

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Estudo da associação entre *Angiostrongylus vasorum* com
*Achatina fulica***

Aytube Coaglio Silva Lucas

Orientador: Prof. Walter dos Santos Lima

Co-orientadora: Cíntia Aparecida de Jesus Pereira

Belo Horizonte

2017

Aytube Coaglio Silva Lucas

**Estudo da associação entre *Angiostrongylus vasorum* com
*Achatina fulica***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Parasitologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais como pré-requisito para
obtenção do grau de Doutor em Parasitologia

Belo Horizonte

2017

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que está presente em cada momento da minha vida, por me conceder sabedoria em meio às dificuldades.

Aos meus pais, Ailton e Lúcia, com carinho, agradeço pela confiança, incentivo e força que me deram e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amados irmãos, Thabata e Mikail, por sempre trazerem alegria, apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Walter dos Santos Lima, por me abrir as portas, o que possibilitou me apresentar ao meio científico, pelos ensinamentos passados com grande discernimento, e pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa. Muito obrigado.

À minha co-orientadora Cíntia Aparecida de Jesus Pereira, pela ajuda, incentivo e ensinamentos durante os trabalhos.

Ao professor Luciano dos Santos Aggum Capettini do laboratório de Biologia Vascular pelos anticorpos cedidos e pela ajuda durante a análise das larvas.

À Professora Deborah A. Negrão-Côrrea pela ajuda e disponibilidade de seu laboratório.

À professora Mônica Alves Neves Diniz Ferreira, pela colaboração das lâminas de *A. fulica* para os estudos histopatológicos.

Ao professor Nelder de Figueiredo Gontijo por ceder os reagentes para análise de fenoloxidase.

Ao Marco Antônio Anacleto pela paciência e pela dedicação na realização dos desenhos científicos das larvas de *A. vasorum*.

Aos colegas, amigos e estagiários do laboratório de Helminologia Veterinária, pela ajuda e paciência.

Aos colegas do laboratório de Imunologia de helmintos que me ajudaram durante os experimentos.

Aos meus amigos e amigas que torceram por mim, me dando apoio durante esta fase da minha vida.

À Selma e ao Zé Carlos pela ajuda e fornecimento dos caramujos. E pelo Wéder pela ajuda no canil.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Sumara Aparecida Guilherme e Sibebe Abreu secretária do Departamento de Parasitologia

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

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 moluscos aquáticos e terrestres como hospedeiros intermediários. O presente trabalho avaliou a relação entre *Achatina fulica* infectado experimentalmente com 1000 L1 *A. vasorum*, nos dias 01, 08, 13 e 30. Analisou-se a presença de fenoloxidase (PO), na fração acelular da hemolinfa, no sobrenadante de hemócitos, utilizando os substratos L-Dopa L-Tirosina e p-fenilenediamine (PPD), assim como a evidência de melanina no tecido da região cefalopodal. Também quantificou-se óxido nítrico, na fração acelular de *A. fulica* pela Reação de Griess. Ainda, nesse estudo, avaliou-se a morfologia e morfometria de L1, L2 e L3, fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com anticorpos anti- β -tubulina, anti- α -tubulina, anti-colgã 1/1-colágeno, anti- β -actina, pelo picrosírio, oil red em microscópio de epifluorescência. E, para observar a infecção natural por *A. vasorum*, realizou-se digestão química de *A. fulica*, capturados na cidade de Belo Horizonte, Sabará, Igarapé e Lagoa Santa. Observou-se atividade de PO e produção de melanina tecidual em *A. fulica*, variando entre o controle e infectados. Ao 1º dpi, observou-se com L-tirosina ($p < 0,001$), L-Dopa ($p < 0,05$) e PPD ($p < 0,01$) aumento de PO coincidente com melanina. Ao 8º dpi, observa-se modulação de PO dependente de L-DOPA ($p < 0,001$) e L-tirosina, mas não com o PPD ($p < 0,05$). Já as análises teciduais foram inversamente proporcionais à PO dosificada com L-DOPA, L-tirosina. Ao 13º dpi, a inibição de PO ocorreu para os três substratos, sendo para L-DOPA ($p < 0,01$) e PPD ($p < 0,001$), e os níveis circulantes de melanina diminuíram no tecido. Ao 30º dpi, a PO com L-tirosina não alterou, enquanto para L-DOPA e PPD aumentaram, e no tecido decresceu a concentração de melanina. O NO foi crescente até o 8º dpi, decrescendo até o 30º dpi. As larvas L1, L2, L3 de *A. vasorum* apresentam, na composição do citoesqueleto, fibras de actina, tubulina, colágeno. Com picrosírio na luz polarizada não evidenciou a morfologia das larvas. No entanto, na epifluorescência associada ao APOTOME, observaram-se estruturas internas da região anterior e posterior. Pelo Oil red, verificou-se que existem reservas de lipídeos localizadas na região anterior e posterior de L1; na L2, as reservas lipídicas preenchem toda a extensão da larva e, na L3, localiza-se na parte posterior. Nos moluscos da região metropolitana de Belo

Horizonte encontrou-se, apenas, larvas do gênero *Strongyluris* sp e *Rhaditis* sp.. O trabalho apresenta um possível mecanismo, a fenoxidase, na eliminação das larvas de *A. vasorum*, principalmente no estágio L1 para L2, onde há aumento de óxido nítrico e melanina nos tecidos. O picrossirius foi o corante usado que apresentou o melhor resultado para análise morfológica das larvas, tendo como vantagem de ser barato e de fácil acesso. Os moluscos coletados em Belo Horizonte e na região metropolitana não estavam infectados com larvas de metastrongilídeos, podendo indicar a ausência dos parasitos nesses locais, sendo áreas livres para metastrongilídeos.

Abstract

Angiostrongylus vasorum is a parasitic nematode of domestic and wild canids, whose adult form can be found in the right ventricle, pulmonary arteries and their ramifications. The cycle involves is heteroxene with the participation of aquatic and terrestrial molluscs as intermediate hosts. The present study evaluated the relationship between *Achatina fulica* experimentally infected with 1000 L1 of *A. vasorum* on days 0, 1°, 8°, 13° and 30° after infection (dpi). The presence of phenoloxidase (PO) in the hemolymph acellular fraction in the hemocyte supernatant was analyzed using the L-DOPA, L-Tyrosine and p-phenylenediamine (PPD) substrates, as well as the evidence of melanin in the tissue of the region cephalopodal. The level of nitric oxide in the acellular fraction of *A. fulica* was quantified by the Griess reaction. In this study, the morphology and morphometry of L1, L2 and L3 were evaluated and fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with antibodies: anti- β -tubulin, anti- α -tubulin, anti-collagen 1/1-collagen and anti- β -actin, and by the dyes: picrosirius and oil red, under an epifluorescence microscope. To observe the natural infection by *A. vasorum* was carried out the chemical digestion of *A. fulica* captured in the city of Belo Horizonte, Sabará, Igarapé and Lagoa Santa. PO activity and tissue melanin production were observed in *A. fulica*, varying between control and infected. At the 1st dpi, L-tyrosine ($p < 0.001$), L-DOPA ($p < 0.05$) and PPD ($p < 0.01$) were observed, increased PO coincident with melanin. At 8° dpi, modulation of L-DOPA-dependent PO ($p < 0.001$) and L-Tyrosine, but not with PPD ($p < 0.05$) was observed, while in the tissue analyzes they were inversely proportional to PO on substrates L-DOPA and L-Tyrosine. At 13° dpi the inhibition of PO occurred in all three substrates and circulating levels of melanin in the tissue decreased. At 30° dpi the PO with L-Tyrosine did not change, whereas for L-DOPA and PPD they increased and in the tissue there was a decrease in the concentration of melanin. At the level of NO, it increased up to 8° dpi and decreased to 30° dpi. The larvae L1, L2, L3 of *A. vasorum* present in the cytokinetic composition fibers of actin, tubulin and collagen. With picrosirius, in the epifluorescence associated with ApoTome obervou internal structures in the anterior and posterior region. In the oil red, lipids were found to be dispersed throughout L1, L2 the lipid reserves fill the entire length of the larva and L3 were located in the posterior part of the larvae. In the molluscs of the metropolitan region of Belo Horizonte, only larvae of the genus

Strongyluris sp and *Rhaditis* sp. were found. The work presents a possible mechanism, phenoloxidase, in the elimination of larvae of *A. vasorum*, mainly in the L1 to L2 stage, where there is an increase of nitric oxide and melanin in the tissues. Picrossirius was the used dye that presented the best result for morphological analysis of the larvae, having the advantage of being cheap and easy to access. The molluscs collected in Belo Horizonte and in the metropolitan region were not infected with metatrongilid larvae, and could indicate the absence of the parasites in these places, being areas free for metastrongilideos.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Atividade de fenoxidase em <i>Achatina fulica</i> infectada com 1000 L1 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> com os substratos L-Dopa (A), L-Tirosina(B) e p-fenoxidiamine (PPD).....	37
Figura 2: Nitrito presente na fração acelular da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i> infectada com 1000 L1 de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	38
Figura 3: Histologia da região cefalopodal de <i>A. fulica</i> controle corada com HE.....	39
Figura 4: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> controle, corada com Fontana-Masson.....	40
Figura 5: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 1° dpi, corada com HE.....	41
Figura 6: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 1° dpi, corada com Fontana-Masson.....	42
Figura 7: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 8° dpi, corada com HE.....	43
Figura 8: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 8° dpi, corada com Fontana-Masson.....	44
Figura 9: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 13° dpi, corada HE.....	45
Figura 10: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 13° dpi, corada com Fontana-Masson.....	46
Figura 11: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 30° dpi, corada com HE.....	47
Figura 12: Histologia da região cefalopodal de <i>Achatina fulica</i> ao 30° dpi, corada com Fontana-Masson.....	47

Capítulo II

Figura 1: Recuperação média dos estádios de <i>Angiostrongylus vasorum</i> em <i>Achatina fulica</i> através da técnica de Baermann.....	56
Figura 2: Recuperação de <i>Angiostrongylus vasorum</i> em <i>Achatina fulica</i> pela digestão com Hcl + pepsina 1%.....	57
Figura 3: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	57
Figura 4: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -ubulina.....	58
Figura 5: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -tubulina, estrutura semicircular na porção anterior da larva.....	58
Figura 6: Porção anterior da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -tubulina.....	59

Figura 7: Porção anterior da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -tubulina.....	60
Figura 8: Comprimento do esôfago da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -tubulina.....	61
Figura 9: Medidas das regiões posterior da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcadas com anti- α -tubulina.....	61
Figura10: Detalhe da região posterior da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcadas com anti- α -tubulina. Distância entre a ponta da cauda ao espinho dorsal.....	62
Figura 11: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- β -tubulina.....	63
Figura 12: Porção anterior da larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- β -tubulina.	64
Figura 13: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> com anti- β -actina, destacando pouco o intestino e anel nervoso.....	64
Figura 14: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com anti-colageno destacando a cutícula.....	65
Figura 15: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	66
Figura 16: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picosirius.....	67
Figura 17: Primórdio genital presente na Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picosirius e distância em relação à ponta da cauda.....	68
Figura 18: Estruturas da muscular da Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picosirius.....	68
Figura 19: Musculatura da Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picosirius. Os traços no desenho destacam os locais mensurados.....	69
Figura 20: Larva de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com oil red.....	70
Figura 21: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	70
Figura 22: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- α -tubulina.....	71
Figura 23: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- α -tubulina.....	71
Figura 24: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- α -tubulina.....	72
Figura 25: Intestino da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina, apresentando massa compacta.....	73
Figura 26: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- β -tubulina.....	74
Figura 27: Região do reto da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- β - tubulina.	74

Figura 28: Intestino da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> com pequenas células arredondadas em todo o seu segmento.....	75
Figura 29: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- β -actina, corada o anel nervoso e intestino.....	76
Figura 30: Imagem da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- β -actina.....	76
Figura 31: Imagem da porção anterior da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti- β -actina.....	77
Figura 32: Imagem da porção anterior da larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- β -actina.....	77
Figura 33: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anticorpo anti-colageno.....	78
Figura 34: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picrosirius.....	79
Figura 35: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , corada com picrosirius. Poro excretor (seta).....	80
Figura 36: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , corada com picrosirius.....	81
Figura 37: Larva de segundo estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com oil red.....	82
Figura 38: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> a microscopia óptica.....	83
Figura 39: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	84
Figura 40: Características do bastão quitinoso da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	84
Figura 41: Região anterior da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	85
Figura 42: Região anterior da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	85
Figura 43: Porção posterior da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	86
Figura 44: Porção posterior da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	87
Figura 45: Primórdio genital da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	87
Figura 46: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti β -tubulina.....	88
Figura 47: Poro excretor da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti- α -tubulina.....	87
Figura 48: Esôfago da larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti β -tubulina.....	89

Figura 49: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , marcada com anti β -tubulina.....	90
Figura 50: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anti β -actina.....	90
Figura 51: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> marcada com anticorpo anti-colágeno.....	91
Figura52: Larva de terceiro estágio de A <i>Angiostrongylus vasorum</i> corada com picosirius.....	92
Figura 53: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , corada com picosirius.....	93
Figura 54: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , corada com picosirius com amphidial pouch	94
Figura 55: Larva de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , corada com corante oil red.....	94

Capítulo III

Figura 1: Ambiente onde foi de encontrado <i>Achatina fulica</i>	102
Figura 2: Larva do gênero <i>Strongyluris</i> sp encontrada em <i>Achatina fulica</i>	103
Figura 3: Detalhes da larva do gênero <i>Strongyluris</i> sp.....	103
Figura 4: Larva do gênero <i>Rhaditis</i> sp encontrada em <i>Achatina fulica</i> , com detalhe da cauda afilada (seta).....	103
Figura 5: Cistos (seta) presentes no manto de <i>Achatina fulica</i>	104

Lista de tabelas

Tabela 1: Medidas durante o desenvolvimento das larvas de *Angiostrongylus vasorum*.....95

Tabela 2: Taxa de infecção e localidade dos nematóides recuperados em *Achatina fulica*..... 102

Lista de Abreviações

L1 - larva de primeiro estágio

L2- larva de segundo estágio

L3 - larva de terceiro estágio

ROS - espécies reativas de oxigênio

PO - fenoloxidase

PPD - p-fenilendiamina

HE - hematoxilina-eosina

Sumário

1. Introdução.....	14
1.2 Aspectos gerais de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	15
1.2.1 Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	16
1.3 Biologia de <i>Achatina fulica</i>	18
1.4 Interações entre moluscos e helmintos	19
2.0 Justificativa.....	25
3.0 Objetivo Geral	26
3.1 Objetivos Específicos	26
Capítulo I.....	27
1.0 Introdução.....	27
2.0 Material e Métodos.....	28
2.1 Manutenção do parasito.....	28
2.2 Manutenção dos moluscos.....	29
2.3 Obtenção das larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	29
2.4 Infecção de <i>Achatina fulica</i> com larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	29
2.5 Coleta da hemolinfa e isolamento dos hemócitos	30
2.6 Determinação da atividade enzimática da fenoloxidase.....	31
2.7 Dosagem de óxido nítrico de <i>Achatina fulica</i>	31
2.8 Estudo de melanina em histologia de <i>A. fulica</i>	32
2.9 Análise estatística	32
3.0 Resultados.....	32
3.1 Carga parasitária de infecção.....	32
3.2 Atividade da Fenoloxidase	32
3.3 Níveis de óxido nítrico na hemolinfa de <i>Achatina fulica</i> durante a infecção por <i>Angiostrongylus vasorum</i>	35
3.4 Presença de melanina em tecido de <i>Achatina fulica</i>	36
4.0 Discussão	44
Capítulo II.....	47
1.0 Introdução.....	47
2.0 Material e métodos	50

2.1	Uso do microscópio epifluorescência para avaliação dos estádios evolutivos.	50
2.2	Recuperação dos estádios larvais	50
2.3	Fixação das larvas.....	50
2.4	Permeabilização das larvas	50
2.4.1	Coloração com picosírius.....	52
2.4.2	Coloração com Oil red O.....	52
3.0	Resultados.....	52
3.1	Recuperação dos estádios larvais	52
3.2	Caracterização morfológica das larvas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> intramolusco	54
3.2.1	Larvas de primeiro estágio:	54
3.2.2	Larvas de segundo estágio:.....	65
3.2.3	Larva de terceiro estágio:	74
4.0	Discussão.....	84
Capítulo III	89
1.0	Intrudução.....	89
2.0	Material e Métodos.....	90
2.1	Epidemiologia de <i>Achatina fulica</i>	90
3.0	Resultados.....	90
4.0	Discussão.....	93
Conclusões	95
Referências	96

1. Introdução

Os parasitos *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus vasorum* são parasitos da artéria mesentérica e artéria pulmonar de roedores, felídeos e canídeos. Esses parasitos possuem o ciclo heteróximo, com os moluscos gastrópodes, presentes nos ambientes de água doce e terrestre como hospedeiros intermediários (Guilhon 1965, Lie & Basch 1967, Lima et al. 1985, Zakikhani et al 2003).

Angiostrongylus cantonensis causa a meningite eosinofílica no homem, principalmente na Ásia, Sul do Pacífico e América do Sul, incluindo o Brasil (Caldeira et al 2007, Lima et al 2009, Thiengo et al 2010). Alguns moluscos são descritos como hospedeiros intermediários naturais para esse parasito, tais como *Sarasinula marginata*, *Subulina octona*, *Bradybaena similaris* (Caldeira et al. 2007, Oliveira et al. 2015), *Pomacea canaliculata* (Lv et al. 2009, Zhang et al. 2008, Hu et al. 2011), *Thelidomus asper* (Lindo et al. 2002) e *Achatina fulica* (Zhang et al.2008, Hu et al. 2011, Fontanilla & Wade 2012). No Brasil *A. fulica* foi descrito infectado, naturalmente, nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo e Amazonas (Lima et al. 2009, Maldonado et al. 2010, Caldeira et al 2007, Moreira et al. 2013, Oliveira et al.2015).

Angiostrongylus costaricensis, agente etiológico da angiostrongilose abdominal no homem, é encontrado desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Pena et al. 1995, Incani et al. 2007). Os moluscos descritos infectados naturalmente foram: *Phyllocaulis variegatus*, *Bradybaena similaris* (Teixeira et al. 1993, Rambo et al. 1997), *Belocaulus angustipes*, *Phyllocaulis soleiformis* (Rambo et al. 1997), *Limax maximus*, *Limax flavus* (Teixeira et al. 1993) e *Sarasinula linguaeformis* (Laitano et al. 2001).

Angiostrongylus vasorum parasita as artérias pulmonares e suas ramificações, principalmente dos canídeos domésticos e silvestres. Este nematódeo tem como hospedeiros intermediários as espécies: *Arion distinctus*, *Tandonia sowerbyi*, *Arion distinctus*, *Tandonia sowerbyi*, *Arion rufus*, *Arion flagellus* e *Limacus maculatus* (Guilhon, 1960, Patel et al. 2014, Aziz et al. 2016). Outros moluscos foram infectados experimentalmente tais como, *Arion rufos* (Guilhon 1965), *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Cepaea nemoralis*, *Arianta arbustorum*, *Euparypha pisana*, *Succinea putris*, *Cochlodina laminata*, (Guilhon & Afghahi 1969), *Biomphalaria glabrata* (Guilhon &

Afghahi 1969, Barçante et al. 2003), *Biomphalaria tenagophila* (Pereira et al. 2006), *Laevicaulis alte*, *Bradybaena similaris*, *Subulina octona*, *Prosopas javanicum* (Rosen et al. 1970), *Achatina fulica* (Sauerlander & Eckert 1974, Coaglio et al. 2016), *Omalonyx matheroni* (Mozzer et al. 2011), *Melanoides tuberculata*, *Bradybaena similaris*, *Sarasinula marginata* (Paula-Andrade 2012) e *Pomacea canaliculata* (Mozzer et al. 2014, Di Cesare et al. 2015).

1.2 Aspectos gerais de *Angiostrongylus vasorum*

Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, conhecido como “French Heartworm” ou filariose francesa, foi descrito pela primeira vez por Serres, em 1853, na cidade de Toulouse, França, observado no sistema circulatório de um cão que morreu subitamente (Conboy 2000, Morgan et al. 2005, Helm et al. 2010).

Os adultos possuem corpo delgado e alongado, pouco atenuado nas extremidades, a cutícula é fina e transparente, sendo a extremidade cefálica ligeiramente dilatada. A abertura bucal é pequena, arredondada e tem comunicação direta com o esôfago claviforme, e é ligeiramente mais alargado na porção final. A fêmea mede cerca de 17 mm de comprimento por 0,26 mm de largura, com ovários longos. A vulva fica anterior ao ânus, apresenta cauda curta e a extremidade posterior é arredondada, com expansão cuticular, em forma de bainha, projetada além da cauda. O macho mede cerca de 13 mm de comprimento por 0,24 mm de largura, apresenta bolsa copuladora pequena, sem o lobo mediano, com dois lobos laterais idênticos e simétricos. Os espículos são longos, fortes e sub-iguais, com estriações transversais (Guilhon & Cens 1973, Lima et al. 1985).

A larva de primeiro estágio (L1) mede cerca de 335 µm de comprimento e 11 µm de largura. Caracteriza-se por ser fina e transparente, com a extremidade anterior arredondada e a cauda recurvada ventralmente, com apêndice unguiforme. O segundo estágio da larva (L2) mede cerca de 440 µm de comprimento e 12 µm de largura, é pouco móvel, fica disposta em arco e apresenta cor marrom, devido à presença de grânulos dentro das células intestinais. Apresenta duas bainhas que ocupa todo o espaço em seu interior. A larva de terceiro estágio (L3) mede cerca de 480 µm de comprimento e 19 µm de largura, aparece livre das bainhas, sendo mais clara e transparente, com a presença de dois bastões quitinosos, dispostos longitudinalmente na extremidade

anterior, a cauda termina com um apêndice digitiforme (Guilhon & Cens 1973, Bessa et al. 2000, Mozzer 2010).

Angiostrongylus vasorum é encontrado em vários países da Europa, assim como na África, Oceania, América do Norte e América do sul (Guilhon 1960, Pallaske 1967, Elsheikha et al. 2014, Jones et al. 1980, Tarazona 1974, Williams et al. 1985, Alho et al. 2016, Morgan & Shaw 2010, Lima et al 1985, Roberts 1940).

No Brasil, não há dados sobre a prevalência de *A. vasorum*, mas há relatos de casos esporádicos em alguns estados. No Rio de Janeiro, Travassos (1927) recuperou o parasito no cachorro do mato (*Cerdocyon thous azarae*) e Langenegger et al. (1962) relataram esse parasito em cães (*Canis familiaris*). No Rio Grande do Sul e Paraná, houve relatos de cães infectados (Gonçalves 1961, Giovanonni et al. 1985). Fehringer e Fiedler (1977) citaram a ocorrência de dois cães infectados em Salvador. Lima et al (1985) recuperaram o parasito das artérias pulmonares de dois cães, procedentes do município de Caratinga (MG) e, posteriormente, Lima et al. (1994) relataram quatro infecções naturais na raposa do campo (*Dusicyon vetulus*), no sul do estado de Minas Gerais, mantidas no zoológico de Belo Horizonte. Duarte et al. (2007) relataram a infecção natural em cachorro do mato na cidade de Juiz de Fora (MG).

1.2.1 Ciclo biológico de *Angiostrongylus vasorum*

O parasito *A. vasorum* possui ciclo heteroxeno, sendo os canídeos silvestres e domésticos, os principais hospedeiros definitivos, e várias espécies de moluscos aquáticos e terrestres, como hospedeiros intermediários (Figura 1). Os moluscos infectam-se com L1, eliminadas pelas fezes dos canídeos, que penetram nos tecidos e/ou são ingeridas. Após a infecção, as larvas permanecem dentro do tecido de penetração sendo frequente a formação de infiltrado celular no entorno do nematóide (Bessa et al. 1996, Barçante 2006). A partir de seis dias intramolusco, ocorre a muda de L1 para L2, ainda nesses locais, em aproximadamente 10 dias, começa a transformação de L2 para L3, sendo que aos 25 dias as larvas infectantes são maioria, algumas saem ativamente dos tecidos, podendo ser encontradas no muco liberado pelos moluscos (Bessa et al. 2000, Barçante 2006, Mozzer et al. 2011, Coaglio 2013, Mozzer et al. 2014).

Os canídeos infectam-se ao ingerirem os moluscos, hospedeiros paratênicos como rã (*Rana temporaria*) (Bolt et al. 1993) e aves (*Gallus gallus domesticus*)

(Mozzer & Lima 2015) e/ou por meio de água e alimentos contaminados com L3 (Guilhon & Cens 1973). Esse estágio penetra na parede do trato digestivo e migra até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda para o quarto estágio (L4). Esta alcança a corrente sanguínea, chegando ao ventrículo direito e artérias pulmonares, aproximadamente ao décimo dia de infecção. Os helmintos alcançam a maturidade sexual por volta do trigésimo dia de infecção, nas artérias pulmonares, onde ocorre a cópula. As fêmeas migram para as pequenas ramificações da artéria pulmonar, onde iniciam a postura dos ovos não embrionados. Nesse local, ocorre o embrionamento dos ovos até o desenvolvimento da L1. Esta eclode, atravessa ativamente os alvéolos, brônquios e bronquíolos, chegando à traqueia, quando será deglutida, seguindo para o trato digestivo, onde será eliminada pelas fezes. A eliminação ocorre a partir do 28º dia de infecção. O período pré-patente varia entre 28 e 108 dias e o cão pode eliminar as larvas por muitos anos após a infecção (Guilhon & Cens 1969, Barçante 2004, Helm et al 2010, Mozzer et al. 2011, Coaglio et al. 2016).

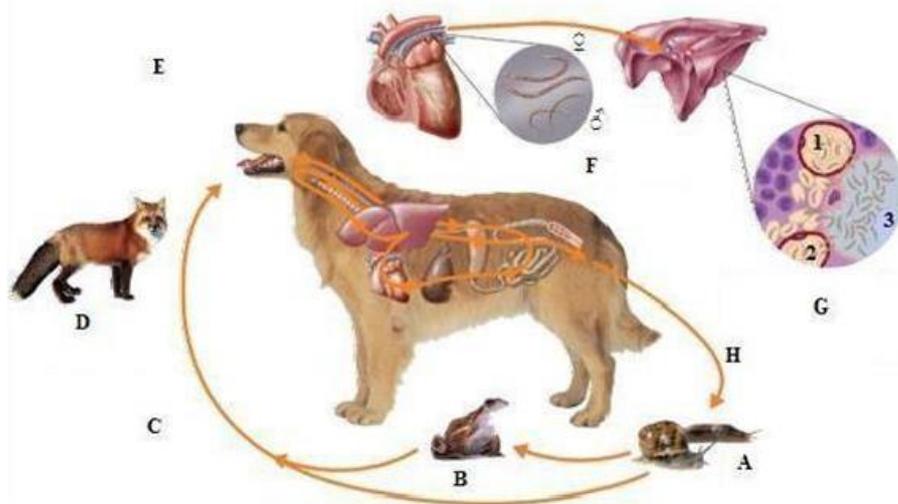


Figura 1: Ciclo de vida do *Angiostrongylus vasorum*. A- Moluscos são hospedeiros intermediários, ingerindo a larva L1 ou penetração ativa, passa por duas mudas para tornar L3 infectante. B- Rã pode ser hospedeira paratênica. C- Período pré-patente varia entre 28 a 108 dias. D- A raposa é um dos hospedeiros naturais de *A. vasorum*. E- Ingestão da L3 que atinge a circulação linfática e se desenvolve em L4 nos linfonodos mesentéricos. Este alcança a corrente sanguínea e chega ao ventrículo direito e artérias pulmonares. F- *A. vasorum* adulto na artéria pulmonar. G- 1-ovos nas ramificações das artérias pulmonares 2- embrionamento dos ovos até o desenvolvimento de L1 3- Larvas eclodem e atravessam ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios, migram para a traquéia, alcançando o meio exterior junto com as secreções pulmonares ou são deglutidas. H- L1 são eliminadas pelas fezes dos canídeos, contaminando o meio ambiente. Figura: Bayer HealyhCare.

1.3 Aspectos gerais de *Achatina fulica*

Achatina fulica Bowdich, 1822, conhecido como caramujo africano, foi introduzido no Brasil, no ano 1980, em uma feira agrícola no estado do Paraná, para ser comercializado como substituto ao escargot, *Helix aspersa*. Mas, como os resultados foram negativos no comércio, os produtores soltaram os moluscos no meio ambiente (Thiengo et al. 2008, Carvalho-Junior & Nunes 2009). O primeiro registro de um molusco encontrado livre no ambiente ocorreu em 1997, no município de Itariri, no estado de São Paulo. Atualmente encontra-se presente em 23 estados brasileiros, incluindo Minas Gerais (Barçante et al 2005, Thiengo et al. 2008).

A rápida dispersão de *A. fulica* pode ter sido favorecida pelo hábito alimentar pouco exigente, ao elevado potencial de sobrevivência e fecundidade (Albuquerque et al. 2008), o que permite a adaptação aos vários tipos de biomas, como florestas, capoeiras, caatinga e brejos (Eston et al. 2006).

Achatina fulica é natural das regiões costeiras do leste e nordeste da África (Raut & Barker, 2002). Dispersou-se, inicialmente, para Madagascar, Sri Lanka, Japão, Índia, Ilhas Indiana, Austrália, Sudeste Asiático, China, Polinésia Francesa, Ilhas do Pacífico, Hawaii, Estados Unidos e Brasil (Vasconcellos & Pile 2001, Thiengo et al. 2007, Albuquerque et al. 2008, Franco-Acuña 2009, Vitta et al. 2011, Fontanilla et al. 2012, Kwon et al. 2013, Moreira et al. 2013, Jayashankar et al. 2015, Stockdale-Walden et al. 2015, Song et al. 2016). Esse molusco causa grande impacto nos locais onde é encontrado, principalmente na agricultura, consumindo várias espécies de plantas, hortaliças e competindo com moluscos nativos. Por isso, é considerado a segunda pior espécie invasora do mundo, segundo o GISD (Global Invasive Species Database), sendo um hospedeiro importante de *A. cantonensis* em países asiáticos (Sarma et al. 2015).

No Brasil, há relatos de *A. fulica*, como hospedeiro intermediário para *A. cantonensis*, nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo e Amazonas (Caldeira et al. 2007, Thiengo et al. 2010, Maldonado et al 2010, Moreira et al. 2013, Oliveira et al. 2015). Os casos de meningite eosinofílica do estado do Espírito Santo estão relacionados à ingestão desse molusco. Não há relato de *A. fulica* infectada naturalmente com *A. costaricensis* ou *A. vasorum*, mas a infecção experimental para essas espécies, foram descritas por Carvalho et al. (2003), Neuhauss et al. (2007), Coaglio et al. (2016). Esse molusco também está associado a outros

parasitos de importância médico-veterinária, como *Aelurostrongylus abstrusus*, parasito do pulmão de gatos, *Rhabditis* sp. e *Strongyluris* sp. (Oliveira et al. 2010), parasitos encontrados no intestino de anfíbios e répteis.

1.4 Interações entre moluscos e helmintos

O sistema imune dos invertebrados possuem dois componentes principais, a fração celular, constituído pelos hemócitos e os fatores solúveis presentes na hemolinfa. Esses mecanismos não são independentes, funcionam sinergicamente para proteger o indivíduo contra infecções por patógenos (Amparyup et al. 2013, Negrão-Corrêa 2007, 2012). Os invertebrados, inclusive os moluscos, são capazes de reconhecerem as partículas-próprias das não-próprias, via células e componentes humorais da hemolinfa (Ottaviani 2006). A eliminação dos patógenos pode ser realizada diretamente pelos hemócitos e/ou pela associação destes, com fatores humorais presentes na hemolinfa. Os hemócitos ativados podem realizar fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos em torno dos patógenos, podendo eliminá-los. A resposta humoral caracteriza-se pela síntese de peptídios antimicrobianos (AMPs), ativação da cascata da fenoloxidase (Satyavathi et al. 2014), produção de proteínas formadoras de poros, como a *Biomphalysin* presente em *Biomphalaria glabrata*, que permite a destruição de esporocistos de *S. mansoni*, produção de formas reativas de nitrogênio e oxigênio e lisozimas (Negrão-Corrêa et al. 2007, 2012, Galinier et al. 2013). Em moluscos, as células circulantes originam-se principalmente no órgão produtor de hemócitos (APO), que se situa entre a cavidade do manto, pericárdio, na porção sacular dos tubos renais e na cavidade ventricular do coração (Ottaviani 2006, Souza & Andrade, 2006, Souza & Andrade 2012). A população celular circulante é chamada de hemócitos, as principais células de defesa, sendo capazes de reconhecer e fagocitar os patógenos. Nos moluscos, há pelo menos uma população de hemócitos na hemolinfa que realizam a fagocitose de partículas estranhas (Adema et al 1992). Os números dos hemócitos circulantes variam de acordo com a espécie e a presença de infecções, sendo que alguns estudos apoiam a ideia de que essas células deslocam-se da circulação e migram para os sítios inflamatórios (Bezerra et al. 1997, Negrão-corrêa et al. 2007, Cueto et al. 2015).

Nos gastrópodes são descritos dois tipos de hemócitos, os hemócitos estrelados (SH) ou granulócitos, que realizam fagocitose e aderem ao vidro, e os hemócitos

redondos (RH) ou hialinócitos, que não realizam fagocitose e não aderem ao vidro. Essas formas celulares foram encontradas em outros moluscos como *Planorbarius corneus*, *L. stagnalis*, *Bulinus guernei*, *B. glabrata*, *Lymnaea stagnalis* e *Helix aspersa maxima* (Adamowicz & Bolaczek 2003, Ottaviani 2006, Negrão-Corrêa et al. 2007, Negrão-Corrêa et al. 2012). Os tipos celulares, citados acima, foram observados no trabalho de Adema et al (1997), que utilizou os moluscos *A. fulica*, *Achatina achatina*, *B. glabrata*, *Bulinus natalensis*, *H. aspera* e *L. stagnalis*, onde os hemócitos se assemelham morfológicamente, sendo observadas diferenças apenas no tamanho entre as células dos moluscos terrestres e aquáticos. Ottaviani (1992) sugere que os hemócitos arredondados possuem características semelhantes aos linfócitos T de vertebrados e os hemócitos estrelados assemelham-se aos macrófagos. Furuta et al. (1986), analisando o molusco terrestre, *Incilaria fruhstorferi*, sugeriu a presença de três tipos celulares: o do tipo I (semelhante aos macrófagos de vertebrados), do tipo II (semelhante aos linfócitos) e do tipo III (semelhante aos fibroblasto). As do tipo I são redondas com pseudópodes curtos, o citoplasma possui numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático, corpos multivesiculares, corpos residuais, aparelho de Golgi e depósitos semelhantes a glicogênio. As do tipo II são menores do que a do tipo I, aderem ao substrato, mas permanecem esféricas e formam pseudópodes fracos, além de possuírem ribossomos dispersos, mitocôndria no citoplasma e núcleo arredondado. As do tipo III são fusiformes, possuem microfibrilas, organismos residuais no citoplasma e dão origem às fibras semelhantes ao colágeno, fora da membrana citoplasmática.

O reconhecimento de organismos estranhos está associado a padrões moleculares conservados, associados aos patógenos (PAMPs) pelos diferentes receptores padrões de reconhecimento (PRRs), o que leva à ativação da resposta imune humoral e celular. Nos moluscos, os mecanismos conhecidos que participam da neutralização e eliminação de patógenos são, principalmente, a fagocitose e a encapsulação. As lectinas são glicoproteínas, produzidas pelos hemócitos e liberados na hemolinfa, funcionando como moléculas de reconhecimento ao opsonizar partículas estranhas. Sendo assim, além de ser um fator de reconhecimento expresso pelos hemócitos, também seria um mecanismo de ativação dessas células. Um grupo de proteínas, com homologia ao fibrinogênio, com atividade de lectina, foi identificado na hemolinfa de *B. glabrata*, aumentando sua expressão, após a infecção do molusco ao *Echinostoma paraensei*. Essa proteína possui a capacidade de precipitar antígenos de

secreção e excreção do parasito, participar do reconhecimento e poderia ser importante inibidor do mecanismo de evasão do parasito (Adema et al 1997).

Os hemócitos ativados alteram a morfologia, transformando-se de células livres em aderentes para formar agregados celulares (Satyavathi et al. 2014). Nesse contexto, ocorre a fagocitose, que se inicia após o reconhecimento do patógeno, ocorrendo o engolfamento e a destruição intracelular (Satyavathi et al. 2014). Para a maioria dos moluscos, a célula responsável, por esse processo, são os granulócitos (Ottaviani et al. 2006).

Durante o encapsulamento ocorre a ligação entre os hemócitos e os patógenos considerados grandes, para serem fagocitados, como protozoários, trematódeos e nematóides. Os hemócitos também formam cápsula com multicamadas ao redor do corpo estranho, podendo formar o fenômeno de nodulação. Quando os hemócitos agregam-se, formando multicamadas para aprisionar grande número de bactérias, fungos e vírus, pode ocorrer a ativação da cascata da fenoloxidase, em alguns invertebrados (Satyavathi et al. 2014). Nessa interação, os hemócitos ativados podem produzir citocinas-like, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Ashida & Brey, 1997), que contribuem com a morte do patógeno (Satyavathi et al. 2014). Ainda há a participação direta e indireta dos componentes solúveis presentes na hemolinfa, que potencializam a destruição dos parasitos (Pereira 2008). Dentre os componentes solúveis tem-se as lectinas (Ito et al 2011) e peptídeos microbianos (Ottaviani et al. 1990, Mitta et al. 2000).

Durante o reconhecimento dos parasitos, os hemócitos ativados, presentes na hemolinfa circulante, liberam produtos citotóxicos (H_2O_2 , NO, ONOO-(peroxinitrito)), que podem danificar o tegumento dos trematódeos (Hahn et al. 2001, Ottaviani 2006) e, também, produzir proteínas semelhantes às citocinas pró-inflamatórias de vertebrados, como a interleucina alfa-1 (IL-1 α), interleucina beta-1 (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). As citocinas-like são fatores solúveis, envolvidas na mediação da resposta imune e na interação entre diferentes tipos celulares, podendo atuar em funções fisiológicas primárias (Ottaviani et al. 1993, Ottaviani et al. 2004). Moléculas semelhantes à citocinas foram encontradas em moluscos como: *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*, *Mytilus galloprovincialis*, embora não se tenha caracterizado como participam dos processos de interação, entre o sistema interno de defesa dos moluscos com os

patógenos. Recentemente, foi demonstrado que a citocina MIF (Fator inibitório da migração de macrófagos) possui ações na patogênese de diversas doenças de origem inflamatória, participando na interação entre *B. glabrata* e *S. mansoni* (Garcia et al.2010), seu mecanismo de ação, embora não totalmente elucidado, consiste na indução de uma série de mediadores responsáveis pela instalação do processo inflamatório. Os patógenos induzem a geração de ROS (espécie reativas de oxigênio) e de óxido nítrico (NO), em hemócitos ativados, levando a oxidação de L-arginine para L-citruline. O NO produzido reage com o superóxido ânion (O_2^-), produzindo o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é altamente tóxico e ajuda a potencializar a eliminação das bactérias, fungos e trematódeos (Hahn et al. 2001, Novas et al.2004, Gust et al 2013, Ray et al. 2013). O NO, apesar de ter a meia vida curta, é capaz de atravessar o tegumento do patógeno, inibindo a síntese e a reparação do DNA (Bogdan 2001). Os moluscos, *Viviparus ater*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* produzem NO, após serem estimulados por lipopolissacárideo (LPS) como de *S. mansoni* e *A. vasorum* (Ottaviani 2006, Pereira et al. 2006, Hahn et al. 2001, Negrão-Corrêa et al. 2007).

Outro mecanismo dos moluscos para eliminar patógenos é a ativação da cascata de proPO (pró-enzima de fenoloxidase), ativadas por serino proteases e proteínas de reconhecimento padrão (PRP). Em invertebrados (Cerenius et al.2008, Gupta et al. 2005, Le Clec'h et al. 2016), durante a cascata da fenoloxidase, os produtos gerados são bastante tóxicos aos patógenos. Nos artrópodes, o sistema da fenoloxidase atua similarmente ao sistema do complemento nos vertebrados (Söderhäll & Cerenius, 1998, Cerenius & Soderhall, 2004). A fenoloxidase também está relacionada à cicatrização de feridas, pigmentação do tecido, processo reprodutivo (Cerenius & Söderhäll 2004, Bai et al. 1996) e na defesa imune inata contra patógenos.

A fenoloxidase é produzida, principalmente, nos hemócitos específicos, como a célula cristal da mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* e, na célula oenocitóide, em outros insetos. Nos crustáceos, é produzida nos hemócitos tipos granulares, enquanto nos moluscos *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Illex argentinus* e *Perna perna* o proPO foi detectada, tanto no plasma, como nos hemócitos (Cerenius et al.2008, Vlisidou and Wood 2015, Sritunyalucksana e Söderhäll 2000, Aladaileh et al. 2007). As células ao desgranular, libera o proPO, que se torna ativada ao entrar em contato com corpos estranhos. Além disso, o PO também ajuda na ligação das proteínas da hemolinfa, levando à coagulação.

A ativação do pro-fenoloxidase (proPO) ocorre pelos PAMPs (padrão molecular associados a patógenos) como os peptidoglicanos, lipopolissacarídeos de bactérias, o β -1,3- glucano de fungos, enzimas que são liberadas pelos patógenos e, também, por danos causados no tecido do hospedeiro, através de serina protease (Vargas-Albores et al, 1997, Cerenius et al. 2008, Hu et al. 2016, Vlisidou & Wood 2015). A cascata da fenoloxidase ativa contribui no controle da infecção, converte os componentes fenólicos ou amina em dopacromo e, depois, em melanina, que possui atividade citotóxica, como quinonas e radicais livres, causadores de lesão nas células do patógeno (Nappi & Vass, 1993, Cerenius et al. 2008). Ao ser gerada, a PO catalisa a hidroxilação de monofenóis, como o aminoácido tirosina, σ - difenóis (DOPA ou Dopamina), seguido da oxidação destes para O- quinonas (Dopaquinona e Dopaminoquinona) (Nappi & Vass, 1993). Ao final da cascata, forma-se o pigmento escuro, a melanina. A síntese desse componente gera, provisoriamente, moléculas tóxicas, como as quinonas e radicais livres, que podem eliminar os patógenos (Nappi & Vass, 1993). A melanina pode funcionar como “scavenger” de radicais livres, ajudando assim, a eliminar os compostos reativos, que podem provocar danos ao tecido do hospedeiro (Nappi & Vass, 1993, Cerenius et al. 2008).

A ativação da PO contribui com a fagocitose, pois uma vez ativada, leva à nodulação de patógenos, à produção de metabólitos tóxicos e a melanização (Ashida & Brey 1997, Satyavathi et al. 2014) e ainda, na ativação de PO, produz várias moléculas nocivas aos patógenos, como as proteases, que podem degradar a proteína do hospedeiro, quinonas citotóxicas, moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio. Há mecanismos de regulação da atividade de PO, os inibidores de serina protease, como a pacifastin presente na lagosta *Pacifastacus leniusculus* e no inseto *Manduca sexta* a serpin-1j, serpin-3 e serpin-6, que impedem a ativação da enzima PO (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2012, Gupta et al. 2005).

A fenoloxidase pode catalisar dois tipos de reações: a tirosinase, que causa oxigenação de monofenóis como a tirosina, para difenóis (L-Dopa) e a lacase que leva à oxidação de difenóis (Dopa e Dopamina) para quinonas (Dopaquinona e Dopaminoquina) (Ashida & Brey, 1998).

Entre os mecanismos de defesa, as fenoloxidases (POs, 1.14.18.1) são grupos de proteínas de cobre, que incluem a tirosinase (EC 1.14.18.1), catecolase (EC 1.10.3.1) e lacase (EC 1.10.3.2). Essas são enzimas limitadoras de velocidade na melanização e

possuem um papel importante no mecanismo de defesa imunológica, em invertebrados (Luna-Acosta et al. 2011). Os três tipos de PO podem oxidar o-difenóis, tais como L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA, atividade de catecolase). No entanto, entre estas três enzimas, apenas as tirosinases podem hidroxilar monofenóis, como a L-tirosina (atividade de monofenoloxidase) e apenas lacases podem oxidar m- e p-difenóis, ou compostos aromáticos, contendo grupos amina, como p-fenilenodiamina (PPD; Atividade da lacase) (Thurston 1994, Luna-Acosta et al. 2011). As POs não têm apenas um papel na melanização, mas também no auto reconhecimento do não-próprio, na fagocitose e na formação dos nódulos, tornando-os enzimas chave do sistema imunológico (Le Bris et al. 2013). A cicatrização de feridas e a fenoloxidase em hemócitos são enzimas tipo tirosinase com atividade cresolase (EC 1.14.18.1) e catecolase (EC 1.10.3.1). Outra PO de cutícula, a lacase (EC 1.10.3.2), pode oxidar o-difenóis e p-difenóis, e parece estar restrita aos tecidos tegumentares, porém não tem sido reportada nos hemócitos circulantes (Caurdenas & Dankert, 2000). Além de seu papel na pigmentação, a PO está envolvida em respostas de defesa celular, incluindo a melanização, o reconhecimento de células próprias e não-próprias, a fagocitose, a formação de nódulos e de cápsulas e a locomoção de hemócitos (Aladaileh et al. 2007).

Entre os substratos utilizados para quantificar a fenoloxidase, L-Dopa (o-diphenol) é o mais comum, mas possui a desvantagem de não ser específico e, com isso, pode levar à medição imprecisa. Também pode ser metabolizado por outras enzimas como as peroxidases, e é suscetível à auto-oxidação. A deposição de melanina, que ocorre nas cápsulas, ou no próprio patógeno, é formada durante a oxidação e polimerização de fenóis, por enzimas chamadas fenoloxidases. As moléculas citotóxicas geradas, neste processo, incluem espécies reativas de oxigênio (ROI), nitrogênio (RNS) e quinóides que são intermediários da melanina. Um aumento na produção de óxido nítrico (NO) ocorre em hospedeiros imunorreativos e atua como molécula efetora, na interação com intermediários reativos, desencadeando a atividade citotóxica usada na defesa contra invasores (Nappi et al 2000, Passos et al.2014).

Especificamente em *B. glabrata* foi descrita a presença da PO em hemócitos lisados (Bahgat et al. 2002). Contudo, no estudo realizado por Bahgat et al. (2002), não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade de PO em *B. glabrata* com diferentes níveis de susceptibilidade ao *S. mansoni*. Nesse mesmo trabalho, mostraram a presença de serino-proteases em hemócitos lisados de *B. glabrata*, porém não foi

possível associar a atividade dessas enzimas à resistência/susceptibilidade ao parasito. Pereira (2009), após fracionamento da hemolinfa (ausente de células) de *B. tenagophila* Taim, verificou a presença de serino-proteases. Além disso, observou *in vitro* que na fração onde a atividade de serino estava co-localizada, ocorria a destruição do tegumento do esporocisto de *S. mansoni*, sugerindo possível papel das serino-proteases na defesa da *B. tenagophila* Taim contra *S. mansoni*. Mattos (2011) demonstrou que a fenoloxidase apresenta maior atividade específica, no sistema interno de defesa de *B. tenagophila* Taim, independente da presença de *S. mansoni* e, tal fato, parece não exercer um papel importante na defesa de *B. tenagophila*, frente ao *S. mansoni*, nem ao *Echinostoma paraensei*.

No sistema interno de defesa de *A. fulica*, como de outros moluscos, os hemócitos são as principais células de defesa. Estudos de Biswas e Mandal (1999) demonstram que os granulócitos realizam fagocitose de partículas como carmin, zimosan, bactérias, leveduras e hemácias, e observaram que os hemócitos recuperados de *A. fulica*, previamente inoculados com LPS, induzem à atividade da cascata de coagulação, em torno de bactérias, em teste, *in vitro*.

Sendo assim, estudos são importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos de reconhecimento de larvas dos helmintos parasitos nos moluscos.

2.0 Justificativa

No Brasil a participação de *Achatina fulica* no contexto da medicina humana e medicina veterinária, deve ser proposta, uma vez que há relatos de infecções naturais desse molusco com larvas de nematóides como *A. cantonensis* e *A. abstrusus* em várias regiões brasileiras. *Achatina fulica* é considerado praga nos locais onde se encontra, devido ao alto potencial biótico e a alimentação generalista. Com isso, este molusco pode vir a ser um importante hospedeiro intermediário para *A. vasorum* nos locais onde essas espécies se coabitam, visto que há relatos de *A. fulica* nos estados onde se registrou a presença de *A. vasorum*.

Achatina fulica infecta-se com *A. vasorum* em condições laboratoriais, apresentando baixa susceptibilidade em relação à outros moluscos, como *B. glabrata* (Barçante et al. 2003) e *Omalonyx matheroni* (Mozzer et al. 2011). Sendo assim, estudar os possíveis mecanismos presentes no sistema interno de defesa de *A. fulica*, bem como,

compreender a relação do desenvolvimento dos estádios larvais durante o desenvolvimento intramolusco se torna importante para compreender a relação do parasito com o hospedeiro intermediário.

3.0 Objetivo Geral

Compreender a associação entre *A. vasorum* com *A. fulica*, avaliando os mecanismos do sistema interno de defesa do molusco durante o desenvolvimento da larva e a morfologia durante o desenvolvimento intramolusco.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença da atividade enzimática de fenoloxidase na hemolinfa e de melanina em tecido da região cefalopodal de *A. fulica*, durante a infecção pelo *A. vasorum*;
- Quantificar a produção de óxido nítrico na hemolinfa de *A. fulica*, durante a infecção pelo *A. vasorum*;
- Observar as características morfológicas e morfométricas dos estádios evolutivos de *A. vasorum* em *A. fulica*;
- Avaliar a ocorrência natural de *A. vasorum* em *A. fulica* em Belo Horizonte e na região metropolitana.

Capítulo I

Avaliação da atividade de fenoloxidase em *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum*

1.0 Introdução

Angiostrongylus vasorum parasita as artérias pulmonares e suas ramificações, de canídeos domésticos e silvestres, tendo os moluscos terrestres e aquáticos como hospedeiros intermediários (Guilhon 1960, Guilhon 1965, Guilhon & Afghahi 1969, Rosen et al. 1970, Barçante et al. 2003, Mozzer et al. 2011, Patel et al. 2014, Mozzer et al. 2015, Di Cesare et al. 2015, Coaglio et al. 2016, Aziz et al. 2016). Os moluscos se infectam com as larvas de primeiro estágio (L1) eliminadas pelas fezes. As L1 se desenvolvem no molusco em larva de segundo estágio (L2) e larva de terceiro estágio (L3), infectante para os hospedeiros definitivos (Guilhon & Cens 1969).

Os moluscos reagem contra a infecção pelos nematóides parasitos via sistema interno de defesa (ISD), composto por células e/ou fatores humorais. A resposta celular é a principal no reconhecimento dos helmintos, mas, na presença dos fatores solúveis da hemolinfa, produzidos majoritariamente pelos hemócitos, tornam-se essas células mais ativas, além disso, a fração acelular da hemolinfa também possui alguns elementos capazes de danificar diretamente as estruturas dos parasitos (Pereira et al., 2008, Pereira 2009)

Após reconhecimento e encapsulamento de patógenos em alguns invertebrados, ocorre a ativação da via da fenoloxidase (PO), responsável pela melanização, assim como na fagocitose e na formação de nódulos (Le Bris et al. 2013).

A PO é uma enzima que existe na forma inativa (proPO) e torna-se ativada por componentes externos de microrganismos (Ashida & Brey, 1997), como β -1,3- glicanas (Vargas-Albores et al, 1997) e lipopolissacarídeos (LPS) (Perazzolo & Barracco, 1997). Esses compostos induzem à clivagem da proPO em PO, por serino protease endógena (Ashida & Brey, 1997). Em seguida, a PO catalisa a hidroxilação de monofenóis, como o aminoácido tirosina, σ - difenóis (DOPA ou Dopamina), seguido da oxidação destes para O-quinonas (Dopaquinona e Dopaminoquinona) (Nappi & Vass, 1993), ao final da cascata, forma-se o pigmento escuro, a melanina. (Söderhäll & Cerenius, 1998).

As fenoloxidasas (POs, 1.14.18.1) são grupos de proteínas de cobre, que incluem a tirosinase (EC 1.14.18.1), catecolase (EC 1.10.3.1) e lacase (EC 1.10.3.2), enzimas limitadoras de velocidade na melanização, e possuem um papel importante no mecanismo de defesa imunológica em invertebrados (Luna-Acosta et al. 2011). Os três tipos de PO podem oxidar o-difenóis, tais como L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA, atividade de catecolase). No entanto, entre estas três enzimas, apenas as tirosinases podem hidroxilar monofenóis, como a L-Tirosina (atividade de monofenoloxidade) e apenas lacases podem oxidar m- e p-difenóis, ou compostos aromáticos, contendo grupos amina, como p-fenilenediamina (PPD; Atividade da lacase) (Thurston 1994, Luna-Acosta et al. 2011).

A deposição de melanina, que ocorre nas cápsulas ou no próprio patógeno, é formada durante a oxidação e polimerização de fenóis. As moléculas citotóxicas geradas neste processo incluem espécies reativas de oxigênio (ROI), nitrogênio (RNS) e quinóides, que são intermediários da melanina. Um aumento na produção de óxido nítrico (NO) ocorre em hospedeiros imunorreativos e atua como molécula efetora na interação com intermediários reativos, desencadeando a atividade citotóxica usada na defesa contra invasores (Nappiet al 2000, Passos et al.2014).

Entretanto, a participação da via de fenoloxidade é pouco conhecida em moluscos, principalmente na interação entre hospedeiros intermediários e nematóides parasitos. Nesse trabalho, caracterizou-se a atividade de PO em *A. fulica* infectada com *A. vasorum*, utilizando-se os substratos L-Tirosinase, L-Dopa e p- fenilenediamine (PPD).

2.0 Material e Métodos

2.1 Manutenção do parasito

A cepa de *A. vasorum* utilizada foi isolada de um cão naturalmente infectado proveniente do município de Caratinga - MG (Lima et al. 1985). O ciclo é mantido, em laboratório, em cães, no canil de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG) e, em moluscos, *B. glabrata*, mantidos no moluscário do Departamento de Parasitologia. (CETEA/UFMG), protocolo 147/2011.

2.2 Manutenção dos moluscos

Para iniciar a criação, 100 exemplares de *A. fulica* foram coletados no bairro Retirinho, município de Raposos, Minas Gerais (19°58'33"S 43°47'54"W) e transportados para o Laboratório de Helmintologia Veterinária do ICB- UFMG. Os moluscos permaneceram em cuba retangular de 30 cm de altura, 60 cm de comprimento e 30 cm de largura, com terra autoclavada suplementada com carbonato de cálcio, água, e alimentados, três vezes por semana, com alfaca. Em cada cuba foram alocados cinco moluscos. Os ovos depositados na terra das cubas foram recolhidos e transferidos para uma cuba de criação, como descrito. Os moluscos eclodidos receberam os mesmos tratamentos e foram utilizados nos experimentos.

2.3 Obtenção das larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*

Para obtenção das L1, as fezes coletadas dos cães mantenedores da cepa foram submetidas à técnica de Baermann modificada, que é composto por um funil de vidro conectado ao tubo de hemólise e unidos pelo tubo de látex. As fezes foram enroladas em gazes dobradas e colocadas dentro do funil e, em seguida, acrescentado água a 42°C. Após 12 h, o tubo de hemólise foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Após a homogeneização dos tubos, realizaram-se contagens de três alíquotas para obtenção do número médio das larvas, posteriormente, realizou-se a infecção.

2.4 Infecção de *Achatina fulica* com larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*

As L1 quantificadas foram transferidas em volume de 1mL de água com 1.000 L1 para o fundo do recipiente de infecção (4 cm largura por 5 cm de altura) de cada molusco (com tamanho médio de 4 cm). Durante a infecção, a parte cefalopodal ficou em contato com as L1 e, a cada 60 minutos, durante 5h, os moluscos foram observados para constar o contato com as larvas. Se estivessem deslocados da suspensão de L1, eram colocados novamente no fundo do recipiente. Para evitar fugas, o recipiente foi tampado com outro semelhante, de forma que este ficasse próximo da concha, e assim diminuindo a locomoção do molusco, os recipientes foram vedados com fita adesiva,

deixando uma abertura para entrada de ar. Os moluscos permaneceram no recipiente de infecção, por 24 horas, em temperatura ambiente (Coaglio 2013).

Após esse período, os recipientes de infecção foram analisados para a contagem das larvas remanescentes. Para conhecer a taxa real de infecção nos moluscos, o líquido do recipiente foi centrifugado a 180g/10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento examinado para contagem das larvas restantes, conforme Pereira et al. (2006).

2.5 Coleta da hemolinfa e isolamento dos hemócitos

A hemolinfa foi coletada durante as fases de transformação de *A. vasorum* em *A. fulica*: ao 1° dpi (L1), ao 8° (L1 e L2), ao 13° dpi (L2 e L3) e ao 30° (L3) conforme (Coaglio et al 2016). Para a retirada da hemolinfa, inicialmente, a concha foi desinfetada com álcool 70% e secada em papel absorvente. Em seguida, a concha, na região do coração, foi perfurada com uma mini furadeira (Sigma) e a hemolinfa foi coletada com seringa de insulina de 1000 µL (Manoject 50 unit) e transferida para tubo de plástico de polipropileno de 12mL, acondicionado em banho de gelo. Foram coletadas amostras, em cinco experimentos independentes, de 40 *A. fulica* infectadas, sendo que se utilizou 10 moluscos, em cada dia avaliado. Além disso, para cada intervalo utilizou-se 10 moluscos, sem infecção.

Inicialmente, analisou-se o pH e a osmolaridade da hemolinfa de *A. fulica* quando aferiu-se o pH de 7.2 e a osmolaridade 160 mOsm/Kg . Com isso, padronizou-se o PBS nessas condições para realizar os estudos (NaCl-71mM; KCL 2,7mM; KH₂PO₄-1,4mM e Na₂HPO₄ – 4,3mM- pH:7,2).

A hemolinfa total de cada grupo foi colocada em frasco de poliestireno de 15 mL e centrifugada a 80g/10min/4°C, o sobrenadante foi utilizado para análise da presença de fenoloxidase e dosagem de NO. A fração celular foi lavada quatro vezes com PBS a 80g/10 min/4°C. Logo após, a viabilidade dos hemócitos foi observada, conforme descrito por Pereira et al. (2008) por contagem em hemocitômetro, após diluição 1:10 em azul de tripan 0.4 % (Sigma). Os hemócitos foram transferidos para tubos de polipropileno de 12 mL, acondicionados em banho de gelo e submetidos a um sonicador com 3 ciclos de 30 segundos, sendo que, entre os ciclos, a amostra descansou

por 1 minuto em banho de gelo. O lisado dos hemócitos foi centrifugado a 1500g/10 min/4°C e o sobrenadante acondicionado em gelo até o momento da análise de PO.

2.6 Determinação da atividade enzimática da fenoloxidase

Foram testados três substratos específicos para enzimas PO: (I) L-Tirosina (monofenol, Sigma) metabolizada apenas por tirosinase, (II) L-DOPA (o-difenol, Sigma) metabolizado por enzimas catecolasas, tirosinase e lacase e (III) p-fenilenodiamina (PPD, p-diamina, Sigma) apenas metabolizada pela enzima lacase (Clec'h et al. 2016).

A concentração de L-DOPA (3-4-dihydrox-L-phenyl-alcaline) (D9628 – sigma), L-tirosina (CASnumber60-18-4-sigma) e PPD (CAS number106-50-3- sigma) foi de 10mM, diluídas com PBS, imediatamente antes do experimento, devido à rápida oxidação dos reagentes.

Numa placa de transferência foi adicionado, em cada poço, 100µl de hemolinfa, 50µl da solução do substrato e 50 µl de PBS. Como controle, utilizou-se 200 µl de PBS e 50µl da solução do substrato com 150 µl PBS. Para cada tratamento, os controles, amostras, e branco foram testados em triplicata.

As reações foram medidas por cinética, durante 2 horas e as leituras foram realizadas a $\lambda = 490$ nm para L-tirosina e L-DOPA e a $\lambda = 465$ nm para PPD em placa de transferência (VersaMax Tunable Microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) cada 20s a 28°C. O resultado foi plotado, utilizando a velocidade máxima da reação (isto é, aumento da absorvância/minuto) conforme Alves et al. (2011).

2.7 Dosagem de óxido nítrico de *Achatina fulica*

A dosagem de óxido nítrico, na fração acelular de *A. fulica*, foi realizada pela reação de Griess, por meio da mensuração da concentração de nitrito (NO₂). Alíquotas de 50 µL foram alocadas para uma placa de transferência de 96 poços (Falcon®, BD lab., EUA). Logo após, acrescentou-se 50 µL do reagente de Griess em cada poço. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm e a quantidade de nitrito, em

cada amostra, foi estimada pela curva padrão de NaNO₂, com nível de detecção de 0.5 nM, conforme Pereira et al. (2006).

2.8 Estudo de melanina em histologia de *Achatina fulica*

Após a retirada da hemolinfa, os moluscos foram sacrificados, a concha foi removida e o tecido cefalopodal fixado com Millonig (Carson et al. 1973), por dois dias a 4°C. Após esse período, foram lavados por 2 h em água corrente e colocados em álcool 70%. Em seguida, desidratado numa série de banhos de álcool e xilol, e emblocados em parafina (Plesh et ai., 1975). Os tecidos foram seccionados em micrótomo, com cortes seriados de 5 µm e corados com Fontana-Masson (Sheehan & Hrapchak, 1980) para visualização da melanização e a hematoxilina-eosina (HE) (Pan, 1958) para análise do núcleo das células. Os cortes foram examinados em microscópio óptico (Olympus BX41) acoplado à câmera digital (Olympus DP12).

2.9 Análise estatística

Os resultados referentes à fenoloxidase foram analisados utilizando análise de variância One way ANOVA, com pós-teste de Tukey.

3.0 Resultados

3.1 Carga parasitária de infecção

Nos potes de infecção dos moluscos, a média de L1 restante foi de 25%. Assim, a carga real, que penetrou, foi de 750 L1.

3.2 Atividade da Fenoloxidase

A Figura 1 apresenta os resultados das dosagens de fenoloxidase na hemolinfa de *A. fulica* controles e infectadas com *A. vasorum*. Observou-se atividade de fenoloxidase, na hemolinfa de *A. fulica*, utilizando substratos L-DOPA, L-Tirosina e

PPD. Entretanto, os níveis circulantes oscilaram durante a cinética enzimática de 2 horas. A atividade de PO com o substrato PPD na hemolinfa, livre de células, foi maior em todos os dias analisados. Ao 1º dpi, os níveis com PPD elevaram 2,62 vezes, em relação ao L-Tirosina e 1,54 à L-DOPA. Ao 8ºdpi, esse aumento foi de 3,96 vezes, em relação à L-Tirosina e 3,06 à L-DOPA. Ao 13º dpi, a resposta foi de 2,67, em relação à L-Tirosina e 1,54 à L-DOPA. E, ao 30º dpi, o nível foi 3,7 vezes, ao ser comparado com o substrato L-Tirosina e 1,68 à L-DOPA.

Na hemolinfa de *A. fulica*, no substrato L-DOPA, ao 1ºdpi teve o nível de PO maior, em relação aos outros intervalos. Após esse dia, o nível de PO diminuiu, voltando a crescer aos 30º dpi, mas com o nível de PO semelhante ao apresentado no molusco não infectado.

No L- Tirosina, o nível de PO do 1º dpi, foi superior a todos os dias de infecção, em relação ao molusco não infectado ($p<0,01$).

No substrato PPD a PO do 1º, 8º e 30º dpi foi maior do que o molusco não infectado, quando houve diferença estatística de ($p<0,05$), ($p<0,05$), ($p<0,01$) respectivamente, também houve uma queda acentuada no 13ºdpi com novo aumento do nível de PO ao 30º dpi.

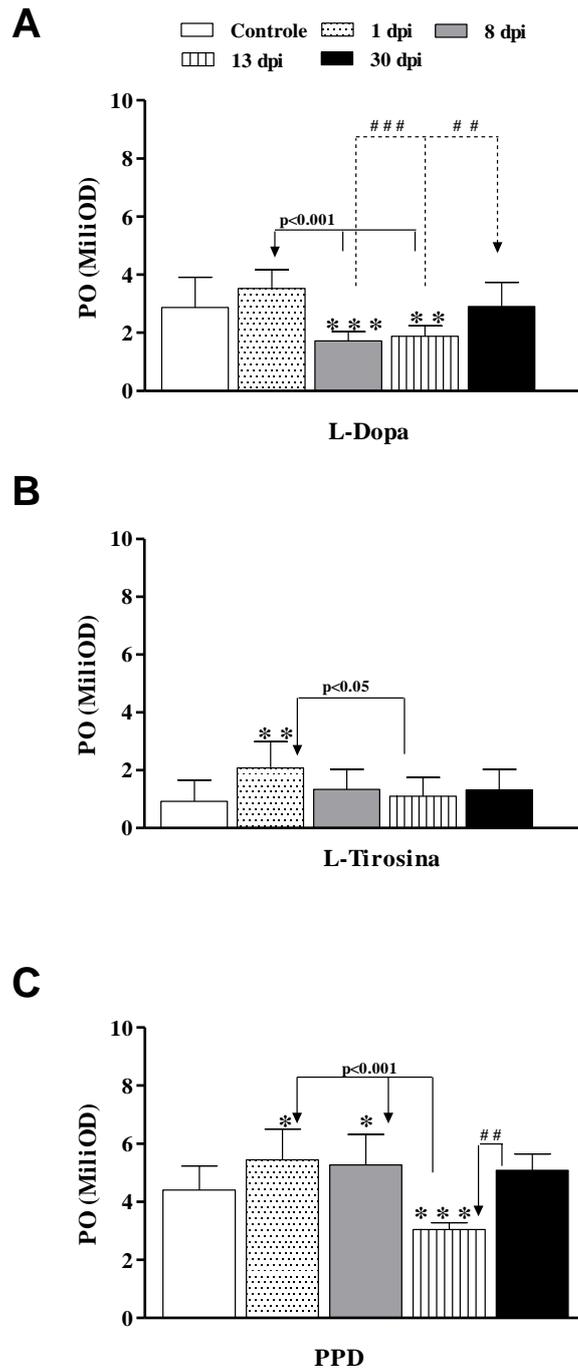


Figura 1: Atividade de fenoloxidase em *Achatina fulica* infectada com 1000 L1 de *Angiostrongylus vasorum* com os substratos L-Dopa (A), L-Tirosina(B) e p-fenoloxidiamine (PPD) (C). A: representa a diferença estatística de L-Dopa do 8° e 13° dpi com controle (**p<0,001 e *p<0,01); (p<0,001) do 8° e do 13° dpi em relação ao 1° dpi; e 30 dpi em relação a 8dpi (### p<0,001) e com 13 dpi (## p<0,01). B: representa a diferença estatística de L-Tirosina do 1° dpi em relação ao controle (** p<0,01); (p<0,05) do 13° dpi em relação a 1°dpi; C: representa a diferença estatística de PPD do 1°, 8° e 13° dpi em relação ao controle (* p<0,05 e ***p<0,001); 13° dpi em relação ao 1°dpi e 8° dpi (p<0,001); 30 dpi em relação ao 13° dpi (## p<0,01).

As populações dos hemócitos apresentaram viabilidade de 95% antes de serem levadas ao sonicador. No entanto, os hemócitos lisados de *A. fulica* não apresentaram atividade de fenoloxidase.

3.3 Níveis de óxido nítrico na hemolinfa de *Achatina fulica* durante a infecção por *Angiostrongylus vasorum*

O nível de NO foi estimado na fração acelular da hemolinfa de *A. fulica*, durante a infecção por *A. vasorum*, através da dosagem de nitrito. Os moluscos não infectados apresentaram baixa quantidade de NO na hemolinfa (0,018nM), em relação aos infectados até o 13° dpi. Ao 30°dpi, os níveis de NO ficaram abaixo dos moluscos controles. O pico de NO foi registrado ao 8° dpi (0,12nM), sendo 6,5 superior ao controle. Ao 13° dpi, a quantidade de NO começou a diminuir, mas mantendo diferença significativa, em relação ao controle ($p < 0,001$). No entanto, ao 30° dpi, os níveis foram 15 vezes menor do que no 8° dpi (Figura 2).

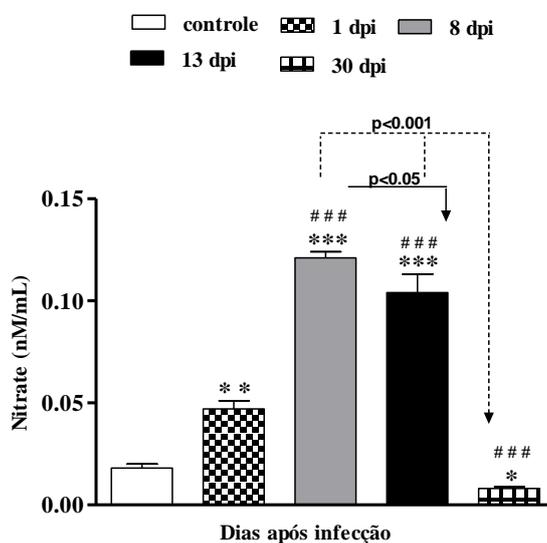


Figura 2: Nitrito presente na fração acelular da hemolinfa de *Achatina fulica* infectada com 1000 L1 de *Angiostrongylus vasorum*. Representa-se a diferença estática entre do 1°, 8°, 13° e 30° dpi em relação ao controle (** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$) respectivamente; entre 8°, 13° e 30° dpi em relação ao 1° dpi (### $p < 0,001$) e entre 13° e 30° dpi em relação ao 8° dpi ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente).

3.4 Presença de melanina em tecido de *Achatina fulica*

Pode ser observado no epitélio da região cefalopodal de *A. fulica* controle a presença de pigmento de melanina esparsa distribuída no tecido fora das células. (Figuras 3), no entanto, com a coloração específica para melanina ficou melhor evidenciado (Figura 4).

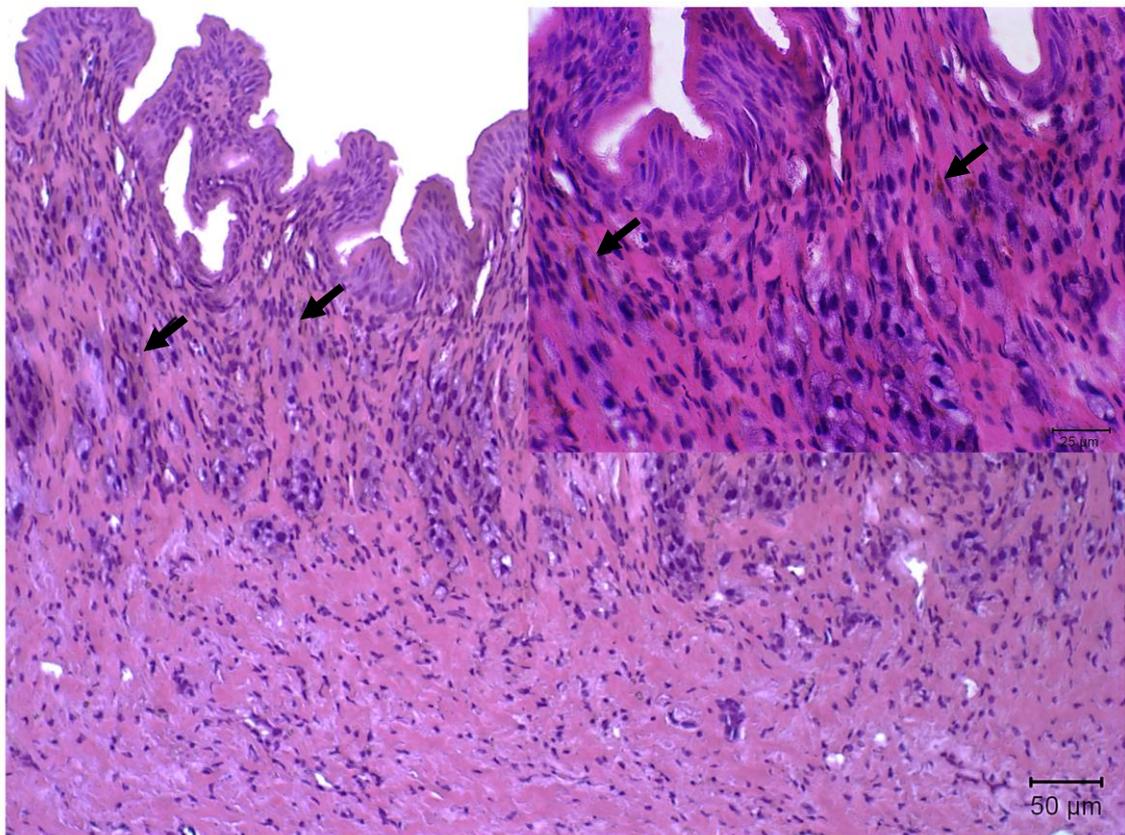


Figura 3: Corte histológico da região cefalopodal de *A. fulica* controle corada com HE. Pontos de melanização no tecido (setas pretas). No detalhe, pigmento de melanina presente no tecido (setas pretas).

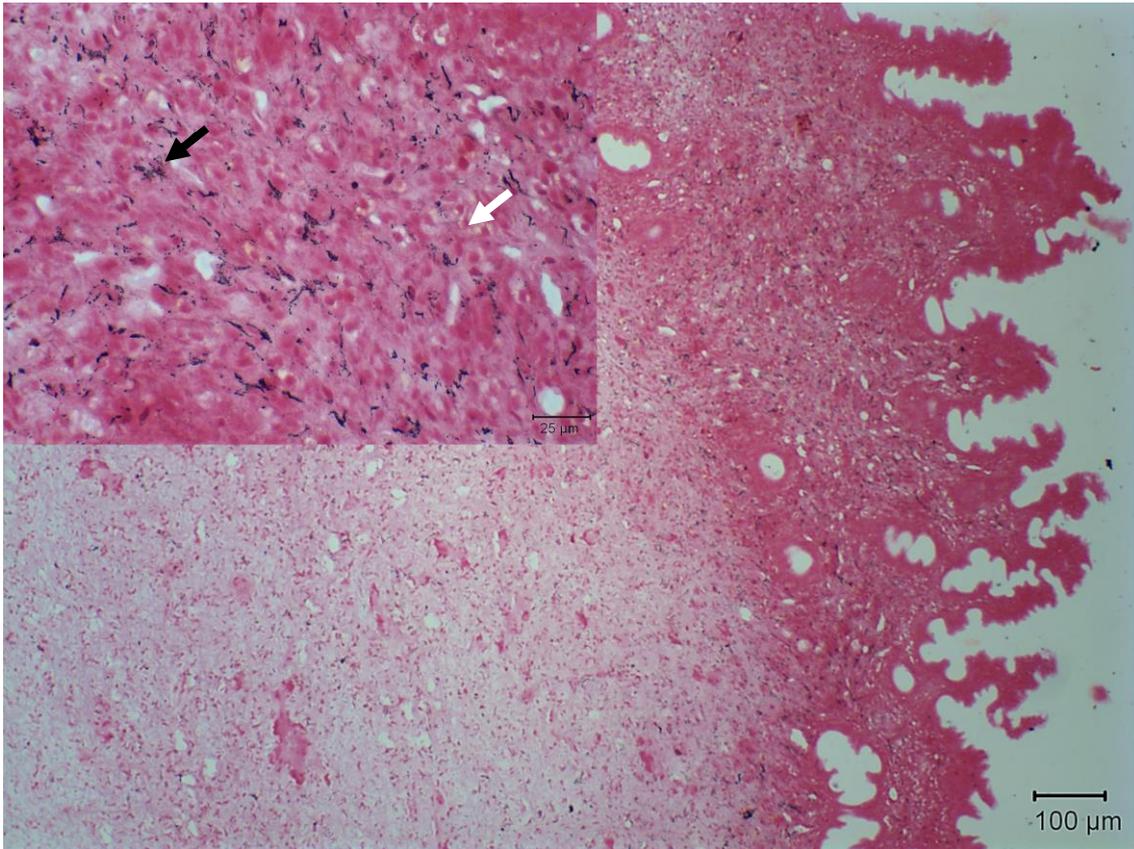


Figura 4: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* controle, corada com Fontana-Masson. Tecido apresentando melanização e no detalhe, depósito de melanização (seta preta) e melanina menos concentrada (seta branca) no tecido.

Na figura 5 visualiza-se ao 1ºdpi a presença de grande quantidade de células no entorno das larvas de *A. vasorum* (Figura 5) e cristais de melanina na hemolinfa pelo HE. No entanto, pelo Fontana-Masson observou-se o infiltrado celular intenso no tecido conjuntivo, apresentando alta concentração de melanina, principalmente na porção mais externa da região cefalopodal (Figura 6). Houve aumento de melanina no tecido conjuntivo ao comparar com o controle, quando não se observava melanina infiltrada. Neste tecido encontra-se L1 envolvida por infiltrado celular com discreta presença de melanina ao seu redor.

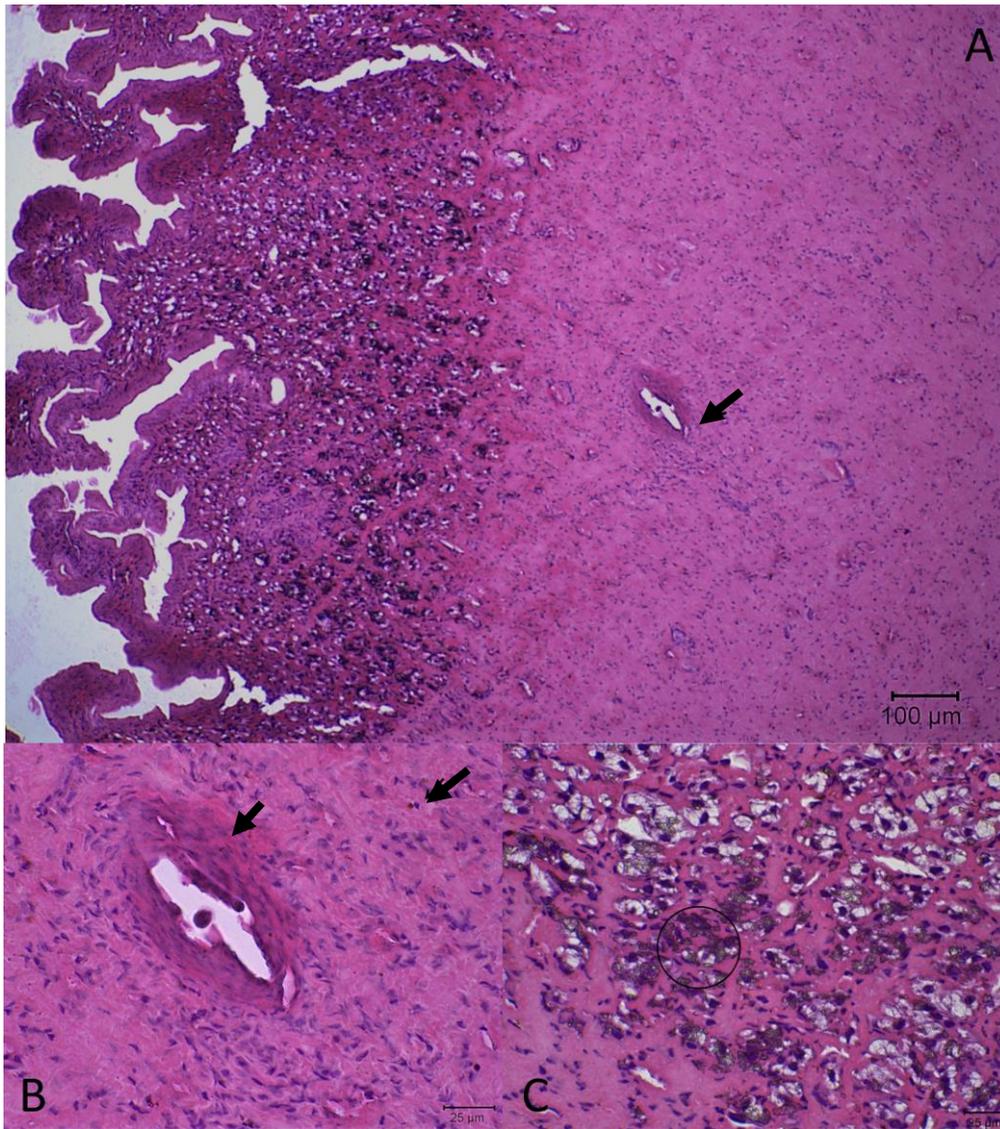


Figura 5: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 1º dpi, corada com HE. A- Larvas envolvida pelo infiltrado celular (seta), B- Pontos de melanina próximo a larva (setas), C- O destaque observa-se a presença cristais de melanina.

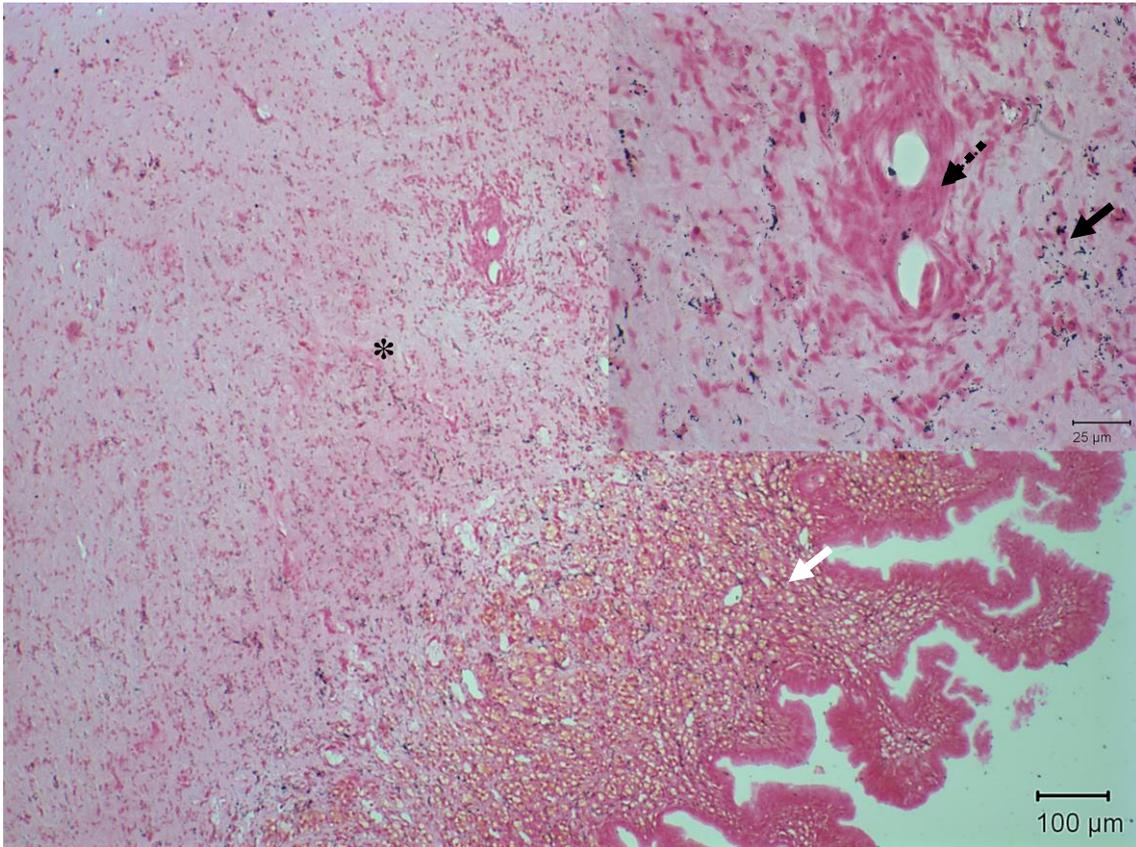


Figura 6: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 1º dpi, corada com Fontana-Masson. Na região do tecido conjuntivo (*), próximo a borda do tecido, apresentando alta concentração de melanização (seta branca), enquanto na porção mais interna do tecido o aumento é menos acentuado. No detalhe, larva envolvida por infiltrado celular (seta pontilhada) com presença de melanina (seta preta).

Ao 8º dpi houve aumento na quantidade de infiltrado celular nos tecidos e entorno das larvas de *A. vasorum* (Figura 7). No tecido conjuntivo o infiltrado celular no entorno da L2 apresenta depósito de melanina superior ao observado ao 1º dpi (Figura 8).

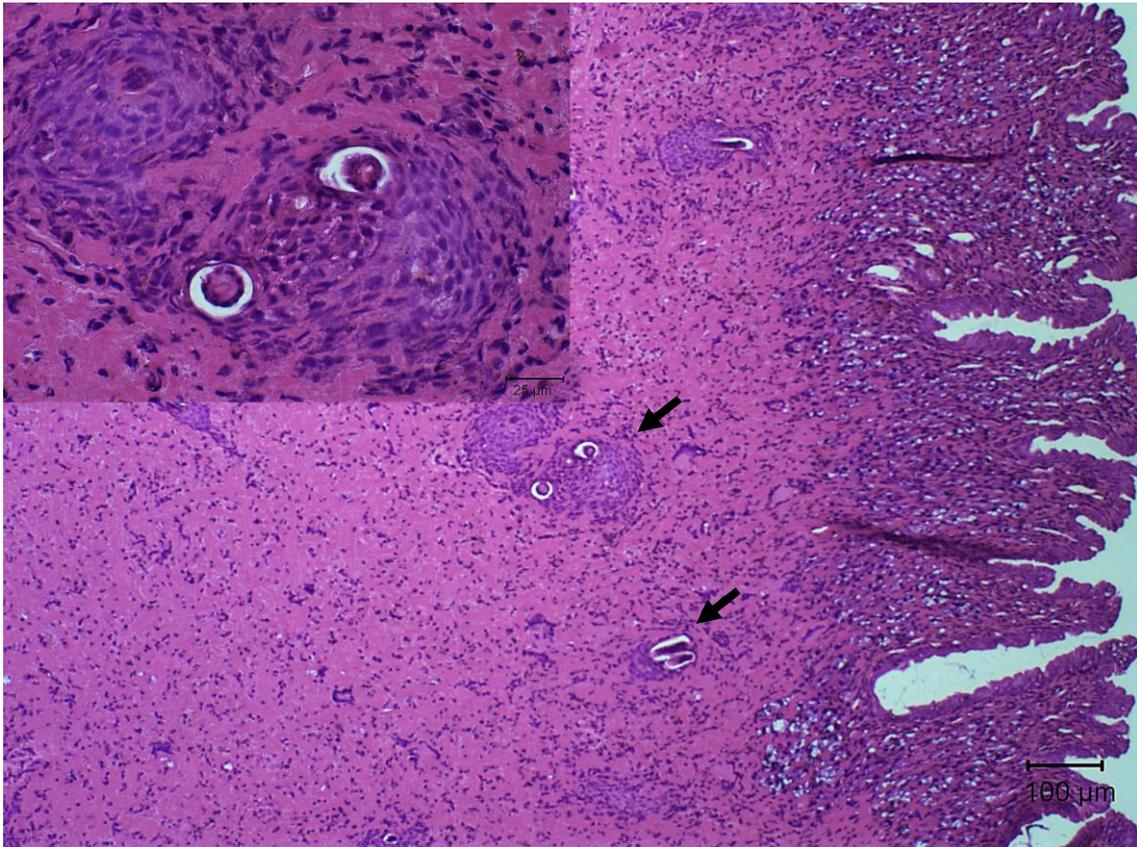


Figura 7: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 8º dpi, corada com HE. Presença de larvas envolvidas em intenso infiltrado celular (setas). Detalhe, presença de larva envolvida em intenso infiltrado celular.

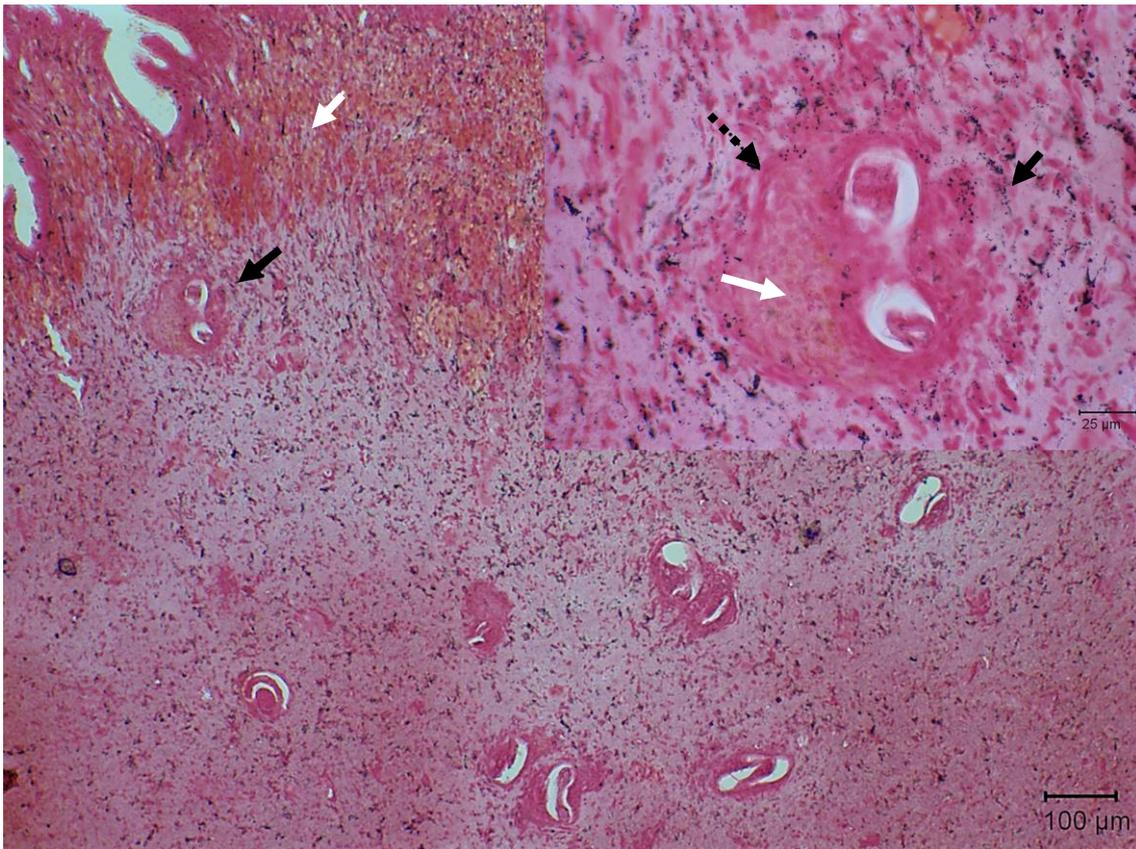


Figura 8: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 8° dpi, corada com Fontana-Masson. Região do tecido conjuntivo (*) com intensa melanização (seta preta) e melanina menos concentrada (seta branca). No detalhe, presença de infiltrado celular (seta pontilhada) com presença de melanina (seta preta) e melanina menos concentrada (seta branca).

Ao 13° dpi, período no qual a L2 muda para o estágio L3, observa-se uma diminuição das células no tecido e ao redor da larva (Figura 9). No entorno das larvas, o depósito de melanina diminui quando comparado ao 8°dpi e não se observa uma melanina intensa no entorno das larvas, como observado na L2, mas é possível observar a presença de melanina no interior do infiltrado (Figura 10).

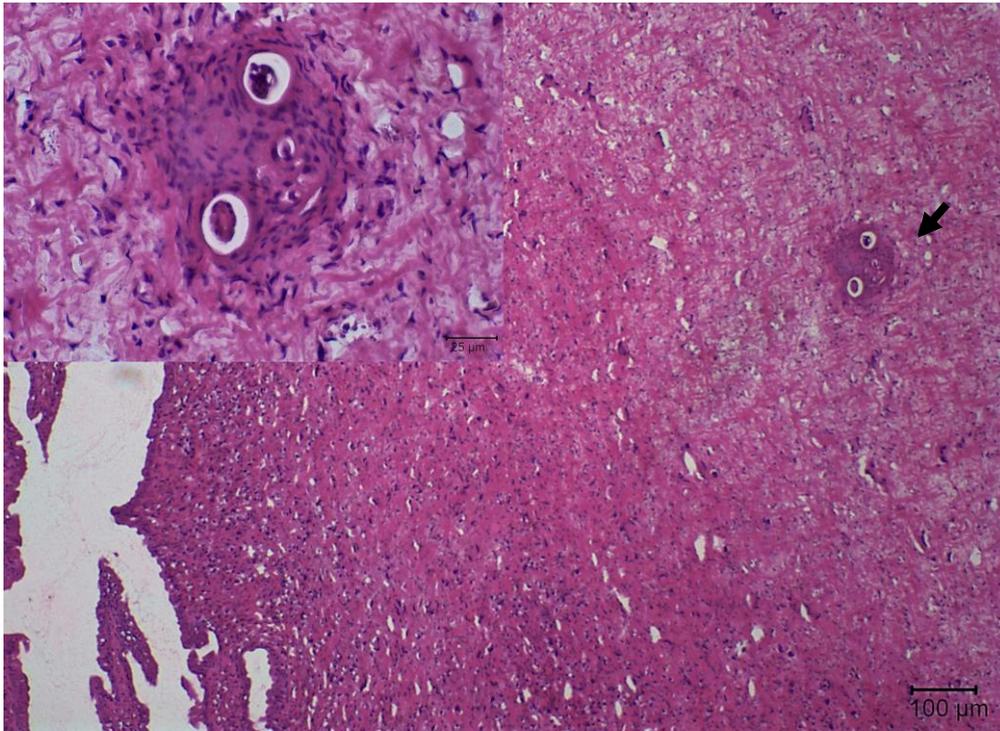


Figura 9: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 13° dpi, corada HE. Presença de larva envolvida em infiltrado celular (seta). Detalhe, presença de larva envolvida em infiltrado celular.

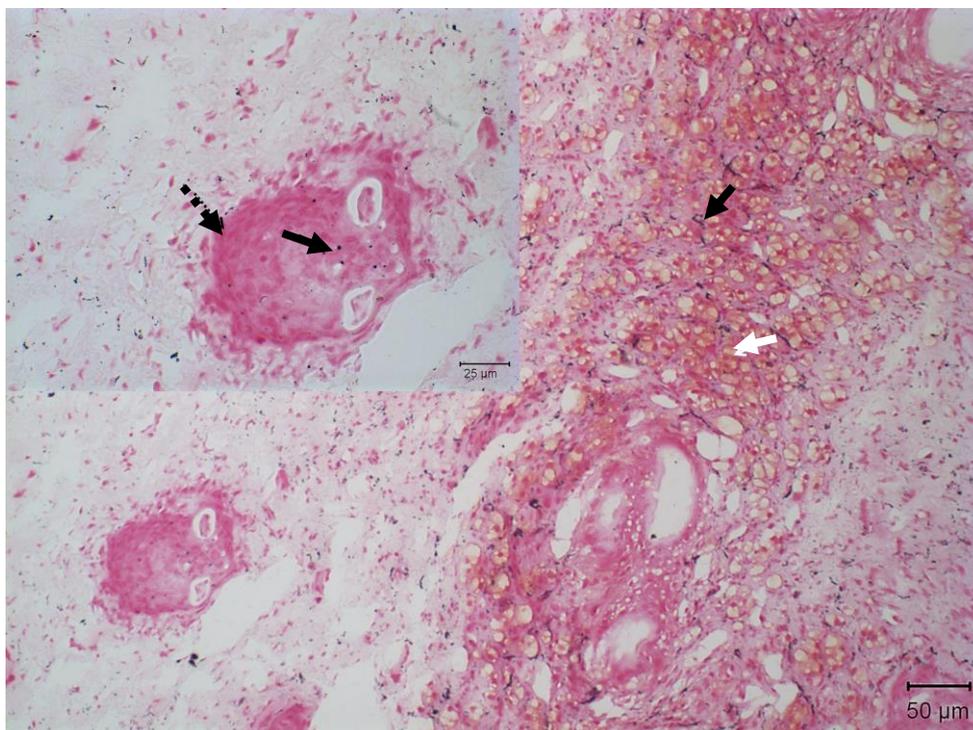


Figura 10: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 13° dpi, corada com Fontana-Masson. Próximo à larva houve diminuição de melanina (seta preta e seta branca). Detalhe, larva envolvida em infiltrado celular (seta pontilhada), com pouca presença de melanina (seta preta) ao seu redor.

Ao 30° dpi, observa-se uma intensa diminuição do infiltrado celular nos tecidos e entorno da L3 de *A. vasorum* (Figura 11). O depósito de melanina diminuiu no entorno da larva, apresentando poucos pontos de melanina no tecido e na porção mais externa do tecido não se observa a presença da melanina menos concentrada, mas a melanina mais escura esta (Figura 12).

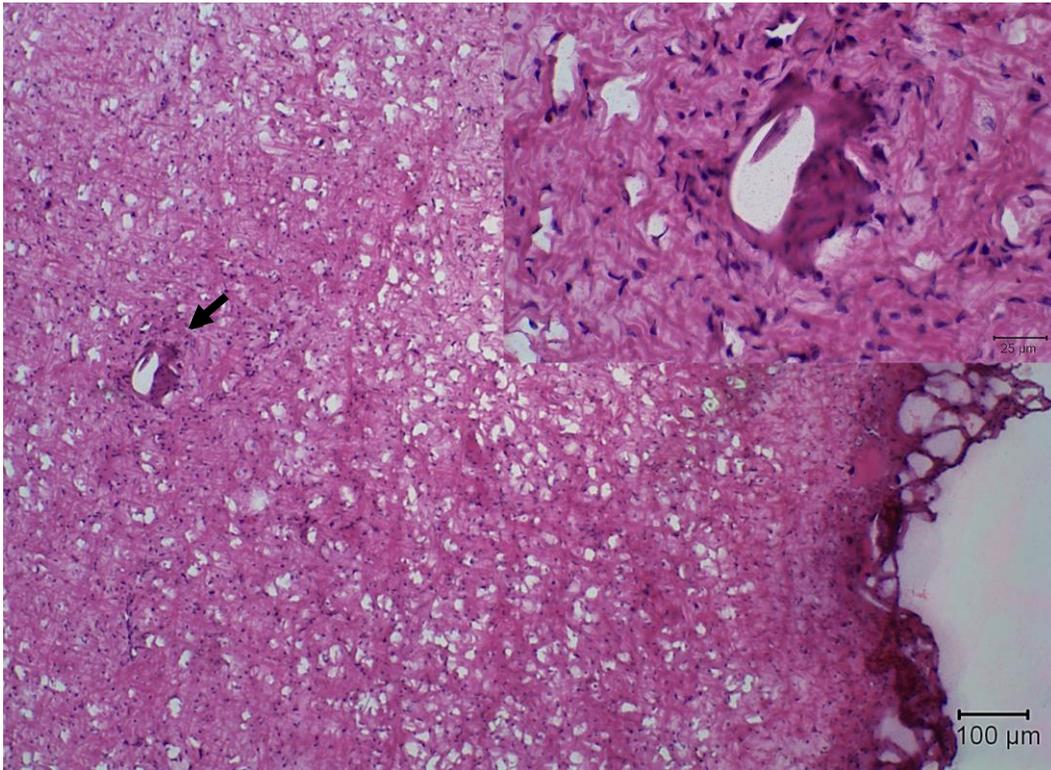


Figura 11: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 30° dpi, corada com HE. Larva envolvida no infiltrado celular menos denso (seta) e detalhe, larva envolvida no infiltrado celular.

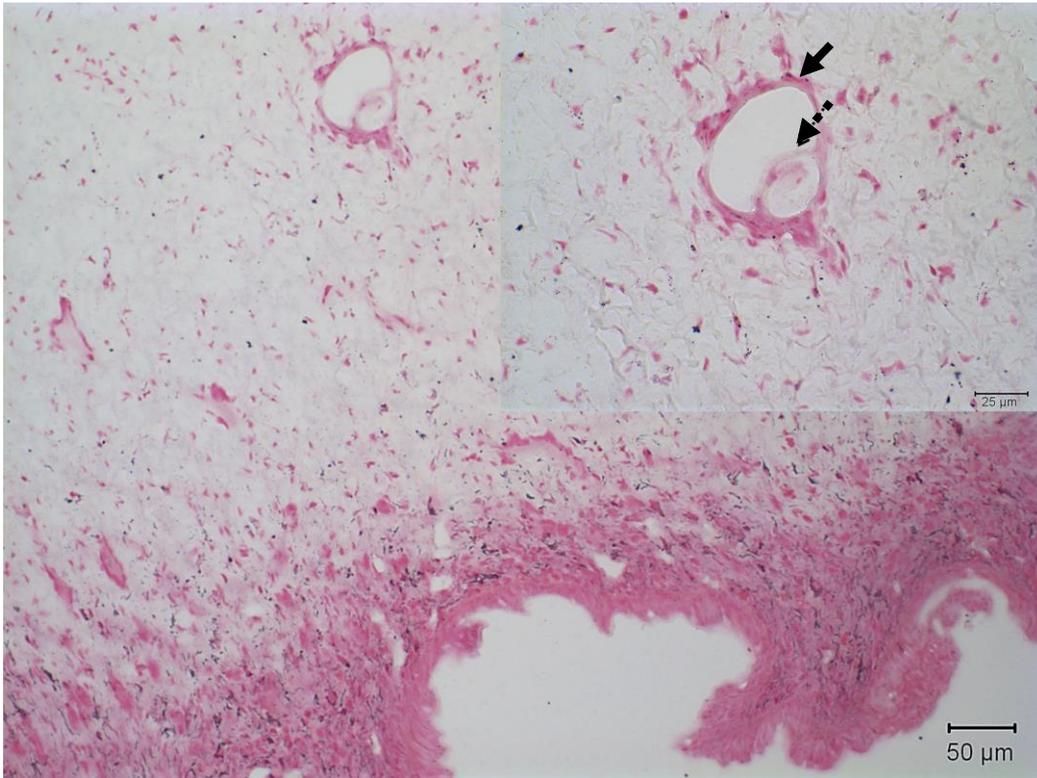


Figura 12: Corte histológico da região cefalopodal de *Achatina fulica* ao 30° dpi, corada com Fontana-Masson. Região próxima à larva com infiltrado de melanina menos denso no tecido; e detalhe, larva envolvida no infiltrado celular (seta pontilhada) menos denso e pouca presença de melanina ao redor da larva (seta preta).

4.0 Discussão

Nesse estudo demonstrou que a hemolinfa de *A. fulica* controle e infectada com *A. vasorum* possui atividade de fenoloxidase, nos fatores solúveis da hemolinfa e, também, está presente no pigmento de melanina, em cristais, no tecido conjuntivo da região cefalopodal. Essa atividade enzimática foi detectada, tanto com o substrato não específico L-DOPA, que metaboliza catecolase, lacase e tirosinase, quanto com os substratos específicos para lacase (PPD) e para tirosinase (L-Tirosina). Ao analisar a histologia de *A. fulica* infectada, observou-se, pelo infiltrado celular, a circulação de melanina nos tecidos.

Na maioria dos modelos de estudo, com moluscos, não relatam atividade de PO com o substrato L-Tirosina, frequentemente observados em trabalhos com insetos como *Drosophilla melanogaster* (Nappi, 2010). Entretanto, nesse trabalho foi encontrado reatividade ao substrato L-Tirosina em *A. fulica*, embora se observe que a melanina circula nos espaços da hemolinfa, mas não deposita no entorno do parasito, como

observado em cápsula melanótica em insetos. A melanina em *A. fulica* não está localizada dentro dos hemócitos circulantes como em algumas populações de insetos, como *D. melanogaster* (Nappi 2010), nem nas células infiltradas dos tecidos analisados.

A atividade de PO ao 1º dpi é coincidente com os níveis quantificados com os substratos L-DOPA, L-Tirosina e PPD. Nesse intervalo, detecta-se um aumento de melanina pela coloração específica nos tecidos. Segundo Allam e Raftos (2015) esse mecanismo de PO em moluscos poderia ser importante no encápsulamento de partículas não-próprias. Entretanto, em *A. fulica*, infectada com *A. vasorum*, esse encápsulamento não é tão evidente, mas os produtos citotóxicos, como NO começam a aumentar nos fatores solúveis da hemolinfa de *A. fulica* ao 1º dpi, podendo auxiliar no controle da infecção.

Ao 8º dpi sugere-se que antígenos produzidos na muda de L1 para L2 possam modular a atividade de PO dependente de L-DOPA e L-Tirosina, uma vez que os níveis detectados, na hemolinfa diminuíram, o que não foi observado com a utilização de PPD. Nesse intervalo, pode haver uma ligação direta de PO depende de PPD com os níveis circulantes de melanina, visto que no tecido, aumenta a produção de melanina, assim como o infiltrado celular presente no entorno da L2. Essa cápsula melanótica poderia funcionar como uma contenção mecânica do parasito. Além disso, a melanina circula no infiltrado tecidual pelos espaços da hemolinfa e libera durante a ativação da via de PO elementos citotóxicos como, quinonas e ROS que poderiam auxiliar no controle do parasito, em nosso estudo o maior nível de NO quantificado foi ao 8º dpi, podendo auxiliar na eliminação da larva.

Ao 13º dpi, pode sugerir que os antígenos produzidos na muda de L2 para L3 possam modular a atividade de PO para os três substratos, diminuindo a atividade, principalmente no PPD. Também, nesse intervalo, os níveis circulantes de melanina começam a diminuir no tecido e no infiltrado celular próximo ao parasito, bem como a quantidade de NO.

Ao 30º dpi a modulação da via PO, no sistema interno de defesa dependente de L-Tirosina, continua no mesmo nível dos outros dias de infecção, enquanto para L-DOPA e PPD os níveis aumentam.

Essas alterações no processo de reconhecimento tecidual do nematóide podem ser devido à eliminação de proteases, uma que vez que a L1 utiliza proteases para penetrar e a L3 para sair dos tecidos do molusco (Lai et al. 2005, Rebello et al. 2012).

Outros fatores que poderiam alterar a ativação da via da PO é a cutícula do nematóide (Brivio et al. 2002) associado à motilidade, que ocorre em L1 e L3 dentro do tecido, diferente do que ocorre com a L2, que apresenta pouca motilidade. No inseto *Diatraea flavipennella*, infectado com o parasitóide *Cotesia flavipes*, foi observado a modulação nos níveis de NO e de PO ao longo infecção pelo parasito (Dos Passos et al. 2013).

Esse trabalho sugere que *A. fulica* apresenta mecanismo inato da via da PO e, após a infecção com *A. vasorum*, ocorrem oscilações que poderiam contribuir no controle da infecção, uma vez que Coaglio et al. (2016) recuperaram em torno de 20% de L3 em *A. fulica* infetada com *A. vasorum*, diferente de Mozzer et al. (2011) e Barçante et al (2003) que recuperaram mais de 80% de L3, em *Omalonyx matheroni* e *B. glabrata* respectivamente. Le Clec'h et al. (2016) observaram que *B. glabrata*, infectada com *S. mansoni*, apresenta atividade de PO dependente de lacase, no entanto, os autores não associam a ativação da via de PO com a susceptibilidade ao parasito.

Em *A. fulica* foi observada ativação de PO dependente de L-DOPA, L-Tirosina e PPD, ao contrário do analisado na hemolinfa livre de hemócitos de outros moluscos como *Saccostrea glomerata*, *Crassostrea virginica*, *Ruditapes philippinarum*, *Chlamys farreri*, que apresentaram PO dependente de L-DOPA, enquanto que para *B. alexandrina*, *Halitotis tuberculata*, *Crassostrea gigas*, *Veneropsis philippinarum* PO foi dependente do substrato lacase. Em nosso estudo, não foi detectada a resposta de PO, nas populações de hemócitos de *A. fulica* durante a infecção pelo *A. vasorum*, como observado em *B. glabrata* por Le Clec'h et al. (2016) e por Seppälä&Leicht (2013) em hemócitos de *Lymnaea stagnalis* infectada com *Plagiorchis* sp.. Em alguns artrópodes (insetos e crustáceos) a localização da PO se dá, principalmente, nos hemócitos. Em insetos, como *D. melanogaster*, a presença fenoxidase ocorre nas células cristais e nos lamelócitos (Yang et al. 2013; Nappi2010). Em *A. fulica*, foi observada, pela primeira vez, PO dependente L-Tirosina, nos fatores solúveis da hemolinfa, o que é mais comum em artrópodes, fato que poderia explicar a pouca susceptibilidade de *A. fulica* ao *Angiostrongylus* sp. (Carvalho et al. 2003; Neuhaus et al. 2007; Coaglio et al. 2016).

Esses dados sugerem que mais estudos sobre o sistema imune inato de *A. fulica*, infectada com *Angiostrongylus* sp., são necessários, pois este hospedeiro intermediário é importante em algumas áreas endêmicas de angiostrongilose, como na Ásia e América do Sul (Hu et al. 2011, Vitta et al. 2011, Caldeira et al. 2007, Maldonado et al., 2010, Oliveira et al.2015, Moreira et al. 2013).

Capítulo II

Caracterização das larvas de *Angiostrongylus vasorum*, no desenvolvimento intramolusco, em *Achatina fulica*

1.0 Introdução

A estrutura básica de nematóides adulto corresponde à membrana externa coberta com cutícula elástica. Completam o parasito a hipoderme delgada e a musculatura somática, composta por uma única camada de células musculares lisas, que são inervadas por extensões de troncos nervosos, originados de células ganglionares, localizadas em torno da porção média do esôfago. O tubo interno corresponde ao tubo digestivo que, nos nematóides, corresponde à cavidade oral, seguida do esôfago e de um longo intestino, uma estrutura tubular revestida por uma única camada de epitélio colunar, com microvilos proeminentes, que termina no ânus. Entre o tubo digestivo e a camada externa, há um pseudoceloma, uma cavidade geral, que não é revestida por uma camada mesotelial (Brusca & Brusca, 2007, Weischer & Brown, 2000, Travassos, 1950).

Os estádios intramoluscos das larvas de nematódeos não são muito estudados, quanto aos parasitos adultos, embora relatos de moluscos infectados com parasitos da família Metastrongylidae, que podem acometer animais e humanos, são descritos no Brasil (Caldeira et al. 2007, Lima et al. 2009, Espírito-Santo et al. 2013, Rocha et al. 2017, Valente et al. 2017, Coia et al 2017, Kistler et al 2014).

Para a identificação das estruturas nas larvas e, principalmente das L3, a técnica mais usual é a utilização da câmara clara, com desenhos mostrando suas principais estruturas. Porém, esse processo não possibilita observar como é realmente a morfologia interna das larvas. Essa técnica foi utilizada para representar estádios evolutivos de *A. costaricensis* (Morera 1973, Thiengo et al. 1997) e *A. cantonensis* (Panha 1988, Yousif & Ibrahim 1978). No trabalho de Ash (1970), representou apenas as características da fase infectante, L3, de *A. cantonensis*, *A. vasorum*, *A. abstrusus* e *Anafilaroides rostratus*.

Outro meio utilizado, para caracterizar as larvas, são fotos obtidas em microscópio óptico, onde são registradas algumas características das larvas, como a

porção final da cauda na L1, a presença da segunda bainha na L2, os bastões quitinosos e a porção final da cauda na L3, como pode ser observado para *A. cantonensis* (Hata & Kojima 1990, Shan Lv et al. 2009, Thiengo et al. 2010, Moreira et al. 2012), *A. abstrusus* (Jefferies et al. 2010, Andrade-Porto et al. 2012, Giannelli et al. 2014) e *A. vasorum* (Bessa et al. 2000, Cesare et al. 2015, Coaglio et al. 2016). A identificação por microscopia eletrônica ajudou na visualização da superfície externa das larvas, sendo observadas estriações nas cutículas, a membrana alada e abertura oral, como mostrado em *A. costaricensis* (Ishih et al. 1990, Rebello et al. 2013) e *A. cantonensis* (Lian-yin et al. 1984, Zeng et al. 2013). Alguns autores utilizaram técnicas mais avançadas com a microscopia confocal em nematódeos, como *Caenorhabditis elegans*, observando o desenvolvimento celular (Merlet et al. 2010) e do neurônio sensorial (Albeg et al. 2011, Liang et al. 2015). Williamson et al. (2009) verificou a musculatura de *Ascaris suum* e Fellowes et al. (1999) a porção neuromuscular. Nos parasitos da família Metastrongylidae, há poucos trabalhos que utilizaram anticorpos para visualizar as estruturas em microscopia confocal, Mendonça et al. (2008) observaram a reserva energética por análise de grânulos lipídicos em L2 de *A. costaricensis*.

O uso da microscopia de epifluorescência, reação imunofluorescente, é desencadeada no microscópio de epifluorescência e ocorre, através da emissão de luz de cor, quando o elétron é excitado por luz de curto comprimento de onda. A imagem por epifluorescência permite avaliar a morfologia geral das células marcadas com sondas moleculares fluorescentes. O uso do ApoTome em microscopia de epifluorescência ajuda a resolver os problemas associados à luz dispersa de outros planos focais. Com a iluminação estruturada, apenas o plano focal aparece na imagem. O princípio de imagem utilizada com o ApoTome é referido na literatura como "projeção de grelha" ou "iluminação estruturada". O ApoTome reconhece a ampliação, movendo a grade apropriada; o sistema calcula a seção óptica, a partir de no mínimo três imagens brutas da amostra, que são adquiridas com a estrutura da grelha, sobreposta em diferentes posições. Essas imagens são subsequentemente processadas em tempo real, utilizando o software do microscópio, que determina o contraste da grade, como uma função de localização, e remove as informações das imagens fora de foco, antes de reuni-las em uma seção óptica final. E, assim, torna-se uma maneira totalmente confiável, para evitar a luz dispersa fora de foco, mesmo em espécimes mais grossos. O ApoTome permite o

uso muito simples e barato de sistemas de imagens de fluorescência convencionais para este tipo de aplicação (Bauch & Schaffer, 2006, Gines & Davidson, 2017).

Para a visualização do citoesqueleto celular, utiliza-se anticorpo anti-tubulina, que reconhece a subunidade α -tubulina, que compõe os microtúbulos, em quase todas as células eucariotas. A tubulina é um componente importante do citoesqueleto que possui cinco formas distintas, designadas por tubulina α , β , γ , δ e ϵ . As tubulinas α e β formam heterodímeros, que se multimerizam para formar um filamento de microtúbulos. Múltiplas isoformas de β -tubulina ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 8$) foram caracterizadas. O $\beta 1$ e $\beta 4$ estão presentes em todo o citosol, $\beta 2$ está presente nos núcleos e nucleoplasma, e $\beta 3$ é uma proteína citoesquelética específica para neurônios.

Todas as células eucarióticas expressam actina, seus filamentos podem formar estruturas estáveis e lábeis e são componentes cruciais no aparelho contrátil das células musculares. Pelo menos seis tipos de actina estão presentes nos tecidos de mamíferos e se dividem em três classes como: α -actina que é limitada a vários tipos de músculo; β e γ -actina, que são os principais constituintes dos filamentos em outros tecidos.

Ainda no citoesqueleto encontra-se colágeno, uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, sendo responsável por propriedades físicas do tecido conjuntivo. Existem 12 tipos de colágenos, o colágeno tipo III está presente em músculo liso, nas trabéculas dos órgãos hematopoiéticos (baço, nódulos linfáticos, medula óssea vermelha), artérias, fígado e camadas musculares do intestino; o tipo IV aparece na membrana basal dos epitélios e o tipo V, que está presente na maioria dos tecidos internos, tendo a função de dar ao corpo a capacidade de resistência. Outro marcador que, também, possibilita a visualização de colágeno é o Picrosirius, quando se utiliza a luz polarizada empregada em histologia, para a visualização dos colágenos tipo I e III (Junqueira et al. 1979).

As células eucariotas também reservam energia na forma de lipídeos, e o corante Oil Red O é utilizado para a visualização dos lipídeos neutros, que possuem a função de armazenamento, incluindo ácidos graxos, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis.

A taxonomia das larvas de *A. vasorum* intramolusco é escassa na literatura, assim, conhecendo a morfologia das larvas torna-se importante para que se possa diferenciar entre as espécies de metastrongilídeos.

2.0 Material e métodos

2.1 Uso do microscópio epifluorescência para avaliação dos estádios evolutivos

Para observar a morfologia dos estádios das larvas de *A. vasorum*, durante o desenvolvimento intramolusco, foram realizados os seguintes passos.

2.2 Recuperação dos estádios larvais

Para analisar a L1, L2 e L3, os moluscos utilizados acima foram sacrificados, os tecidos enrolados em gazes e realizado o Baermann por 12h. Após esse período, os tecidos das gazes foram digeridos, conforme Coaglio et al. (2016), com ácido clorídrico e pepsina a 1% por 40 minutos. As larvas obtidas foram preparadas, segundo o protocolo de Duerr (2006), com modificações, conforme apresentado no item 2.3 e 2.4. As estruturas foram analisadas em microscopia epifluorescência (Zeiss LSM 510) e pelo ApoTome no CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG).

2.3 Fixação das larvas

Foram utilizadas 100 larvas por estágio (L1, L2 e L3), por procedimento, e analisadas 10 larvas. As larvas recuperadas foram resuspensas em 300µl de PBS e alocadas em tubo de eppendorf de 2 mL. Em seguida, acrescentou-se o triplo do volume do fixador paraformaldeído 4%, e foram deixadas por, no mínimo, 24h à 4 °C. Após este tempo, as larvas foram lavadas duas vezes em água, por centrifugação, para retirar o excesso do fixador. Após a lavagem, iniciou-se o processo de permeabilização das larvas.

2.4 Permeabilização e marcação das larvas

Os tubos de eppendorf de 2 mL, com os estádios larvais, foram colocados em um recipiente com álcool a 95% por 4 minutos a -80 °C, para permitir que pequenos poros fossem formados na cutícula. Após esse procedimento, os tubos de eppendorf foram descongelados em água por 10 minutos, à temperatura ambiente sob agitação

(Bioixer TS-2000A) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o eppendorf com as larvas foi centrifugado a 450g, durante 1 minuto. Após esse procedimento, foi adicionado saponina 0,5% por 10 minutos, à temperatura ambiente, no agitador e, em seguida, as larvas foram lavadas duas vezes, por centrifugação, a 450g, durante 1 minuto.

Logo após, foi acrescentado 200µL de solução BTB (Borate Triton β -mercaptoethanol solution), deixado em agitador por 1h, à temperatura ambiente. Após esse período, centrifugou a 450g por 1 minuto, descartando o sobrenadante e acrescentando novamente à solução BTB. Esse processo foi repetido três vezes.

Após a 3ª hora, com o BTB, realizou-se a lavagem, sob baixa centrifugação, 220g por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se a solução de BT (Borate Triton solution). Esse processo foi repetido três vezes.

Após a retirada do sobrenadante do BT, acrescentou-se 50µL do anticorpo primário para o citoesqueleto: anti- β -tubulina (mouse-sc55529), anti- α -tubulina (sc5286), anti-colga 1/1- colagen (SC 9855) e anti- β - actina (cs 69879), diluído 1:500, de forma independente. Cada tubo foi deixado no agitador a 4°C, em baixa velocidade, *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 220g, o sobrenadante descartado e acrescentado 250µL da solução de bloqueio (Albumina 4%) por 1h30, no agitador a 4°C. Em seguida, centrifugaram-se os tubos por 2 minutos a 220g, o sobrenadante foi descartado, e a lavagem foi repetida quatro vezes. Em seguida, foi acrescentado 50µL do anticorpo secundário, diluído 1:500, conjugados às sondas fluorescentes Alexa Fluor 633 (gt- antimouse Invitrogen, USA) e deixado por 2h no agitador, na ausência de luz, à temperatura ambiente. Ao término desse processo, os tubos foram centrifugados e lavados quatro vezes.

Ao término do procedimento, 20 µL da preparação das larvas, foram colocadas entre lâmina e lamínula, e analisadas ao microscópio epifluorescência (Zeiss LSM 510), com excitação a 633 nm e emissão a 650 nm, para detecção do Alexa flúor-633. As imagens adquiridas no microscópio epifluorescência foram processadas pelo software FijiimageJ.

2.4.1 Coloração com picrosirius

Após a fixação das larvas com paraformaldeído 4%, essas foram centrifugadas para retirar o excesso do fixador, em seguida, foi acrescentado o corante picrosirius na proporção de 3:1 e deixado no mínimo por 24h a 4°C. Após esse período as larvas foram lavadas 2x para retirar o excesso do corante e em seguida as larvas foram montadas em lâmina e lamínula e levadas ao microscópio de epifluorescência, utilizando o ApoTome para visualização das estruturas.

2.4.2 Coloração com Oil red O

Após a fixação das larvas com paraformaldeído 4%, essas foram centrifugadas para a retirada do excesso do fixador, em seguida, foi acrescentado na proporção de 3:1 do corante oil red e deixado por 24h à temperatura ambiente. Após esse período as larvas foram montadas em lâmina e lamínula e levadas ao microscópio óptico para visualização.

3.0 Resultados

3.1 Recuperação dos estádios larvais

As L1, L2 e L3 recuperadas através do Baermann (Figura 1), nos moluscos infectados com 1000 L1 de *A. vasorum* foram utilizadas na microscopia epifluorescência. A recuperação de L1 foi em média de 3 ± 2 , L2 de $2 \pm 0,5$ e na L3 média de 4 ± 2 , com diferença estatística entre 30° dpi e 8°dpi ($p < 0,01$).

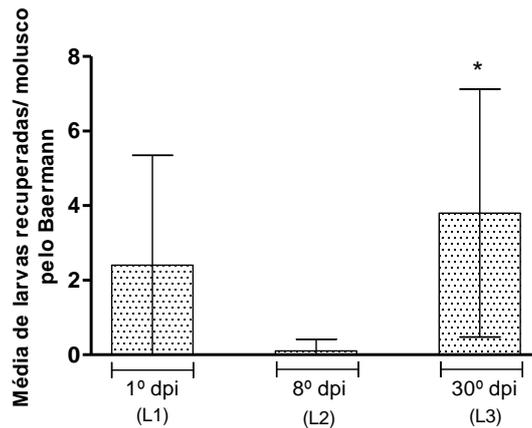


Figura 1: Recuperação média por molusco dos estádios larvais de *Angiostrongylus vasorum* em *Achatina fulica* através da técnica de Baermann. Com diferença estatística entre 30º dpi e 8º dpi (* $p < 0,01$).

Após a realização do Baermann, por 12h, os tecidos restantes foram digeridos, para recuperar as larvas restantes nos tecidos. A média e o desvio padrão da recuperação dos estádios foram de L1:147±60, L2:15±7 e em L3:147±70. Apresentando diferença estatística entre 1º dpi e 8º dpi ($p < 0,001$) 30º dpi e 8º dpi ($p < 0,001$) (Figura 2). Essas larvas também foram utilizadas na microscopia epifluorescência.

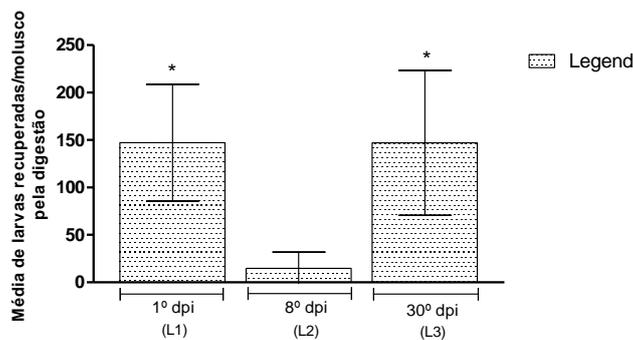


Figura 2: Recuperação média por molusco dos estádios larvais de *Angiostrongylus vasorum* em *Achatina fulica* pela digestão com HCl + pepsina 1%. Houve diferença estatística entre 30º dpi e 8º dpi (* $p < 0,001$).

3.2 Caracterização morfológica das larvas de *Angiostrongylus vasorum* intramolusco

Após a marcação com anticorpos, observou-se a semelhança das estruturas analisadas à microscopia de epifluorescência, tanto quanto as larvas provenientes do Baermann, quanto da digestão. Para tanto, toda a caracterização morfológica foi realizada, em paralelo, com larvas obtidas pelas duas técnicas. Vale ressaltar, ainda, que com o marcador picosirus foi possível analisar as cavidades das larvas permitindo o reconhecimento em toda extensão do tubo digestivo, quando se utilizou o recurso do ApoTome.

3.2.1 Larvas de primeiro estágio

Ao comparar as principais estruturas estudadas em L1, L2 e L3, de *A. vasorum*, observou-se que o bastão quitinoso de L3 é o dobro do tamanho mensurado para L1 e L2. À medida que a larva se desenvolve, o esôfago se alonga e também o primórdio genital, conforme demonstrado na tabela 1, onde se apresentam as medidas (μm) das principais estruturas dos estádios larvais.

Tabela 1: Medidas durante o desenvolvimento das larvas de *Angiostrongylus vasorum*.

	Bastão quitinoso	Comprimento anel nervoso	Distância do anel nervoso a região anterior	Comprimento do esôfago	Comprimento do Primórdio genital	Distância do Primórdio genital à cauda
L1	7 \pm 0,2	6 \pm 0,4	70 \pm 1	109 \pm 0,8	6 \pm 0,3	99 \pm 2
L2	6 \pm 0,3	15 \pm 0,8	80 \pm 3	147 \pm 1	15 \pm 0,4	170 \pm 4
L3	13 \pm 0,5	18 \pm 0,9	64 \pm 4	192 \pm 2	21 \pm 0,7	156 \pm 5

Ao campo claro, as L1 são finas e transparentes (Figura 3A). No entanto, na epifluorescência observa-se com o anticorpo anti- α -tubulina, o anel nervoso, a região do intestino e a abertura anal (Figura 3B). Quanto às medidas, a L1 têm cerca de 332 \pm 12 μm de comprimento e 11 \pm 1 μm de largura, e a extremidade anterior é arredondada, com cauda recurvada ventralmente e apêndice unguiforme, tanto ao campo claro, quanto à epifluorescência, é possível reconhecê-las (Figura 3A,B).

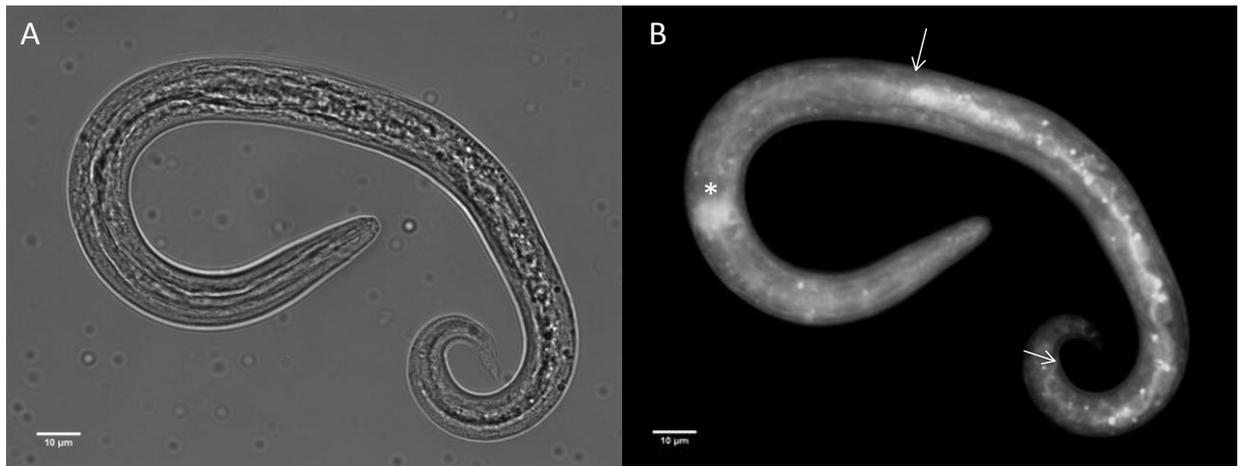


Figura 3: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. A- não marcada. B- marcada com anti- α -tubulina. O anel nervoso (*), as setas indicam o início e final do intestino, na abertura anal.

Ainda, com esse anticorpo, pode-se observar, ao lado do bastão quitinoso, uma estrutura em semicírculo, que não se observa em microscopia óptica. Estas estruturas distanciam-se de $5\pm 0,9$ μm da abertura oral, e medem $2\pm 0,5$ μm de comprimento por $0,5\pm 0,2$ μm de largura (Figura 4,5 e 6).

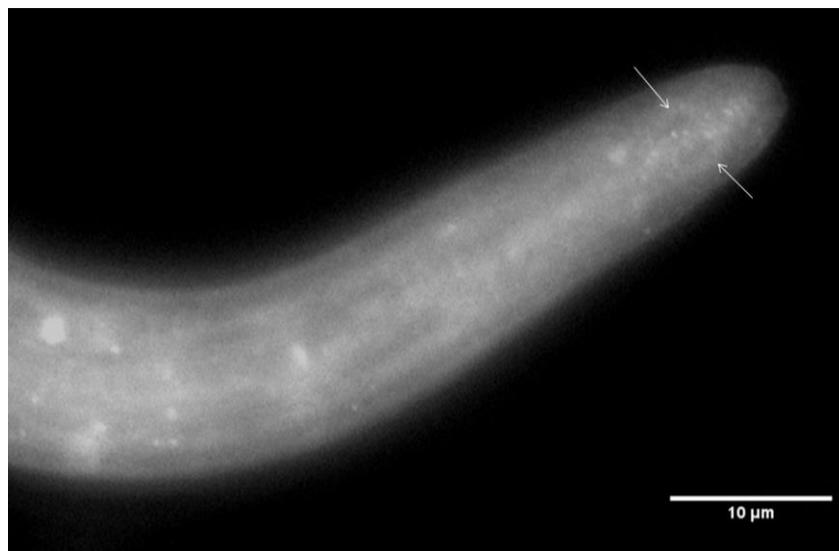


Figura 4: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina. Observam-se duas estruturas semicirculares, indicadas pelas setas.

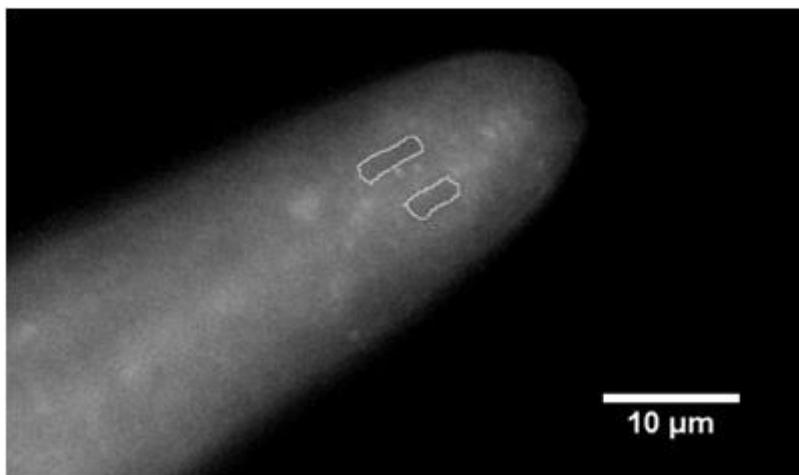


Figura 5: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina, estrutura semicircular na porção anterior da larva.

A figura 6 mostra a abertura oral da larva, medindo cerca de $4\pm 0,9\ \mu\text{m}$, com distância de $1\pm 0,3\ \mu\text{m}$ da abertura oral, ao início do par de bastão quitinoso.

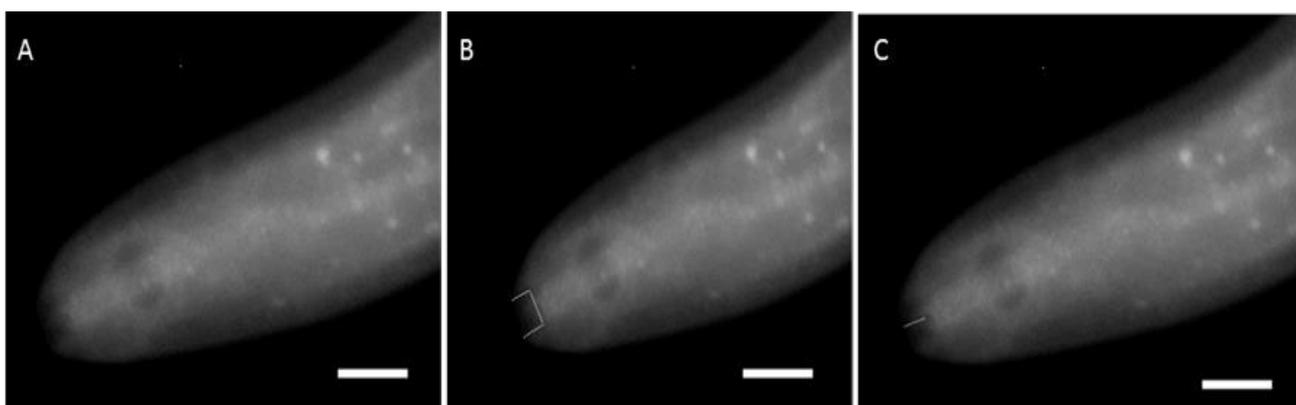


Figura 6: Porção anterior da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina. A- Abertura oral da larva e estrutura semicircular. B-Destaque da abertura oral. C- Distância da abertura oral ao bastão quitinoso. Barra: $10\ \mu\text{m}$.

A figura 7A demonstra o anel nervoso, que se localiza a $70\pm 2\ \mu\text{m}$ da abertura oral da L1. Já a figura 7B demonstra o comprimento do anel nervoso de $6\pm 1\ \mu\text{m}$ por $7\pm 1\ \mu\text{m}$ de largura.

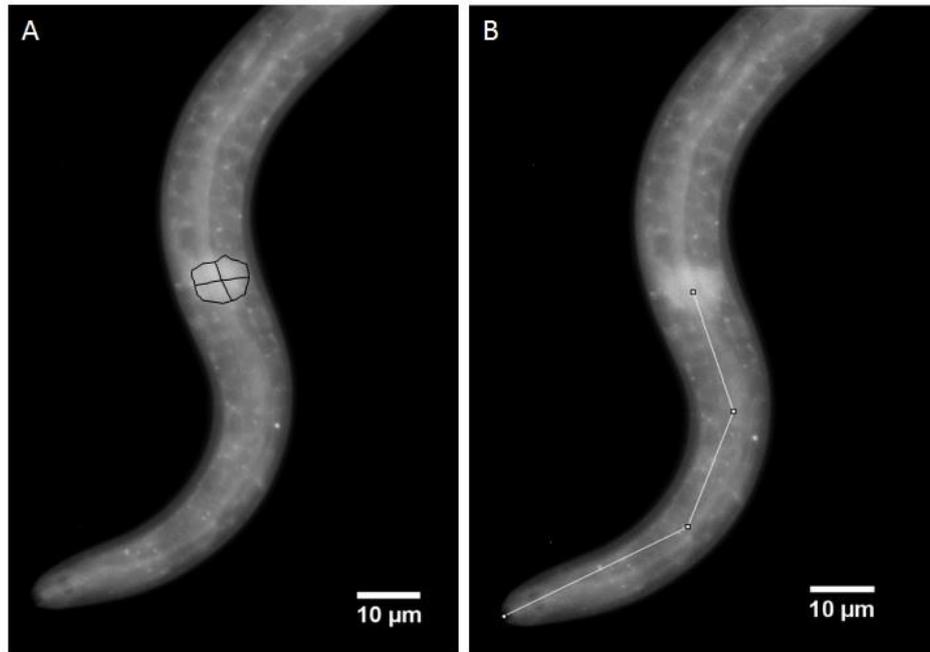


Figura 7: Porção anterior da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina. A- Destaque no anel nervoso. B- Distância do anel nervoso à região anterior da L1.

O esôfago da L1 mede 109 ± 2 µm de comprimento (Figura 8).

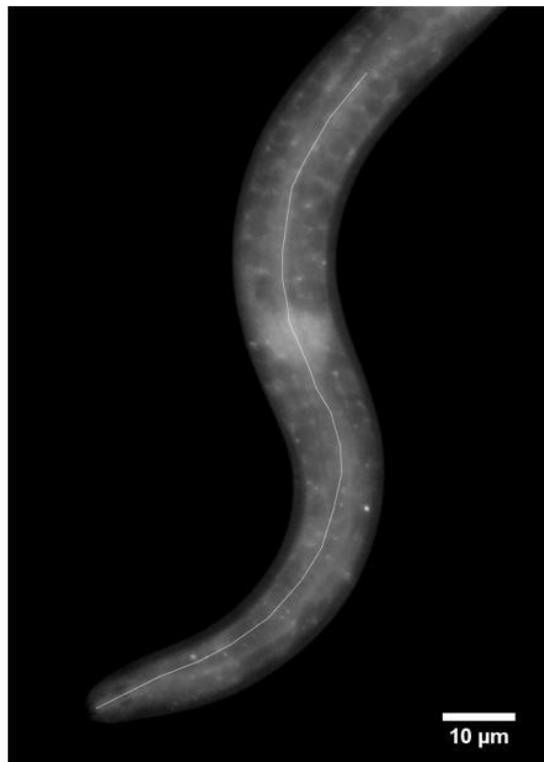


Figura 8: Comprimento do esôfago da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina

Na figura 9A, observa-se o intestino que possui 135 ± 3 μm de comprimento, a abertura anal se localiza a 25 ± 2 μm da porção final da cauda (Figura 9B).

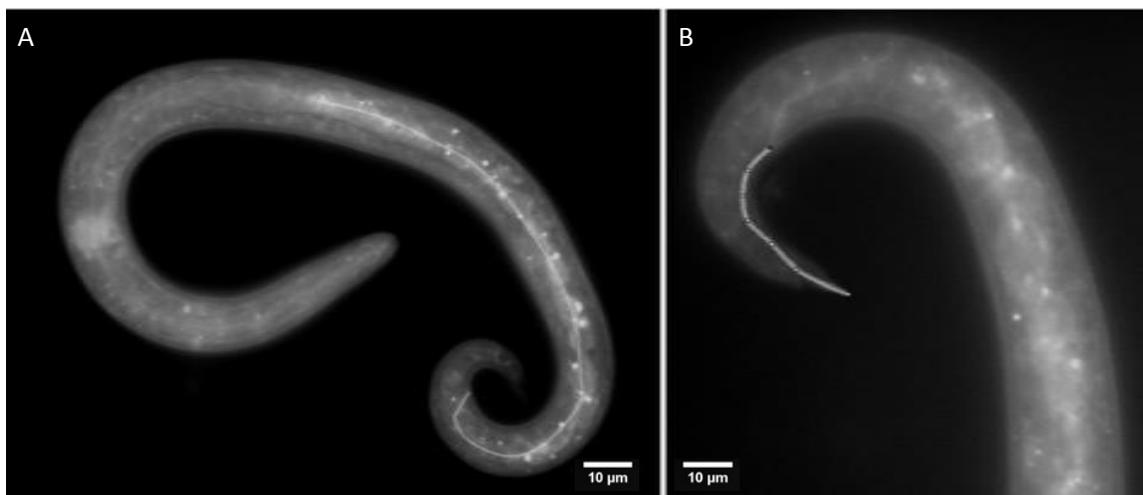


Figura 9: Medidas das regiões posterior da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcadas com anti- α -tubulina. A- Comprimento do intestino. B- Distância da abertura anal à ponta da cauda.

A figura 10 demonstra a distância entre a ponta da cauda e o espinho dorsal que é de $4\pm 0,9$ μm de comprimento.

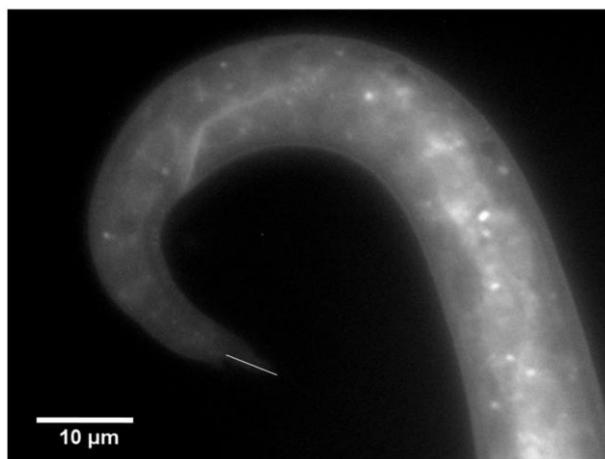


Figura 10: Detalhe da região posterior da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcadas com anti- α -tubulina. Distância entre a ponta da cauda ao espinho dorsal.

Ao utilizar o anticorpo anti- β -tubulina, também se destacou o bastão quitinoso, o intestino, sendo que o anel nervoso ficou pouco nítido (Figura 11). Observa-se, também,

que, nas L1, existem células dispersas por toda a larva, que apresentam marcação celular mais externa (figura 7, 8,11,12 e 14).



Figura 11: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti-β-tubulina.

Os bastões quitinosos, semelhantes a estiletos, possuem tamanho entre 6 e 7 ± 1 μm, sendo que, na L1, os bastões são justapostos e retilíneos, ao longo de toda a extensão (Figura 12).

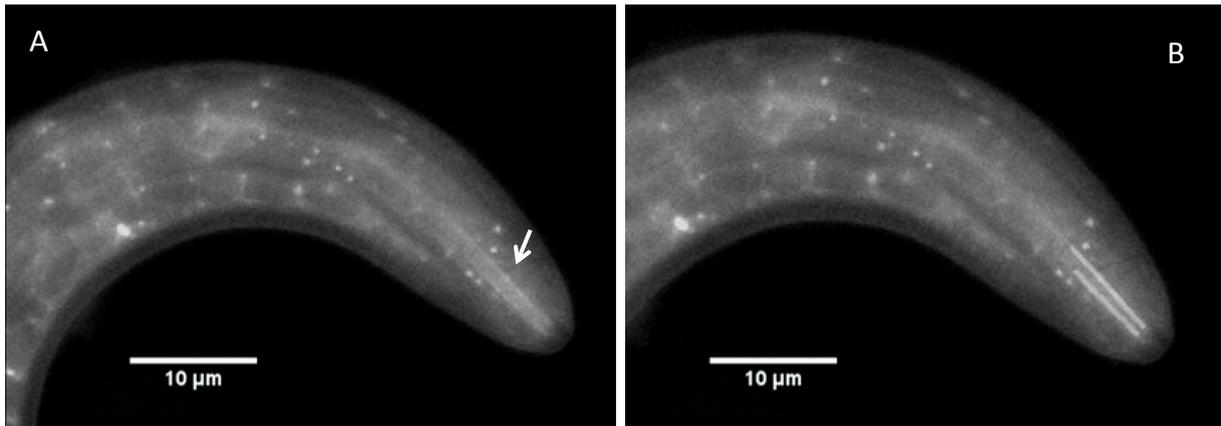


Figura 12: Porção anterior da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- β -tubulina. A- Bastão quitinoso (seta). B- Bastão quitinoso destacado.

O anticorpo anti- β -actina reconheceu, com maior destaque, o anel nervoso e a porção do intestino (Figura 13).



Figura 13: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* com anti- β -actina, destacando o intestino e anel nervoso.

O anticorpo anti-colágeno foi usado para observar possível presença de fibras de colágeno nas estruturas da larva. Verificou-se, as células intestinais e um fraco reconhecimento do bastão quitinoso e anel nervoso. No entanto, também se detectou, por imagem negativa, a cutícula, e a dilatação final do esôfago (Figura 14).



Figura 14: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com anti-colageno destacando a cutícula (seta pontilhada dupla), anel nervoso (**), a luz do esôfago (seta cheia) e a dilatação final do esôfago (seta pontilhada).

A bainha da L1 está afastada $1\pm 0,2$ µm do tecido muscular e a dilatação do esôfago, em sua porção final, é de $9\pm 0,7$ µm de largura (Figura 15).

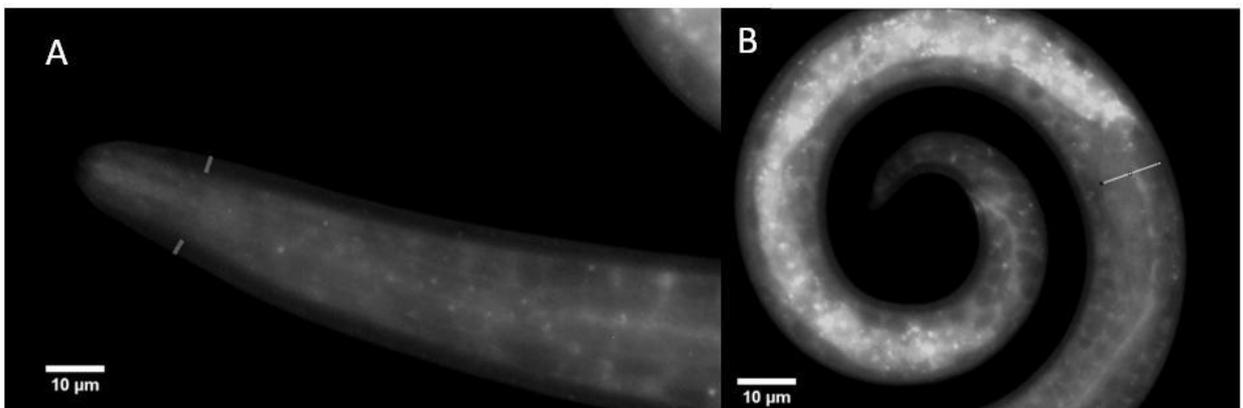


Figura 15: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Marcada com anti-colageno A- distância da bainha da larva de primeiro estágio ao tecido muscular. B- dilatação do esôfago em sua porção final

Com o corante picosirius, as estruturas internas ficaram nítidas (Figura 16). Foi possível visualizar o bastão quitinoso, o anel nervoso, o esôfago e a musculatura somática da larva, o intestino, a abertura anal e o primórdio genital. Observou-se,

também, que o esôfago da L1 é do tipo claviforme, como observado nas figuras 17 e 20, cilíndrico e com dilatação, na região terminal posterior, segundo Travassos (1989).



Figura 16: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picosirius. O anel nervoso (*) e o primórdio genital (seta).

A estrutura do primórdio genital tem o formato elíptico, possui $6\pm 0,9$ μm de comprimento e localiza-se a 69 ± 2 μm da abertura anal e a 99 ± 3 μm da ponta da cauda (Figura 17).

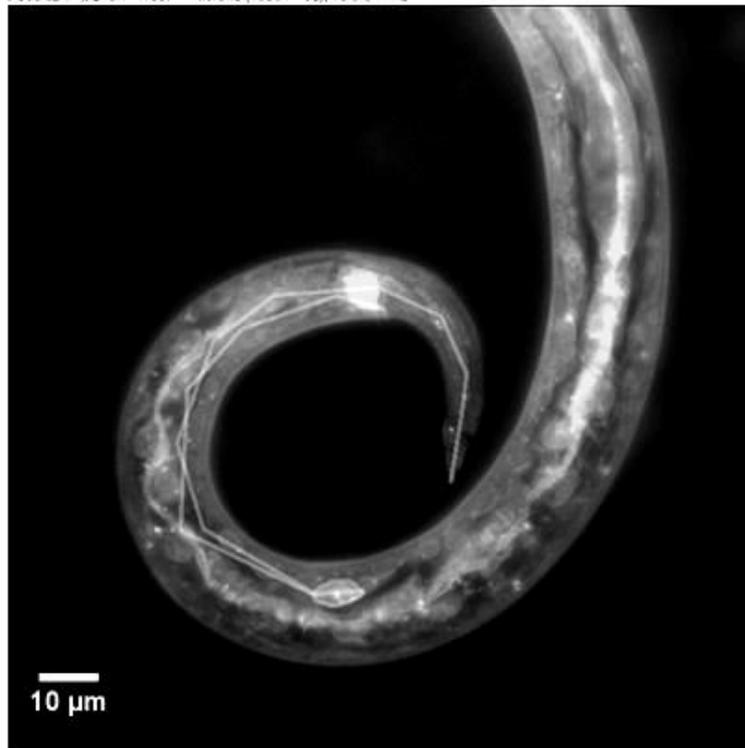


Figura 17: Primórdio genital presente na larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picrossírius e a distância em relação à ponta da cauda.

Na musculatura da larva existem pequenas estruturas elípticas, com cerca de $3\pm 0,3$ μm de comprimento (Figura 18).

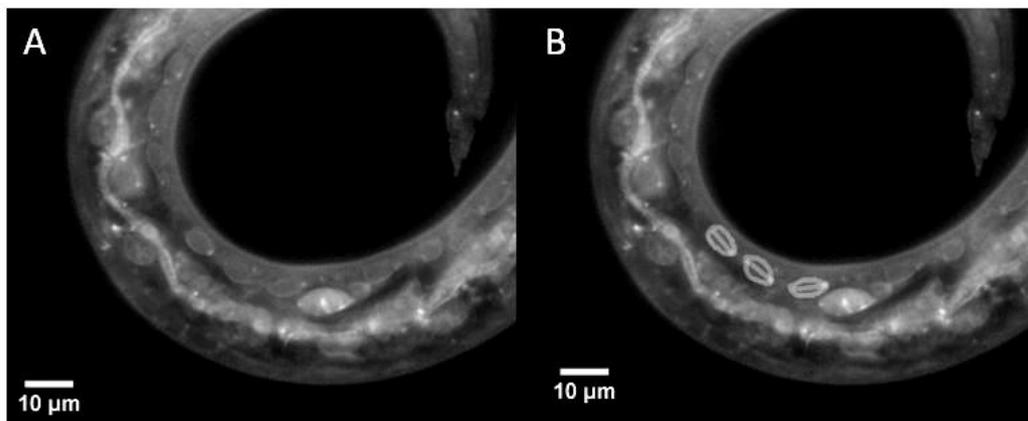


Figura 18: Estruturas da muscular da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picrossírius. A- Imagem da musculatura da larva e B- destaque dessa musculatura.

A musculatura da L1 possui cerca de $2\pm 0,8$ μm de espessura (Figura 19).

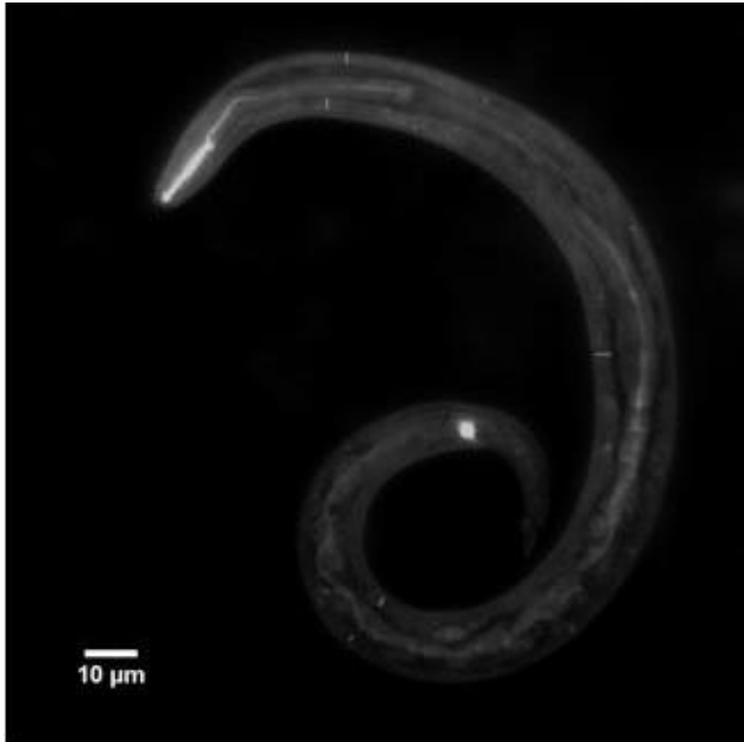


Figura 19: Musculatura da larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picosirius. Os traços no desenho destacam os locais mensurados.

A L1 apresenta uma grande quantidade de lipídeos, os pontos pretos, ao longo de toda extensão corporal (Figura 20).

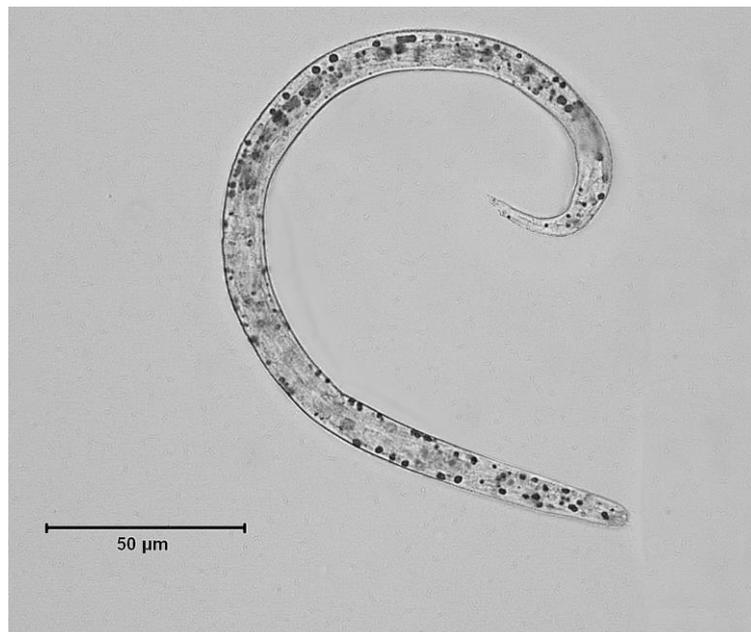


Figura 20: Larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com oil red.

3.2.2 Larvas de segundo estágio

Ao campo claro, observa-se que as L2 medem aproximadamente $420 \pm 23 \mu\text{m}$ de comprimento, $12 \pm 2 \mu\text{m}$ de largura e apresentam duas bainhas (Figura 21).

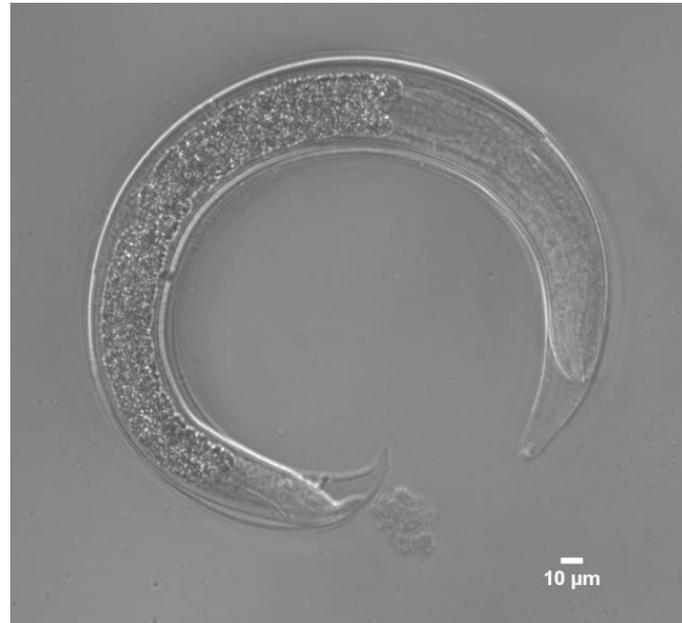


Figura 21: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*

Nas L2, coradas com anti- α -tubulina, destacaram-se o esôfago que apresenta $147 \pm 3 \mu\text{m}$ de comprimento, e a porção final com dilatação de $12 \pm 1 \mu\text{m}$ de largura por $27 \pm 2 \mu\text{m}$ de comprimento (Figura 22).

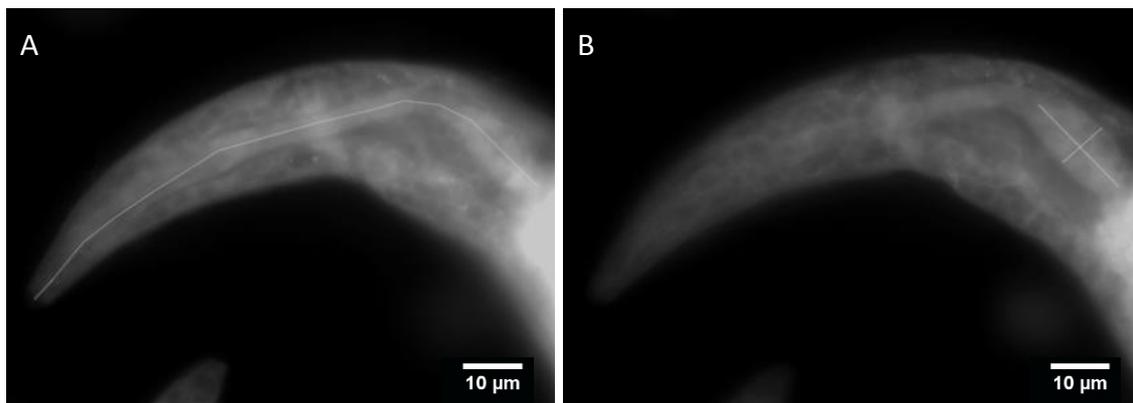


Figura 22: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- α -tubulina. A- Comprimento do esôfago. B- Dilatação, na porção final do esôfago.

Nas L2, o bastão quitinoso é pouco evidenciado (Figura 23), mas o tamanho é semelhante ao da L1. No entanto, na L2, estão mais justapostas, em comparação com a L1. Os bastões, na L2, estão mais projetados ao nível da abertura oral, quando comparado à L1.

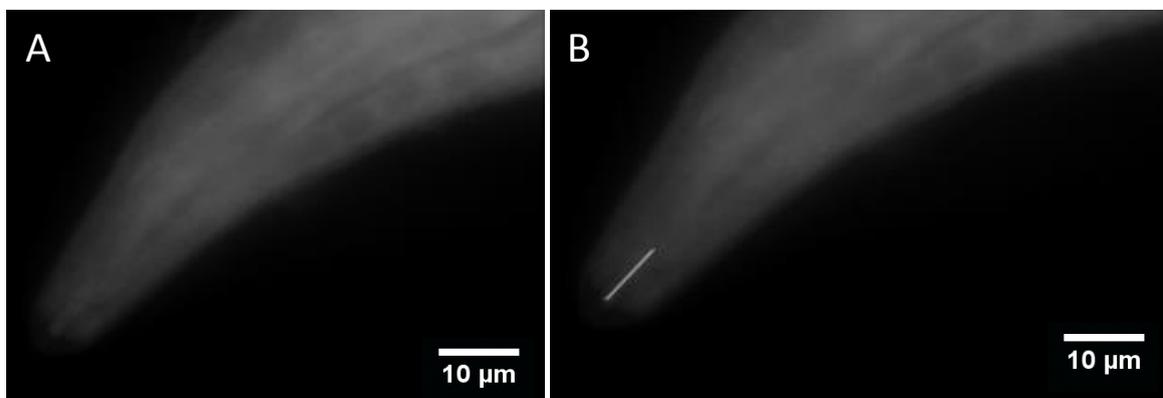


Figura 23: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- α -tubulina. A-Bastão quitinoso B- bastão projetado.

Observa-se que, na L2, em comparação com a L1, algumas estruturas como o anel nervoso, estão mais desenvolvidas, medindo 15 ± 2 μm de largura, distanciando-se a 80 ± 2 μm da abertura oral (Figura 24).

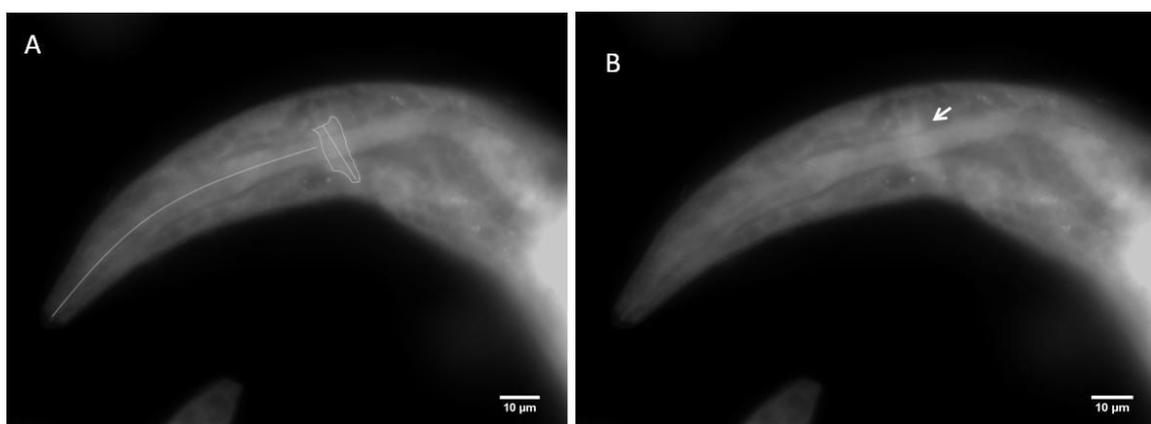


Figura 24: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- α -tubulina. A- Distância do anel nervoso à porção anterior da larva. B- Localização do anel nervoso (seta branca).

O intestino da L2 apresenta como uma massa compacta de 27 ± 2 μm de largura, ocupando a parte posterior do corpo, diferente da L1, onde o intestino se apresentava como um filamento (Figura 25).

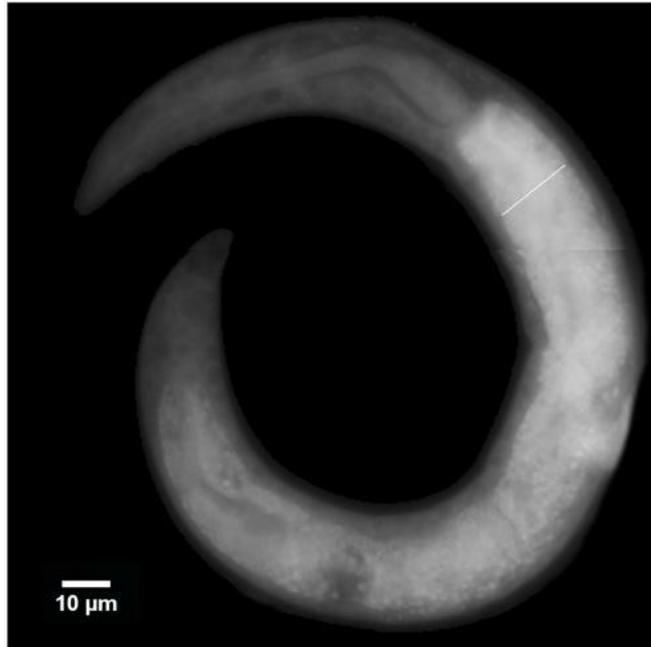


Figura 25: Intestino da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina, apresentando massa compacta.

Com o anticorpo anti- β -tubulina, evidencia-se o intestino, mas reconhece o esôfago (Figura 26).

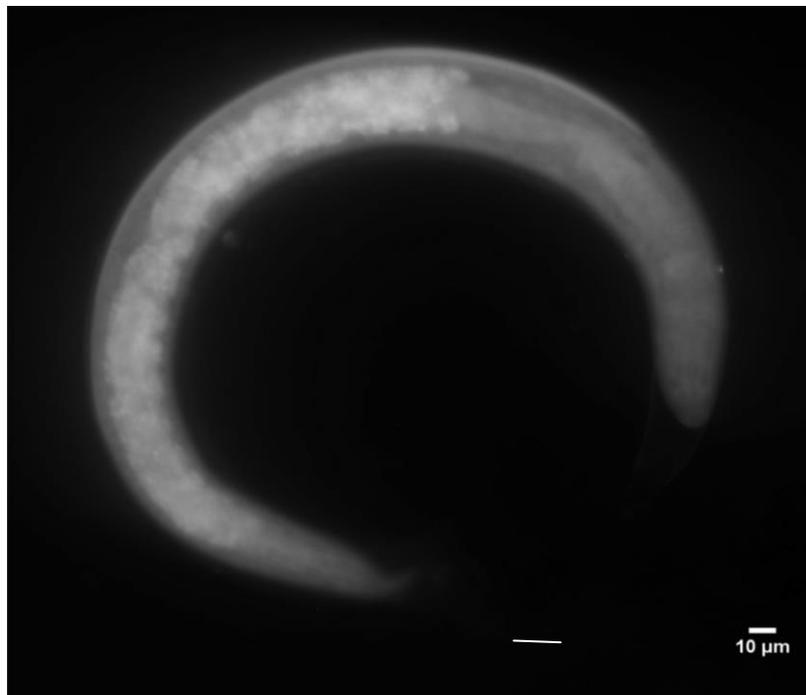


Figura 26: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- β -tubulina.

Ao final do intestino da larva, termina com o reto que, em algumas extensões, apresenta até de $2\pm 0,7$ μm de largura terminando na abertura anal (Figura 27).



Figura 27: Região do reto da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- β -tubulina. A e B- Reto em destaque. C- Largura do reto.

Todo o intestino é composto por pequenas células arredondadas (Figura 25,26,27,28).

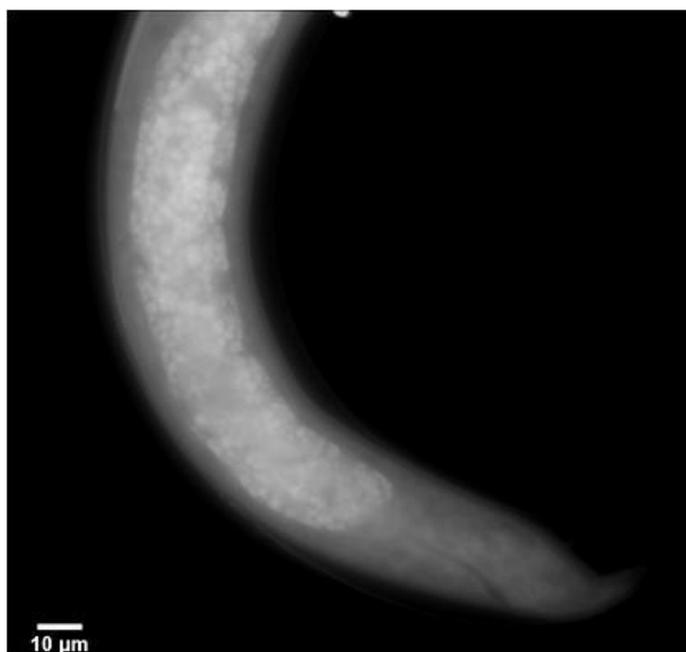


Figura 28: Intestino da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* com pequenas células arredondadas em todo o seu segmento.

O anticorpo anti- β -actina marcou o anel nervoso e o intestino (Figura 29), visualizado ao microscópio epifluorescência. Enquanto ao usar o ApoTome, só foi marcado o intestino. Entretanto, observou-se, ainda, pelo ApoTome, a marcação celular por toda a larva (Figura 30).

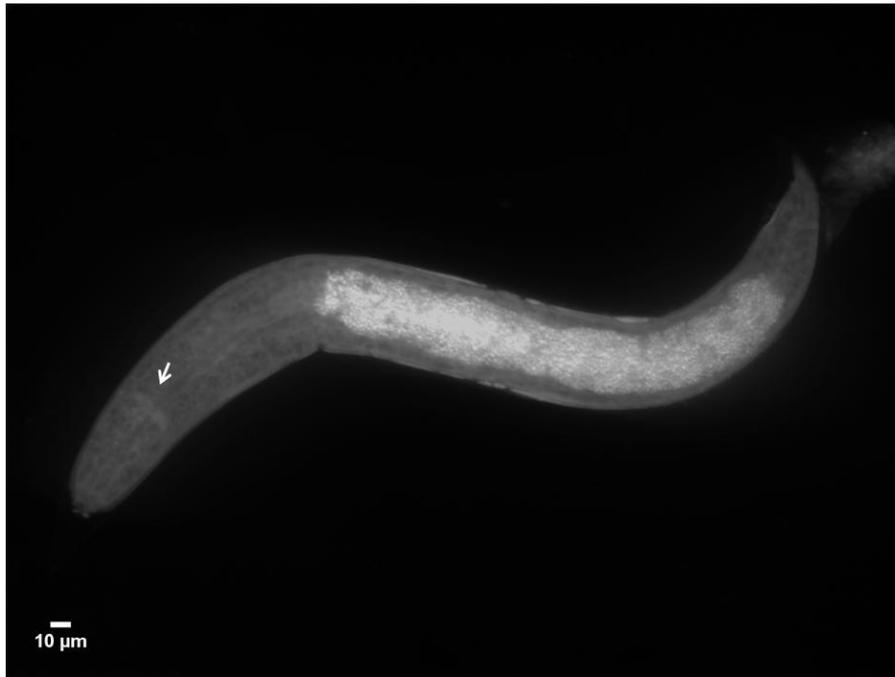


Figura 29: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- β -actina, o anel nervoso (seta) e intestino.

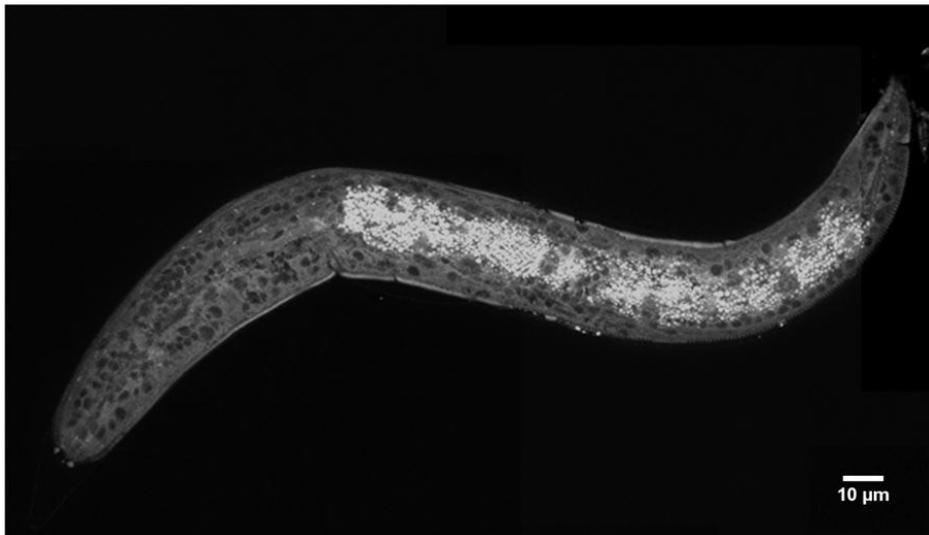


Figura 30: Imagem da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- β -actina.

A L2 apresenta, na porção anterior, duas pequenas projeções arredondadas de cerca de $2\pm 0,8$ μm de largura distantes $5\pm 0,3$ μm uma da outra (Figura 31). Observa-se, ainda, que a abertura oral da L2 é de $15\pm 0,4$ μm (Figura 32).

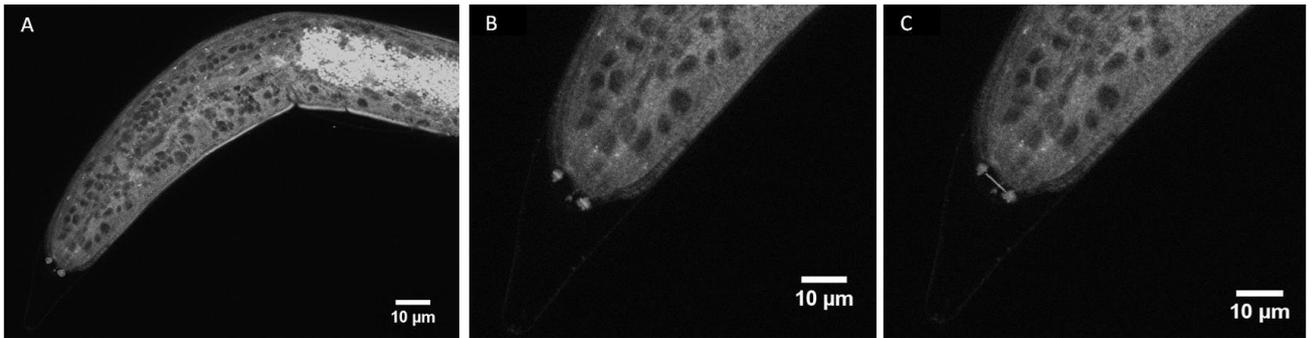


Figura 31: Imagem da porção anterior da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti- β -actina. A, B, C- projeções arredondadas na extremidade anterior da larva.

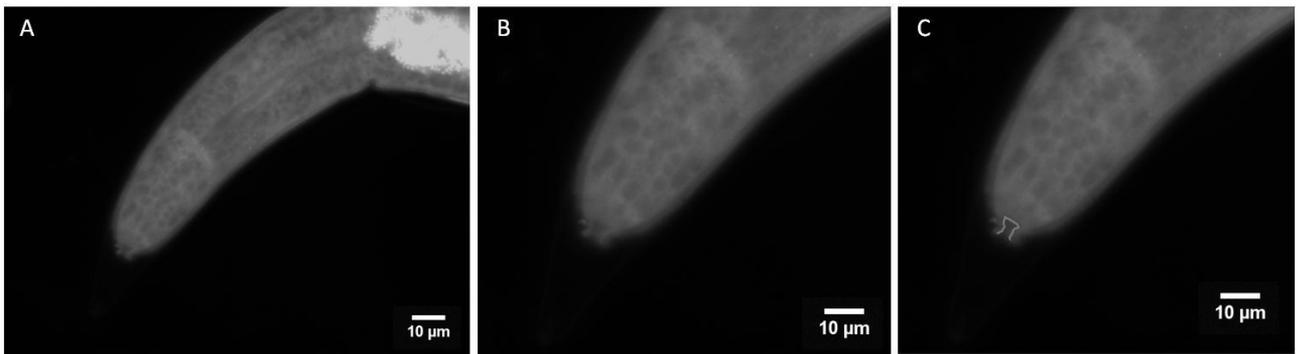


Figura 32: Imagem da porção anterior da larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- β -actina. A, B- Abertura oral da larva. C- Destaque da abertura oral.

O anticorpo anti-colágeno destacou o anel nervoso e o intestino (Figura 33)

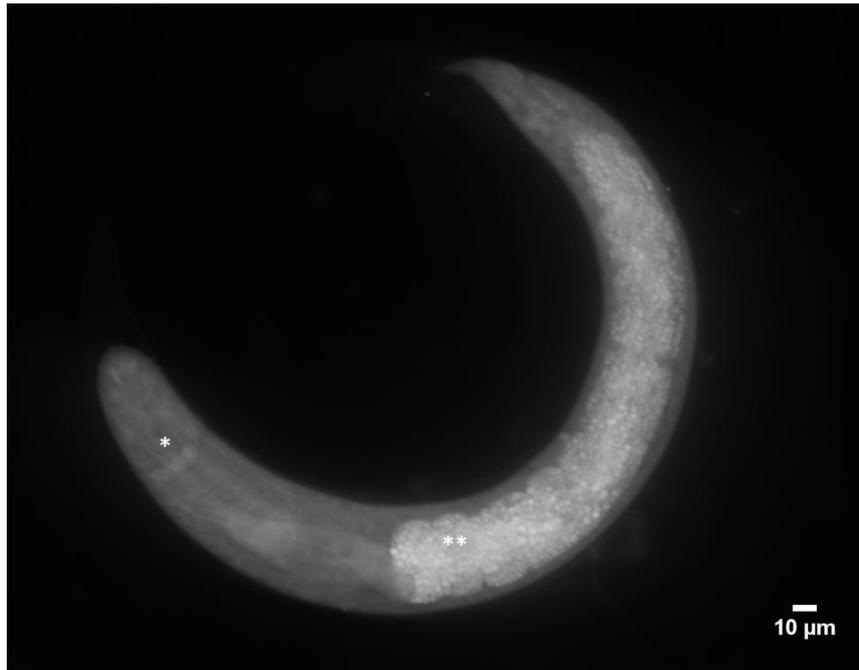


Figura 33: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anticorpo anti-colágeno, destacando o anel nervoso (*) e intestino (**).

Com o picosirius, na L2, foi observada a parede do esôfago, característica não evidenciada com os anticorpos anti- β -tubulina, anti- α -tubulina, anti-colágeno, anti- β -actina (Figura 34).

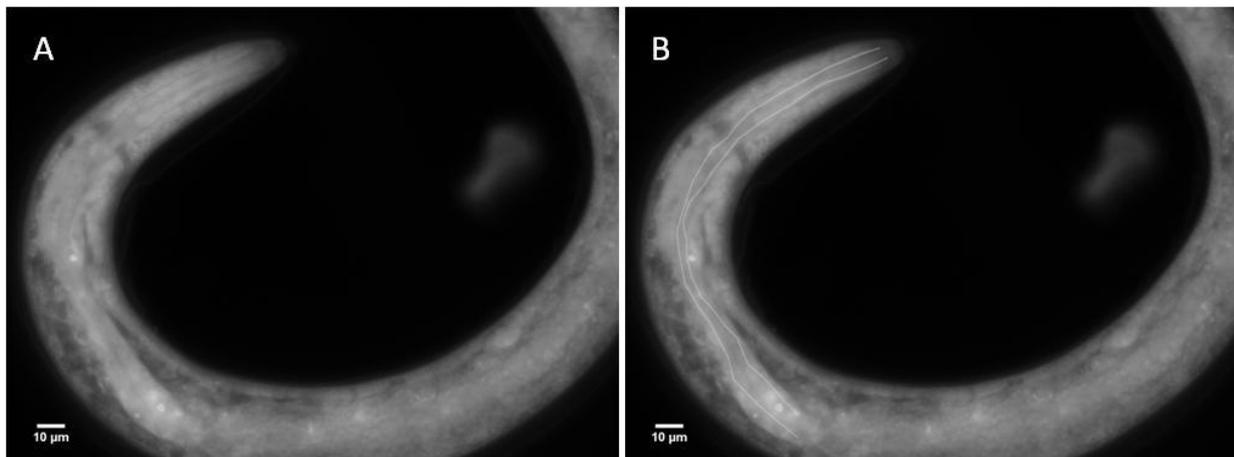


Figura 34: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picosirius: A- Esôfago. B- Canais do esôfago.

Ao analisar a L2, utilizando-se o ApoTome, visualizou-se melhor as estruturas como o esôfago que, internamente, apresenta camada de células dispostas, em cada lado, a aproximadamente um terço da porção inicial. Ainda, na parte anterior, evidencia-

se o poro excretor, com tamanho de 30 ± 3 μm de comprimento (Figura 35) e a musculatura da larva, que possui cerca de 5 ± 1 μm de espessura.

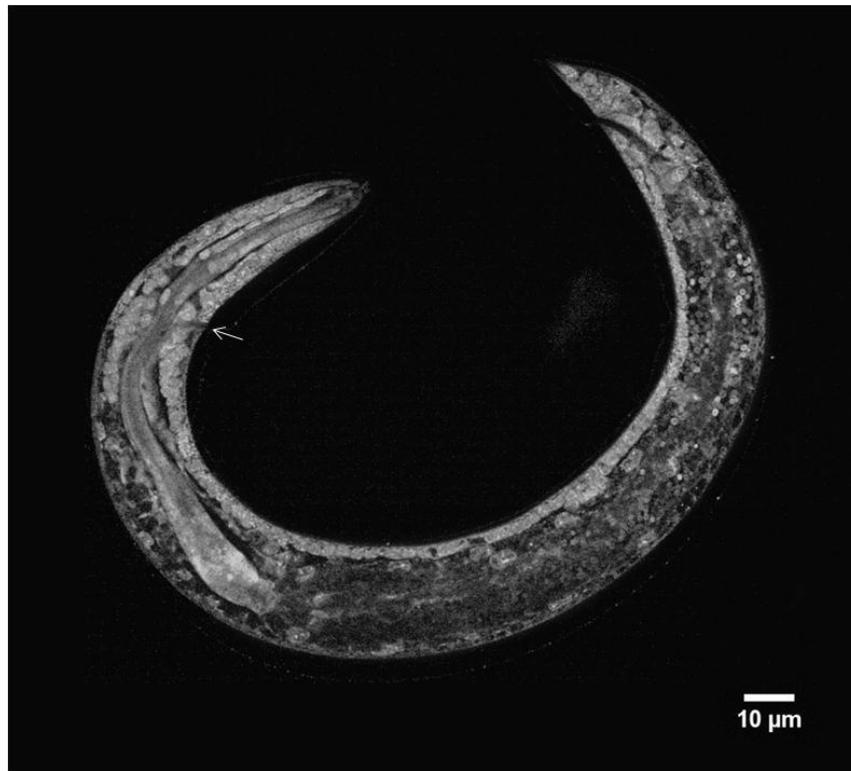


Figura 35: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, corada com picosirius. Poro excretor (seta).

Na L2, o primórdio genital, também, foi evidenciado com o picosirius, apresentando-se como aglomerado de células de 17 ± 2 μm de comprimento por 6 ± 1 μm de largura, localizado a 180 ± 4 μm de distância da porção final da cauda da larva (Figura 36).

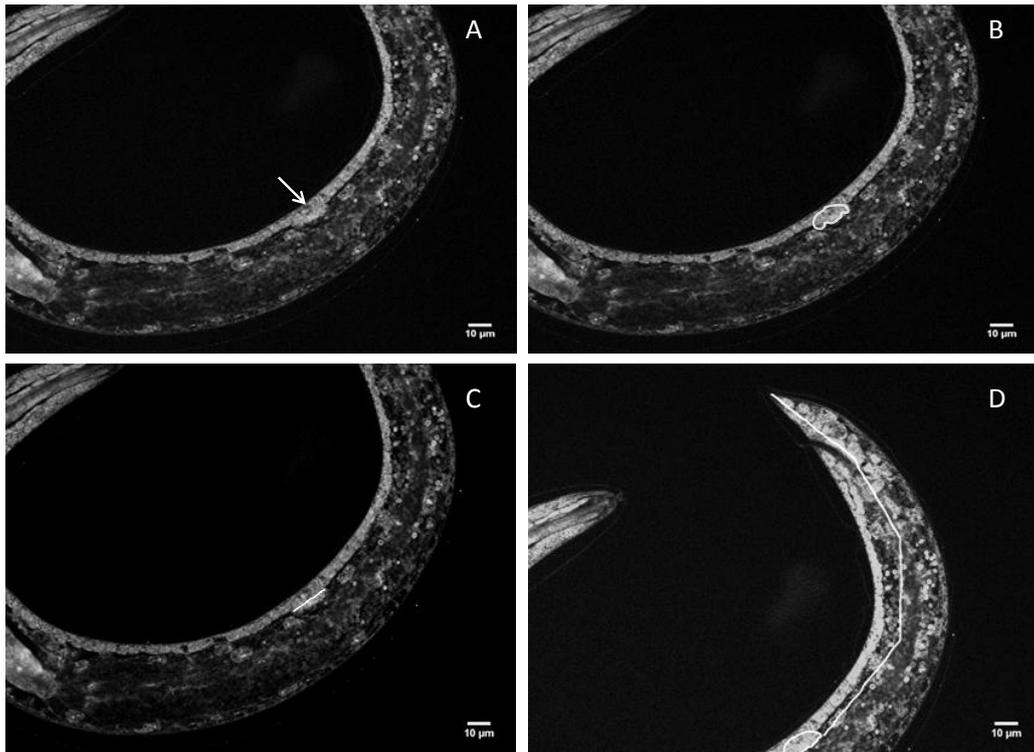


Figura 36: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum*, corada com picosirius. A - Primórdio genital. B- Primórdio genital em destaque. C- Comprimento do primórdio genital. D- Distância do primórdio genital à porção final da cauda da larva.

Os lipídeos foram reconhecidos pelo corante oil red em toda L2, sendo que, na região mediana, ocorreu maior presença das reservas neutras (Figura 37).

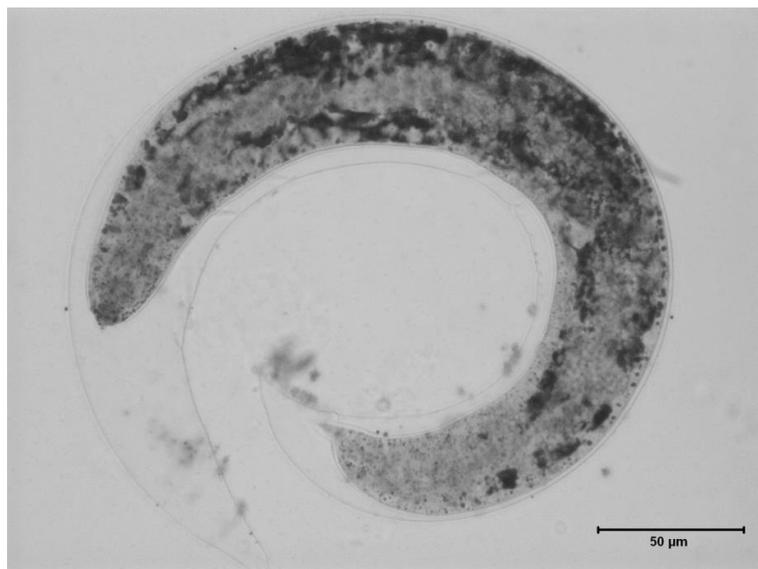


Figura 37: Larva de segundo estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com oil red.

3.2.3 Larva de terceiro estágio

Ao campo claro, as L3 aparecem livres da bainha, sendo mais claras e transparentes, com a presença de dois bastões quitinosos, dispostos longitudinalmente, na extremidade anterior, a cauda termina com apêndice digitiforme. A extensão da larva é de $470 \pm 25 \mu\text{m}$ de comprimento e $19 \pm 1 \mu\text{m}$ de largura (Figura 38).



Figura 38: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* à microscopia óptica.

Em L3, coradas com anti- α -tubulina, destacou-se o bastão quitinoso, anel nervoso, a região da válvula, membranas que envolvem os órgãos, como a parede do esôfago, intestino, bem como a luz do esôfago. Pode-se observar que a larva, em sua lateral, possui uma camada de células arredondadas, em toda sua extensão, caracterizada em nematóides adultos, como musculatura somática (Figura 39).

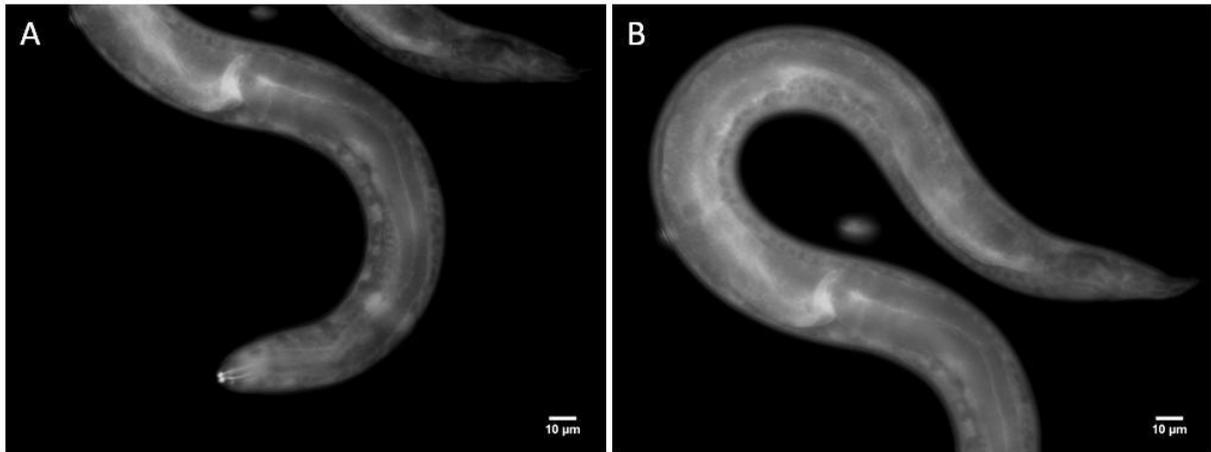


Figura 39: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A- Porção anterior destaque ao bastão quitinoso, anel nervoso e esôfago. B- Porção posterior destaque, intestino, primórdio genital e abertura anal.

Os bastões quitinosos medem cerca de $13 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e são afastados entre si por $2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. O bulbo do bastão possui $1,5 \pm 0,09 \mu\text{m}$ de comprimento por $1 \pm 0,07 \mu\text{m}$ de largura (Figura 40). E a bainha está afastada do tecido muscular em $1 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

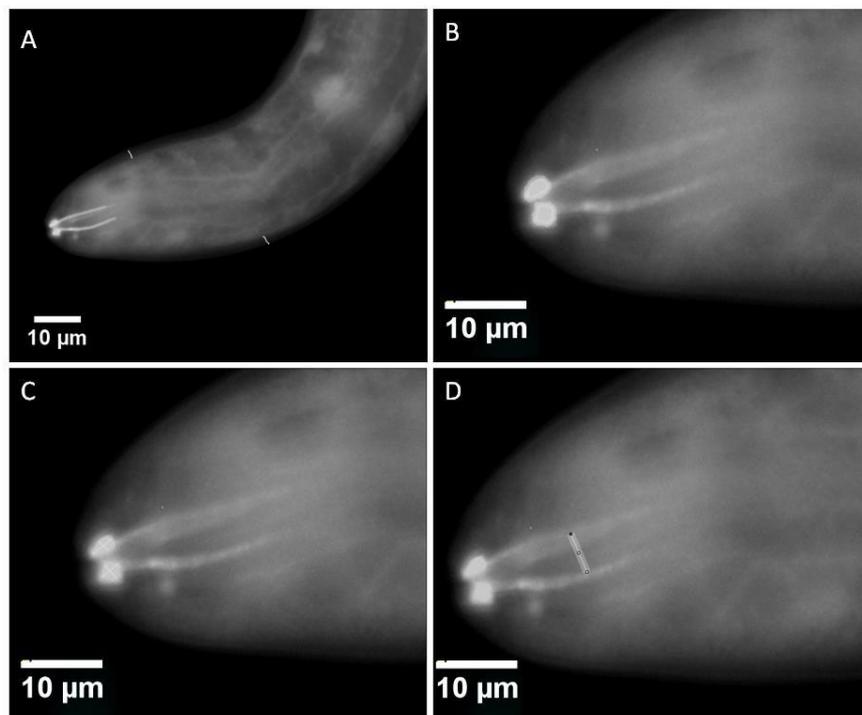


Figura 40: Características do bastão quitinoso da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A- Bastão quitinoso, distância da bainha da L3 ao tecido muscular (traços brancos). B- Bulbo do bastão quitinoso. C- Comprimento do bastão quitinoso. D- Distância entre os bastões.

O anel nervoso localiza-se a $64\pm 3\ \mu\text{m}$ da porção anterior da larva, medindo $18\pm 3\ \mu\text{m}$ de comprimento por $8\pm 2\ \mu\text{m}$ de largura (Figura 41).



Figura 41: Região anterior da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A- Distância do anel nervoso à porção anterior da larva. B- destaque no anel nervoso. C- Comprimento do anel nervoso.

O esôfago tem comprimento de $192\pm 4\ \mu\text{m}$, com dilatação, na porção final, de $46\pm 4\ \mu\text{m}$ de comprimento por $20\pm 2\ \mu\text{m}$ de largura (Figura 42).

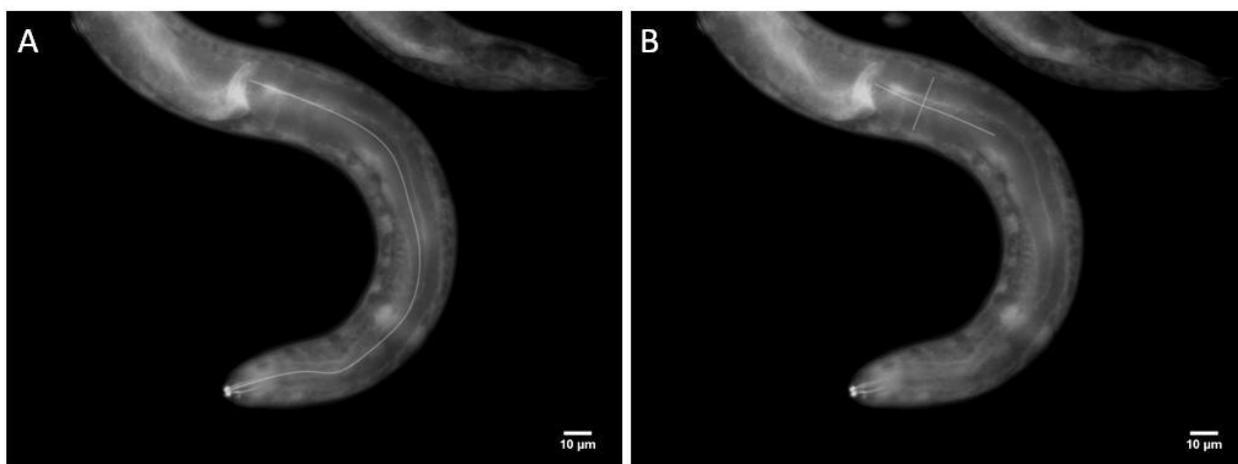


Figura 42: Região anterior da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina A- Comprimento do esôfago. B- Dilatação, comprimento e largura da porção final.

Nota-se, na L3, que o intestino se liga ao esôfago pela válvula, como evidenciado na figura 43A. O intestino apresenta $260\pm 5\ \mu\text{m}$ de comprimento e $20\pm 3\ \mu\text{m}$ de largura. A abertura anal está a $36\pm 4\ \mu\text{m}$ da ponta da cauda e possui $26\pm 3\ \mu\text{m}$ de comprimento (Figura 43).

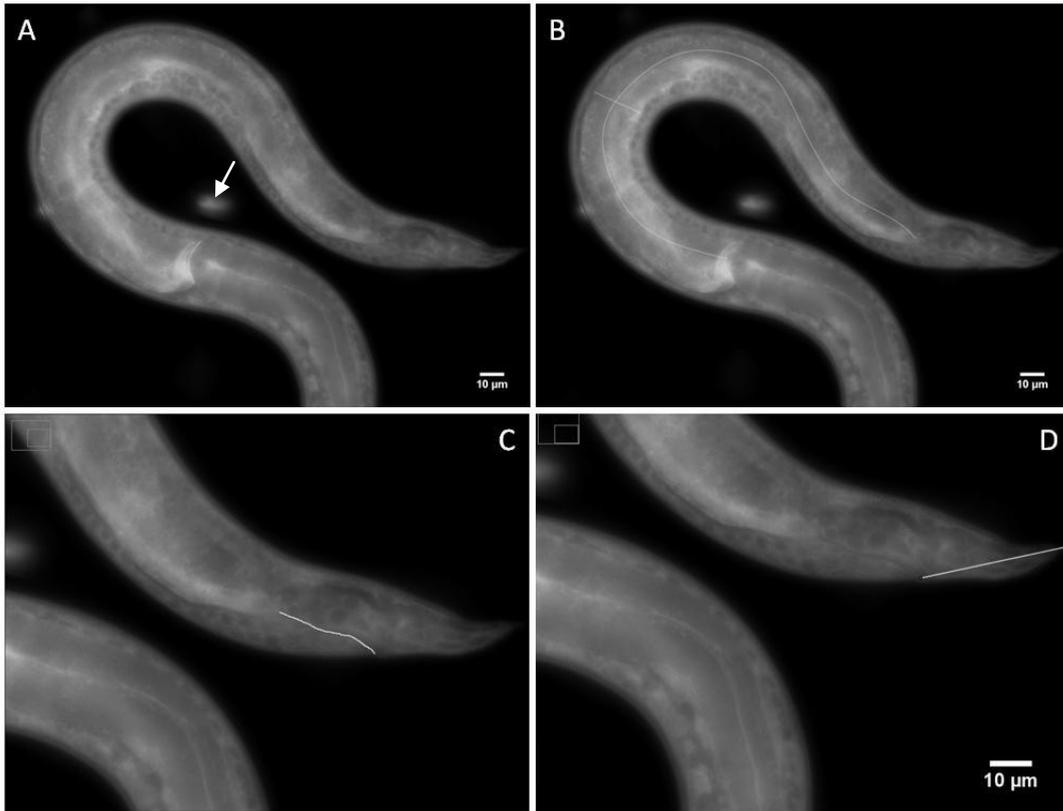


Figura 43: Porção posterior da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A- região da válvula (seta). B- Comprimento e largura do intestino. C- Abertura anal. D- Distância da abertura anal à ponta da cauda

A porção final da L3, apresenta uma estrutura semi-circular medindo $17 \pm 4 \mu\text{m}$ de comprimento, contendo nove células em seu interior, com média de $2,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de comprimento cada célula. Esta estrutura está distante a $31 \pm 0,8 \mu\text{m}$ da ponta da cauda (Figura 44).

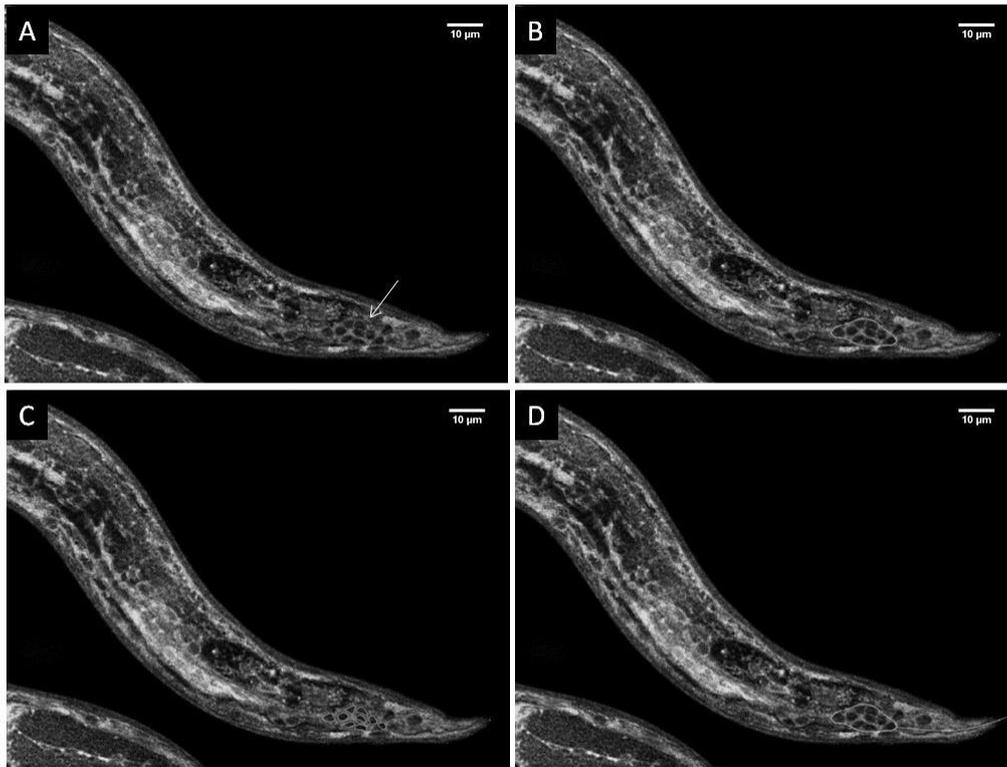


Figura 44: Porção posterior da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A,B,C,D-Estrutura semi-circular encontrada na porção final da larva de terceiro estágio.

O primórdio genital da L3 mede 21 ± 1 μm de comprimento por $6 \pm 0,9$ μm de largura, sendo composto por 15 células arredondadas. O primórdio genital localiza-se a 156 ± 3 μm de distância da ponta final da cauda (Figura 45).

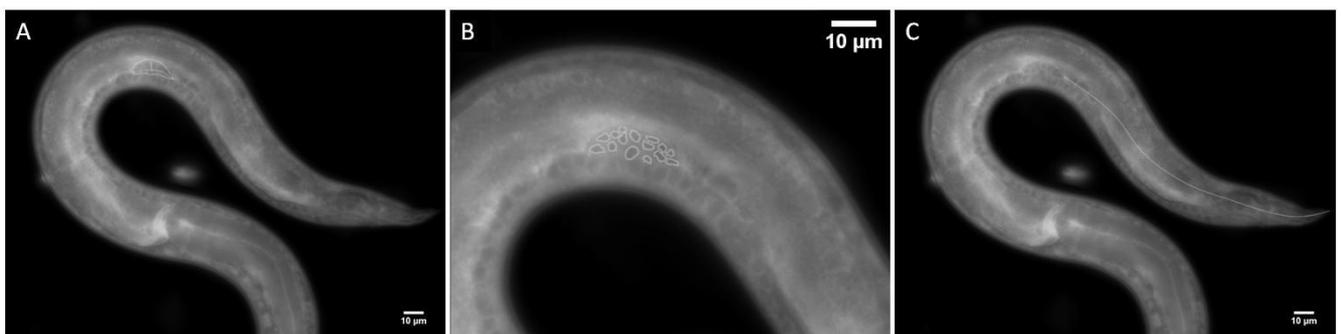


Figura 45: Primórdio genital da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti- α -tubulina. A- Primórdio genital destacado. B- Células que compõem o primórdio genital. C- Distância do primórdio genital à ponta da cauda.

A figura 46 apresenta a L3 marcada com o anticorpo anti β -tubulina.



Figura 46: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti β - tubulina.

O poro excretor da L3 está a 66 ± 3 μm de distância da abertura oral, sendo possível detectar, aproximadamente, 32 ± 2 μm do seu comprimento (Figura 47).

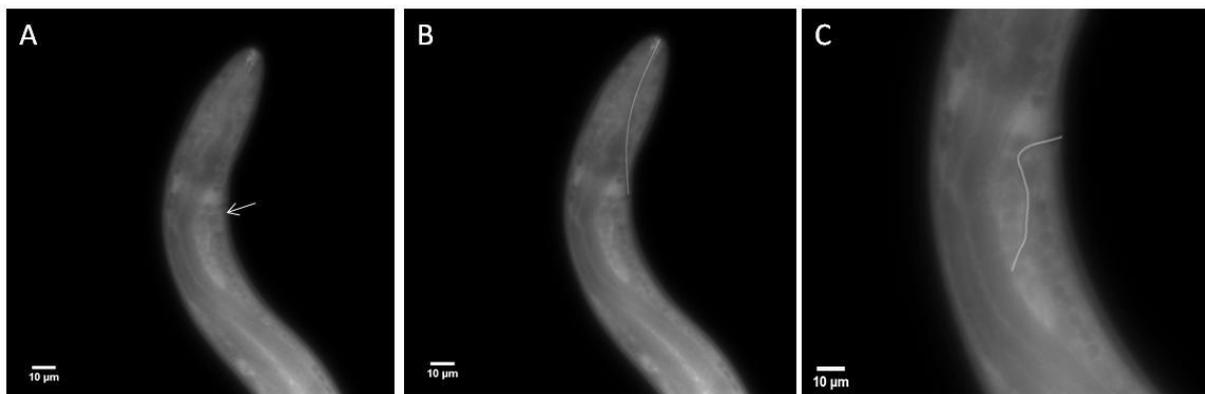


Figura 47: Poro excretor da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti β - tubulina. A- Poro excretor (seta). B- Distância do poro excretor à abertura oral. C- Comprimento do canal do poro excretor.

O esôfago da L3, ao observar a figura 48, é claviforme. Na porção final, é dilatada, possuindo camada muscular bem desenvolvida.



Figura 48: A-Esôfago da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti β -tubulina. B- Esquema da larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti β -tubulina.

Na porção do intestino, observaram-se gânglios nervosos com formato ovalar, espaçados simetricamente uns dos outros em $17 \pm 3 \mu\text{m}$. Essas células foram observadas, na porção mediana final do intestino, quando se utilizou o anti- β -tubulina (Figura 49).

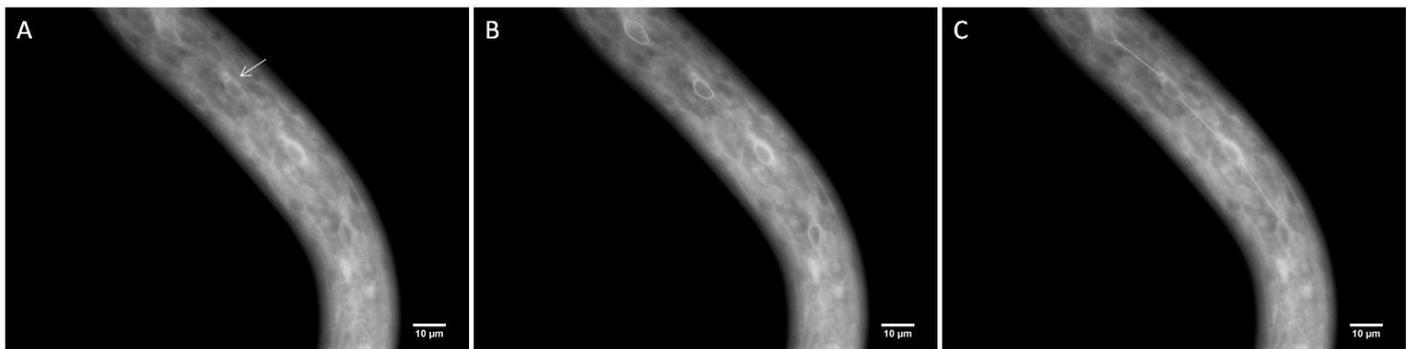


Figura 49: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, marcada com anti β -tubulina A- Na porção mediana final do intestino, observaram-se gânglios nervosos espaçados simetricamente.

Em L3, marcada com anti- β -actina, destacou-se o bastão quitinoso, anel nervoso, a região da válvula e a parede do esôfago, intestino, bem como a luz do esôfago. Observou-se que na lateral da larva, possui uma camada de células arredondadas, em toda sua extensão (Figura 50).



Figura 50: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anti β -actina

Com o anticorpo anti-colágeno, destacou-se o anel nervoso, a região posterior da do esôfago e células na região posterior da larva (Figura 51).



Figura 51: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* marcada com anticorpo anti-colágeno.

Com o corante picrossirius visualizou-se o bastão quitinoso, o poro excretor, esôfago claviforme, o primórdio genital, o reto, a abertura anal e as camadas de células arredondadas na lateral, que compõem a musculatura somática. E ainda, conjunto de

células presentes na porção final da cauda, na parte de baixo do reto até a ponta da cauda (Figura 52A). Desenho esquemático da L3 corada com picosirius, destacando células no interior do esôfago (Figura 52B).



B

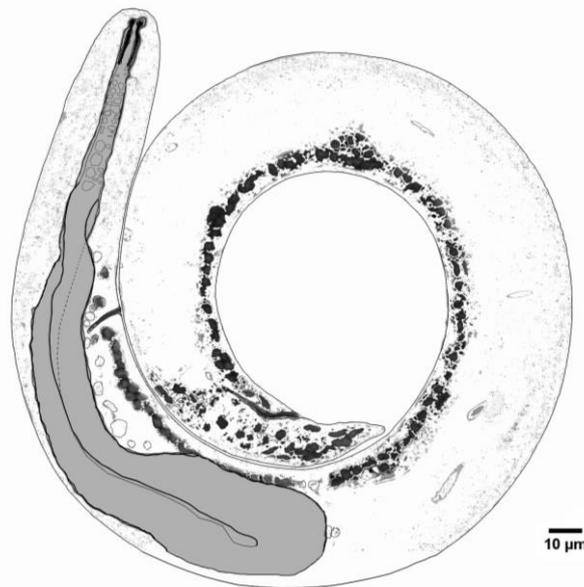


Figura 52: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* corada com picosirius. A- Observa-se o bastão quitinoso, poro excretor, esôfago, primórdio genital, abertura anal e as camadas de células arredondadas na lateral da larva. B- Desenho esquemático da L3 corada com picosirius.

Também, com o corante picosirus, foi possível observar as estruturas em formato ovalar, espaçadas simetricamente, os gânglios nervosos, como observado com o anticorpo- β -tubulina. Vale ressaltar que com o picosirus, foi possível observar ainda, os gânglios nervosos, em todo o segmento do intestino (Figura 53). Observa-se ainda que, na região anterior, há existência de células nervosas, semelhantes ao *amphidial pouch* de alguns nematóides adultos.



Figura 53: Larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, corada com picosirus, sendo observado um cordão de células em formato ovalar e espaçadas simetricamente distribuída em todo o segmento do intestino.

A estrutura em formato ovalar também foi observada, nas laterais da região anterior, próximas ao bastão quitinoso, semelhante ao *amphidial pouch*, medindo $3\pm 0,9$ μm de comprimento por $1\pm 0,08$ μm de largura, distante um do outro em $9\pm 0,9$ μm (Figura 54).

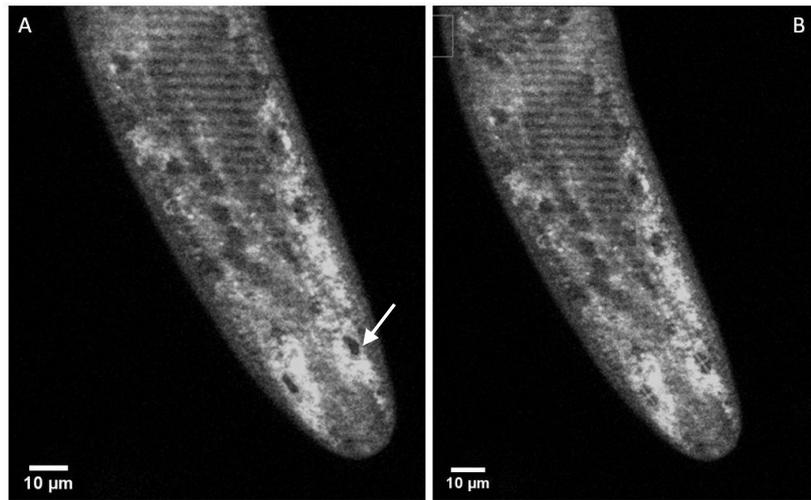


Figura 54: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, corada com picosirius *com amphidial pouch*. A- Localização da estrutura em formato ovalar (seta). B- Comprimento e largura da estrutura em formato ovalar.

As reservas lipídicas da L3 estão evidenciadas pelo *Oil Red*, apenas no intestino (Figura 55).



Figura 55: Larva de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, corada com corante oil red.

4.0 Discussão

A caracterização dos estádios intramoluscos é pouco conhecida para *A. vasorum*. O comprimento dos estádios larvais de *A. vasorum*, recuperados de *A. fulica*, são

semelhantes aos encontrados em *Arion* sp., *O. matherony* e *S. octona*, a L1 com média de 335 µm, L2 média de 420 µm e a L3 com 485 µm (Guilhon & Cens 1973, Bessa et al. 2000, Mozzer 2006).

Durante o desenvolvimento intramolusco, *A. vasorum* sofre duas mudas, com a passagem de L1 para L2 e de L2 para L3, momento em que inicia o desenvolvimento do aparelho digestivo, em alguns nematóides e o aparelho reprodutor.

Os marcadores utilizados, no reconhecimento morfológico dos três estádios larvais de *A. vasorum*, foram úteis para melhor análise das estruturas presentes, que não são bem visualizados à microscopia de luz. Os marcadores anti- α -actina, anti-colágeno, anti- β -tubulina e picosirus destacaram, na L1, a abertura oral, o bastão quitinoso e um par de estruturas semicircular, o anel nervoso, o esôfago, o intestino, o reto e a abertura anal. Já com o corante anti β -actina, foi possível observar o anel nervoso e o intestino. Nesse estágio, observaram-se regiões marcadas em todo o interior, sugerindo que há uma composição de diferentes fibras na organização dessas estruturas. Quanto às estruturas morfológicas, são observadas na L1 de *A. vasorum*, na região anterior a formação inicial do bastão quitinoso. A morfologia apresentada sugere que o bastão quitinoso é parte da cavidade oral. Tal estrutura parece compor o sistema digestivo da L1, o qual seria um estoma estreito, quase fechado e na L3, nota-se uma dilatação entre as estruturas, ao observar a dilatação entre as estruturas, confere a abertura oral um aspecto de estoma.

Nota-se, nesse estudo, que o intestino é bem caracterizado na L1, inicia no terço final da larva e termina na abertura anal, diferente do trabalho de Shan Lv et al. (2009), que identifica o intestino, na L1 de *A. cantonensis*, somente após cinco dias de desenvolvimento da infecção em *P. canaliculata*, quando sugerem um intestino com um aspecto mais dilatado. A cauda da L1 é característica, termina em forma de apêndice unguiforme, como descrito por Rosen et al. (1970). A maioria dos trabalhos cita essa característica principal, para diferenciar o estágio L1 de Metastrongylidae de outros nematóides.

Na L2, destacou-se a abertura oral, o bastão quitinoso e um par de estruturas arredondadas, projetadas, semelhante a uma protuberância cuticular, o anel nervoso, o esôfago, intestino, primórdio genital, canal e abertura anal. Na abertura oral, aparecem duas protuberâncias, que não estão presentes nos outros estádios, isso pode ser devido ao desenvolvimento da larva e do bastão quitinoso. O intestino aparece como uma

massa compacta, ocupando praticamente toda a porção posterior da larva. A larva de segundo estágio não é muito estudada, devido à dificuldade de recuperá-la, no tecido dos moluscos, e por ser uma fase do parasito que não é observado no ambiente. Nessa fase, destacou-se o aumento do intestino, em relação à L1 e L3. Isso se dá, devido à característica, deste estágio, de aumentar a reserva energética para se desenvolver. Nessa fase, a larva possui duas bainhas, uma da L1 que está sendo eliminada e a outra que está sendo formada para compor a L3. Essas são as principais características observadas para L2, como também relatada nos trabalhos de Guilhon (1965), Guilhon e Afghahi (1969), Bessa et al. (2000), Mozzer et al.(2014), Coaglio et al. (2016).

Na L3, demonstrou-se a abertura oral, o bastão quitinoso, o anel nervoso, o poro excretor, o esôfago, o intestino, o primórdio genital, o reto e a abertura anal. No final da cauda, após a abertura anal, há um conjunto de células, com tamanhos simétricos. Esse conjunto pode ser alguma estrutura que se originará no parasito adulto. Na base do esôfago, foi visualizada uma válvula que se liga ao intestino. Esse trabalho é o primeiro realizado com anticorpos, para visualizar melhor a estrutura das larvas de *A. vasorum*. Outros trabalhos foram realizados para visualizar as estruturas de *H. diminuta* (Rozario et al. 2015), cercária de *S. mansoni* (Collins et al. (2011), *Echinostoma paraensei* (Souza et al. 2011), *Ascaris suum* (Fellowes et al. 1999, Williamson et al. 2009) e *Caenorhabditis elegans* (Albeg et al. 2011).

A larva de terceiro estágio é a infectante para os canídeos. Caracteriza-se pelos bastões quitinosos perto da boca. O bastão em *A. vasorum* é citado como característica desse estágio pelos autores (Ash 1970, Guilhon & Cens 1973, Bessa et al. 2000, Di Cesare et al. 2015, Coaglio et al. 2016). Após análises prévias, nossos dados sugerem que tais estruturas estão presentes a partir da L1 e são bem desenvolvidas na L3, quando apresentam espaço entre os bastões, podendo compor o estoma no parasito adulto. Os parasitos *A. cantonesis*, *A. costaricensis* e *A. abstrusus* também apresentam bastões quitinosos, como característica para o terceiro estágio (Ash 1970, Hata & Kojjima 1990, Shan Lv et al. 2009, Ohlweiler et al. 2010). Entretanto, não há relatos de estudos morfológicos caracterizando tal morfologia interna de nematóides intramoluscos. A estrutura muscular que compõe o intestino apresenta uma estrutura celular mais espessa terminando na abertura anal. Também, na estrutura do corpo, nota-se que a disposição da musculatura é densa em relação à L1. A porção final do intestino das larvas destacou-se com os anticorpos. Isso pode ter ocorrido devido a presença de

microtúbulos e a miofilamentos do citoesqueleto, presentes nas células dessa região do intestino. A cauda da L3 termina com a característica do apêndice digitiforme, morfologia comum as L3 de *A. vasorum*, *A. costaricensis* e *A. cantonensis* (Ash 1970, Guilhon & Cens 1973, Hata & Kojjima 1990, Bessa et al. 2000) diferente das L3 de *A. abstrusus*, que apresentam um botão arredondado na ponta da cauda (López et al. 2005).

Os três estádios larvais, corados com o picrosírius, tiveram bons resultados para análise das estruturas. Com esse corante, foi possível observar praticamente todas as estruturas que foram observadas com os anticorpos, tendo a vantagem de que o picrosírius é um corante bem mais barato, para realizar os experimentos. Vale esclarecer que só foi possível observar as estruturas das larvas, quando visualizadas com o ApoTome, enquanto na epifluorescência as estruturas não ficaram evidentes para análise. Dá-se a isso, devido ao mecanismo do ApoTome, que filtra a luz recebida e, assim, realiza uma limpeza na imagem, deixando-a mais nítida. Até o momento, não se tem informação da utilização do picrosírius para observar as estruturas de um nematóide. Esse corante é utilizado para observar a produção de colágeno, em corte histológico de tecido, como descrito por Junqueira (1979) em tecido de fígado de camundongo, para analisar sua resposta à infecção com ovos de *S. mansoni*.

O uso de corantes como picrosírius e anticorpos tem a vantagem sobre a técnica de câmara clara ou microscopia eletrônica, por dar uma visão mais real da larva, em relação às suas estruturas. E com isso, produz resultados que poderão fornecer informações para serem comparadas com outras larvas de outros parasitos, além de conhecer os aspectos biológicos de cada estrutura.

As larvas de *A. vasorum* coraram com *Oil red O*, mostrando os principais locais de reserva, em cada estágio larval. Os lipídeos saturados são as reservas energéticas mais importantes nos nematóides, representando de 11% a 67% do peso seco, na fase juvenil do parasito. As gorduras neutras, como os triglicerídeos, são a principal forma de armazenamento em nematóides adultos (Barrett & Wright, 1998, Andaló et al. 2011). As reservas de lipídeos observadas, na L1, foram uniformes, na porção inicial do esôfago, com pontos de reservas espalhados no centro da larva e um pouco mais concentrados no intestino da larva. As gotas de lipídeos são os principais locais de armazenamento dos lipídeos neutros e, durante o seu desenvolvimento, essas gotas se modelam, à medida da demanda da energia (Xu et al. 2012). As L2 de *A. vasorum*, por serem larvas que ficam imóveis no tecido e transitam de estágio, a reserva foi

encontrado em praticamente todo o corpo, sendo mais intenso na região esôfago-intestino, com os grânulos variando de tamanho, resultado semelhante foi observado no trabalho de Mendonça et al. (2008) ao corar L2 de *A. costaricensis* com *Oil Red*. As L3, por serem mais ativas, gastam suas reservas energéticas, observando apenas gotas de lipídeos na região do intestino e, em quantidade menor, em relação aos outros estádios. Em larvas juvenis infecciosas de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp., observou-se uma coloração mais intensa na área intestinal e mais leve na porção anterior, com distribuição irregular pelo corpo (Andaló et al. 2011). Em adulto de *C. elegans*, o corante *Oil Red* realçou as reservas de lipídeos no intestino e na hipoderme do nematóide (Palgunow et al. 2012).

Nesse trabalho, demonstra-se que alguns detalhes da morfologia interna dos estádios de *A. vasorum* intramolusco são inéditos, como a musculatura, os gânglios nervosos, o primórdio genital na L1 e L2, e a reserva energética das larvas, com isso, podem ajudar a compreender melhor a biologia deste parasito.

Capítulo III

Captura de *Achatina fulica* na região metropolitana de Belo Horizonte para análise da presença de larvas de metastrongilídeos.

1.0 Introdução

Achatina fulica, conhecido como caramujo africano, foi introduzido no Brasil, no ano 1980, em uma feira agrícola no estado do Paraná, para ser comercializado como substituto ao escargot, *Helix aspersa*. Porém, como os resultados foram negativos no comércio, os produtores soltaram os moluscos no meio ambiente (Thiengo et al. 2008, Carvalho-Junior & Nunes 2009). A rápida dispersão de *A. fulica* pode ter sido proporcionada ao hábito alimentar pouco exigente, ao elevado potencial de sobrevivência e fecundidade (Albuquerque et al. 2008), o que permite a adaptação aos vários tipos de biomas, como florestas, capoeiras, caatinga e brejos (Eston et al. 2006).

No Brasil, há relatos de *A. fulica*, como hospedeiro intermediário para *A. cantonensis*, nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo e Amazonas (Caldeira et al. 2007, Thiengo et al. 2010, Maldonado et al. 2010, Moreira et al. 2013, Oliveira et al. 2015). Os casos de meningite eosinofílica do estado do Espírito Santo estão relacionados à ingestão desse molusco. Não há relato de *A. fulica* infectada naturalmente com *A. costaricensis* ou *A. vasorum*, mas há infecção experimental para essas espécies, nos trabalhos de Carvalho et al. (2003), Neuhauss et al. (2007) e Coaglio et al. (2016). Esse molusco também está associado a outros parasitos como *Aelurostrongylus abstrusus*, parasito do pulmão de gatos, *Rhabditis* sp. e *Strongyluris* sp. (Oliveira et al. 2010), parasitos encontrados no intestino de anfíbios e répteis.

Devido ao encontro constante de *A. fulica* no ambiente em locais onde há a presença de roedores e cães, o trabalho busca a ocorrência desse molusco infectado com parasitos da família Metastrongylidae e assim, diagnosticar o potencial desse molusco na dispersão de parasitos.

2.0 Material e Métodos

2.1 Coleta de *Achatina fulica*

Foram realizadas coletas de *A. fulica* em Belo Horizonte, no bairro Jardim Montanhês, e na região metropolitana, nas cidades de Igarapé, bairro Cidade Nova, Sabará, Bairro Pompéu e Lagoa Santa, bairro Jardim Ipê. As coletas foram realizadas por catação manual aleatória, no período de outubro a fevereiro, dias quentes e alta umidade, o que favorece a captura dos moluscos. Os moluscos coletados foram alocados em caixa de isopor e levados para o laboratório de Helminologia Veterinária-ICB-UFMG, onde foram destinados em recipientes de criação, contendo terra, água e alface. Dos moluscos capturados, 60% foram sacrificados e digeridos com ácido clorídrico e pepsina a 1% (Coaglio et al. 2016), para examinar a presença de parasitos da família Metastrongylidae. Os moluscos restantes foram utilizados para manter a criação em laboratório. As larvas encontradas foram fixadas com Millonig, montadas entre lâmina e lamínula e analisadas em microscópio óptico.

3.0 Resultados

Os espécimes de *A. fulica*, capturados, na cidade de Belo Horizonte, Sabará, Igarapé e Lagoa Santa, apresentavam diferentes fases de desenvolvimento e foram encontrados, principalmente, escondidos em entulhos de construção (Figura 1).

Em nenhum molusco analisado, foram recuperadas larvas de parasitos de animais ou do homem. Nos moluscos foram encontradas larvas que sugerem ser do gênero *Strongyluris* sp. (Figura 2), devido à característica da região anterior indicando a presença de esôfago do tipo oxiuridiforme e a região posterior apresentando a cauda curvada dorsoventralmente com ânus evidenciado (Figura 3) e do gênero *Rhaditis* sp., em nossos exemplares, só foi possível observar a característica da cauda longa e afilada (Figura 4), mas este gênero possui a característica na extremidade anterior como primórdio da cápsula bucal, sistema digestivo assinalando pseudobulbo, válvula e bulbo, e na extremidade posterior com o ânus e a cauda longa e afilada. Em alguns espécimes de *A. fulica*, aproximadamente 0,5% apresentaram cistos no manto (Figura 5). A tabela 2 apresenta a quantidade de parasitos recuperados em *A. fulica*.

Tabela 2: Taxa de infecção e localidade dos nematóides recuperados em *Achatina fulica*

Cidade	Número de <i>A.fulica</i> examinados (n)	Larva de Metastrongilideos	<i>Rhaditis</i> sp (%)	<i>Strongyluris</i> sp (%)
Belo Horizonte	300	0	18	7
Igarapé Sabará	200	0	4	4,5
Sabará	150	0	8	5,3
Lagoa Santa	230	0	10	3,4

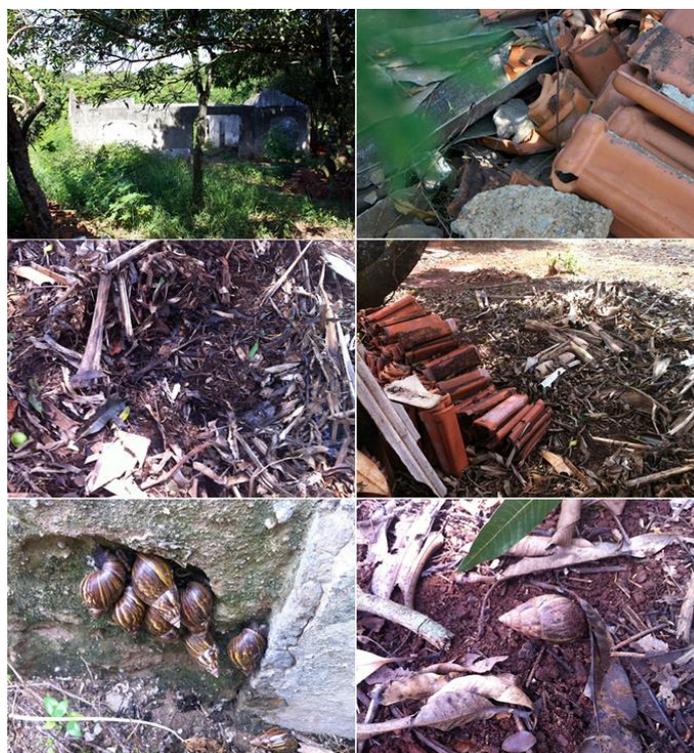


Figura 1: Ambiente onde foi de encontrado *Achatina fulica*. Fotos: Amorim



Figura 2: Larva do gênero *Strongyluris* sp encontrada em *Achatina fulica*



Figura 3: Detalhes da larva do gênero *Strongyluris* sp. A- Região anterior, esôfago do tipo oxiuridiforme (seta), B- Região posterior, cauda curvada dorsoventralmente com ânus evidenciado (seta).



Figura 4: Larva do gênero *Rhaditis* sp encontrada em *Achatina fulica*, com detalhe da cauda afilada (seta).



Figura 5: Cistos (seta) presentes no manto de *Achatina fulica*

4.0 Discussão

Nesse estudo, os exemplares de *A. fulica* foram coletados em regiões onde havia hortas, lixos e entulhos, confirmando a adaptação a diferentes ambientes, aspecto observado por outros autores (Simião & Fischer 2004, Barçante et al. 2005, Eston et al. 2006; Carvalho & Nunes 2009, Henrique et al. 2007, Albuquerque et al. 2008). Em nosso trabalho, não encontramos moluscos infectados para metastrongilídeos. Tal fato pode ser atribuído à baixa susceptibilidade desse molusco às infecções por *A. vasorum* (Coaglio et al., 2016), *A. cantonensis* e *A. costarecensis* (Neuhauss et al. 2007), como mostrado em estudos experimentais e devido à distribuição e ocorrência dos parasitos nos locais coletados. Em *A. fulica*, capturada em Juiz de Fora (MG), não foi encontrado nenhum molusco infectado (Barçante et al. 2005), o mesmo fato ocorreu com Carvalho e Pile (2001), na captura desse molusco no Vale do Paraíba (RJ), onde só foram encontradas larvas, que não afetam a saúde humana ou animal.

O molusco *A. fulica* se adaptou bem ao clima em todas as regiões do Brasil, sendo encontrado infectado com *A. cantonensis* em vários estados, como Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo e Pará (Thiengo et al. 2010, Maldonado et al. 2010, Caldeira et al. 2007, Moreira et al. 2013). Esse molusco também foi encontrado infectado com larvas de *A. abstrusus*, parasito, principalmente de felinos, nos estados do Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Sergipe, Espírito Santo, Mato Grosso e Amazônia (Thiengo et al. 2008, Ohlweiler et al. 2010, Oliveira et al. 2010, Andrade-Porto et al. 2012).

Nos locais coletados, não foram encontradas larvas nocivas ao homem, as principais larvas encontradas foram de vida livre, que sugerem ser do gênero *Strongyluris* sp., *Rhaditis* sp. e *A. abstrusus*, essas larvas foram relatadas nos trabalhos de Oliveira et al. (2010) e Ohlweiler et al. (2010). Franco-Acuña et al. (2009) relataram a ocorrência de cistos encontrados, em vários órgãos de *A. fulica*, como larvas de *Strongyluris* sp. Em nosso trabalho foram encontrados cistos no colar do manto e ao examiná-los, encontrou, em seu interior, larvas de nematóides semelhantes à descrita por Franco-Acuña et al. (2009).

Os achados de infecção natural por nematóides no Brasil em *A. fulica*, é crescente e incidente nas regiões do país. Tal fato sugere que, apesar da pouca susceptibilidade a infecções experimentais por *Angiostrongylus* sp., o potencial biológico desse molusco, eleva a importância como hospedeiro intermediário no Brasil.

No Brasil, nos locais onde ocorre *A. fulica*, há um desequilíbrio no meio, pois esse molusco possui um acelerado aumento populacional e se alimenta de praticamente todo tipo de vegetal e legumes, causando a diminuição da disponibilidade de alimentos para outras espécies de moluscos nativos (Raut & Barker 2002). Com isso, esse molusco pode tornar-se um importante transmissor de parasitos nocivos ao homem e ao animal devido ao seu alto potencial biótico.

Conclusões

- Existe produção de fenoloxidase, melanina e óxido nítrico durante o desenvolvimento de *A. vasorum* em *A. fulica*;
- Os marcadores anti- β -tubulina, anti- α - tubulina ,anti- colagen e anti- β - actina e picosirius, possibilitam a análise da morfologia e morfometria das larvas de *A. vasorum*;
- O corante picosirius permite a visualização da musculatura das larvas intramolusco de *A. vasorum*;
- O corante picosirius permite a visualização de gânglios nervosos na L3;
- O corante picosirius é melhor para análise morfológica e morfométrica de L1, L2 e L3 de *A. vasorum* em *A. fulica*, sendo um corante mais barato e acessível;
- As L1, L2 e L3 de *A. vasorum* apresentam lipídeos como reserva energética.
- Os estádios L1, L2 e L3 são semelhantes ao observados em *Arion* sp.
- Os moluscos recuperados nas cidades não apresentam importância na manutenção do ciclo de metastrongilídeos até o momento.

Referências

- Adamowicz A, Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (helicidae). *Zoologica Poloniae*. 2003; 48(1-4):93-101.
- Adema CM, Harris RA, Deutekom-Mulder EC. A Comparative Study of Hemocytes from Six Different Snails: Morphology and Functional Aspects. *Journal of invertebrate pathology*. 1992; 59: 24-32.
- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 94(16): 8691–8696.
- Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2007;148(4):470-80.
- Albuquerque FS, Peso-Aguiar MC, Assunção-Albuquerque MJ. Distribution, feeding behavior and control strategies of the exotic land snail *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) in the northeast of Brazil. *Braz J Biol*. 2008;68(4):837-42.
- Albeg A, Smith CJ, Chatzigeorgiou M, Feitelson DG, Hall DH, Schafer WR, Miller DM 3rd, Treinin M. *C. elegans* multi-dendritic sensory neurons: morphology and function. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46(1):308-17. doi: 10.1016/j.mcn.2010.10.001.
- Alho AM, Schnyder M, Schaper R, Meireles J, Belo S, Deplazes P, de Carvalho LM. Seroprevalence of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and parasite-specific antibodies in dogs from Portugal. *Parasitol Res*. 2016;22.
- Allam B, Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J Invertebr Pathol*. 2015;131:121-36.
- Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(4):990-1001.
- Andaló V, Moino A, Maximiniano C, Campos VP, Mendonça LA. Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología*. 2011; 37(2): 203-209.
- Andrade-Porto, SM Souza, KCP, Cárdenas MQ, Roque RA, Pimpão DM, Araújo CS, Malta JCO. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in the Amazon region. *Acta Amazonica*, 2012; 42(2): 245-250.
- Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Parasitol*. 1970; 56(2):249-53.

Aziz NA, Daly E, Allen S, Rowson B, Greig C, Forman D, Morgan ER. Distribution of *Angiostrongylus vasorum* and its gastropod intermediate hosts along the rural-urban gradient in two cities in the United Kingdom, using real time PCR. *Parasit Vectors*. 2016;9:56.

Barçante TA, Barçante JM, Dias SR, Lima Wdos S. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitol Res*. 2003; 91(6):471-475.

Barçante JMP. Aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004;176pp.

Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, LimaWS. Ocorrência de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda: Achatinoidea) no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Bol. Mus. Biol.Mello Leitão*. 2005;18:65-70.

Barçante TA. Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006, 179 pp.

Bahgat M, Doenhoff M, Kirschfink M, Ruppel A. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2002; 88: 489-494.

Barrett J, Wright DJ. Intermediary metabolism. p. 331-353. En: Perry, R. N.; Wright, D. J. (eds.). *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CAB International. Wallingford. 1998; 448 p.

Bauch H., Schaffer J. Óptical sections by means of structured illumination: background and application in fluorescence microscopy. *Microscopy*. 2006. 86-88.

Bessa EC, Lopes CWG, Pinheiro NL, Araújo JLB. Sítios de desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* em *Subulina octona* em condições de laboratório. *Bol ICB*. 1996; 47: 13-19.

Bessa ECA, Lima WS, Erik D, Cury MC, Barros AJL. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia*, 2000; 17(1), 29-41.

Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Martins RL, Coelho PM. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop*.1997; 39: 197-201.

Biswas C, Mandal C. The Role of Amoebocytes in Endotoxin-Mediated Coagulation in the Innate Immunity of *Achatina fulica* Snails. *Scand. J. Immunol*.1999; 49: 131–138.

- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001;2:907 – 916.
- Bolt G, Monrad J, Frandsen F, Henriksen P, Dietz HH. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratecnic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res*. 1993; 79: 428-430.
- Brusca, R., Brusca, G.J. Invertebrados. 2^a ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 2007; 968 p.
- Caldeira RL, Mendonça CL, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota EM, Pecora IL, Medeiros AM, Carvalho Odos S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(7):887-9.
- Carvalho O dos S, Teles HM, Mota EM, Lafeta C, de Mendonça GF, Lenzi HL. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36:743–5.
- Carvalho JrVCB, Nunes JRS. Ocorrência e distribuição do caramujo africano “*Achatina fulica*” Bowdich, 1822, no Município de Várzea Grande- MT, Espírito Santo do Pinhal, 2009, 6(2): 606-620.
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 2008; 29(6):263-71.
- Coaglio A.L. Susceptibilidade e comportamento de *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum*. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, departamento de Parasitologia. 2013, Belo Horizonte, MG.
- Coaglio AL, Mozzer LR, Corrêa DN, Pereira CAJ and Lima WS. Evaluation of techniques for recovery of *Angiostrongylus vasorum* from *Achatina fulica*, a potential intermediate host. *Rev Patol Trop* 2016; 45 (1): 87-97.
- Collins JJ 3rd, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(3):e1009.doi: 10.1371/journal.pntd.0001009.
- Cueto JA, Rodriguez C, Vega IA, Castro-Vazquez A. Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123964.
- Coia ME, Hammond G, Chan D, Drees R, Walker D, Murtagh K, Stone J, Bexfield N, Reeve L, Helm J. Retrospective evaluation of thoracic computed tomography findings in dogs naturally infected by *Angiostrongylus vasorum*. *Vet Radiol Ultrasound*. 2017; doi: 10.1111/vru.12505.

Di Cesare A, Crisi PE, Bartolini R, Iorio R, Talone T, Filippi L, Traversa D. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* in the land snail *Helix aspersa*. Parasitol Res. 2015; 114(10):3649-55.

Elsheikha HM, Holmes SA, Wright I, Morgan ER, Lacher DW. Recent advances in the epidemiology, clinical and diagnostic features, and control of canine cardio-pulmonary angiostrongylosis. Vet Res. 2014; 45:92.

Eston MR, Menezes GV, Antunes AZ, Santos ASR. Espécie invasora em unidade de conservação: *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) no Parque Estadual Carlos Botelho, Sete Barras, SP, Brasil, São Paulo. Rev. Inst. Flor. 2006;18: 173-179.

Espírito-Santo MC, Pinto PL, da Mota DJ, Gryscek RC. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2013; 55: 129-132.

Fellowes RA, Dougan PM, Maule AG, Marks NJ, Halton DW. Neuromusculature of the ovijector of *ascaris suum* (Ascaroidea, nematoda): an ultrastructural and immunocytochemical study. J Comp Neurol. 1999 ;415(4):518-28.

Fontanilla I KC, Wade CM. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in the giant African land snail *Achatina fulica* in French Polynesia detected using the SSU rRNA gene. Trop Biomed. 2012; 29(4):642-5.

Franco-Acuña DO, Pinheiro J, Torres EJ, Lanfredi RM, Brandolini SV. Nematode cysts and larvae found in *Achatina fulica* Bowdich, 1822. J Invertebr Pathol. 2009;100(2):106-10.

Furuta E, Yamaguchi K, Shimozawa A. The ultrastructure of hemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata). Anatomischer Anzeiger. 1986; 162: 215–224.

Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, Mitta G, Gourbal B, Duval D. Biomphalysin, a new β pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog. 2013. 9(3):e1003216.

Giannelli A, Ramos RA, Annoscia G, Di Cesare A, Colella V, Brianti E, Dantas-Torres F, Mutafchiev Y, Otranto D. Development of the feline lungworms *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior* in *Helix aspersa* snails. Parasitology. 2014; 141(4):563-9.

Gines TB, Davidson MW. Education in Microscopy and Digital Imaging. 2017. www.zeiss-ampus.magnet.fsu.edu/tutorials/ópticalsectioning/ApoTome/indexflash.html

González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2012; 142: 1–16.

Guilhon J. Evolution larvaire d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet,1866) dans l'organisme d'Arionidés, Comptes rendus Acad. Sci, Série D. 1965; 261:4225-4227.

Guilhon J, Cens B. Migrations et évolution d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) dans l'organisme du chien. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. Série D. 1969; 269.

Guilhon J, Afghahi A. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) in organisms of various species of terrestrial molluscs. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D, Sciences naturelles*. 1969; 268 (2):434-436.

Guilhon J, Cens B. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Etude biologique et morphologique. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 1973; 48: 567-596.

Gupta S, Wang Y, Jiang H. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005; 35(3):241-8.

Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagné F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol.* 2013;126:393-403.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 2001; 87: 778-785.

Hata H, Kojima S. *Angiostrongylus cantonensis*: in vitro cultivation from the first-stage to infective third-stage larvae. *Exp Parasitol.* 1990; 70(4):476-82.

Henrique SJB, Pereira SCSB, Vasconcellos MC. *Achatina fulica* BOWDICH, 1822 (Mollusca, Gastropoda) e a saúde pública. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA do Brasil, Caxambu. 2007. Anais. Caxambu: Congresso de Ecologia do Brasil, 2007.

Hu Y, Wang Y, Deng J, Jiang H. The structure of a prophenoloxidase (PPO) from *Anopheles gambiae* provides new insights into the mechanism of PPO activation. *BMC Biol.* 2016;14(1):2.

Hu X, Du J, Tong C, Wang S, Liu J, Li Y, He C. Epidemic status of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan island, China. *Asian Pac J Trop Med.* 2011;4(4):275-7.

Incani RN, Caleiras E, Martín M, González C. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2007; 49(3):197-200.

Ishih A, Rodriguez BO, Sano M. Scanning electron microscopic observations of first- and third-stage larvae and adults of *Angiostrongylus costaricensis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1990; 21(4):568-73.

Jayashankar M, Murthy GS. Record of gut associated nemathelminth in the giant African snail *Achatina fulica* (Bowdich) from Bangalore, India. *J Parasit Dis.* 2015; 39(2):144-6.

Jefferies R, Vrhovec MG, Wallner N, Catalan DR. *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus* sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in cats inhabiting Ibiza, Spain. *Vet Parasitol.* 2010; 173(3-4):344-8.

Junqueira, L.C.U.; Bignolas, G. & Brentani, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 1979; 11: 447-455.

Kistler WM, Brown JD, Allison AB, Nemeth NM, Yabsley MJ. First report of *Angiostrongylus vasorum* and Hepatozoon from a red fox (*Vulpes vulpes*) from West Virginia, USA. *Vet Parasitol.* 2014; 200(1-2):216-20.

Kwon E, Ferguson TM, Park SY, Manuzak A, Qvarnstrom Y, Morgan S, Ciminera P, Murphy GS. A severe case of *Angiostrongylus* eosinophilic meningitis with encephalitis and neurologic sequelae in Hawai'i. *Hawaii J Med Public Health.* 2013; 72(6 Suppl 2):41-5.

Laitano AC, Genro JP, Fontoura R, Branco SS, Maurer RL, Graeff-Teixeira C, Milanez JM, Chiaradia LA, Thomé JW. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34(1):95-7.

Liang X, Dong X, Moerman DG, Shen K, Wang X. Sarcomeres Pattern Proprioceptive Sensory Dendritic Endings through UNC-52/Perlecan in *C. elegans*. *Dev Cell.* 2015;33(4):388-400.

Lian-yin H, Ash LR, Voge M. Scanning Electron Microscope Studies of Adults, First- and Third-Stage Larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 51(1), 1984, pp. 85-91.

Lima WS, Araujo Costa HM, Guimarães MP, Leite AC. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1985; 80 (2): 233-235.

Lima AR, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ER, Rosa Lda R, Duarte FS, Teixeira AO, Costa ZR, Ferreira ML. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2009; 67 (4): 1093-1096.

Lima WS, Guimaraes MP, Lemos IS. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. *J. Helminthol.* 1994; 68: 87.

Lindo JF, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard ML, Sullivan JJ, Bishop HS, Robinson DG, Holtz T, Robinson RD. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(3):324-6.

López C, Panadero R, Paz A, Sánchez-Andrade R, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P. Larval development of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Angiostrongylidae) in

experimentally infected *Cerņuella (Cerņuella) virgata* (Mollusca, Helicidae). Parasitol Res. 2005; 95(1):13-6.

Lv S, Zhang Y, Liu HX, Zhang CW, Steinmann P, Zhou XN, Utzinger J. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. Parasitol Res. 2009;104(6):1351-9.

Maldonado Jr A, Simões RO, Oliveira AP, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, Monteiro SS, Torres EJ, Thiengo SC. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(7):938-41.

Mendonça CL, Carvalho OS, Mota EM, Lenzi HL. Development of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 (Nematoda: Angiostrongylidae) larvae in the intermediate host *Sarasinula marginata* (Semper 1885) (Mollusca: Soleolifera). Parasitol Res. 2008;102(5):861-5.

Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. FEBS Lett. 2000; 476: 185-190.

Moreira VL, Giese EG, Melo FT, Simões RO, Thiengo SC, Maldonado A Jr, Santos JN. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. Acta Trop. 2013;125(1):90-7.

Morgan ER, Shaw SE, Brennan SF, De Waal TD, Jones BR, Mulcahy G. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. Trends Parasitol. 2005;21(2):49-51.

Morgan E, Shaw S. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and developments in diagnosis and treatment. J Small Anim Pract. 2010;51(12):616-21.

Mozzer LR, Lima WS, Vidigal THDA. Desenvolvimento dos estádios evolutivos de *Angiostrongylus vasorum* em moluscos do gênero *Omalonyx* e aspectos clínicos da angiostrongilose em *Canis familiaris*. 2010. 99 pp. enc. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

Mozzer LR, Montresor LC, Vidigal TH, Lima WS. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. Journal of Parasitology Research. 2011; 2011, 4 p.

Mozzer LR, Coaglio AL, Dracz RM, Ribeiro VM, Lima WS. The development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822). J Helminthol. 2015;89(6):755-9.

Mozzer LR, Lima WS. *Gallus gallus domesticus*: paratenic host of *Angiostrongylus vasorum*. Vet Parasitol. 2015;207(1-2):81-4.

Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ 2007. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. ISJ. 2007;4: 101-111.

Neuhauss E, Fitarelli M, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(1):49-52.

Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JI. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. Int J Biochem Cell Biol. 2004 ;36(3):390-4.

Ohlweiler FP, Guimarães MC, Takahashi FY, Eduardo JM. Current distribution of *Achatina fulica*, in the state of São Paulo including records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(4):211-4.

Oliveira AP, Gentile R, Maldonado Júnior A, Lopes Torres EJ, Thiengo SC. *Angiostrongylus cantonensis* infection in molluscs in the municipality of São Gonçalo, a metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil: role of the invasive species *Achatina fulica* in parasite transmission dynamics. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(6):739-44.

Oliveira APM, Torres E JL, Maldonado JrA, Araújo JLB, Fernandez MA, Thiengo SC. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. Ver. Patol. Tropical. 2010; 39 (3): 199-210.

Ottaviani E. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). Italian Journal of Zoology 1992; 59(2):129-139.

Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993; 195: 984-988.

Ottaviani E, Malagoli D, Franchini A. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. *Prog Mol Subcell Biol.* 2004;34:1-25.

Ottaviani E. Molluscan immunorecognition ISJ. 2006;3: 50-63.

Palgunow D, Klapper M, and Döring F. Dietary Restriction during Development Enlarges Intestinal and Hypodermal Lipid Droplets in *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2012; 7(11): e46198.

Paula-Andrade C. *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Protostrongylidae): Aspectos do desenvolvimento dos estádios evolutivos em *Melanoides tuberculata* (Caenogastropoda: Thiaridae), *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Xanthonychidae) e *Sarasinula marginata* (Soleolifera: Veronicellidae). Dissertação de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte. 2012; 104 pp.

Pena GP, Andrade Filho J, de Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the State of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995;37(4):369-74.

- Perazzolo LM, Barracco MA. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev Comp Immunol*. 1997;21(5):385-95.
- Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PM, Lima WS, Negrão-Corrêa D. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. 2006; 98: 224-233.
- Pereira CAJ. Caracterização da atividade de moléculas solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila* Taim envolvidos na morte dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* cultivados *in vitro*. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, 2009; 198 pp.
- Rambo PR, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil--prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(1):9-14.
- Ray M, Bhunia NS, Bhunia AS, Ray S. A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(1):244-53.
- Rebello KM, Siqueira CR, Ribeiro EL, Valente RH, Mota EM, Perales J, Neves-Ferreira AG, Lenzi HL. Proteolytic activity in the adult and larval stages of the human roundworm parasite *Angiostrongylus costaricensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):752-9.
- Rebello KM, Menna-Barreto RF, Chagas-Moutinho VA, Mota EM, Perales J, Neves-Ferreira AG, Oliveira-Menezes A, Lenzi H. Morphological aspects of *Angiostrongylus costaricensis* by light and scanning electron microscopy. *Acta Trop*. 2013;127(3):191-8.
- Rosen L, Ash LR, Wallace GD. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Am J Vet Res*. 1970; 31(1): 131-143.
- Sarma RR, Munsri M1, Ananthram AN. Effect of Climate Change on Invasion Risk of Giant African Snail (*Achatina fulica* Férussac, 1821: Achatinidae) in India. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0143724.
- Satyavathi VV, Minz A, Nagaraju J. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell Signal*. 2014; 26(8):1753-63.
- Sauerländer R, Eckert J. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). *A Parasitenkd*. 1974; 44: 59-72.
- Simião MS, Fischer ML. Estimativa e inferências do método de controle do molusco exótico *Achatina fulica* Bowdich 1822 (Stylommatophora; Achatinidae) em Pontal do Paraná, Litoral do Estado do Paraná, Paraná. *Cad. biodivers*. 2004; 4(2): 74-84.
- Souza JG, Garcia JS, Manso PP, Neves RH, Maldonado A Jr, Machado-Silva JR. Development of the reproductive system of *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy. *Exp Parasitol*. 2011;128(4):341-6.

- Souza, S. D. S., Andrade, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101(SUPPL. 1):213–218.
- Souza SS, Andrade ZA. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2012; 107(5): 598-603.
- Song L, Wang X, Yang Z, Lv Z, Wu Z. *Angiostrongylus cantonensis* in the vector snails *Pomacea canaliculata* and *Achatina fulica* in China: a meta-analysis. *Parasitol Res*. 2016; 115(3):913-23.
- Sritunyalucksana K, Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*. 2000; 191:53–69.
- Stockdale-Walden HD, Slapcinsky J, Qvarnstrom Y, McIntosh A, Bishop HS, Rosseland B. *Angiostrongylus cantonensis* in Introduced Gastropods in Southern Florida. *J Parasitol*. 2015;101(2):156-9.
- Teixeira CG, Thiengo SC, Thome JW, Medeiros AB, Camillo-Coura L, Agostini AA. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88(3):487-9.
- Thiengo SC, Vicente JJ, Pinto RM. Redescription of *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* Morera & Céspedes (nematoda, metastrongyloidea) from a brazilian strain. *Rev. Bras. Zool*. 1997; 14(4): 839-844.
- Thiengo SC, Fernandez MA, Torres EJ, Coelho PM, Lanfredi RM. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *J Invertebr Pathol*. 2008; 98(1):34-9.
- Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres EJ, Caldeira R, Carvalho OS, Oliveira AP, Simões RO, Fernandez MA, Lanfredi RM. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop*. 2010;115(3):194-9.
- Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v. 140, p. 19-26, 1994.
- Travassos L. Novos nematódeos. *Bol. Biol*. 1927; 6:52-61.
- Travassos L. Introdução ao estudo da helmintologia. *Revista brasileira de biologia*. 1950. 174 pg.
- Valente R, Diaz JI, Salomón OD, Navone GT. Natural infection of the feline lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* in the invasive snail *Achatina fulica* from Argentina. *Vet Parasitol*. 2017;235:17-19.
- Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia GM. Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1997;116(4):453-8.

Vasconcellos MC, Pile E. Occurrence of *Achatina fulica* in the Vale do Paraíba, Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2001; 35(6):582-4.

Vitta A, Polseela R, Nateeworanart S, Tattiyapong M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4(8):597-9.

Vlisidou I, Wood W. Drosophila blood cells and their role in immune responses. *FEBS J*. 2015; 282(8):1368-82.

Williamson SM, Robertson AP, Brown L, Williams T, Woods DJ, Martin RJ, Sattelle DB, Wolstenholme AJ. The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000517.

Xu N, Zhang SO, Cole RA, McKinney SA, Guo F, Haas JT, Bobba S, Farese RV Jr, Mak HY. The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol*. 2012;198(5):895-911. doi: 10.1083/jcb.201201139. Epub 2012 Aug 27.

Yang B1, Lu A, Peng Q, Ling QZ, Ling E. Activity of fusion prophenoloxidase-GFP and its potential applications for innate immunity study. *PLoS One*. 2013; 8(5):e64106.
Yousif F, Ibrahim A. The first record of *Angiostrongylus cantonensis* from Egypt. *Z Parasitenkd*. 1978;56(1):73-80.

Zeng X, Wei J, Wang J, Wu F, Fung F, Wu X, Sun X, Zheng H, Lv Z, Wu Z. *Angiostrongylus cantonensis*: Scanning Electron Microscopic Observations on the Cuticle of Moulting Larvae. *Korean J Parasitol*. 2013; 51(6): 633–636. doi: 10.3347/kjp.2013.51.6.633

Zhang RL, Chen MX, Gao ST, Geng YJ, Huang DN, Liu JP, Wu YL, Zhu XQ. Enzootic angiostrongyliasis in Shenzhen, China. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(12):1955-6.