 hora de exposição

Foto 1 – Várias larvas (L1) no interior de um ducto na região do pé (seta). Observar a presença de células ao redor das larvas (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Larva (L1) penetrando no epitélio da massa pediosa do molusco (HE, Bar = 150 μ m).

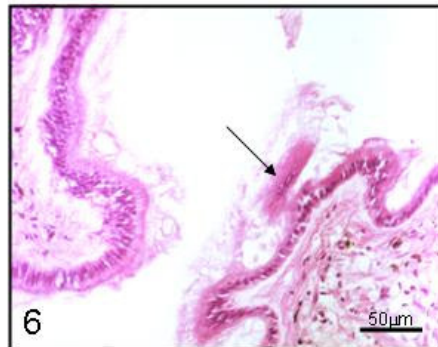
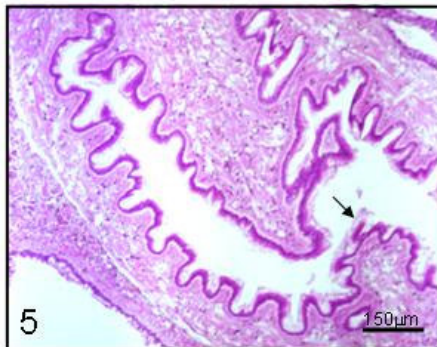
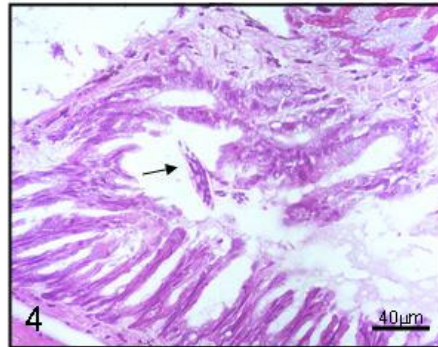
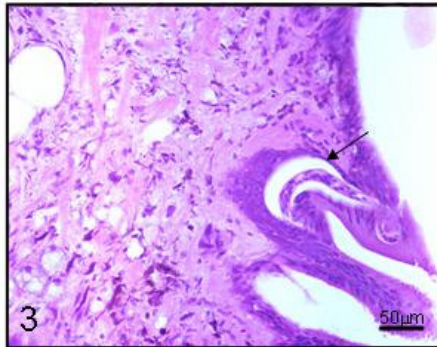
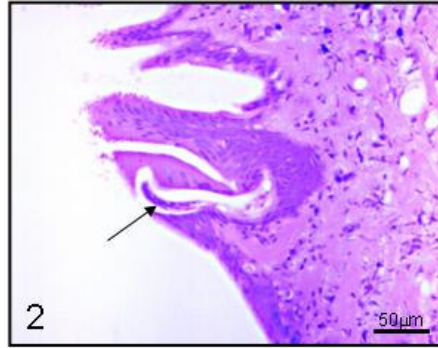
Foto 3 – Mesmo acontecimento da foto anterior (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 4 – Larva no interior do tubo digestivo próxima à mucosa (HE, Bar = 40 μ m).

Foto 5 – Visão geral de uma porção do tubo digestivo com uma larva próxima à mucosa (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 6 – Mesmo local da foto anterior em uma visão mais fechada na larva (HE, Bar = 50 μ m).

PRANCHA 1



Prancha 2 – 0,5 hora de exposição

Foto 1 – Larvas (L1) na luz do intestino posterior (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Larva (L1) mais aproximada (HE, Bar = 40 μ m).

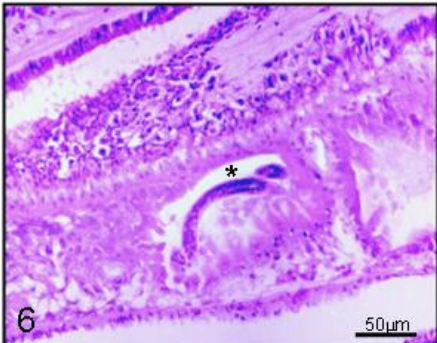
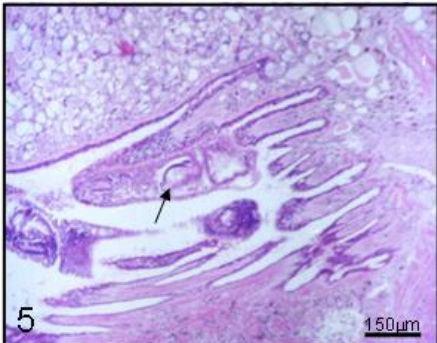
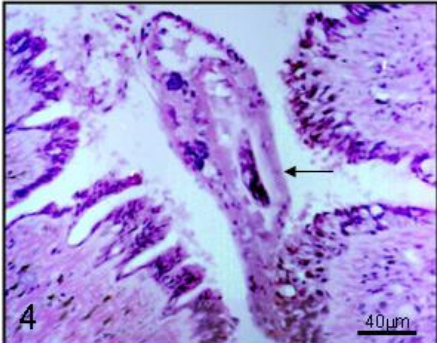
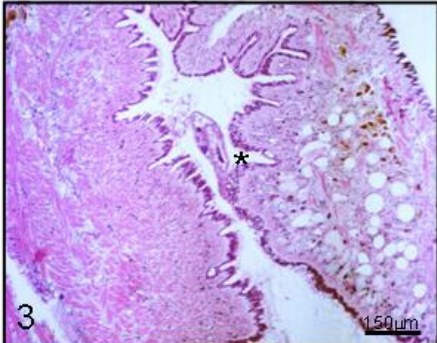
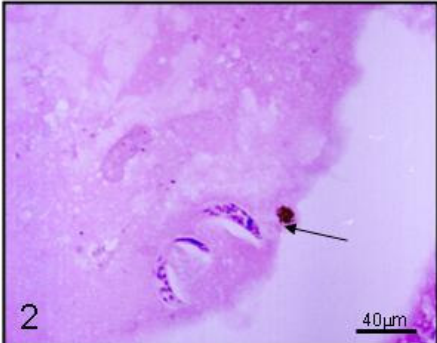
Foto 3 – Visão geral da localização da larva na região pediosa no interior de um ducto (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Detalhe mais aproximado da foto anterior (HE, Bar = 40 μ m).

Foto 5 – L1 no interior de um ducto na região pediosa, em uma visão geral (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 6 – Mesmo local da foto anterior em detalhe aproximado da larva (HE, Bar = 50 μ m).

PRANCHA 2



Prancha 3 – 1 hora de exposição

Foto 1 – Larvas (L1) em um ducto na região do pé (HE, Bar = 40 μ m).

Foto 2 – Larva (L1) no interior do intestino aproximando da mucosa (HE, Bar = 150 μ m).

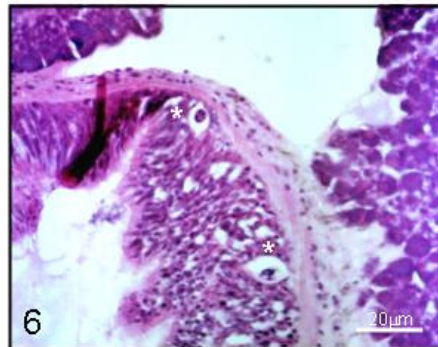
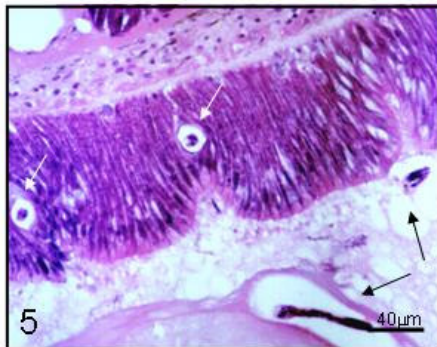
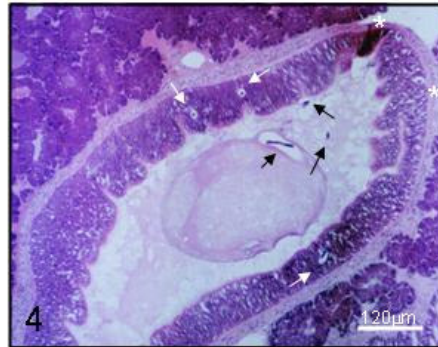
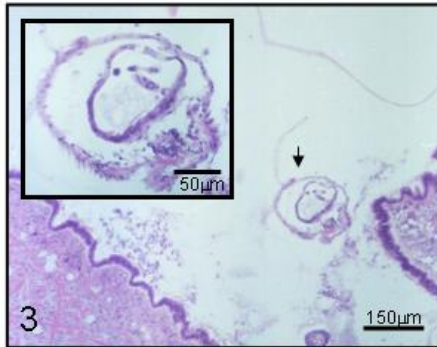
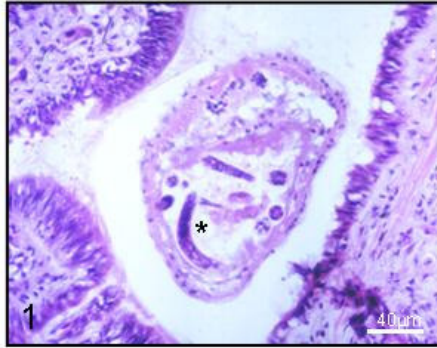
Foto 3 – Ducto da região do pé com larvas no interior (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Visão geral da região do estômago com várias larvas na luz (setas negras), no epitélio (setas brancas) e na camada subepiteial (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 5 – Detalhe de larvas no interior do epitélio gástrico (HE, Bar = 40 μ m).

Foto 6 – Mesmo local em detalhe, com larvas mais profundas atingindo a membrana basal do estômago (HE, Bar = 50 μ m).

PRANCHA 3



Prancha 4 – 2 horas de exposição

Foto 1 – Larvas (L1) em um ducto na região do pé (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Detalhe aproximado de larvas (L1) no interior do ducto (HE, Bar = 50 μ m).

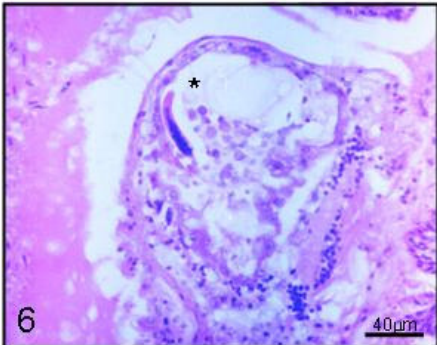
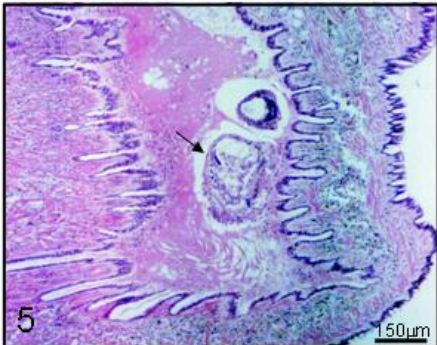
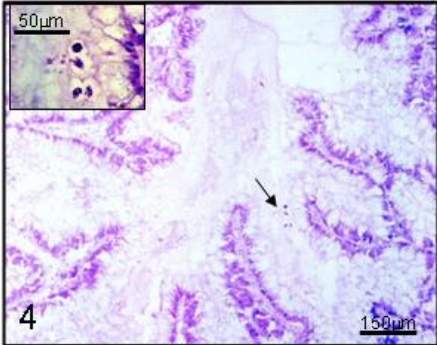
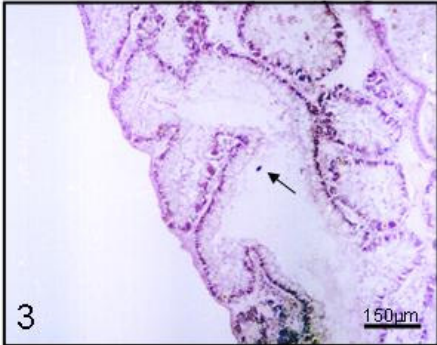
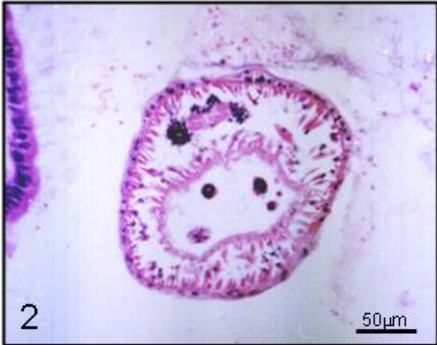
Foto 3 – Larvas no interior da glândula digestiva (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Outra localização da glândula digestiva com mais larvas (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 5 – Larva no interior de ducto do sistema reprodutiva na região do pé (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 6 – Mesmo local em detalhe, mostrando a larva próxima da parede do órgão (HE, Bar = 40 μ m).

PRANCHA 4



Prancha 5 – 2 horas de exposição

Foto 1 – Larvas (L1) na glândula digestiva (HE).

Foto 2 – Outra localização da glândula digestiva (HE, Bar = 50 μ m).

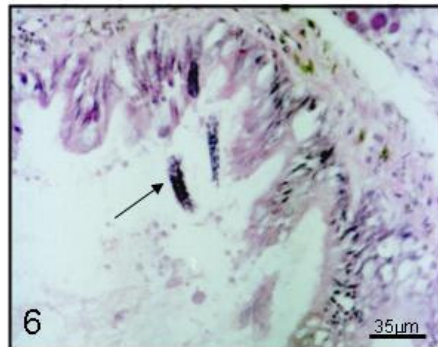
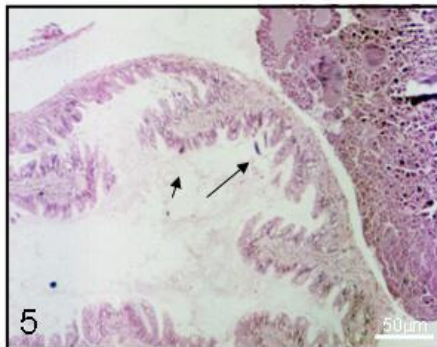
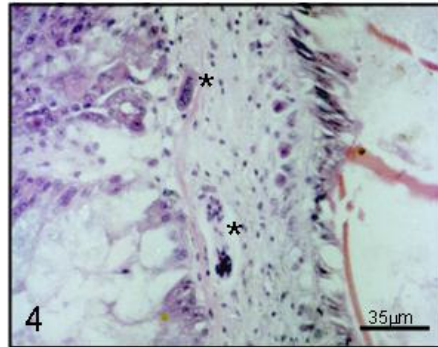
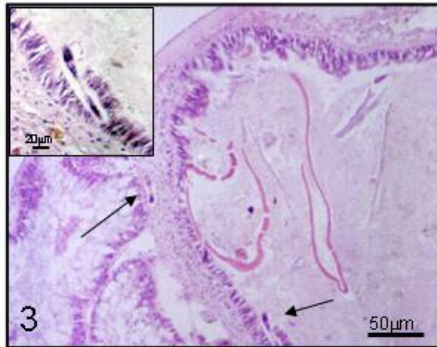
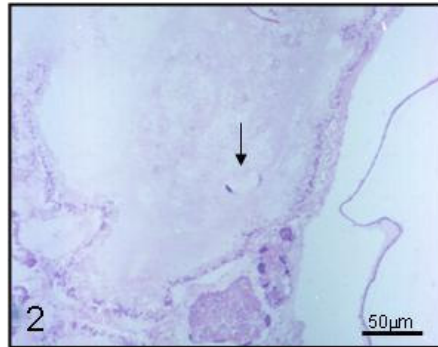
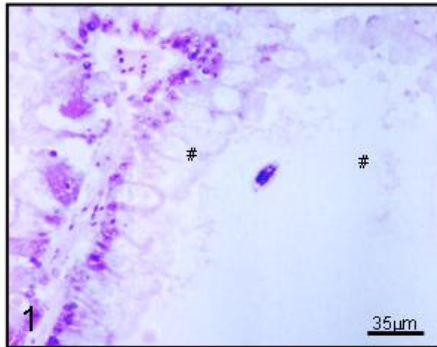
Foto 3 – Larva penetrando na mucosa do intestino médio (ver detalhe ampliado). Na seta maior, larvas localizadas na camada conjuntiva sub-epitelial (HE).

Foto 4 – Detalhe das larvas da foto anterior, com alguma reação celular local (HE).

Foto 5 – Larvas no interior do intestino anterior aderida à mucosa (seta menor) e próximas à mucosa (seta maior) (HE).

Foto 6 – Mesmo local em detalhe, mostrando a larva próxima da parede do órgão (HE).

PRANCHA 5



Prancha 6 – 3 horas de exposição

Foto 1 – Larvas (L1) na glândula digestiva (HE, Bar = 350 μ m).

Foto 2 – Detalhe da foto anterior (HE, Bar = 120 μ m).

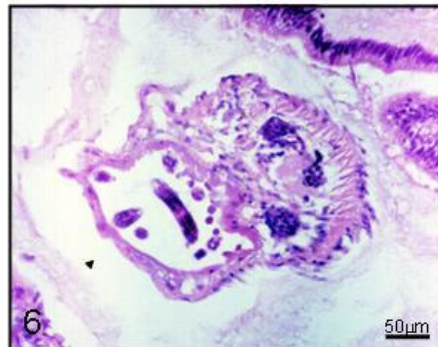
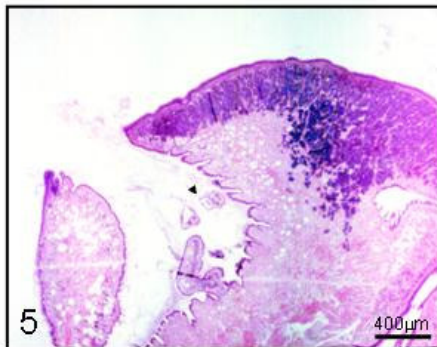
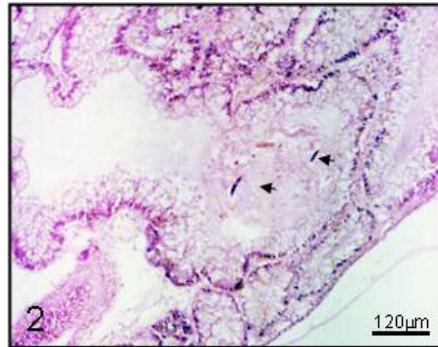
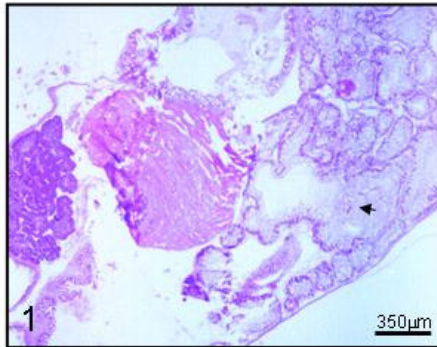
Foto 3 – Larva localizada no colar do manto (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Detalhe da larva da foto anterior. (HE).

Foto 5 – Vista geral da região do pé mostrando um ducto com larvas (HE, Bar = 400 μ m).

Foto 6 – Mesmo local em detalhe, mostrando as larvas no interior do órgão (HE Bar = 50 μ m).

PRANCHA 6



Prancha 7 – 3 horas de exposição

Foto 1 – Visão geral de larvas (L1) penetrando na mucosa, já na submucosa e no tecido conjuntivo sub-epitelial no estômago (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Detalhe da larva na região de submucosa e conjuntivo sub-epitelial do estômago (HE, Bar = 50 μ m).

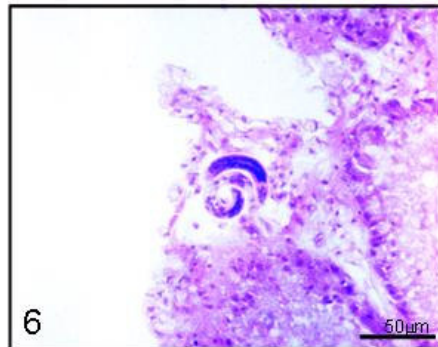
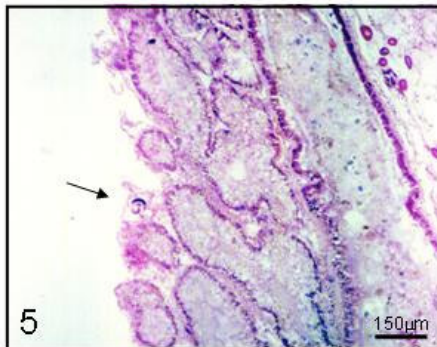
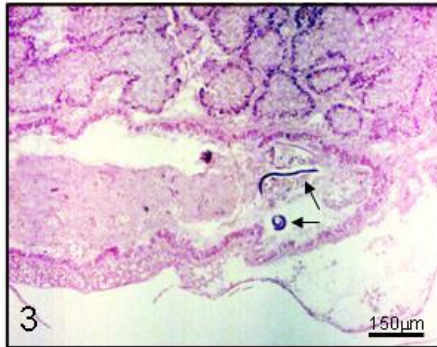
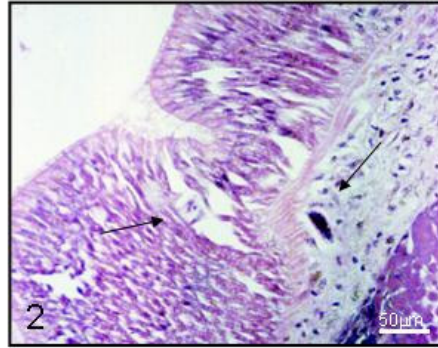
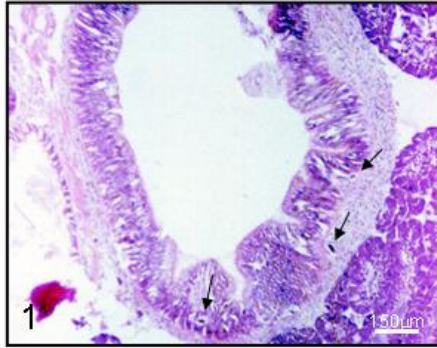
Foto 3 – Larvas localizadas na luz do intestino posterior (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Detalhe das larvas da foto anterior. (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 5 – Vista geral da região de glândula digestiva mostrando uma larva na hemocèle (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 6 – Mesmo local em detalhe, mostrando a larva com uma reação celular ao seu redor (HE Bar = 50 μ m).

PRANCHA 7



Prancha 8 – 4 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) na luz do intestino médio (seta). (HE, Bar = 250 μ m).

Foto 2 – Larvas (L1) no luz de um ducto do sistema reprodutor na massa pediosa do molusco (HE, Bar = 200 μ m).

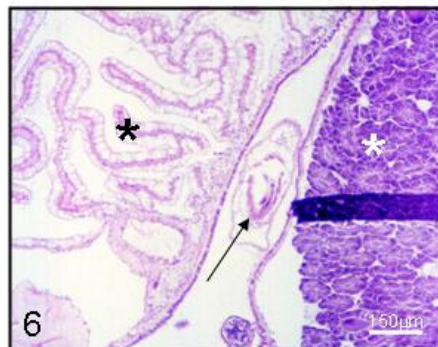
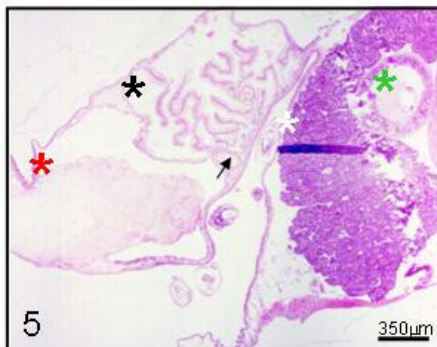
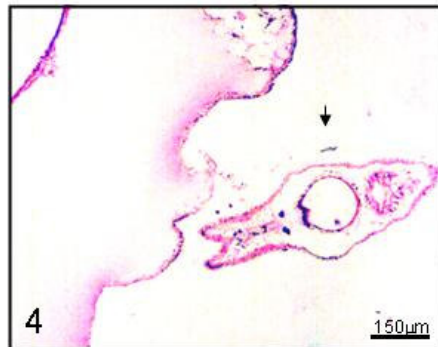
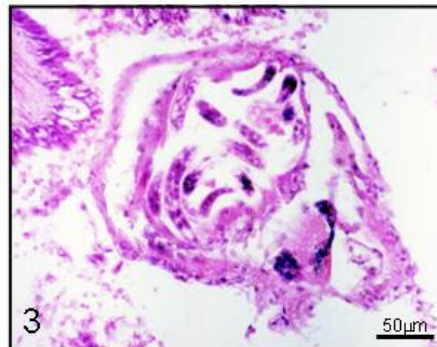
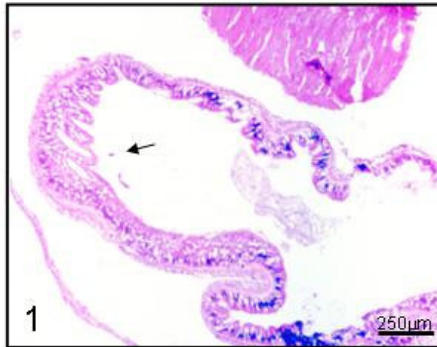
Foto 3 – Mesmo local da foto anterior em detalhe (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 4 – Larva no interior da cavidade do manto (seta) (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 5 – Visão geral mostrando larvas no interior do sistema circulatório (seta). Vê-se também a glândula de albúmen (asterisco branco) e o rim (asterisco preto), o estômago (asterisco verde) e o coração rim (asterisco vermelho) (HE, Bar = 350 μ m)

Foto 6 – Detalhe das larvas no interior do sistema circulatório (seta) entre a glândula de albúmen (asterisco branco) e o rim (asterisco preto) (HE, Bar = 150 μ m).

PRANCHA 8



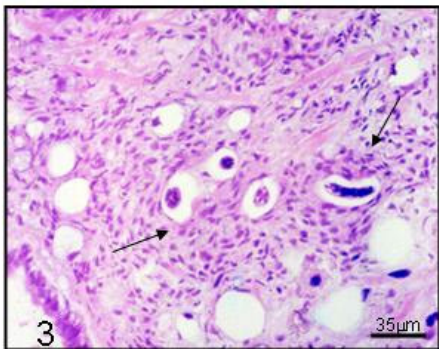
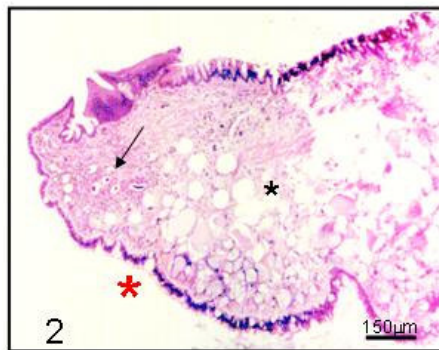
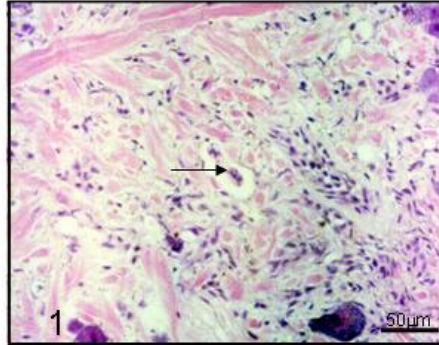
Prancha 9 – 5 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido fibromuscular do pé (seta). Notar fraco infiltrado celular ao redor da larva (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 2 – Visão geral da massa pediosa mostrando vários ductos excretores de muco em corte transversal (asterisco preto). Conjunto de larvas aglomeradas no tecido. Notar a presença de três ductos excretores de muco (asterisco vermelho) (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 3 – Mesmo local da foto anterior em detalhe. Neste ponto ocorre um maior infiltrado celular ao redor das larvas (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 9



Prancha 10 – 6 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido fibromuscular do pé (seta) sem reação celular. Asterisco branco evidencia estruturas do sistema nervoso (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 2 – Larva localizada no músculo columelar com infiltrado celular próximo à larva (HE, Bar = 35 μ m).

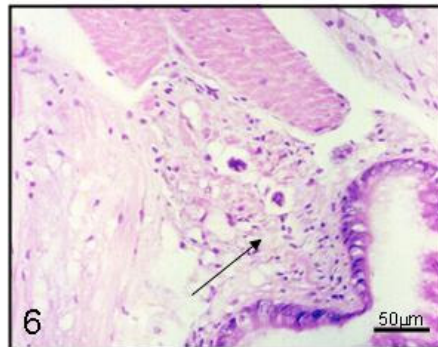
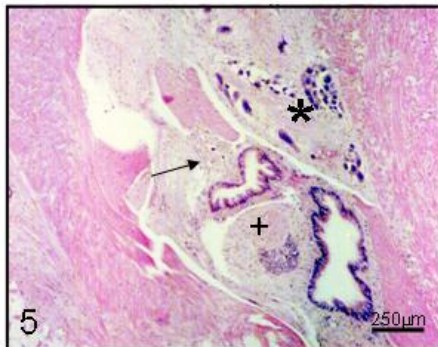
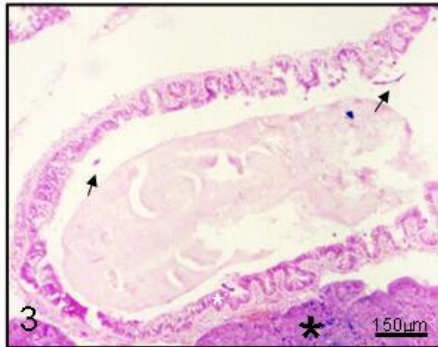
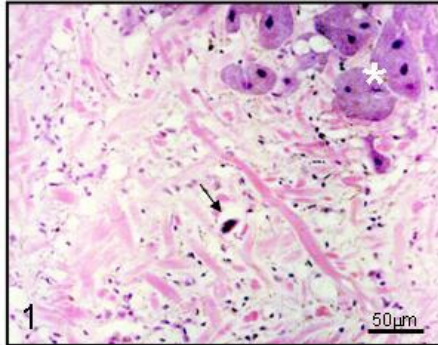
Foto 3 – Larvas na luz do intestino anterior (setas) e penetrando na mucosa (asterisco branco). Glândula de albúmen (asterisco preto) (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Detalhe da larva penetrando na mucosa (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 5 – Larvas no tecido adjacente ao bulbo bucal (+) com infiltrado celular. Nota-se gânglio nervoso (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Detalhe da foto anterior mostrando o infiltrado celular (seta). (HE, Bar = 50 μ m).

PRANCHA 10



Prancha 11 – 8 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) na luz do intestino médio em aproximação da mucosa (seta maior). Notar a presença de uma larva invadindo a mucosa (seta menor) (HE, Bar = 35 μ m).

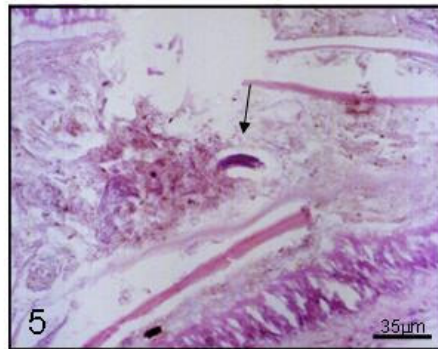
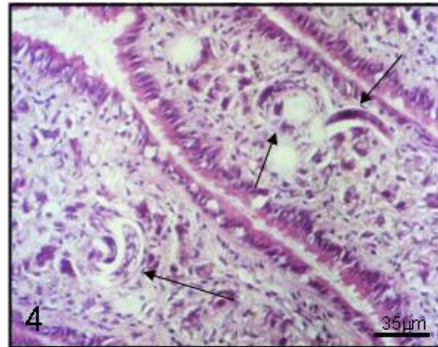
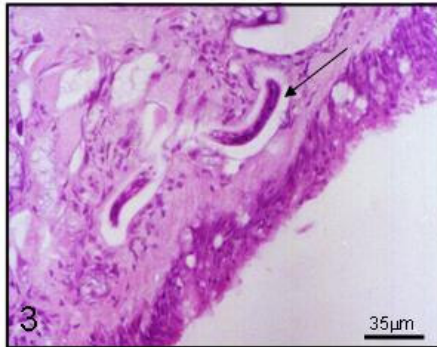
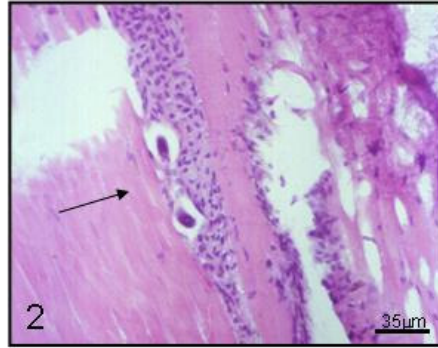
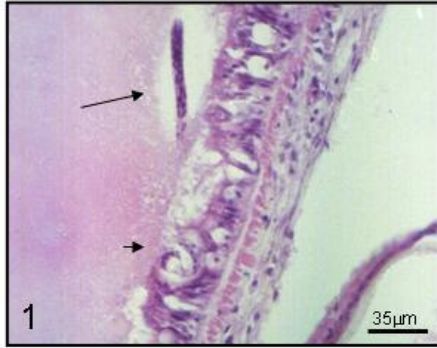
Foto 2 – Larva (seta) localizada no músculo columelar entre as fibras do tecido com forte infiltrado celular (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 3 – Larvas (seta) em localização sub-epitelial no tecido da região pediosa do molusco. Observar um fraco infiltrado celular (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larvas (setas) localizadas nas lamelas da pseudobrânquia. Notar ausência de infiltrado celular. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Larva (seta) localizada na luz do reto. (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 11



Prancha 12 – 12 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido fibromuscular do pé (seta) com reação pré-granulomatosa. (HE, Bar = 25 μ m).

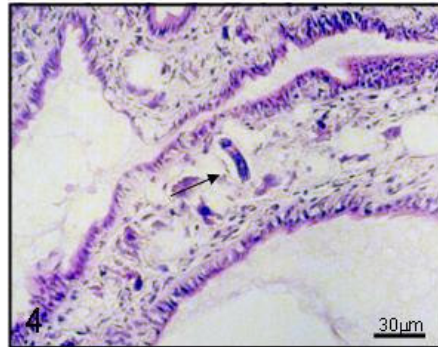
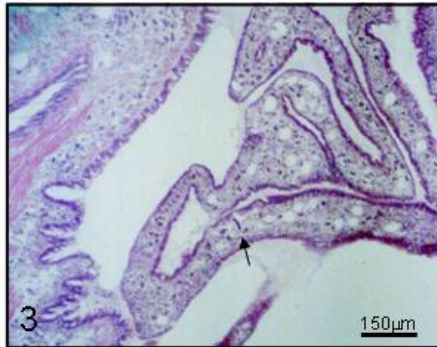
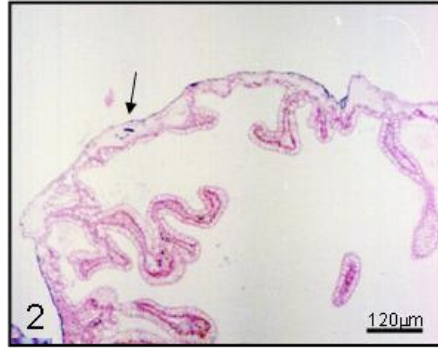
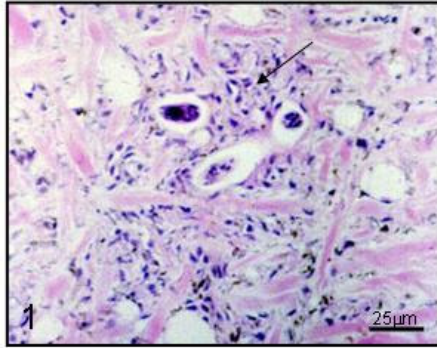
Foto 2 – Larva localizada no epitélio do tecido renal (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 3 – Larvas na parede do rim (seta) (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 4 – Detalhe da larva da foto anterior (HE, Bar = 30 μ m).

Foto 5 – Larva (seta) na luz do intestino médio (asterisco) próxima à mucosa (HE, Bar = 30 μ m).

PRANCHA 12



Prancha 13 – 24 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) na luz do intestino (seta). (HE, Bar = 40 μ m).

Foto 2 – Larvas localizadas no tecido fibromuscular do pé (setas) (HE, Bar = 125 μ m).

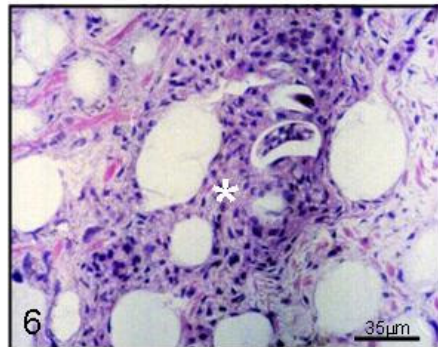
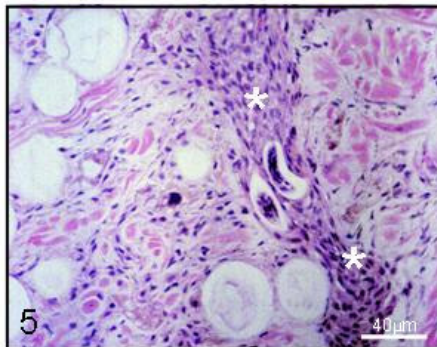
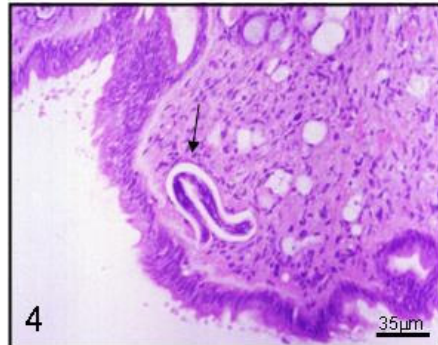
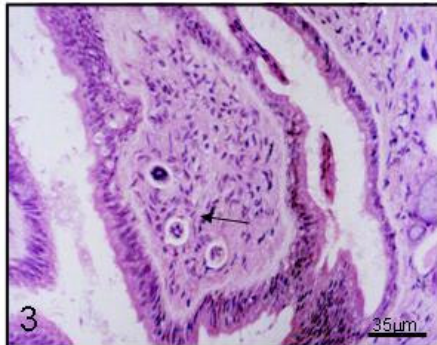
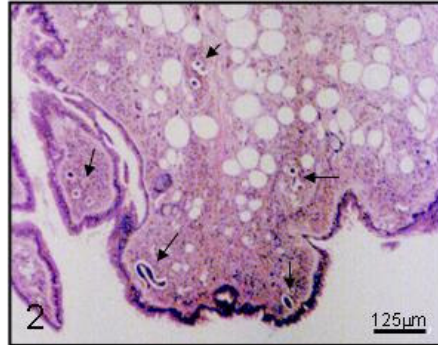
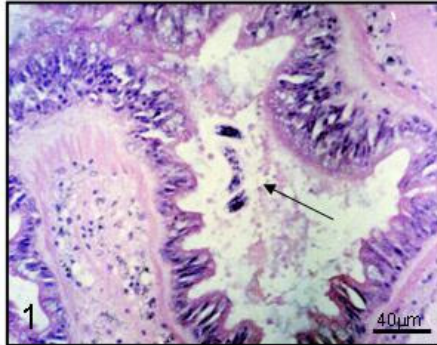
Foto 3 – Larvas na camada fibromuscular superficial (seta) com reação celular ao redor da larva (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larva na camada fibromuscular superficial na massa pediosa (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Intensa reação celular no tecido fibromuscular da massa pediosa com presença de um pré-granuloma perilarvar (asterisco branco) (HE, Bar = 40 μ m)

Foto 6 – Intensa reação celular no tecido fibromuscular da massa pediosa com presença de um pré-granuloma perilarvar (asterisco branco) (HE, Bar = 35 μ m)

PRANCHA 13



Prancha 14 – 24 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido fibromuscular do pé com reação pré-granulomatosa (asterisco vermelho). Presença de um botão celular (seta) (HE, Bar = 50 μ m).

Foto 2 – Larvas localizadas na luz do reto (HE, Bar = 12 μ m).

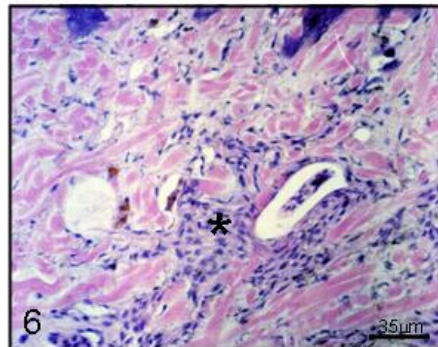
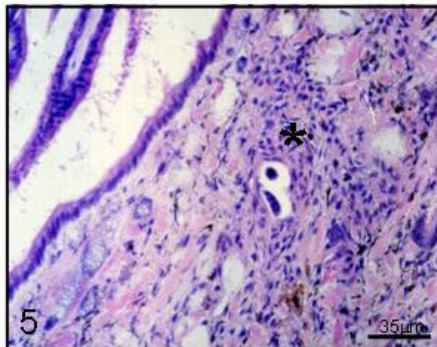
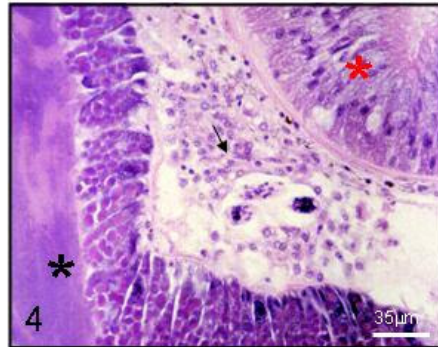
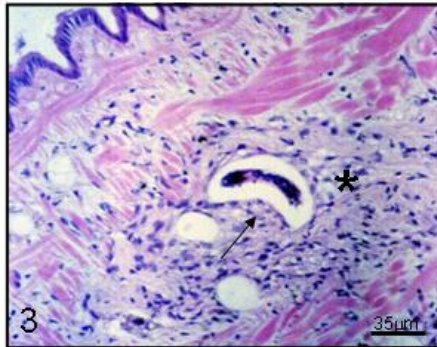
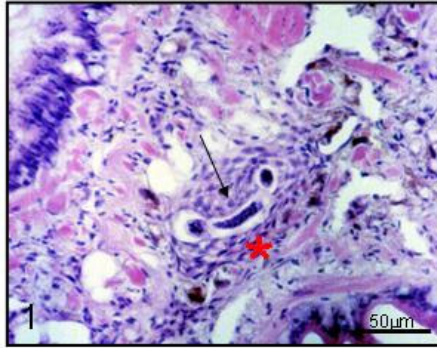
Foto 3 – Infiltrado celular no tecido fibromuscular da região pediosa (asterisco preto). Presença de um botão celular em um dos lados da reação pré-granulomatosa (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larva na cavidade celomática, entre o intestino médio (asterisco vermelho) e a glândula de albúmen (asterisco preto). Reação celular intensa formando uma reação pré-granulomatosa ao redor da larva. Nota-se a presença de um espaço claro entre a larva e as células. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Infiltrado celular no tecido fibromuscular da região pediosa (asterisco preto). (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Infiltrado celular no tecido fibromuscular da região pediosa (asterisco preto). (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 14



Prancha 15 – 48 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido fibromuscular do pé (seta) com reação pré-granulomatosa. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Larva localizada no tecido fibromuscular, evidenciando o botão celular em um dos lados da larva(asterisco branco) (HE, Bar = 35 μ m).

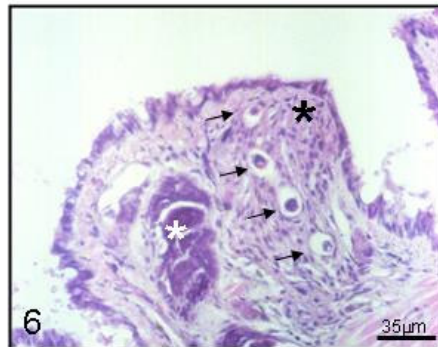
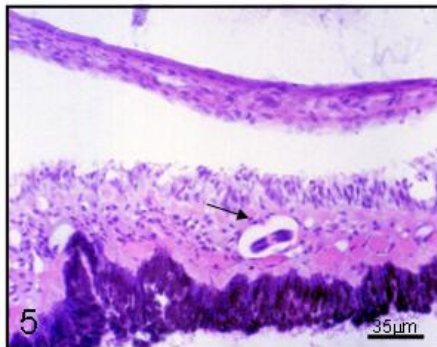
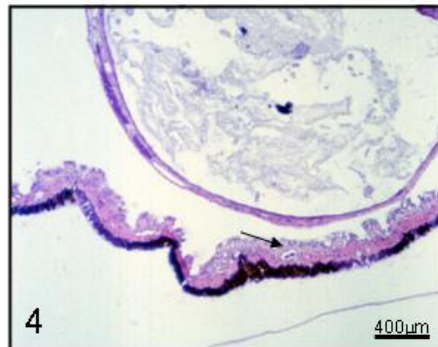
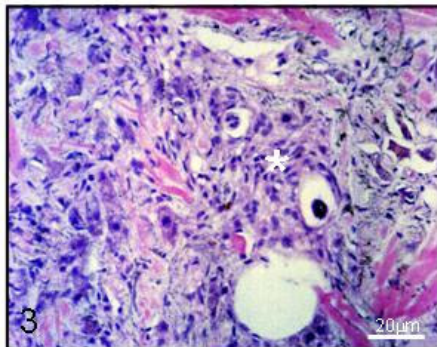
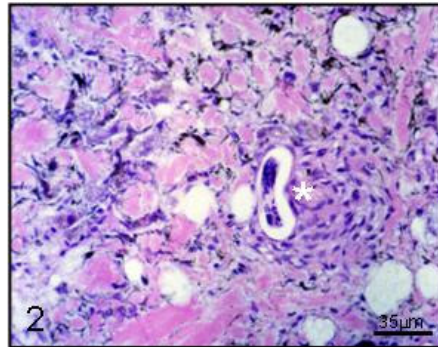
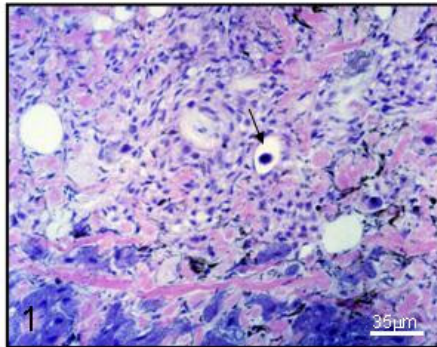
Foto 3 – Larvas no tecido fibromuscular do pé com reação perilarvar (asterisco branco) (HE, Bar = 20 μ m).

Foto 4 – Larva localizada no manto sem reação local. Presença do espaço claro ao redor da larva (HE, Bar = 400 μ m).

Foto 5 – Detalhe da foto anterior. Presença do espaço claro ao redor da larva (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 –Larvas no tecido fibromuscular do pé (setas) envolvidas por uma intensa reação celular (asterisco preto) ao lado de um gânglio nervoso (asterisco branco). (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 15



Prancha 16 – 48 horas de exposição

Foto 1 – Larva (L1) no tecido da glândula digestiva (seta) com uma discreta reação pré-granulomatosa. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Detalhe do corte anterior. Não está presente o espaço claro ao redor da larva (HE, Bar = 35 μ m).

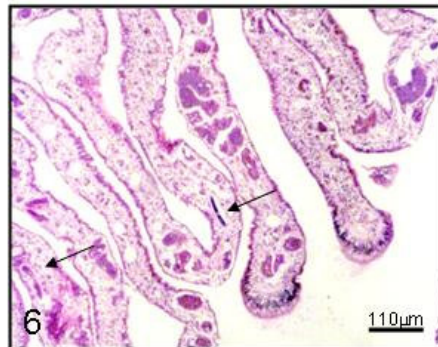
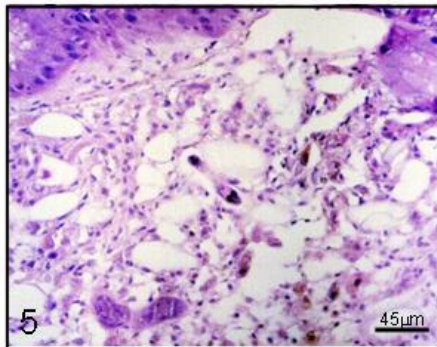
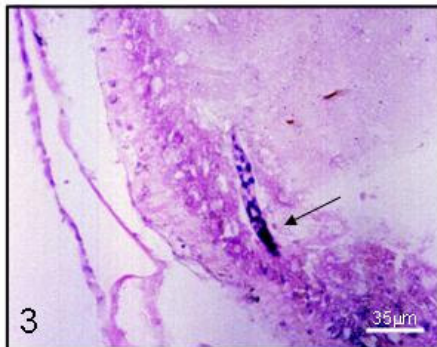
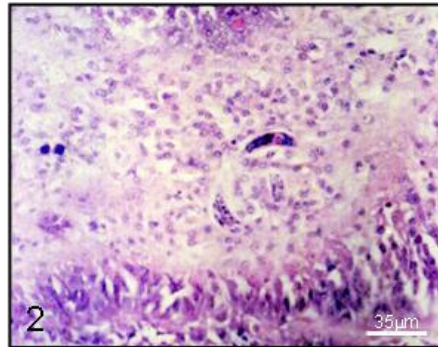
Foto 3 – Larvas penetrando na parede do intestino posterior (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Visão geral de larva no tecido conjuntivo, sem reação perilarvar evidente (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 5 – Detalhe da foto anterior. Evidencia a ausência de reação tecidual e muitas células de muco (HE, Bar = 45 μ m).

Foto 6 – Larvas no tecido conjuntivo. Evidencia a ausência de reação tecidual (HE, Bar = 110 μ m).

PRANCHA 16



Prancha 17 – 6 dias após a exposição

Foto 1 – Formação do granuloma com duas camadas. Uma interna com células de aspecto epitelíóide (asterisco preto) e outra externa com células tipo fibroblasto (seta). Evidenciar a formação de um botão celular em uma das faces da larva (cruz branca). (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Adensamento celular ao redor das larvas com aspecto de pré-granuloma localizado na região pediosa (HE, Bar = 35 μ m).

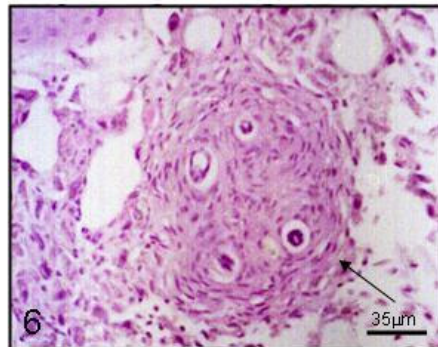
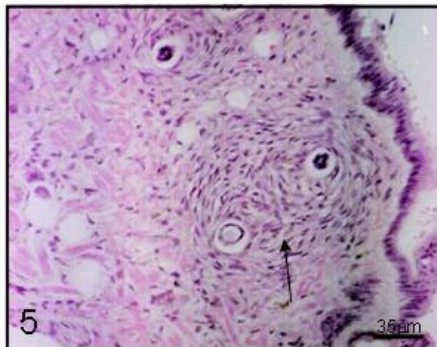
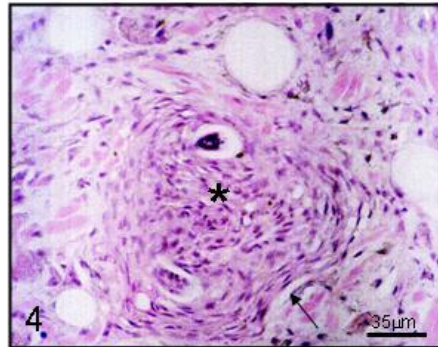
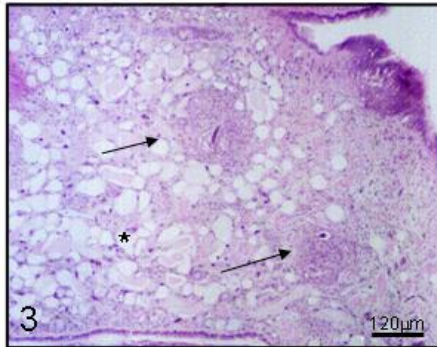
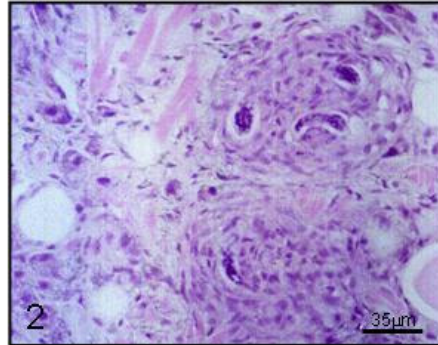
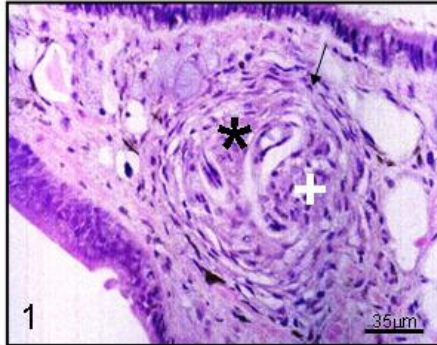
Foto 3 – Tecido fibromuscular do pé com dois granulomas (setas) e várias células de muco (asterisco preto) (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 4 – Granuloma típico constituído por duas camadas celulares. Uma área central formada por adensamento celular com aspecto epitelíóide (asterisco preto) e uma pseudo-cápsula externa constituída por células tipo fibroblasto com núcleo fusiforme (seta)(HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Granuloma na região pediosa com início de formação da pseudocápsula (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Região pediosa com um granuloma grande constituído por quatro menores. A pseudocápsula está em processo de formação. (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 17



Prancha 18 – 6 dias após a exposição

Foto 1 – Larva (seta vertical) localizada entre o estômago e a glândula de albúmen apresentando um infiltrado celular ao seu redor. Larva (seta horizontal) envolta por uma reação celular pré-granulomatosa no interior da glândula de albúmen (asterisco branco). Notar, hemolinfa (asterisco preto) e a luz do estômago (asterisco vermelho)(HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Detalhe da larva (seta) no interior da glândula de albúmen envolvida por uma reação celular. Notar a presença de infiltrado celular na periferia (asterisco branco) (HE, Bar = 35 μ m).

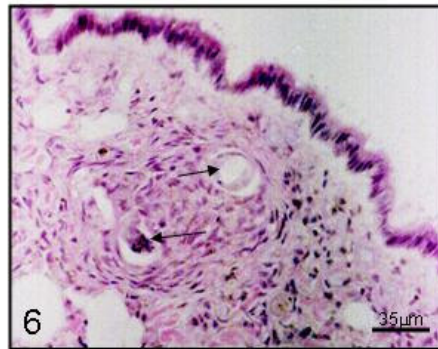
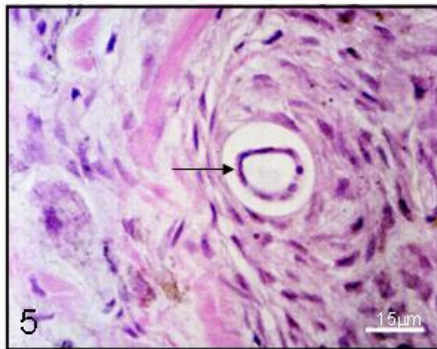
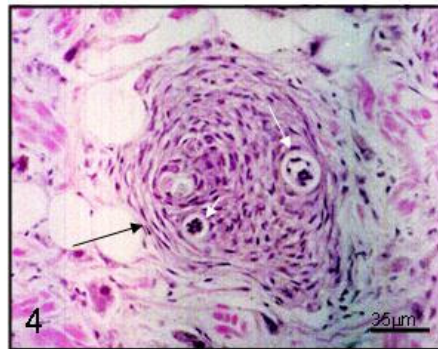
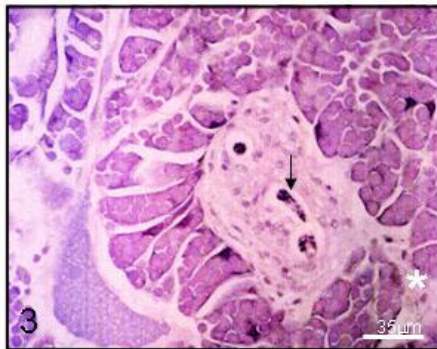
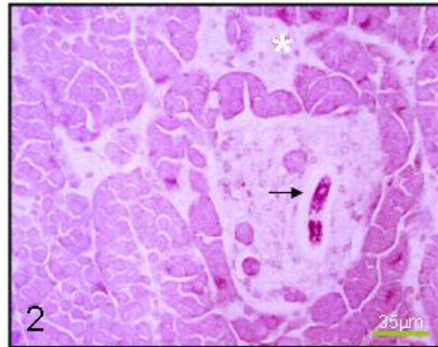
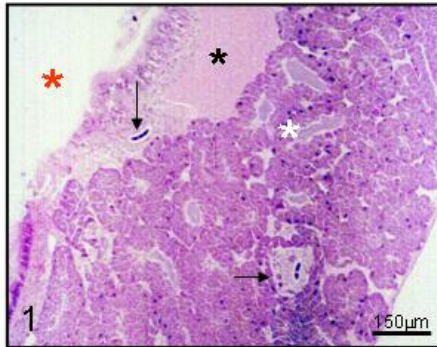
Foto 3 – Detalhe da larva (seta) no interior da glândula de albúmen envolvida por uma reação celular. Notar a presença de infiltrado celular na periferia (asterisco branco), com células se aproximando (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larvas no interior de outro granuloma típico na região do pé do molusco. Nota-se a segunda camada de células (seta preta) e as larvas (setas brancas) (HE, Bar = 15 μ m).

Foto 5 – Larva no interior de um granuloma na região do pé (seta) (HE, Bar = 15 μ m).

Foto 6 – Larvas no interior de um granuloma na região do pé (setas) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 18



Prancha 19 – 14 dias após a exposição

Foto 1 – Granuloma no interior da artéria renal (asterisco branco). Asterisco preto representa o espaço renal. A seta indica uma L2 pela presença de grânulos ao redor do intestino (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Granuloma na região pediosa próximo ao epitélio. Notar o adelgaçamento do epitélio (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

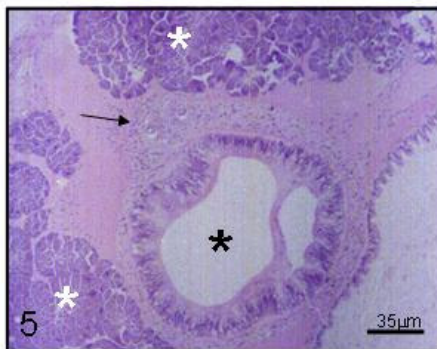
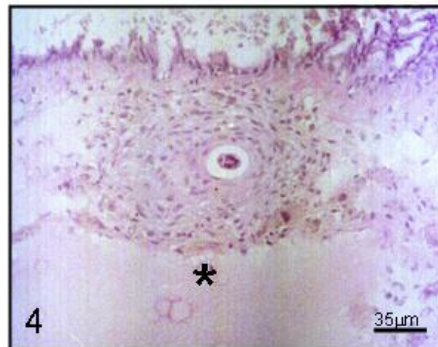
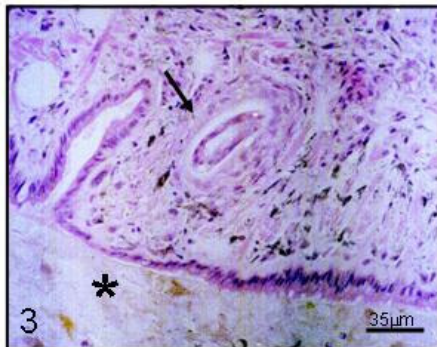
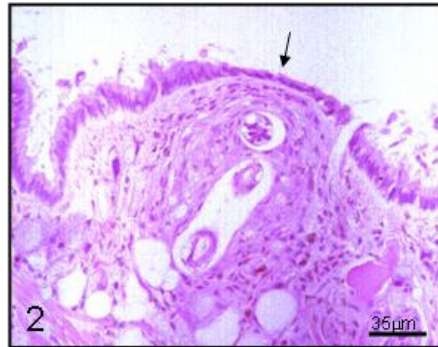
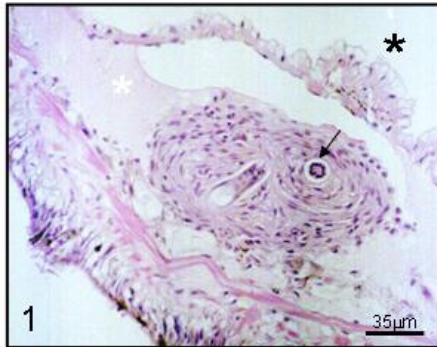
Foto 3 – Larva próxima da região subepitelial do reto (seta). O asterisco preto indica a luz do reto (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 4 – Larva em granuloma no tecido de revestimento da hemocele (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Reação granulomatosa na hemocele ao redor de larvas (seta) entre a glândula de albúmen (asterisco branco) e o estômago (asterisco preto). (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Detalhe da foto anterior, evidenciando o padrão de reação do granuloma com uma camada interna (asterisco preto) e uma pseudocápsula (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 19



Prancha 20 – 14 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas localizadas entre os divertículos da glândula digestiva (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

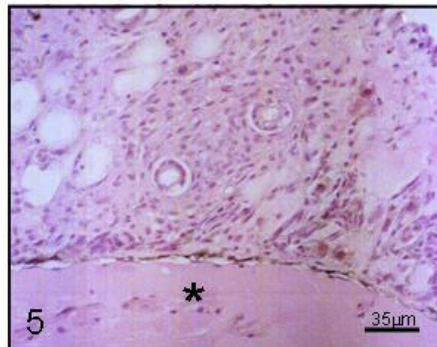
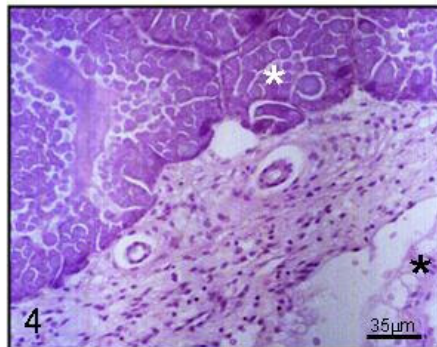
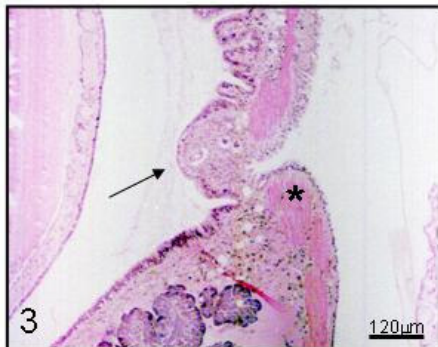
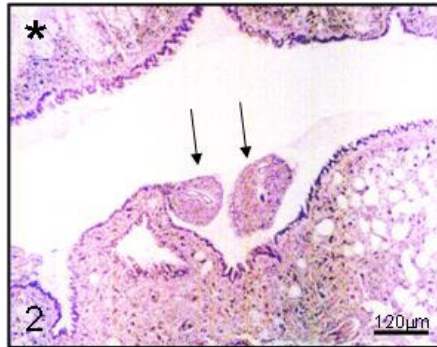
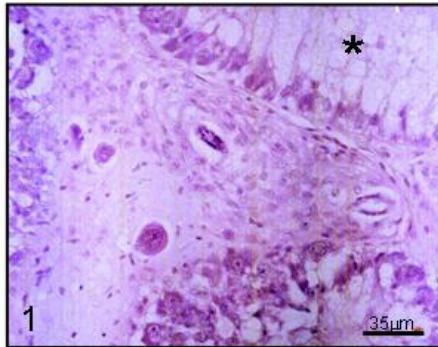
Foto 2 – Dois granulomas nas lamelas da pseudo-brânquia. Acima pode-se ver a região renal (asterisco preto) (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 3 – Reação granulomatosa (seta) localizada no tecido conjuntivo acima do músculo columelar (asterisco preto) (HE, Bar = 120 μ m).

Foto 4 – Larvas em reação granulomatosa localizadas entre o rim (asterisco preto) e a glândula de albúmen (asterisco branco) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Larvas localizadas no tecido ao lado da região cardíaca (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 20



Prancha 21 – 20 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas no interior de células de muco. Observar a presença de muco no interior das células (setas) ao redor das larvas (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Granuloma na hemocele (seta preta), causando desvio de fluxo de hemolinfa (setas brancas). Asterisco preto indica o músculo columelar e o asterisco vermelho a luz do reto. (HE, Bar = 100 μ m).

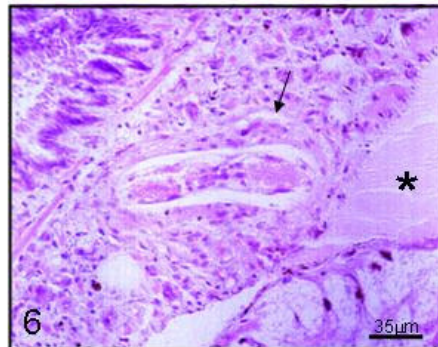
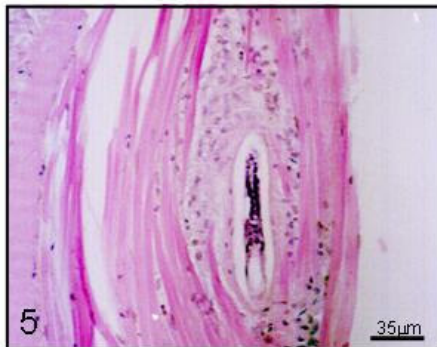
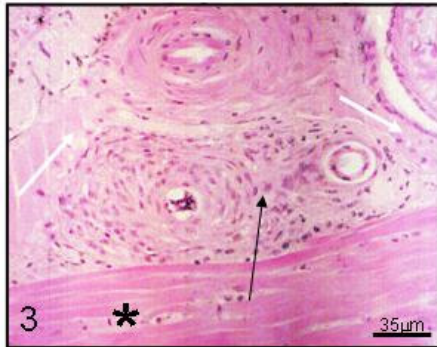
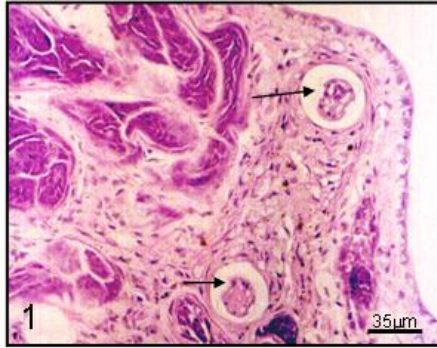
Foto 3 – Detalhe da foto anterior (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Reação localizada no músculo columelar, provocando afastamento e ruptura de fibras musculares. Observa-se o influxo celular na região ao redor (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Larva localizada no músculo columelar apresentando o mesmo padrão de afastamento e ruptura de fibras musculares em função da reação celular. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Larva (seta) localizada no tecido conjuntivo ao lado da hemocele (asterisco preto). (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 21



Prancha 22 – 20 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas localizadas no tecido que reveste a cavidade pulmonar (setas) (HE, Bar = 150 μ m).

Foto 2 – Larva localizada na glândula pediosa (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

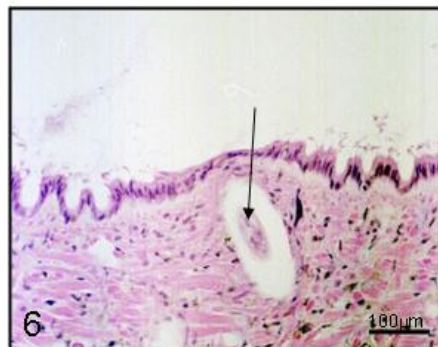
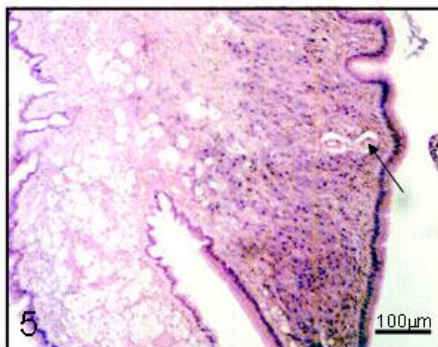
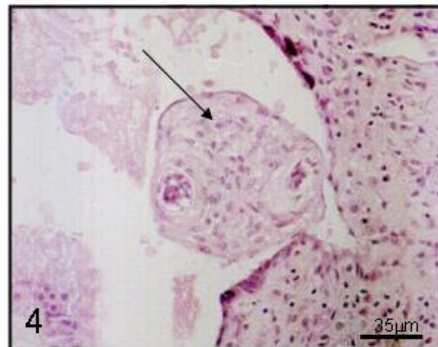
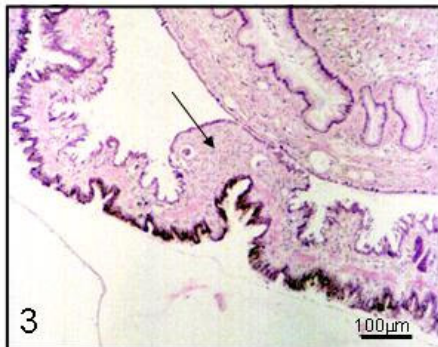
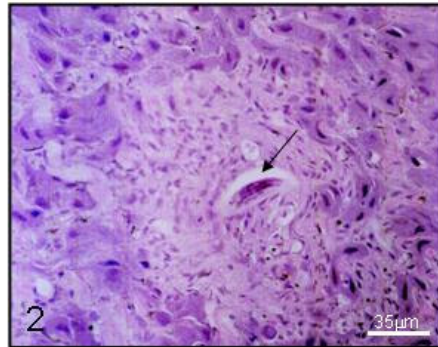
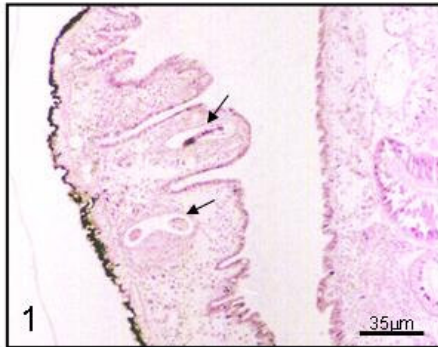
Foto 3 – Granuloma localizado no tecido que reveste a cavidade pulmonar (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Granuloma localizado no rim (seta) (HE, Bar = 15 μ m).

Foto 5 – Larva localizada na glândula pediosa (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Larva localizada no tecido fibromuscular, próxima ao epitélio (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 22



Prancha 23 – 20 dias após a exposição

Foto 1 – Granuloma em posição intrarrenal (seta) (HE, Bar = 100 μ m).

Foto 2 – Larvas em granuloma na região do rim (seta) (HE, Bar = 35 μ m).

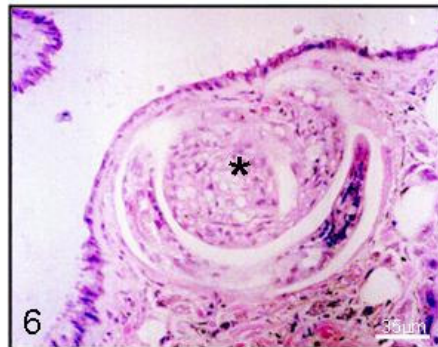
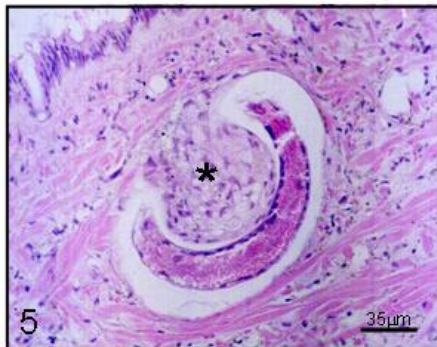
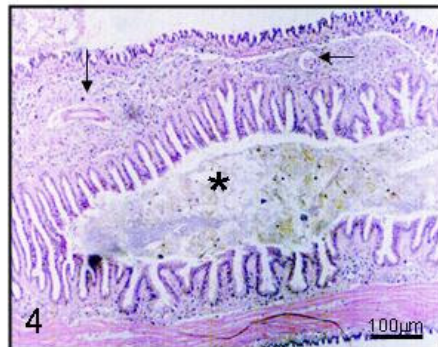
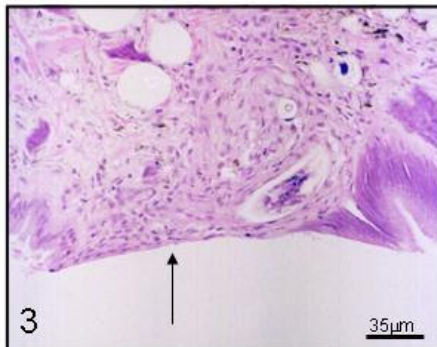
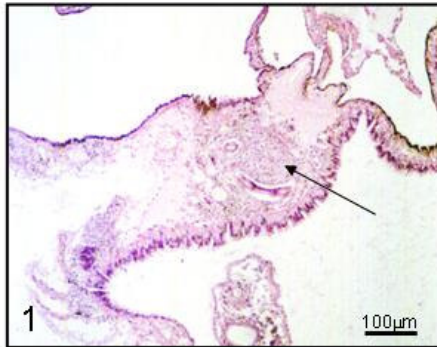
Foto 3 – Larva próxima ao epitélio, com granuloma provocando seu adelgaçamento (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larvas (setas) localizadas no tecido ao redor do reto (asterisco preto) (HE, Bar = 15 μ m).

Foto 5 – Larva com reação em forma de botão (asterisco preto) no tecido fibromuscular do pé. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Larva com reação em forma de botão (asterisco preto) no tecido fibromuscular do pé, mais próxima do epitélio (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 23



Prancha 24 – 30 dias após a exposição

Foto 1 – Larva (seta amarela) em um granuloma localizado no tecido conjuntivo ao redor do rim. Asterisco preto indica o saco renal. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Granuloma localizado na massa pediosa próximo ao epitélio, circundado por várias células de muco (asterisco preto). (HE, Bar = 35 μ m).

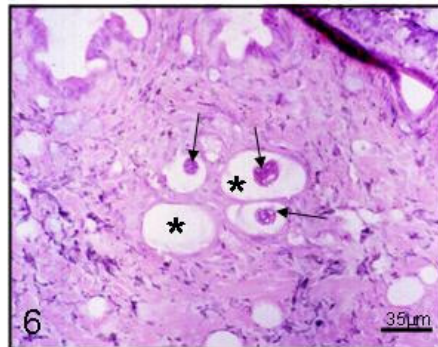
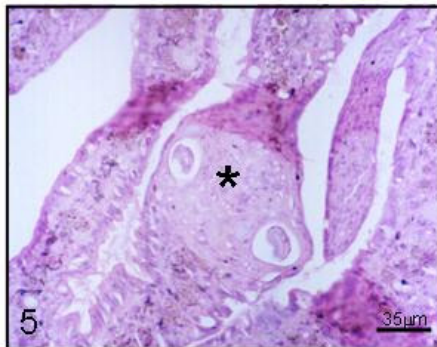
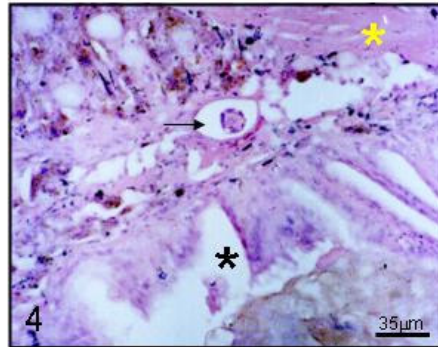
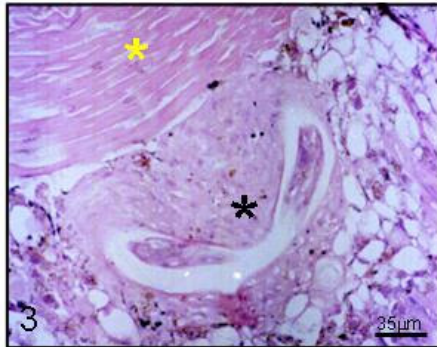
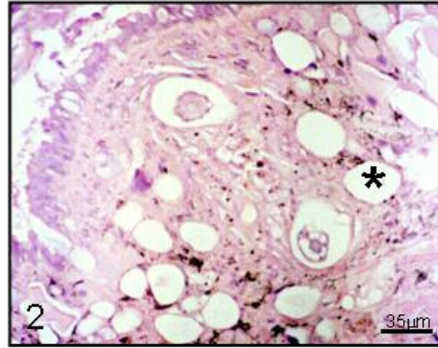
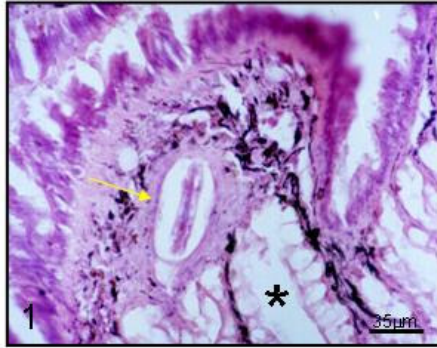
Foto 3 – Larva localizada no tecido conjuntivo acima do músculo columelar (asterisco amarelo). Formação do botão celular em uma das faces da larva (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larva (seta) envolta com uma fraca reação celular localizada próximo ao reto (asterisco preto). Asterisco amarelo indica o músculo columelar (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Granuloma (asterisco preto) localizado na lamela da pseudobrânquia. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Fraca reação celular ao redor de larvas (setas) no interior de células de muco (asterisco preto) (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 24



Prancha 25 – 60 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas na região do pé sem reação celular, próximas ao epitélio (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Dois granulomas (setas) no espaço da hemocele (asterisco branco). Asterisco amarelo representa a glândula de albúmen, o asterisco preto indica o intestino médio (HE, Bar = 35 μ m).

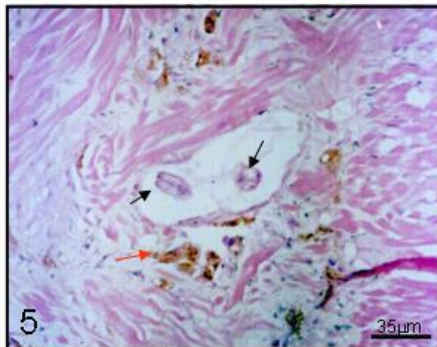
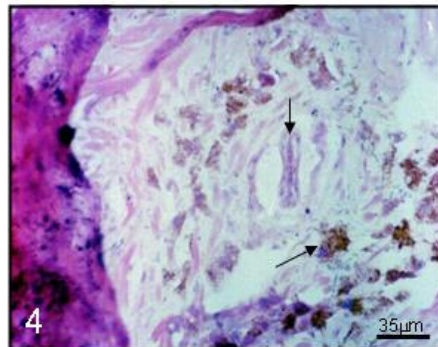
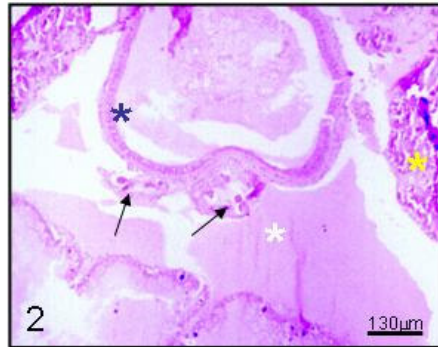
Foto 3 – Detalhe da foto anterior. Evidenciar que o granuloma está com aspecto frouxo, com menor reação celular. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larva (seta vertical) localizada no tecido fibromuscular do pé. Notar perda de celularidade e depósito de pigmento melânico (seta oblíqua) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Larva (setas pretas) localizadas no tecido fibromuscular do pé. Notar perda de celularidade e depósito de pigmento melânico (seta vermelha) (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Larvas (setas pretas) localizadas no tecido subepitelial do intestino anterior (asterisco preto). Notar perda de celularidade (HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 25



Prancha 26 – 60 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas livres (seta) abaixo da glândula digestiva (asterisco preto) e do intestino posterior (asterisco vermelho)(HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Detalhe da foto anterior evidenciando ausência de celularidade.(HE, Bar = 35 μ m).

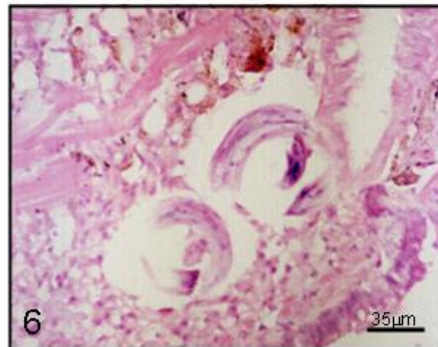
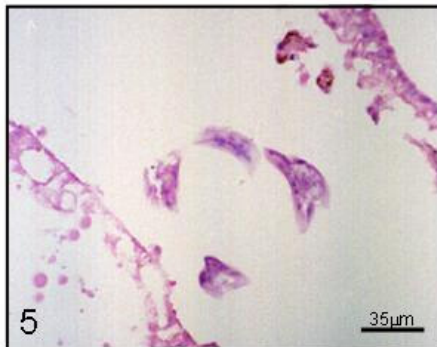
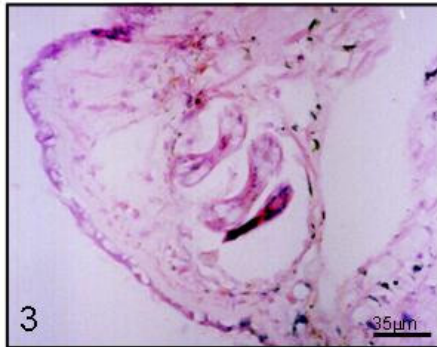
Foto 3 – Larvas no tecido pedial evidenciando a perda de celularidade na reação. (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Larva livre (seta) no espaço renal (asterisco preto)(HE, Bar = 35 μ m).

Foto 5 – Detalhe da foto anterior mostrando a larva sem reação celular ao seu redor (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 6 – Larvas no tecido conjuntivo com uma fraca reação celular (HE, Bar = 35 μ m)

PRANCHA 26

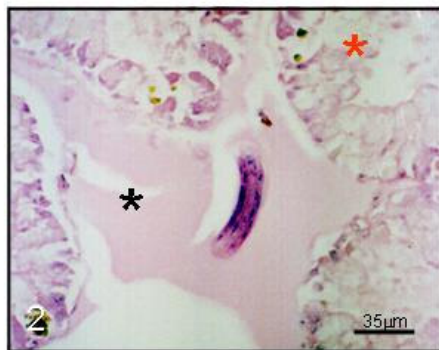
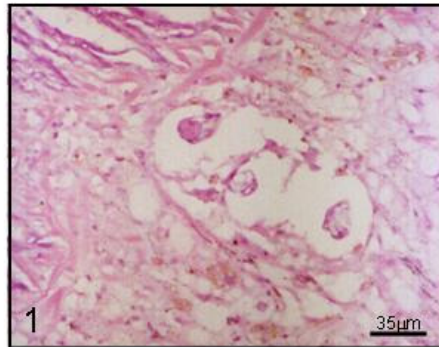


Prancha 27 – 60 dias após a exposição

Foto 1 – Larvas no tecido conjuntivo sem celularidade (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Larva localizada nos espaços (asterisco preto) entre os divertículos da glândula digestiva (asterisco vermelho)(HE, Bar = 35 μ m).

PRANCHA 27



Prancha 28 – Controle sem infecção

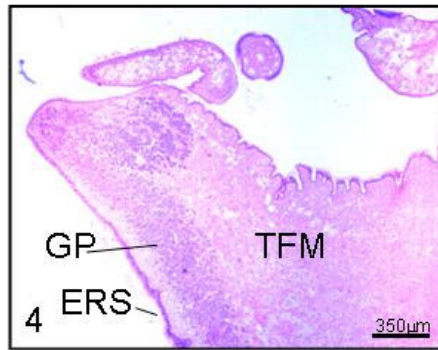
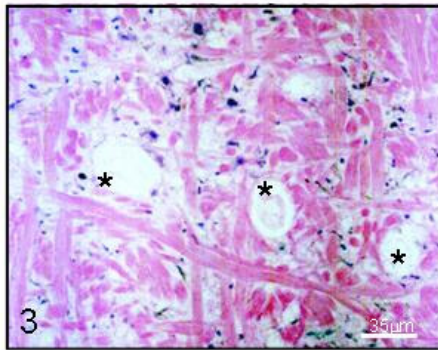
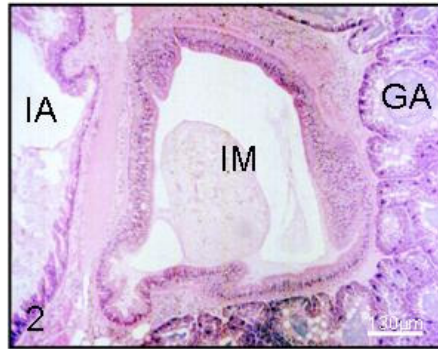
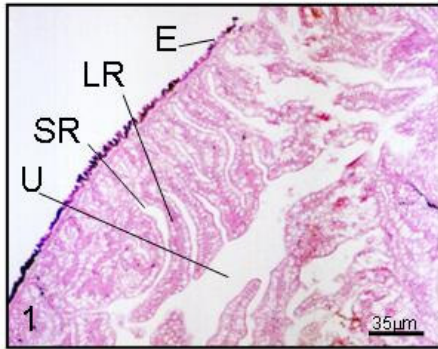
Foto 1 – Aspecto geral do rim: U = ureter, E = epitélio de revestimento; LR = lamela renal; SR = saco renal (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 2 – Aspecto geral: IM = intestino médio; IA = Intestino anterior; GA = glândula de albúmen (HE, Bar = 130 μ m).

Foto 3 – Aspecto geral do tecido fibromuscular evidenciando células (asteriscos) com muco no interior (HE, Bar = 35 μ m).

Foto 4 – Aspecto geral da região do pé: GP = glândula pediosa; ERS = epitélio de revestimento as sola; TFM = tecido fibromuscular. (HE, Bar = 350 μ m).

PRANCHA 28



6 - DISCUSSÃO

6.1 – RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Desde a descrição da participação de moluscos do gênero *Arion* como hospedeiros intermediários no ciclo evolutivo do *Angiostrongylus vasorum* por Guilhon (1960), muito pouco foi revelado sobre a biologia de infecção bem como sobre a interação parasito-hospedeiro. Sabe-se, no entanto que várias espécies de moluscos aquáticos e terrestres podem servir como hospedeiro intermediário e que em alguns casos a infecção pode não ocorrer (Guilhon & Afghahi, 1969; Guilhon & Cens, 1973).

O primeiro trabalho experimental realizado por Guilhon (1965), demonstrou que quando mantidos à temperatura variando entre 18 e 23°C, o limacídeo *Arion rufus* foi suscetível à infecção e que as mudas de larva de primeiro estágio (L1) para larva de segundo estágio (L2) e de L2 para larva de terceiro estágio (L3) ocorreram aos sete e 17 dias após a infecção, respectivamente. Entretanto, não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que abordem efeitos de luz e temperatura sobre a infecção e desenvolvimento das larvas de *A. vasorum* em moluscos.

Neste trabalho verificou-se que o processo de infecção não sofre influência da luminosidade, visto que tanto com luz do dia quanto no escuro, durante o período de exposição às L1, não houve diferença no número médio de larvas recuperadas. Tal resultado é semelhante ao encontrado por Yousif & Lämmler (1975), que ao observarem a influência da luz no processo de infecção de *Biomphalaria glabrata* por *A. cantonensis*, verificaram não haver efeito significativo no resultado da infecção.

No que tange à intensidade (potência) da luz, quando esta é alterada o resultado encontrado pode variar. Assim, foi possível verificar que ao expor os caramujos em foco luminoso de 25W o percentual de recuperação larvar foi potencializado, ao passo que com o aumento gradual da potência (40W, 60W e 100W), ocorreu uma diminuição no número de larvas recuperadas. Paralelamente, no presente trabalho, foi possível verificar que conforme se aumenta a potência do foco luminoso, a temperatura da água também sofre alteração. Desta forma, observou-se que nas infecções realizadas à luz do dia e no escuro a temperatura ambiente média era de 21,5°C. Quando era utilizada a fonte luminosa de 25W a temperatura

da água era elevada em 3,5°C culminando em uma temperatura final de 25°C. Da mesma, para fonte luminosa de 40W a temperatura final foi de 28°C, com fonte luminosa de 60W de 30°C e com fonte luminosa de 100W de 38°C. Assim, pôde-se verificar que infecções realizadas sob foco luminoso à 25°C fornecem melhores resultados, em função da obtenção de uma temperatura ideal, em torno de 25°C. Desta forma, pode-se concluir que a maior influência no momento da exposição às larvas infectantes e que determina uma maior intensidade na infecção é exercida pela temperatura, independente da luminosidade, o que também foi observado por Yousif & Lämmler (1975) para infecções com *A. cantonensis*.

Corroborando com o verificado anteriormente, ao avaliar o efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento e no percentual de recuperação larvar, verificou-se que o número médio de larvas recuperadas foi significativamente maior quando os caramujos foram infectados à temperatura de 25°C (9,4 L3 – 10°C; 96 L3 - 20°C; 130 L3 - 25°C; 86 L3 – 30°C ; 0 L3 - 37°C). Resultados semelhantes foram observados por Yousif & Lämmler (1975), que ao avaliarem o efeito da temperatura na infecção de *B. glabrata* por *A. cantonensis*, verificaram que os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 26°C (138,6 L3). De modo semelhante, Lv et al. (2006) ao testarem o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de *A. cantonensis* em *Pomacea canaliculata*, observaram que à temperatura de 16°C e 14°C não houve desenvolvimento de L3 e que o tempo de desenvolvimento diminui à medida que se eleva a temperatura (19°C, 22°C, 25°C e 28°C). Em estudos com outros protostrongilídeos, também foi demonstrada a influência da temperatura no desenvolvimento larvar. Kutz et al. (2001) demonstraram que o desenvolvimento de *Umingakstrongylus pallikuukensis* em *Deroceras laeve* e *D. reticulatum* não ocorre abaixo de 8,5°C e 9,5°C, respectivamente. Ainda demonstraram que às temperaturas de 12°C, 15°C, 20°C e 25°C o desenvolvimento de L3 ocorre com 66, 32, 15 e 11 dias em *D. reticulatum*. Em *D. laeve*, no entanto, o desenvolvimento de L3 em 11,5°C, 15°C, 20°C e 23,4°C ocorreu aos 42, 21, 12 e 9 dias após infecção. Da mesma forma, Jenkins et al. (2006) determinou o importante papel da temperatura sobre o desenvolvimento de *Parelaphostrongylus odocoilei* em *D. laeve*.

A partir destes resultados, investigou-se a influência da temperatura de manutenção dos moluscos sobre o desenvolvimento das larvas de *A. vasorum*. Ao avaliar o efeito de diferentes temperaturas de manutenção: 10°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C no desenvolvimento e na recuperação de larvas de *A. vasorum*, observou-se que para caramujos mantidos à temperatura de 25°C o tempo de desenvolvimento larvar e o percentual de recuperação de L3 é

significativamente superior. Em contrapartida, percebe-se que em temperaturas mais baixas (10°C) ocorre um retardo significativo no tempo de desenvolvimento, sendo que L1 podem ser encontradas até 30 dias após a infecção (dai) e as L3 só apareceram aos 20dai e também em pequena quantidade. Desta forma, demonstrou-se que em temperaturas inferiores à 20°C, é possível o desenvolvimento larvar, embora de forma bastante lenta. Ishii (1984), ao testar a influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *A. cantonensis* em *B. glabrata*, demonstrou que temperaturas de 10°C e 14°C, não favorecem o desenvolvimento L1 até L3, não sendo encontradas larvas de terceiro estágio até 41 semanas após a infecção. Por outro lado, a elevação na temperatura de manutenção é benéfica somente até certo ponto. Pode-se verificar que à 30°C embora não tenha sido observada uma diminuição no tempo de desenvolvimento larvar, verificou-se um aumento no percentual de recuperação de L3. Todavia, à temperatura de 37°C os caramujos não sobreviveram, sendo considerada esta temperatura incompatível com a biologia de *B. glabrata*, em condições de laboratório. Assim, verificou-se que a temperatura de infecção e de manutenção são fatores que interferem diretamente no desenvolvimento e na recuperação larvar a partir de *B. glabrata* infectados *A. vasorum*.

Em relação ao substrato utilizado para infecção, ao contrário do observado por Rosen et al. (1970) que observaram uma alta taxa de mortalidade em moluscos na presença de fezes de cão, no presente trabalho não ocorreu mortalidade dos moluscos. Todavia, verificou-se que quando foi utilizado material fecal oriundo de cães infectados diluído em água em diferentes concentrações, houve uma redução significativa no número total de L3 recuperadas aos 30dai. Este fato pode ter correlação com o fato comportamental observado durante a infecção, em que os moluscos procuravam sair do material fecal diluído em água. Em contrapartida, quando se utilizou as larvas em suspensão, com ou sem a adição de alface, os caramujos permaneceram na água, o que acabou favorecendo a infecção e conseqüentemente o desenvolvimento e o percentual de recuperação larvar (Guilhon & Cens, 1973; Sauerlander & Eckert, 1974; Yousif & Lämmler, 1975; Ishii, 1984; Lima et al., 1992; Ubelaker et al., 1980; Pereira et al., 2006).

No que tange aos efeitos da infecção na biologia e no desenvolvimento do hospedeiro intermediário, pode-se verificar que a ovoposição foi afetada após a infecção. O número de ovos encontrados nas cubas de manutenção foi estatisticamente menor até os 5 dai, quando comparado ao controle. Além disso, não foi registrada postura de ovos nos dois primeiros dias no grupo infectado. Entretanto, com o passar do tempo após a infecção, foi observado que o número de ovos manteve-se semelhante ao controle até o final dos trinta dias. À análise dos

cortes histológicos de *B. glabrata* verificou-se a ausência de larvas de *A. vasorum* nos órgãos sexuais de *B. glabrata*. Desta forma, a redução inicial na oviposição, parece ser uma influência da irritação provocada pela penetração das larvas ou simplesmente um fator de estresse relacionado ao processo de infecção, sem qualquer influência da migração larvar. Tal resultado corrobora os achados de Sauerlander & Exckert (1974), que relatam a ausência de larvas de *A. vasorum* nos órgão sexuais de *Achatina fulica*.

6.2 – EMERGÊNCIA DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *A. vasorum*

Os resultados do presente trabalho mostram que assim como em outras espécies de *Angiostrongylus*, as L3 de *A. vasorum* têm a capacidade de sair ativamente do molusco infectado. O número de larvas recuperadas com estímulo luminoso (1-70), 37°C (1-272) e 23-25°C foram maiores quando comparado com outras espécies de *Angiostrongylus* quando o hospedeiro foi *B. glabrata* (Richards & Merrit, 1967; Ubelaker et al., 1980). A emergência de L3 em *A. cantonensis* em moluscos aquáticos e terrestres foi primeiramente relatada por Cheng & Alicata (1964).

O número total de larvas obtidas pelo somatório do número de L3 que emergiram utilizando diferentes estímulos mais as L3 recuperadas pelo método de Baermann foi similar em todos grupos. Este resultado mostrou que nos três grupos, *B. glabrata* foi infectado de modo semelhante com as L1 de *A. vasorum*. As diferenças encontradas entre os três grupos foram devido aos estímulos recebidos que induziram a emergência das larvas. Além disso, foi possível verificar que o número de L3 que emergem de *B. glabrata* aumenta à medida que também aumenta o tempo de observação, o que indica que o larvas possuem a capacidade de sair do caramujos por vários dias.

O número de L3 que emergiram dos caramujos mantidos em banho-maria (37°C) e dos expostos ao foco luminoso de 60W foi maior que o número de L3 que emergiram dos caramujos mantidos sem estímulos. Estes efeitos podem estimular a eliminação de L3 pelo aumento da movimentação do molusco ou pelo aumento da contração muscular, refletindo a ocorrência de estímulo irritativo. Como a temperatura da água não variou significativamente no grupo que recebeu estímulo luminoso, os resultados mostram que tanto o estímulo luminoso quanto a temperatura da água (37°C) aumentam a eliminação de L3. Morera &

Céspedes (1988) observaram que moluscos terrestres eliminam L3 de *A. costaricensis* após uma forte contração muscular ou quando o animal é tocado. Conejo & Morera (1988) demonstraram que o desenvolvimento das larvas de *A. costaricensis* ocorre no tegumento e que a eliminação é devida a um fenômeno mecânico e acidental. Então, os resultados apresentados sugerem que, no ambiente natural, agentes externos como a luz ou a elevação da temperatura podem atuar como estímulos irritativos aumentando a contração muscular do molusco, aumentando com isso a eliminação de larvas em moluscos naturalmente infectados, como já demonstrado em outras espécies de *Angiostrongylus*. Entretanto, Heyneman & Lim (1967) demonstraram que larvas de *A. cantonensis* normalmente emergem de caramujos aquáticos recentemente mortos, não dependendo da movimentação ou contração do molusco. Desta forma, acredita-se que as larvas seriam então capazes emergir por conta própria sem depender do estímulo do molusco. Entretanto, os resultados mostram que no caramujo aquático *B. glabrata* vivo as L3 de *A. vasorum* são capazes de emergir por vários dias seguidos. Além disso, quando submetidos ao estresse luminoso ou térmico, a emergência de larvas aumenta, podendo ser mais em função de um estímulo sobre a larva do que propriamente sobre o molusco. Não obstante, L3 de *A. vasorum* podem emergir por mais de 15 dias na água sem estímulo, como visto em *A. cantonensis* e *A. costaricensis* (Heyneman & Lym, 1967; Richards & Merrit, 1967; Ubelaker et al., 1980).

Duffy et al. (2006) sugerem que este fenômeno pode ter uma contribuição da própria larva, visto que em cortes histológicos de *Triodopsis* sp infectado por *Parelaphostrongylus tenuis*, utilizando marcação imunohistoquímica, foi visto que o granuloma ao redor da larva parece ser destruído ao passar do tempo e pode ser realizado por uma proteína análoga a Catepsina B (*Ptcpr-1*), produzida pela larva. Neste caso a aparente destruição do granuloma coincide com a emergência das larvas, que ao saírem do molusco diminuem a produção da referida proteína. Com isso, na infecção de *A. vasorum* em *B. glabrata* pode-se inferir que nos resultados apresentados ocorre um padrão de destruição do granuloma semelhante. Como pode ser observado nos cortes histológicos, a partir dos 30 dai ocorreu um afrouxamento no granuloma perilarvar, que praticamente desaparece aos 60 dai. Desta forma, percebe-se que nas infecções de *B. glabrata* por *A. vasorum* os dois fatores parecem agir simultaneamente. A destruição do granuloma perilarvar que tem início a partir dos 30 dai, deixa a larva mais livre nos tecidos do caramujo, que, sob a influência de fatores externos que causem estresse físico ao molusco (luminosidade, elevação da temperatura) resultando na sua contração muscular, facilitaria a

emergência desta L3, pelas glândulas de muco, pelo tegumento, pela cavidade pulmonar e pelo intestino, como foi observado nas preparações histológicas.

A infecção de cães com as L3 de *A. vasorum* foi possível, independente da ingestão do hospedeiro intermediário. A diferença encontrada no período pré-patente (39 e 65 dias) não revela significado, visto que está dentro dos valores normais de variação. Corroborando com os resultados, Cury et al. (1996) utilizando o mesmo inóculo (100L3/kg de peso) encontrou uma variação no período pré-patente de 28 a 67 dias, em sete cães. Desta forma, o fato dos cães terem sido infectados por meio de larvas que emergiram dos caramujos, denota uma nova possibilidade de infecção sem a necessidade de ingestão do hospedeiro intermediário, sugerindo que os cães podem se infectar ingerindo alimentos ou bebendo água onde tenham moluscos infectados. Além disso, pelo fato das larvas estarem livre no ambiente, abre-se a possibilidade de infecção humana, uma vez que outros parasitos do gênero *Angiostrongylus* são comprovadamente zoonoses (Rambo et al., 1997; Prociv et al., 2000).

6.3 – RESPOSTA HEMOCITÁRIA E VIA MIGRATÓRIA

A resposta celular nos moluscos é realizada pelo hemócitos (celomócitos ou amebócitos) que são fagócitos que se agrupam (encapsulam) ao redor dos patógenos e geram intermediários humorais (Beck, 1998). Dos quatro tipos celulares que atuam no sistema de defesa dos moluscos (células endoteliais, células reticulares, células porosas e hemócitos) apenas os hemócitos são encontrados na hemolinfa e são consideradas as principais células de defesa. Como o sistema circulatório dos moluscos é em geral aberto, os hemócitos podem mover-se livremente para dentro e fora dos tecidos (Van der Knaap & Loker, 1990). Este fato justifica os resultados encontrados, uma vez que, depois de infectados por L1 de *A. vasorum*, o número de hemócitos circulantes na hemolinfa em *B. glabrata* reduz significativamente. Nos cortes histológicos, observa-se o início de infiltrado celular com 5 h de exposição e a redução celular na hemolinfa inicia-se com 4 h de exposição. Segundo Osman et al. (2003), a população de hemócitos circulantes em *Biomphalaria alexandrina* pode aumentar ou diminuir nos primeiros dois dias após a exposição ao estágio infectante de *Schistosoma mansoni*. De maneira semelhante Bezerra et al. (1997) mostrou a diminuição da população de hemócitos circulantes em *B. glabrata* nas primeiras 5 h após a infecção com *S. mansoni*. Desta forma, isso indica que nas infecções de *B. glabrata* por *A. vasorum* à medida que tem início a

formação de uma reação tecidual perilarvar e formação de um granuloma típico, ocorre a migração de células circulantes para o tecido, acarretando em uma diminuição da quantidade destas na hemolinfa. Da mesma forma, com o curso da infecção, cessa a quimiotaxia de células para o sítio de infecção larvar, conseqüentemente, ocorre um restabelecimento dos níveis celulares.

Adicionalmente, à observação dos cortes histológicos, verificou-se uma diminuição da reatividade ao redor das larvas, justificando esta estabilização na composição celular da hemolinfa. De maneira semelhante, Pereira et al. (2006) observaram um aumento da ativação hemocitária sem um correspondente aumento no número de hemócitos circulantes em *B. tenagophila* infectada com *A. vasorum*, devido à migração das células circulantes para o sítio da infecção durante o processo de encapsulamento.

A caracterização de hemócitos circulantes em moluscos do gênero *Biomphalaria* vem sendo realizada como visto anteriormente, baseando em características morfológicas e bioquímicas (Matricón-Gordon & Letorcart, 1999; Johnston & Yoshino, 2001; Pereira et al., 2006). Além disso, a análise por citometria de fluxo demonstrou ser uma ferramenta útil para a análise de hemócitos circulantes. Especificamente em *B. glabrata*, foram caracterizadas duas subpopulações de células em moluscos não infectados. Uma subpopulação de células pequenas e arredondadas, com pouca granulosidade e tamanho entre 5 e 6µm de diâmetro, e a outra constituída por células grandes, entre 6,5 e 8µm e maior granulosidade (Johnston e Yoshino, 2001).

No presente trabalho, verificou-se a presença de duas subpopulações com características semelhantes às descritas anteriormente e alterações no perfil celular durante a infecção por *A. vasorum*. Como observado, ocorreram variações nas proporções celulares ao longo do tempo.

Alguns estudos demonstram que os hialinócitos são precursores dos granulócitos e que nas contagens por citometria, as células pequenas seriam os hialinócitos e pequenos granulócitos ao passo que os granulócitos seriam as células grandes. Assim, no início da infecção por *A. vasorum*, a proporção de células pequenas diminui em função da conversão de hialinócitos em granulócitos e posteriormente ocorreria a migração deste granulócitos para os tecidos após 5 h, como visto nos cortes histológicos, justificando então neste ponto o aumento da proporção de células pequenas na hemolinfa. Tal fato corrobora os resultados de Bezerra et al. (1997)

que justifica a diminuição no número de granulócitos na hemolinfa pelo fato destas serem as células efetoras e migrarem para o sítio da infecção como demonstrado em cortes histológicos. Enfim, na infecção tardia os percentuais de células pequenas seriam menores pelo fato do molusco estar infectado e as células efetoras estarem agindo mesmo que em menor intensidade como visto nos cortes histológicos.

6.4 – VIAS DE PENETRAÇÃO E MIGRAÇÃO

Primeiramente, acreditava-se que as infecções de moluscos por L1 de *A. vasorum* ocorreriam somente pela ingestão destas larvas (Guilhon, 1965). Posteriormente, as vias de infecção oral e percutânea por larvas de *A. vasorum* em caramujos terrestres foi demonstrada (Guilhon & Afghahi, 1969). Nos resultados apresentados foi demonstrado que as duas vias de infecção podem ocorrer. Na análise dos cortes histológicos foi determinado que as L1 podem penetrar no tegumento do caramujo a partir de 0,5h de exposição, determinando a dissociação tecidual e se alojando no tecido fibromuscular. Ao serem ingeridas, a partir de 0,5h já podiam ser encontradas larvas no tubo digestivo, penetrando posteriormente na mucosa a partir de 1 h de exposição. Em outros angiostrongilídeos, estas duas vias de infecção também foram confirmadas (Mackerras & Sanders, 1955; Cheng & Alicata, 1965; Courdurier et al., 1967; Yousif & Lammler, 1977). Thiengo (1995) observou em cortes histológicos que a ocorrência de infecção oral, concomitante à percutânea em *A. costaricensis* inicia-se aos 40 minutos de exposição. Entretanto, ainda não se conhecem os mecanismos moleculares que participam da interação das L1 com o epitélio dos diferentes segmentos do tubo digestivo e do tegumento. Apesar disso, pode-se observar que a penetração ocorre rapidamente, não induz reação inflamatória local e parece ser dependente de atividade proteolítica.

A invasão de várias vísceras ocorre provavelmente pelo contato direto órgão a órgão, ou através do sistema hemolinfático. Observou-se que o processo de penetração e invasão tecidual ocorreram preferencialmente nas primeiras 5 h, a partir das quais foram encontradas as primeiras reações perilarvares no tecido fibromuscular, immobilizando as larvas. Entretanto, a migração pelas vísceras ocorre por um período de tempo maior, sendo encontradas as primeiras reações perilarvares a partir de 24 h. Preferencialmente, as larvas atingem a glândula digestiva, rim, trato gastrintestinal, pulmão, pseudobrânquia e o tecido conjuntivo. Sauerlander & Eckert (1974) demonstraram que na infecção de *Achatina fulica* por larvas de

A. vasorum ocorre um padrão de distribuição larvar independente da via de penetração, ou seja, ao infectar os moluscos com exposição à suspensão de larvas, injeção no tecido do pé, inoculação pela boca ou na cavidade do manto, as larvas foram sempre encontradas no pulmão, pé, manto, glândula digestiva e trato gastrintestinal. Por outro lado, Mendonça et al. (1999) consideram que independente da via de infecção, ocorre uma tendência de direcionamento das larvas para o tecido fibromuscular do pé na infecção de *Sarasinula marginata* por *A. costaricensis*. Richards & Merritt (1967) propuseram que após a penetração das larvas de *A. cantonensis* pelo trato gastrintestinal de *B. glabrata*, muitas delas atingem a hemocele chegando até a massa cefalopodal e o manto.

Nas preparações histológicas aqui analisadas, foram encontradas larvas de *A. vasorum* na hemocele de *B. glabrata*, o que de certa forma justificaria a maior quantidade de larvas encontradas no pé do molusco. Entretanto, o evento parece ser aleatório e não direcionado, uma vez que foram encontradas larvas envoltas por granulomas na hemocele, formando êmbolos, o que poderia impedir o acesso ao tecido fibromuscular. Apesar de elas ficarem retidas também nas vísceras, acredita-se que isso não seja empecilho para sua emergência, visto que com o passar da infecção, a constituição do granuloma parece ser alterada morfológicamente. Essas alterações poderiam facilitar a emergência da larva quer seja por estímulo externo ou espontaneamente. Além disso, a localização das larvas no pulmão, rim e justa retal, por exemplo, aumentam a possibilidade de saída por outras vias que não seja a cutânea. Esta possibilidade é reforçada pelo encontro de L3 livres no rim bem como no celoma 60 dias após a infecção.

O desenvolvimento da reação perilarvar iniciou-se a partir de 5 h e mostrou um padrão de desenvolvimento independente do local de destino. Inicialmente formou-se um adensamento de células ao redor da larva, com posterior diferenciação de células semelhantes a fibroblastos com formação de uma pseudocápsula a partir de 6 dias de infecção. Esta diferenciação de amebócitos em fibroblastos foi proposta por Pan (1963; 1965). Tal padrão também foi observado por Harris & Cheng (1975) em infecções de *A. cantonensis* em *B. glabrata*. A formação de um espaço claro ao redor da larva foi um fenômeno freqüente que em outros angiostrongilídeos é atribuída a possíveis enzimas proteolíticas produzidas pela larva (Mendonça et al., 1999). Entretanto não pode ser confundido com aquelas larvas que inserem em células de muco na região do pé, que apresentam aparência semelhante e também com a possibilidade de artefato da técnica histológica promovendo retração tecidual.

Conforme foi visto nos resultados, para *A. vasorum* parece não existir uma via migratória pré-determinada ou o desenvolvimento em algum órgão específico. Observa-se que o desenvolvimento ocorre independente do local onde a larva seja imobilizada, diferentemente do que ocorre para outros parasitos que necessitam se alojar em algum órgão preferencialmente. Todavia, percebe-se que as larvas que penetram pelo tegumento permanecem retidas no tecido fibromuscular do pé, ao passo que aquelas que são ingeridas necessitam atravessar o epitélio intestinal em qualquer nível, não apresentando especificidade de sítio, até podem alcançar os demais órgãos internos pela hemocele ou pelo contato direto. O desenvolvimento das larvas não apresenta um caráter temporal frente à infecção, ou seja, as larvas podem alcançar os diversos órgãos, aparentemente a qualquer tempo, basta que sejam ingeridas no início do tempo de exposição, visto que os moluscos ficaram 24h em contato com as larvas.

Os granulomas formados em *B. glabrata* em decorrência da infecção por *A. vasorum* em todo o período de observação nunca foram capazes de matar as larvas o que de certa forma contribui para o seu desenvolvimento. Mendonça et al. (1999) também não encontraram larvas mortas pela reação tecidual. Harris & Cheng (1975) em infecções de *B. glabrata* com *A. cantonensis*, atribuem ao processo de encapsulamento o favorecimento do desenvolvimento das larvas. Segundo Richards & Merrit (1967) as larvas de *A. cantonensis* podem ser encontradas em *B. glabrata* por mais de 12 meses. Logo, novamente percebe-se que o processo de defesa celular do organismo hospedeiro acaba por contribuir para o desenvolvimento do parasito e perpetuação do seu ciclo (Doenhoff et al., 1986; Lenzi, 1997; Mendonça et al., 1999).

Em última análise, a permanência das larvas nos tecidos do caramujo por longos períodos, parece favorecer também o parasito ao eventual encontro do hospedeiro definitivo, visto que, livres no ambiente as larvas acabam sofrendo influências externas, como variações sazonais, podendo morrer antes de chegar ao hospedeiro final. Por outro lado, estando no molusco e apresentando uma sobrevida que pode chegar a mais de 12 meses (Richards & Merrit, 1967) as chances destas larvas serem ingeridas pelo hospedeiro definitivo aumentariam.

Diante do exposto, o estudo da relação parasito-hospedeiro, pela avaliação da infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum*, tem muito a acrescentar ao conhecimento dos mecanismos de defesa envolvidos nesta relação. Além disso, o fato de *A. vasorum* ser um nematóide de crescente

importância veterinária, cuja possibilidade de ser um agente causador de zoonose ainda não ter sido descartada, faz com que os estudos realizados acerca da interação entre o molusco e o parasito tenham importância para o entendimento da biologia e epidemiologia da angiostrongilose. Além de serem ferramentas que tem muito a acrescentar, no estudo e no desenvolvimento de medidas de controle desta parasitose.

7 - CONCLUSÕES

1. Nas condições de realização dos experimentos, a luminosidade não influencia a intensidade da infecção e o desenvolvimento de larvas de *Angiostrongylus vasorum* em *Biomphalaria glabrata*.
2. Sob as condições experimentais realizadas, a temperatura influencia diretamente a intensidade da infecção e o desenvolvimento das larvas de *A. vasorum* em *B. glabrata*.
3. A infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum* não compromete a postura de ovos até 30 dias.
4. As larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* são capazes de emergir de *B. glabrata*.
5. As L3 de *A. vasorum* que emergem de *B. glabrata* são capazes de infectar cães.
6. A infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum* ocorre pelas vias oral e percutânea.
7. Não ocorre um padrão migratório definido, não sendo o desenvolvimento larvar órgão-dependente ou tecido-dependente.
8. A infecção de *B. glabrata* por *A. vasorum* induz a mobilização sistêmica de hemócitos na formação da reação perilarvar.
9. Não foi observado sinais de morte das larvas em função da resposta celular.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅBLAD, B. et al. *Angiostrongylus vasorum* etablerad i Sverige. **Svensk. Veterinärtidning.** v.12, p.11-15. 2003.
- ACEDO, C.S., DIEZ, J.B., MORALES, J.G. Angiotrongylosis canina. **Rev. Iber. Parasitol.** v.39, p.135-142, 1979.
- AGERSBORG, H.P.K. Studies on the effect of the parasitism upon the tissues. I. With special reference to certain gateropod molluscs. **Quart. J. Microscop. Sci.** v.68, p.361-401. 1924.
- ALLAM, B.; PAILLARD, C.; AUFFRET, M. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the *Manila clam*, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. **J. Invertebr. Pathol.** v.76, p.63-69. 2000.
- ALVAREZ, F. et al. Lung and hearth nematodes in some Spanish mammals. **Wiad Parazytol.** v.37, p.481-90. 1991.
- BAILLET, C. Strongle des vaisseaux et du coeur du chien. **N. Dict. Paract. Med. Vet.** v.8, p.587-588. 1866.
- BARÇANTE, J.M.P. et al. A method to obtain *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitol. Res.** v.89, n.2, p.89-93, 2003.
- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN; P.C. Macrophage-like hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J. Parasitol.** v.39, p.413-419. 1980.
- BESSA, E.C. de. *Desenvolvimento biológico de Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em Subulina octona Bruguière, 1789 (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório.* 1996. 103p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- BESSA, E.C. de et al. Sítios de desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em *Subulina octona* (Bruguere, 1789) (MOLLUSCA: Subulinidae) em condições de laboratório. **Bol. Inst. Ciênc. Biol.** v.47, p.13-19. 1996.
- BESSA, E.C. de et al. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (MOLLUSCA: Subulinidae) em condições de laboratório. **Rev. Bras. Zool.** v.17, p.29-41. 2000.
- BEZERRA, F.S. et al. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.39, p.197-201. 1997.
- BLAXTER, M.L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature.** v.392, p.71-75. 1998.

- BOLT, G. et al. The fox (*Vulpes vulpes*) as a reservoir for canine angiostrongilosis in Denmark. **Acta. Vet. Scand.** v.33, p.357-362. 1992.
- BOLT, G. et al. The common frog (*Rana temporaria*) as a pontencial paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitol. Res.** v.79, p.428-430. 1993.
- BOLT, G. et al. Canine angiostrongylosis: a review. **Vet. Rec.** v.135, p.447-452. 1994.
- BOSSI, G. Due casi di carditi verminosa prodotta da un particolare entozoa com accessi epilettiforme in due cani de caccia. **Glor. Med. Vet.** v.19, n.7, p. 300-303. 1871.
- BOURQUE, A. et al. *Angiostrongylus vasorum* infection in 2 dogs from Newfoundland. **Can. Vet. J.** v.43, p.876-879. 2002.
- BROUSSEAU, P. et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. **Toxicol.** v.142, p.145-56. 2000.
- BWANGAMOI, O. *Angiostrongylus vasorum* and other worms in dogs in Uganda. **Vet. Rec.** v.19, p.267. 1972.
- _____. Renal Lymphoyd and pulmonary lesion in naturally acquired canine angiostrongylosis in Uganda. **Bull. Epizoot. Dis. Afr.** v.22, p.55-68. 1974.
- CARSON, F.L.; MARTIN, J.H. & LYNN, J.A. Formalin fixation for eletron microscopy: a re-evaluation. **Am. J Clin. Pathol** v.59, p.365-375. 1973.
- CHENG, T.C. The effects of *Echinoparyphium* larvae on the structure of and glycogen deposition in the hepato-pancreas of *Helisoma trivolvis* and glycogenesis in the parasite larvae. **Malacologia** v.1, p.291-303. 1963.
- _____. Studies on phosphatase systems in hepatopancreatic cells of the molluscan host of *Echinoparyphium* sp. and in the rediae and cercariae of this trematode. **Parasitology** v.54, p.73-79. 1964.
- _____. Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. **Comp. Pathobiol.** v.3, p.21. 1977.
- CHENG, T.C.; ALICATA, J.E. On the modes of infection of *Achatina fulica* by the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. **Malacol.** v.2, p.267-274. 1965.
- CHENG, T.C & RIFKIN, E. Cellular reaction in marine molluscs in response to helminth parasitism. In: SNIESZKO, S.F. ed. SYMPOSIUM ON DISEASES OF FISHES AND SHELLFISHES. p.443-496.1970.
- CHENG, T.C. & SNYDER, R.W.Jr. Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their host. A review. II – The utilization of the host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glythelmins pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. **Trans. Am. Microscop. Soc.** v.81, p.209-228. 1962a.

_____. Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their host. III – Certain aspects of lipid metabolism in *Helisoma trovolvis* (Say) infected with the larvae of *Glythelmins pennsylvaniensis* and associated phenomena. **Trans. Am. Microscop. Soc.** v.81, p.327-331. 1962b.

CHENG, T.C.; THAKUR, A.S. & RIFKIN, E. Phagocytosis as na internal defense mechanism in the Mollusca: with an experiment study of the role of Leucocytes in the removal of ink particles in *Littorina scabra* Linn. In: “PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM ON MOLLUSCA”, 1969, Marine Biol Assoc India, Pt. 2, p.546-563.

CHERTKOWA, A.N. Fauna der Netatoden und Acantocephalen von Fuschsen nachdem Material des Moskaver Zoos. (Russ) **Trudy Vsesoyuz Inst Gelmintol** 9: 125-126. In: BESSA, E.C. de. **Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório.** 1996. 103p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

COBB, M.A.; FISHER, M.A. *Angiostrongylus vasorum*: transmission in south east England. **Vet. Rec.** v.126, n.21, p.529, 1990.

CONEJO, M.E.; MORERA, P. Influência de la edad de los veronicelideos en la infección com *Angiostrongylus costaricensis*. **Rev. Biol Trop.** v.36, n.2B, p.519-526. 1988.

COSTA, J.O. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: *Considerações taxonômicas, patológicas e de diagnóstico imunológico (ELISA) em cães experimentalmente infectados.* 135p. 1992. Tese (Doutorado em Doenças Parasitárias) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, J.O.; DE ARAUJO COSTA, H.M.; GUIMARAES, M.P. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951. **Revue Méd. Vét.** v.154, p.9-16. 2003.

COURDURIER, J.; GUILHON, J.; MALARDÉ, L. The realization of the cycle of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) in the laboratory. II. The use of *Australorbis glabratus* (Say) as intermediate host. Contribution on the method of infestation of the mollusks by the larvae of the parasite. Histological aspects. **Bull. Soc. Path. Exot.** v.60, p.165-173. 1967.

DIAS, S.R.C. *Suscetibilidade do gato doméstico (Felis catus) à infecção por Angiostrongylus vasorum: parâmetros clínicos, parasitológicos e laboratoriais.* 2006.101p. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DODD, K. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infestation in a greyhound Kennels. **Vet. Rec.** v.92, p.195-197. 1973.

DOENHOFF, N.J. et al. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v.80, p.503-514. 1986.

- DOUGHERTY, E. C. The genus *Aelurostrongylus* (Cameron, 1927) (Nematoda: Mestastromylidae), and its relatives; with descriptions of *Parafilaroides*, gen. nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus*, sp. nov. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.** v.13, p.16-26, 1946.
- DUFFY, M.S. et al. Cathepsin B homologue at the interface between a parasitic nematode and its intermediate host. **Inf. Immun.** v.74, p.1297-1304. 2006.
- ECKERT, J.; LAMMLER, G. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. **Z. Parasitensk.** v.39, p.303-322. 1972.
- FEHRINGER, W.T.; FIEDLER, H.H. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. **Arq. Esc. Med. Vet. Salvador** v.2, p.110-114. 1977.
- FINNERUP, E. *Angiostrongylus vasorum* hos hund. En oversigt og en Kasuistik. **Dansk Veterinaertidsskrift.** v.66, p.388-340. 1983.
- FLETCHER, T.C. & COOPER-WILLIS, C.A. Cellular defense systems of the Mollusca, p141-166. In: Cohen, N. Sigel, MM (eds) **The reticuloendothelial. A comprehensive treatise.** Plenum Press, New York. 1986.
- GIOVANONNI, M.; FERNADEZ, B.F.; KAVINSKY, L.C. Angiostrongylose do cão. **Arq. Biol. Tec. Paraná** v.28, n.4, p.601-604. 1985.
- GONÇALVES, P.C. *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) novo parasita do cão do Rio Grande do Sul (Brasil). (Nematoda: Metastrongyloidea). **Rev. Agron. Vet. Univ. Rio Grande do Sul** v.4, n.1, p.35-40. 1961.
- GRISI, L. Ocorrência de *Angiocaulus railliet* (Travassos, 1927) em *Canis familiaris*. (Nematoda, Protostrongylidae). **Rev. Bras. Biol.** v.31, p.27-32, 1971.
- GUILHON, J. Role des limacidés dans le cycle évolutif d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **C.R. Acad. Sci.** v.251, p.2252-2253. 1960.
- _____. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the Arionidae arionid. **C.R. Acad. Sci.** v.261, p.4225-4227. 1965.
- _____. Transmission of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) to the wild Canidae. **C.R. Acad. Sci.** v.261, p. 4496-4497. 1965.
- GUILHON, J & AFGHAHI A. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the body of various species of terrestrial mollusks. **C. R. Acad. Sci. Paris** v.268, p.434-436. 1969.
- GUILHON, J.; CENS, B. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Étude biologique et morphologique. **Ann. Parasitol.** v.48, p.567-596. 1973.
- GUILHON, J. & GAALON, A. Évolution larvaire d'un nematode parasite de pappariel circulatoire du chien dans l'organisme de mollusques dulçaquicoles. **C.R. Acad. Sci.** v.268, n.3, p.612-615. 1969.

- HARRIS, K.R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.266, p.446-464. 1975.
- HARRIS, K.R. & CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. **Int. J. Parasitol.** v.5, p.521-528. 1975a.
- HARRY, H.W. & ALDRICH, D.V. The distress syndrome in *Taphius glabratus* (Say) as a reaction to toxic concentrations of organic ions. **Malacol.** v.1, p.283-289. 1963.
- HEYNEMAN, D.; LIM, B.L. *Angiostrongylus costaricensis*: proof of direct transmission with its epidemiological implications. **Science** v.158, p.1057-1058. 1967.
- HURST, C.T. Structural and functional changes produced in the gastropod mollusk, *Physa accidentalis* in the case of parasitism by the larvae of *Echinostoma revolutum*. **Uni Calif Publ Zool.** v.27, p.321-404. 1927.
- ISHII, A.I. Effects of temperatura on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermetiate host, *Biomphalaria glabrata*. **Z. Parasitenkd.** v.70, p.375-379. 1984.
- JACOBS, D.E.; PROLE, J.H.B. *Angiostrongylus vasorum* and others nematodes in British Greyhounds. **Vet. Rec.** v.22, p.180. 1975.
- JAROSZESKI, M.J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Mol. Biotechnol.** v.11, p.37-53. 1999.
- JENKINS, E.J. et al. Bionomics of larvae of *Paralaphostrongylus odocoilei* (Nematoda: Protostrongylidae) in experimentally infected gastropod intermediate hosts. **J. Parasitol.** v.92, p.298-305. 2006.
- JONES, G.W.; NEAL, C.; TURNER, G.R.J. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in Cornwall. **Vet. Rec.** v.26, p.83. 1980.
- JOHNSTON, L.A.; T.P. YOSHINO. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **J. Parasitol.** v.87, p.786-793. 2001.
- KAMENSKY, S. O Sistematcheskom polozenii roda *Metastrongylus* wost in *Protostrongylus* g. n. sredi ostal'nykh Strongilid. **Sbornik Trudov Khar'kovskogo Veterinarnogo Instituta** v.10, n.2, p.17-50. 1905.
- KOCH, J.; BOLT, G. *Angiostrongylus vasorum* hos hund. **Dansk. Veterinaertidsskrift.** v. 73, p. 1239-1243, 1990.
- KOCH, J.; JENSEN. A. L.; MONRAD, J. *Angiostrongylus vasorum* infection in a Scottish terrier associated with gastric dilat. **J. Small Anim. Pract.** v.33, p.239-241, 1992.
- KRUPA, P.L.; LEWIS, L.M. & VECCHIO, P.D. *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guernei*: electron microscopy of hemocyte-sporocyst interations. **J. Invert. Pathol.** v.30, p.35-45. 1977.

- KUTZ, S.J.; HOBERG, E.P.; POLLEY, L. *Umingmakstrongylus pallikuukensis* (Nematoda: Prothostrongylidae) in fastrops: larval morphology, morphometrics and development rates. **J. Parasitol.** v.87, p.527-535. 2001.
- LANGENEGGER, J. et al. Ocorrência da infestação por *Angiostrongylus vasorum* em cães do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7, 1962. p.246-247.
- LENZI, H.L. et al. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: Co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.92, p.19-32. 1997.
- LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata*. **Int. J. Parasitol.** v.5, p.621. 1975.
- LIE, K.J.; HEYNEMAN, D.; YAU, P. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.** v.61, p.574-576. 1975.
- LIE, K.J.; JEONG, K.H.; HEYNEMAN, D. Further characterization of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol.** v. 68, n. 4, p. 529-531. 1982
- LIEGLER, T.J. et al. Detection and quantification of live, apoptotic and necrotic human peripheral lymphocytes by single-laser flow cytometry. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v.2, p.69-376. 1995.
- LIMA, L.C. et al. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). **Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo.** v.34, p.399-402. 1992.
- LIMA, W.S. et al. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.80, n.2, p.233-235. 1985.
- LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; LEMOS, I.S. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. **J. Helminthol.** v.68, p.87. 1994.
- LOKER, E.S. et al. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunol. Rev.** v.198, p.10-24. 2004.
- LV, S. et al. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck 1822). **Parasitol. Res.** v.99, p. 583-587. 2006.
- LYNCH, Y. *Angiostrongylus vasorum* in the dog. **Vet. Rec.** v.101, p. 41-42, 1977.
- MACKERRAS, M.J. & SANDERS, D.F. The life history of the rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae). **Austral. J. Zool.** v.3, p.1-25. 1955.

- MACKIN, J.G. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) By *Dermocystidium marinum* (Mackin, Owen, and Collier). **Bull. Marc. Sci. Gulf. Caribbean** v.1, p.72. 1951.
- MAHAFFEY, M.B. et al. Experimental canine Angiostrongylosis: II. Radiographic Manifestation. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v.17, p.499-502. 1981.
- MARTIN, N.W.S.; ASHTON, G.; SIMPSON, B.R. Angiostrongylosis in Cornwall: Clinical presentation of eight cases. **J. Small Anim. Pract.** v.34, p.20-25. 1993.
- MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J. Invert. Pathol.** v.74, p.224-234. 1999.
- MEAD, A.R. Disease in the Giant African Snail *Achatina fulica*. **Science.** v.123, p.1130-1131. 1956.
- MENDONCA, C.L. et al. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.94, p.549-556. 1999.
- METCHNIKOFF, E. Lecons sur la pathologie comparee de l'inflammation. Paris (Reprinted by Dover Publication Inc, New York, 1968 as Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation). 1892.
- MICHELSON, E.H. A method for the relaxation and immobilization of pulmonate snails. **Trans Am Microscop Soc.** v.77, p.316-319. 1958.
- MICHELSON, E.H. An acid-fast pathogen of freshwater snails. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.10, p.423-433. 1961.
- MICHELSON, E.H. *Plistophora husseyi* sp. n., a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snails. **J. Insect. Pathol.** v.5, p.28-38. 1963.
- MICHELSON, E.H. Cellular defense mechanisms and tissue alteration in gastropod mollusks. In: MARAMOROSCH, K. & SHOPE, R.E. eds. Invertebrate Immunity. p181-195. **Academic Press**, New York. 1975.
- MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. Increased alkaline phosphatase in the tissues and hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol.** v.44, p.763-767. 1973.
- MORGAN, E.R. et al. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. **Trends Parasitol.** v.21, p.49-51. 2005.
- NODA, S; SATO A. Effects of infection with *Angiostrongylus cantonensis* on the circulating haemocyte population and the haematopoietic organ of the host snail M-line *Biomphalaria glabrata*. **J. Helminthol.** v.64, p.239-47. 1990.

- OLIVEIRA-JUNIOR, S.D. et al. Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. **Vet Parasitol.** v.141, p.101-106. 2006.
- OSMAN, A.M.; GOMAA, M.; SAAD, A.H. *Biomphalaria alexandrina*: cellular responses of susceptible and resistant snails to *Schistosoma mansoni* infection. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** v.33, n.3, p.805-27. 2003.
- OTTAVIANI, E. The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata). **Dev. Comp. Immunol.** v.7, p.209-216. 1983.
- OTTAVIANI, E.; COSSARIZZA, A. Immunocytochemical evidence of vertebrate bioactive peptide-like molecules in the immuno cell types of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). **FEBS Lett.** v.267, p.250-252. 1990.
- PALLASKE, G. Zur Angiostrongylose des Hundes. **Deuts. Tier.**, v.74, p.166-167. 1967.
- PAN, C.T. Generalized and focal tissue responses in the snail *australorbis glabratus* infected with *Schistosoma mansoni*. **Ann. of the New York Acad. Sci.** v.113, p.475-485. 1963.
- _____. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am J. Trop. Med. Hyg.** v.14, p.931-976. 1965.
- PARAENSE, W.L. Planorbideos hospedeiros intermediaries do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A.S. (Ed.) *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1970. 13-30p.
- PATTESON, M.W. et al. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. **Vet. Rec.** v.133, p.565-570. 1993.
- PEREIRA, C.A.J. et al. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.** v.98, p.224-233. 2006.
- PERRY, A. W., HERTLING, R. & KENNEDY, M. J. Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. **Canadian Vet. J.** v.32, n.7, p.430-431. 1991.
- POLI, A. et al. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy. **J Wildl Dis.** v.20, n.4, p.345-6. 1984.
- PROCIV, P.; SPRATT, D.M.; CARLISLE, M.S. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. **Int J Parasitol.** v.30, p.1295-1303. 2000.
- PROWSE, R.H. & TAIT, N.N. In vitro phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Muller) I. Evidence for opsonic factor(s) in serum. **Immunol.** v.17, p.437-443. 1969.
- RACHFORD, F.W. Host-parasite relationship of *Angiostrongylus cantonensis* in *Lymnaea palustris*. II. Histopathology. **Exp. Parasitol.** v.39, p.382. 1976.

- RAILLIET, A.; HENRY, A. Sur les variation des Strongles de l'appareil respiratoire de mammiferes. **C.R. Soc. Biol.** v.63, p.751-753, 1907.
- RAMBO, P.R.; AGOSTINI, A.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil – Prevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate hosts from eighteen endemic foci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.92, p.9-14. 1997.
- RENWRANTZ, L.R. et al. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of the snail *Helix pomatia*. **J. Comp. Parasitol.** v.53, p.382-388. 1981.
- RIBIERE, T. et al. Case of canine angiostrongylosis. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.** v.143, p.313-318. 2001.
- RICHARDS, C.S. Pearl formation by *Biomphalaria glabrata*. **J Invert Pathol.** v.15, p.459-460. 1970.
- _____. *Biomphalaria glabrata* genetics: pearl formation. **J Invert Pathol.** v.20, p.37-40. 1972.
- RICHARDS, C.S. & MERRIT, J.W. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. **J. Parasitol.** v.53, p.382-388. 1967.
- RICHINITTI, L.M.Z.; FONSECA, N.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. The effect of temperature on mobility of *Angiostrongylus costaricensis* third-stage larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.41, p.225-228. 1999.
- ROBERTS, F. H. S. Notes on some helminthes infesting domestic animals in Queensland. **Austral. Vet. J.** v.16, p.30-33. 1940.
- ROCHE, M. M.; KELLIHER, D. J. *Angiostrongylus vasorum* infestation in a dog. A case report. **Irish Vet. J.** v.22, p. 108-113, 1968.
- RONDELAUD D; BARTHE D. The development of the amoebocyte-producing organ in *Lymnaea truncatula* Muller infected by *Fasciola hepatica* L. **Z Parasitenkd.** v. 65, n 3, p. 331-341. 1981
- ROSEN, L.; ASH, L.R.; WALLACE, G.D. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Am. J. Vet. Res.** v.31, n.1, p.131-143. 1970.
- SAEED, I. et al. Helminths of red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. **Vet. Parasitol.** v.139, p.168-179. 2006.
- SAMPAIO, I.B.M. 1998. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: Fundação do Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 221p.

- SAUERLANDER R, ECKERT J. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). **Z. Parasitenkd.** v.44, p.59-72. 1974.
- SAUERLANDER R. Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*. **Z. Parasitenkd.** v.49, p.263-80. 1976.
- SEGOVIA, J.M. et al. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. **J. Helminthol.** v.75, n.2, p.183-192. 2001.
- SERRES, E. Entozoaires trouvés dans o'oirelette droit du coeur, le ventricule correspondant et l'artère pulmonaire du chien. **J. Vet. Midi (Toulouse)**, v.2, p.70-72, 1854.
- SIMPSON, V.R. *Angiostrongylus vasorum* infection in foxes (*Vulpes vulpes*) in Cornwall. **Vet Rec.** v.139, p.443-445. 1996.
- SIMPSON, V.R.; NEAL,C. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs and slugs. **Vet Rec.** v.111, p.303-304. 1982.
- SMINIA, T. Structure and function of blood and connetive tissue cells to the freshwater pulmanate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** v.130, p.497-526. 1972.
- SMINIA, T.; BORGHART-REINDERS, E. & van der LINDE, A.W. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell. Tissue Res.** v.153, p.307-326. 1974.
- STANG-VOSS, C. On the ultrastructure of invertebrate haemocytes. 3. On the haemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* L. (Pulmonata). **Z Zellforsch Mikrosk Anat.** v. 107,n. 1, p. 142-156. 1970.
- TARAZONA, J.M. Helmitos parasites de vertebrados de vida silvestre de la provincia de Huesca. In: **ANALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, HIGIENE Y SANIDAD ANIMAL.** 1974. v.1, p.61-165.
- THIENGO, S.C. Mode of Infection of *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.91, n.3, p.277-278, 1996.
- TORRES, J.; MIQUEL, J.; MOTJÉ, M. Heminth parasites of the eurasian badger (*Meles meles*) in Spain: a biogeographic approach. **Parasitol. Res.** v. 87, p. 259-263, 2001.
- TRAVASSOS, L. Nematódeos novos. **Bol. Biol. São Paulo** v.6, p.52-61. 1927.

- TRIPP, M.R. Cellular responses of mollusks. **Ann. New York Acad. Sci.** v.113, p.467-474. 1963.
- _____. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. **J. Invert. Pathol.** v.8, p.478-484. 1966.
- _____. Defense mechanisms of mollusks. **J. Reticuloendothel. Soc.** v.7, p.173-182. 1970.
- UBELAKER, J.E.; BULLICK, G.R.; CARUSO, J. Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). **J. Parasitol.** v.66, p.856-857. 1980.
- Van der KNAAP, W.P.W. et al. Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (amebocytes) of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell. Tissue Res.** v.219, p.292-296. 1981.
- Van der KNAAP, W.P.W. et al. Specificity and memory in increased defense reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Dev. Comp. Immunol.** v.7, p.435-443. 1983.
- Van der KNAAP, W.P.W.; LOKER, E.S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitol. Today.** v.6, p.175-182. 1990.
- WALTERS, M.N.I. & PAPADIMITRIOU, J.M. Phagocytosis: a review. **Crit. Rev. Toxicol.** v.5, p.377. 1978.
- WAGGE, L.E. Amebocytes. **Rev. Cytol.** v.4, p.31-78. 1955.
- WILLIAMS, J.F. et al. *Angiostrongylus* in a Greyhound. **J. Am.Vet. Med. Assoc.** v.186, n.10, p.1101- 1103. 1985.
- WILLINGHAM, A.L. et al. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. **J.Helminthol.** v.70, p.259-63. 1996.
- WITTKE, M.; RENWRANTZ, L. Quantification of cytotoxic hemocytes of *Mytilus edulis* using a cytotoxicity assay in agar. **J Invertebr Pathol.** v. 43, n. 2, p. 248-253. 1984.
- WRIGHT, C.A. The pathogenesis of helminths in the Mollusca. **Helminth.** v.35, p.207-224. 1966.
- YAMAGUTI, S. Sistematic survey of nematodes of vertebrates and their host relationship. In: _____. *Systema helminthum; the nematodes of vertebrates*. Ney York: Interscience Publishers v.3, pt.2, p.681-704. 1961.
- YOUSIF F, LAMMLER G. The effect of some biological and physical factors on infection of *Biomphalaria glabrata* with *Angiostrongylus cantonensis*. **Z. Parasitenkd.** v.47, p.191-201. 1975.

YOUSIF, F; LAMMLER, G. The mode of infection with and the distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Z. Parasitenkd.** v.53, p.247-250. 1977.