

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

**ISABELA RESENDE ÁVILA**

***Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) COMO HOSPEDEIRO  
PARATÊNICO DE *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866)  
KAMENSKY, 1905**

**Belo Horizonte – MG  
2019**

**ISABELA RESENDE ÁVILA**

***Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) COMO HOSPEDEIRO PARATÊNICO DE  
*Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) KAMENSKY, 1905**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, área de concentração em Helmintologia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Prof. Dr. Walter dos Santos Lima  
Orientador  
Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante  
Coorientadora

**Belo Horizonte – MG  
2019**

*Aos meus pais, Cleber e Antonia, pelo amor e confiança imensuráveis.*

*Ao meu esposo, Matheus, pelo companheirismo, compreensão e amor.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelas oportunidades que me foram oferecidas e por permitir que esse sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, Antonia e Cleber, que são meus exemplos de vida e que sempre apoiaram minhas decisões, meus estudos e estiveram presentes em todos os momentos da minha vida. Essa conquista é nossa. Amo vocês!

Ao meu esposo, Matheus, pela amizade, cuidado, companhias nos finais de semana de experimento, nos corredores escuros do ICB e esforço em me fazer sorrir. Além de aguentar meus momentos de mau humor, de estresse e vibrar com minhas vitórias. Obrigada por toda a ajuda, amo você!

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa do Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho. Além de ter proporcionado a melhor experiência em campo, através da disciplina que nos leva em Januária. Aprendi muito!

À Sumara e Sibebe, secretárias do Departamento de Parasitologia, pela ajuda nas matrículas nas disciplinas, na concessão da bolsa, na marcação de apresentação de projeto e defesa, além dos conselhos.

À CAPES, pela concessão da bolsa, que me auxiliou durante a permanência na instituição e na participação de eventos de cunho científico.

Ao meu orientador, Prof. Walter dos Santos Lima, pelo acolhimento em seu laboratório - sem ao menos me conhecer-, pelos ensinamentos e conselhos de grande valia e pela oportunidade de desenvolver meu projeto de pesquisa. Muito obrigada!

À minha coorientadora, que nunca deixará de ser minha orientadora, Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante, pela orientação e ensinamentos que foram muito além de currículo, desde o ingresso à Universidade. Muito obrigada e sinto saudades!

À todos os professores, que contribuíram para minha formação intelectual e moral, desde os primeiros anos da escola, especialmente aos professores do Departamento de Parasitologia.

Ao Dr. Aytube Coaglio, pelas instruções e conselhos que foram de grande importância.

À Prof. Dra. Cíntia Pereira, por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À todos que abriram as portas de seus laboratórios para que eu pudesse agregar meus conhecimentos através das conversas e das experiências compartilhadas, permitindo meu crescimento profissional.

Aos funcionários do ICB, que sempre ajudaram em tudo que eu precisei, especialmente ao Weder pelo apoio e ajuda no canil.

Aos colegas do LABHELVET, que me ajudaram inúmeras vezes. Especialmente aos ICs que me auxiliaram nos momentos de descontração e também durante a execução do projeto. Não posso deixar de mencionar que a Olívia Soares também foi extremamente importante nesse período, visto que dividiu comigo todas as alegrias e tristezas de se fazer um mestrado. Obrigada!

Às amigas que fiz durante o mestrado, tornando os momentos difíceis um pouco mais fáceis, principalmente no período das disciplinas, seja dando conselho, seja ouvindo as lamentações. Passamos bons momentos juntas meninas! Obrigada Andreza, Bárbara, Flaviane, Ludmila e Olívia! Com certeza vocês fizeram a diferença em minha vida!

Aos meus familiares e amigos, que sempre torceram e acreditaram na minha conquista, especialmente minhas madrinhas que além disso, são tia e prima, Alcione e Eduarda. Aos meus primos Bruno e Joãozinho que me alegraram durante essa fase da minha vida.

Por fim, peço desculpas as pessoas que eu possa ter esquecido, mas as agradeço pela participação nesses 2 anos, seja através de orações, de palavras de incentivo e de conselhos.

*“Ama-se mais o que se conquista com esforço. ”*  
*(Benjamin Disraeli)*

## RESUMO

*Angiostrongylus vasorum* é um nematoide, cujas formas adultas podem ser encontradas nas artérias pulmonares e coração direito de cães domésticos e canídeos silvestres, que são os hospedeiros definitivos. Além da importância na clínica de pequenos animais, este parasito tem importância discutida em termos de saúde pública, devido à possibilidade de infecção humana. O ciclo heteroxeno, apresenta diversas espécies de moluscos como hospedeiros intermediários, que se infectam por ingestão e/ou penetração de larvas de primeiro estágio do parasito. Nos moluscos ocorrem duas mudas, de larva de primeiro estágio (L1) para L2 e L3, que é infectante para os hospedeiros definitivos. Além dessas vias de infecção, pode haver também a participação de hospedeiros paratênicos, que podem abrigar as L3, como por exemplo, rãs, camundongos, ratos e aves. Considerando que várias questões inerentes ao ciclo deste parasito ainda permanecem obscuras, o presente estudo teve como objetivo avaliar se *Biomphalaria glabrata* pode ser hospedeiro paratênico de *Angiostrongylus vasorum*, identificando as possíveis vias de penetração destas larvas, a rota migratória, além de descrever as possíveis alterações histológicas em diferentes tempos de infecção. Larvas de terceiro estágio foram recuperadas de moluscos da espécie *B. glabrata*, com 30 dias após infecção com 1.000 L1 de *A. vasorum*, utilizando o método de Baermann modificado. As L3 recuperadas foram utilizadas para infecção de moluscos da espécie *B. glabrata*, com o número de 100 L3+ (Larva de terceiro estágio advinda de molusco infectado com 100 L3). Larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* foram recuperadas vivas e ativas nos tecidos dos moluscos, demonstrando assim, a permissividade destes a infecção por L3+. Os demais exemplares de moluscos infectados, foram fixados em formol 10% para avaliação histológica, onde se observou a presença de larva no tecido e que as mesmas tendem a ficar na região cefalopodal. Em relação a viabilidade das L3+, ainda são necessários mais estudos, visto que dois cães sem raça definida foram submetidos a patê canino com a presença das L3+ e até o momento somente quatro L1 foram encontradas nas fezes dos cães. Este trabalho demonstra pela primeira vez, a possibilidade de *B. glabrata* participar como hospedeiro paratênico no ciclo de *A. vasorum*.

**Palavras-chave:** *Angiostrongylus vasorum*. *Biomphalaria glabrata*. Larva L3.

## ABSTRACT

*Angiostrongylus vasorum* is a nematode whose adult forms can be found in the pulmonary arteries and right heart of domestic dogs and wild canids, which are the definitive hosts. In addition to the importance in the small animal clinic, this parasite is discussed in terms of public health due to the possibility of human infection. The heteroxene cycle presents several molluscan species as intermediate hosts, which are infected by ingestion and / or penetration of first stage larvae of the parasite. In the molluscs two seedlings of first instar larvae (L1), L2 and L3 occur, which is infective to the definitive hosts. In addition to these infection routes, there may also be paratenic hosts, which may harbor L3, such as frogs, lizards, mice, rats and birds. Considering that several issues inherent to the cycle of this parasite still remain obscure, the present study aimed to evaluate if *Biomphalaria glabrata* can be paratenic host of *Angiostrongylus vasorum*, identifying the possible routes of penetration of these larvae, the migratory route, besides describing the possible changes at different times of infection. Third instar larvae were recovered from *B. glabrata* molluscs 30 days after infection with 1.000 L1 of *A. vasorum* using the modified Baermann method. The recovered L3 were used for infection of mollusks of the species *B. glabrata*, with the inoculum of 100 L3 + (larva of third stage coming from mollusc infected with 100 L3). Third-instar larvae of *A. vasorum* were recovered alive and active in the mollusc's tissues, thus demonstrating their permissiveness to L3 + infection. The other specimens of infected molluscs were fixed in 10% formaldehyde for histological evaluation, where the presence of larvae in the tissue was observed and they tended to remain in the cephalopodal region. Regarding the viability of L3 +, further studies are still needed, since two mixed breed dogs were submitted to canine pate with the presence of L3 + and so far only four L1 were found in the feces of the dogs. This work demonstrates, for the first time, the possibility of *B. glabrata* to participate as paratenic host in the *A. vasorum* cycle.

**Keywords:** *Angiostrongylus vasorum*. *Biomphalaria glabrata*. LarvaL3.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número médio de larvas de terceiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i> , liberadas espontaneamente por moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com 1.000 larvas de primeiro estágio de <i>A. vasorum</i> . As barras longitudinais representam o desvio padrão. Experimento realizado em quadruplicata com 45 moluscos.....	30
Figura 2 –	Sobrevivência de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com 1.000 larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	31
Figura 3 –	Número médio de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas pelo método de Baermann de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com 1.000L1 de <i>A. vasorum</i> . Cada ponto representa média e desvio padrão de quatro experimentos independentes .....	31
Figura 4	Número médio de L3+ liberadas espontaneamente de moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> infectado com 100 L3/molusco.....	32
Figura 5 –	Sobrevivência em porcentagem de moluscos infectados com 100 L3 de <i>Angiostrongylus vosorum</i> .....	33
Figura 6 –	Larvas de terceiro estágio (L3) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> recuperadas pelo método de Baermann. A: L3+ proveniente de <i>B. glabrata</i> infectado com 100 L3. B: L3 proveniente de molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> infectado com 1.000 L1. A região circulada em amarelo indica a localização do par de estiletos quitinosos e a região circulada em vermelho, indica a cauda com apêndice digitiforme. Barra: 50µm.....	34
Figura 7 –	Larva de terceiro estágio (L3+) (setas amarelas) na musculatura da região cefalopodal, 30 minutos após a exposição de <i>B. glabrata</i> à suspensão de 100 L3+ de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . Aumento: 60x; Barra 15µm; Coloração: HE.....	35
Figura 8 –	Região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> uma hora após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . As setas amarelas indicam a presença de L3+ com destruição do músculo (asteriscos amarelos). Aumento: 60x; Barra: 15 µm; Coloração: HE.....	36
Figura 9 –	Região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> duas horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . As setas amarelas indicam a presença de L3+. Aumento: 10x; Barra: 200 µm; Coloração: HE.....	36
Figura 10 –	Larva de terceiro estágio (L3+) (setas amarelas) na região cefalopodal, 4 horas após a exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> à suspensão de 100 L3+ de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . Os asteriscos amarelos indicam o rompimento das fibras musculares da região cefalopodal do molusco. Aumento: 40x; Barra: 50 µm; Coloração: HE.....	37

Figura 11 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> no interior da rádula de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 4 horas após a exposição à suspensão de 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> . Aumento: 10x; Barra: 200 µm; Coloração: HE.....	37
Figura 12 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> no interior do tubo digestivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 4 horas após a exposição à 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> . Aumento: 20x; Barra: 100µm; Coloração: HE.....	38
Figura 13 – Região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> cinco horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 40x; Barra: 25µm; Coloração: HE.....	38
Figura 14 – Região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> cinco horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 20x; Barra: 100µm; Coloração: HE.....	39
Figura 15 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> no interior do tubo digestivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 5 horas após a exposição à 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> . Aumento: 60x; Barra: 15µm; Coloração: HE.....	39
Figura 16 – Região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> 12 horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 40x; Barra: 25 µm; Coloração: HE.....	40
Figura 17 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> na região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 2 dias após a exposição à 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> , com área de infiltrado inflamatório (círculo amarelo). Aumento: 40x; Barra: 25µm; Coloração: HE.....	41
Figura 18 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> na região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 5 dias após a exposição à 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> e ausência de infiltrado inflamatório (estrela azul). Aumento: 10x; Barra: 200 µm; Coloração: HE.....	41
Figura 19 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> na região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 7 dias após a exposição à 100 L3+ de <i>A. vasorum</i> e ausência de infiltrado inflamatório (estrela azul). Aumento: 20x; Barra: 50µm; Coloração: HE .....	42

- Figura 20 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* 11 dias após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 40x; Barra: 25 µm; Coloração: HE..... 43
- Figura 21 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* 15 dias após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 20x; Barra: 50 µm; Coloração: HE..... 43

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

L1	Larva de primeiro estágio;
L2	Larva de segundo estágio;
L3	Larva de terceiro estágio;
L3+	Larva de terceiro estágio advinda de molusco infectado com 100 L3;
HI	Hospedeiros Intermediários;
HD	Hospedeiros Definitivos;
HP	Hospedeiros Paratênicos;
DPI	Dias pós infecção;
HE	Hematoxilina-Eosina;
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácido;
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
h	Horas;
µm	Micrômetros;
mm	Milímetros;
L	Litros;
µl	Microlitros;
mL	Mililitros;
cm	Centímetros.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	15
1.1	HISTÓRICO .....	16
1.2	BIOLOGIA .....	17
1.2.1	TAXONOMIA .....	17
1.2.2	MORFOLOGIA .....	18
1.2.3	CICLO - HOSPEDEIRO DEFINITIVO .....	18
1.2.4	CICLO - HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO .....	19
1.2.4.1	<i>Biomphalaria glabrata</i> .....	21
1.2.5	HOSPEDEIRO PARATÊNICO .....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1	<i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	25
4.2	OBTENÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO DE <i>A. vasorum</i> .....	25
4.3	INFECÇÃO DE MOLUSCOS COM L1 DE <i>A. vasorum</i> .....	26
4.4	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 E MORTALIDADE DOS MOLUSCOS INFECTADOS .....	26
4.4.1	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 .....	26
4.4.2	MORTALIDADE DOS MOLUSCOS INFECTADOS COM 1.000L1 .....	27
4.5	RECUPERAÇÃO DE L3 DE <i>A. vasorum</i> .....	27
4.6	INFECÇÃO DOS MOLUSCOS COM L3 DE <i>A. vasorum</i> .....	27
4.7	ROTA MIGRATÓRIA E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	27
4.8	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS L3 RECUPERADAS DO <i>B. glabrata</i> PARATÊNICO .....	28
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
5	RESULTADOS .....	30
5.1	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 EM <i>B. glabrata</i> INFECTADOS COM L1 DE <i>A. vasorum</i> .....	30

5.2	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 EM <i>B. glabrata</i> INFECTADOS COM L3 DE <i>A. vasorum</i> .....	32
5.3	PARTICIPAÇÃO DE <i>Biomphalaria glabrata</i> COMO HOSPEDEIRO PARATÊNICO DE <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	33
5.3.1	VIAS DE PENETRAÇÃO E ROTA MIGRATÓRIA DE L3 EM <i>B. glabrata</i> .....	34
5.3.2	VIABILIDADE DAS L3+ .....	44
6	DISCUSSÃO .....	45
7	CONCLUSÕES .....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Angiostrongylus vasorum* é um nematoide (Strongylida: Metastrongyloidea: Protostrongylidae: Angiostrongylinae) cujas formas adultas podem ser encontradas parasitando as artérias pulmonares e o coração direito de cães domésticos e diversas espécies de canídeos silvestres, que são os hospedeiros definitivos (HDs) do parasito (GUILHON, 1960; LIMA *et al.*, 1985; DUARTE *et al.*, 2007). No cão, a infecção pode passar despercebida e/ou causar doença associada à ocorrência de tosse, dispneia, intolerância ao exercício, perda de peso, vômitos, sinais neurológicos, deficiências cardíacas e morte (OLIVEIRA-JR *et al.*, 2006).

Além da importância na clínica veterinária de pequenos animais, este parasito tem importância discutida em termos de saúde pública, devido à possibilidade não descartada de infecção humana (ROSEN *et al.*, 1970).

O ciclo biológico de *A. vasorum* é do tipo heteroxeno, no qual diversas espécies de moluscos aquáticos e terrestres são os hospedeiros intermediários (HI). Com relação aos nematoides, os primeiros HIs podem ser invertebrados ou vertebrados (L1-L2-L3), quando há um segundo e/ou terceiro HIs, estes frequentemente, são vertebrados (L3) (CHUBB; BALL; PARKER, 2010).

Observa-se a participação de hospedeiros paratênicos (HP), especialmente no ciclo biológico dos nematoides, desempenhando importante papel na disseminação de muitas espécies desse filo (CHUBB; BALL; PARKER, 2010).

Quando os HP são vertebrados, foram descritos roedores, peixes, pássaros, anfíbios, répteis, que podem albergar formas evolutivas de espécies como: *Aelurostrongylus abstrusus* (nematoda), *Anguillicola crassus* (nematoda), *Dioctophyme renale* (nematoda), entre outras (JEŻEWSKI, 2013; MORAVEC; SKORIKOVA, 1995; PEDRASSANI *et al.*, 2009; SZÉKELY, 1994). Já quando são invertebrados, relata-se minhocas, copépodes (crustáceos), insetos (baratas, moscas, libélulas) e moluscos, que abrigam, por exemplo, *Aelurostrongylus abstrusus* (nematoda), *Anguillicola crassus* (nematoda), *Stephanurus dentatus* (nematoda), entre outros (FALSONE *et al.*, 2017; TROMBA, 1955).

Existem 18 espécies de *Angiostrongylus* descritas, nove delas estão presentes nas Américas (MALDONADO; SIMÕES; THIENGO, 2012). Apesar de serem pouco estudadas, três delas têm importância médico-veterinária: *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*.

Com relação à espécie *Angiostrongylus costaricensis* não foram encontrados na literatura relatos da participação de HP. Para *A. cantonensis* existem relatos de camarões, caranguejos terrestres, sapos, lagartos, planárias predadoras terrestres, peixes, bezerros e porcos

como HP do parasito (ALICATA, 1965; WANG, 2012). Para *A. vasorum* já foram descritos, rãs, camundongos, ratos e aves domésticas atuando como HP (BOLT *et al*, 1993; BOLT *et al*, 1994; MOZZER; LIMA, 2015).

Considerando que vários aspectos da biologia de *A. vasorum* são pouco conhecidos, como por exemplo, HIs naturalmente infectados, estudos que visem elucidar questões inerentes ao ciclo e formas de transmissão são de grande importância para a compreensão da epidemiologia da angiostrongilose canina.

## 1.1 HISTÓRICO

Serres relatou, em 1853, a primeira ocorrência do *A. vasorum*, quando observou alguns nematoides parasitando o coração e pulmões de um cão em que foi feita a necropsia na Escola de Veterinária de Toulouse, na França (SERRES, 1854). Baillet (1866) fez a primeira descrição taxonômica do parasito, denominando-o de *Strongylus vasorum* (BAILLET, 1866) e posteriormente Kamensky, em 1905, revisou a taxonomia da espécie e a denominou de *Angiostrongylus vasorum*.

O parasito *A. vasorum* apresenta uma distribuição cosmopolita, caracterizada por áreas enzoóticas, como o sudoeste da França (GUILHON E CENS, 1973) e regiões com ocorrências isoladas do parasito como no caso do Brasil (BOLT *et al.*, 1994; JEFFERY *et al*, 2004).

Travassos (1927) fez o primeiro relato do parasitismo de canídeos por *A. vasorum*, quando descreveu *Haemostrongylus railliet* (= *A. vasorum*) recuperado do ventrículo direito e artéria pulmonar de cachorros do mato (*Cerdocyon thous azarae*), provenientes do município do Rio de Janeiro - RJ. Em 1961, Gonçalves relatou, pela primeira vez no Brasil, *A. vasorum* parasitando cães domésticos no Rio Grande do Sul. Posteriormente, foram relatados casos de infecções naturais por: Langenegger *et al.* (1962), que registraram a ocorrência de dois cães naturalmente infectados, provenientes do município do Rio de Janeiro; Fehringer e Fiedler (1977), que citaram a ocorrência de dois casos de *A. vasorum* em cães no município de Salvador- BA; e Giovanonni *et al.* (1985), que relataram a ocorrência de *A. vasorum* em um cão adulto, procedente do interior do Estado do Paraná.

Lima *et al* em 1985, realizaram a descrição morfológica de espécimes de *A. vasorum*, recuperados das artérias pulmonares de dois cães, procedentes do município de Caratinga – MG. Na ocasião, os autores recuperaram L1 de *A. vasorum* provenientes das fezes de um dos animais e realizaram a infecção experimental de moluscos da espécie *B. glabrata*. Essa cepa



isolada foi utilizada por Costa (1992) para fazer a descrição morfológica das formas adultas de *A. vasorum* e analisou comparativamente as descrições feitas do parasito colocando como sinônimos de *A. vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky 1905 as seguintes espécies: *Strongylus vasorum* Baillet, 1866; *Entomozoa filaria cardíaca* Bossi, 1971; *Haemonchus vasorum* (Baillet, 1866) Sluiter e Swellengrebel, 1912; *Haemostrongylus railliet* (Baillet, 1866) Railliet e Henry, 1907; *Haemostrongylus railliet* Travassos, 1927; *Angiostrongylus railliet* (Travassos, 1927) Dougherty, 1946; *Angiocaulus railliet* (Travassos, 1927) Grisi, 1971. Posteriormente, Lima, Guimarães e Lemos (1994) relataram a infecção natural por *A. vasorum* em *Dusicyon vetulus* na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Duarte *et al* em 2007, fizeram relato da ocorrência de *A. vasorum* no município de Juiz de Fora no Estado de Minas Gerais, que foram recuperados dos pulmões e átrio direito de cachorros do mato (*Cerdocyon thous*).

## 1.2 BIOLOGIA

### 1.2.1 TAXONOMIA

A posição taxonômica da espécie *Angiostrongylus vasorum*, revisada por Costa *et al.* (2003), levando-se em consideração a sistemática molecular (Blaxter *et al.*, 1998) é:

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Ordem: Strongylida

Superfamília: Metastrongyloidea

Família: Protostrongylidae

Subfamília: Angiostrongylinae

Gênero: *Angiostrongylus* Kamensky, 1905

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

### 1.2.2 MORFOLOGIA

A forma adulta de *A. vasorum* caracteriza-se por apresentar corpo delgado e cilíndrico, ligeiramente atenuado nas extremidades, coloração esbranquiçada ou rósea quando recém-colhidos. A cutícula é fina e transparente, deixando perceber o aspecto helicoidal dos órgãos genitais em torno do tubo digestivo, contrastando sua coloração esbranquiçada com a tonalidade rósea ou acinzentada do intestino (LIMA *et al.*, 1985; COSTA, 1992).

As larvas de primeiro estágio (L1) possuem a extremidade anterior arredondada, com cutícula transparente e o esôfago é do tipo filarióide (GUILHON E CENS, 1973). O tamanho da larva é variável, a cauda é fina, possui um entalhe dorsal e uma pequena ondulação ventral (GUILHON E CENS, 1973).

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

As larvas de terceiro estágio (L3), segundo Guilhon e Cens (1973), apresentam um par de estiletos quitinizados dispostos longitudinalmente na região anterior com comprimento de 15 a 16µm. A cauda apresenta um apêndice digitiforme com cerca de 2µm de comprimento. Apresenta um primórdio genital e é uma larva bastante móvel. Segundo Bessa *et al.* (2000), o comprimento das L3 variou de 418,2 a 527,3µm e a largura de 32,7 a 41,8µm.

### 1.2.3 CICLO - HOSPEDEIRO DEFINITIVO

O ciclo de transmissão tem início quando o HD se infecta ao ingerir: (i) HP que estão infectados com L3, como rãs, aves e pequenos mamíferos (ROSEN *et al.*, 1970; BOLT *et al.*, 1994; MOZZER; LIMA, 2015), (ii) HI infectados ou (iii) L3 que estão livres contaminando o ambiente (BARÇANTE *et al.*, 2003). Embora o molusco não faça parte da alimentação dos cães, a infecção pode ocorrer pela ingestão de moluscos de forma acidental, junto com água de ribeirões ou remansos, ou ainda, pelo hábito coprofágico realizado por muitos cães, que acabam por ingerir pequenos moluscos infectados que colonizam fezes caninas (BESSA, 1996).

Após a ingestão, as L3 vão adentrar no epitélio do trato digestivo do HD, migrar para os linfonodos mesentéricos, onde vão ocorrer mudas de L3 para L4 e por fim, adulto imaturo.

Os adultos imaturos vão para corrente linfática ou sanguínea e, aproximadamente, no décimo dia pós a infecção (DPI), podem ser encontrados no ventrículo direito do coração e na artéria pulmonar. No vigésimo dia após a infecção, os nematoides atingem a maturidade sexual e realizam a cópula. As fêmeas migram para as ramificações da artéria pulmonar e se inicia a postura de ovos não embrionados. Nessas ramificações, ocorre o embrionamento dos ovos até o desenvolvimento de L1, que vão eclodir e passar ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios. Como nesse estágio as larvas são muito ativas, elas migram para a traqueia, onde são expelidas junto a secreções pulmonares ou são deglutidas. Ao chegarem no trato digestivo, serão eliminadas nas fezes, a partir do vigésimo oitavo dia após infecção (CURY; LIMA, 1996). No ambiente, as L1 podem permanecer no bolo fecal ou atingir coleções de água e serem ingeridas ou penetrarem um molusco. (GUILHON E CENS, 1973)

#### **1.2.4 CICLO - HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO**

A participação de moluscos no ciclo de *A. vasorum* foi demonstrada por Guilhon (1960), quando encontrou lesmas do gênero *Arion*, naturalmente infectadas, com larvas do parasito capazes de infectar o cão. Outras espécies também foram encontradas naturalmente infectadas: *Tandonia sowerbyi*, e *Limacus maculatus* (AZIZ *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2014).

Estudos experimentais demonstraram que moluscos de diferentes espécies, terrestres e aquáticas, podem participar como possíveis HIs no ciclo de *A. vasorum*, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1- Espécies de moluscos descritas, experimentalmente, como hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus vasorum*.

<b>Espécie</b>	<b>Autores</b>
<i>Arion rufus</i>	Guilhon, 1965
<i>Helix aspersa</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Helix pomatia</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Cepaea nemoralis</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Arianta arbustorum</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Euparypha pisana</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Succinea putris</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Cochlodina laminata</i>	Guilhon e Afghahi, 1969
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Guilhon e Gaalon, 1969; Barçante <i>et al.</i> , 2003
<i>Laevicaulus alte</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Bradybaena similares</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Subulina octona</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970; Bessa <i>et al.</i> , 1996
<i>Prosopas javanicum</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Deroceras agrestes</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Deroceras leave</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Vitrea diáfana</i>	Rosen <i>et al.</i> , 1970
<i>Achatina fulica</i>	Sauerlander e Eckert, 1974; Coaglio <i>et al.</i> , 2016
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2006
<i>Omalyonx matheroni</i>	Mozzer <i>et al.</i> , 2011
<i>Melanoides tuberculata</i>	Paula-Andrade, 2012
<i>Sarasinula marginata</i>	Paula-Andrade, 2012
<i>Pomacea canaliculata</i>	Mozzer <i>et al.</i> 2014, Di Cesare <i>et al.</i> 2015

O molusco, ao se infectar com larvas de primeiro estágio (L1) do parasito (ingestão e/ou penetração percutânea) eliminadas junto com as fezes do HD, passa a fazer parte do ciclo como HI, no qual ocorrem as mudas de L1 para larva de segundo estágio (L2) e desta para larva de terceiro estágio (L3), que é a forma infectante para o HD (GUILHON, 1960).

#### 1.2.4.1 *Biomphalaria glabrata*

Diversos autores têm utilizado moluscos da espécie *B. glabrata* como modelo experimental e para manutenção do ciclo de *A. vasorum* em laboratório (LIMA *et al.*, 1985; BARÇANTE *et al.*, 2012).

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

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Subclasse: Pulmonata

Ordem: Basommatophora

Família: Planorbidae

Gênero: *Biomphalaria* (Preston, 1910)

Espécie: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

#### 1.2.5 HOSPEDEIRO PARATÊNICO

O ciclo biológico clássico de *A. vasorum* descrito na literatura envolve a participação de moluscos terrestres do gênero *Arion* e das espécies *Tandonia sowerbyi*, e *Limacus maculatus*, onde as larvas passam por duas mudas intramolusco até atingir o terceiro estágio evolutivo (L3), que é infectante para o cão (GUILHON, 1960). O HD pode se infectar através da ingestão de larvas de terceiro estágio, que podem estar no molusco ou através da ingestão do hospedeiro paratênico, como rãs, camundongos e ratos (BOLT *et al.*, 1993; BOLT *et al.*, 1994). Mozzer e Lima em 2015, comprovaram que aves da espécie *Gallus gallus domesticus* também tem sua participação como HP no ciclo desse parasito. Devido à possibilidade de diferentes espécies participarem do ciclo biológico de *A. vasorum* como HP e o ciclo biológico ainda apresenta aspectos que não foram estudados, são necessários mais estudos para se entender o comportamento do parasito em seus diferentes hospedeiros.

## 2 JUSTIFICATIVA

A infecção de cães e animais silvestres por *A. vasorum* têm sido frequentes em diversas partes do mundo, entretanto, o desenvolvimento desse nematóide em moluscos, HIs, ainda é pouco discutido. Observa-se a ocorrência de infecção natural em *Arion*, *Tandonia sowerbyi*, e *Limacus maculatus* (AZIZ *et al.*, 2016; GUILHON, 1960; PATEL *et al.*, 2014). Por outro lado, a permissividade comprovada por infecções experimentais foi demonstrada para vários gêneros de moluscos aquáticos e terrestres como por exemplo, *Arion*, *Helix*, *Succinea*, *Biomphalaria*, *Laevicaulus*, *Bradybaena*, *Subulina*, *Achatina*, *Omalonyx* e *Pomacea*.

Sabe-se que os HPs participam de 15% dos ciclos biológicos dos nematoides. Contudo, são poucos os trabalhos que descrevem a participação de HPs no ciclo de *A. vasorum*. Registros demonstram a participação de rãs, camundongos, ratos e aves domésticas como HPs em potencial de *A. vasorum* em condições experimentais.

Não existem trabalhos que avaliem a participação de moluscos como HPs de *A. vasorum*. Considerando que as larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* são liberadas no ambiente espontaneamente e/ou a partir de moluscos que morreram, torna-se relevante avaliar a possibilidade de L3 conseguirem infectar moluscos livres de infecção, aumentando as chances de sobrevivência e de dispersão do parasito.

Estudos que elucidem aspectos da biologia de *A. vasorum*, podem contribuir para o entendimento das alterações epidemiológicas inerentes à angiostrongilose canina. Além disso, a compreensão dessas lacunas no ciclo biológico permitirá o entendimento da ocorrência, sobrevivência e da dispersão do parasito, fazendo-se necessário, uma vez que, esse nematoide apresenta importância em termos de saúde pública, se encaixando na nova tendência mundial de Uma Saúde (One health).

### 3 OBJETIVOS

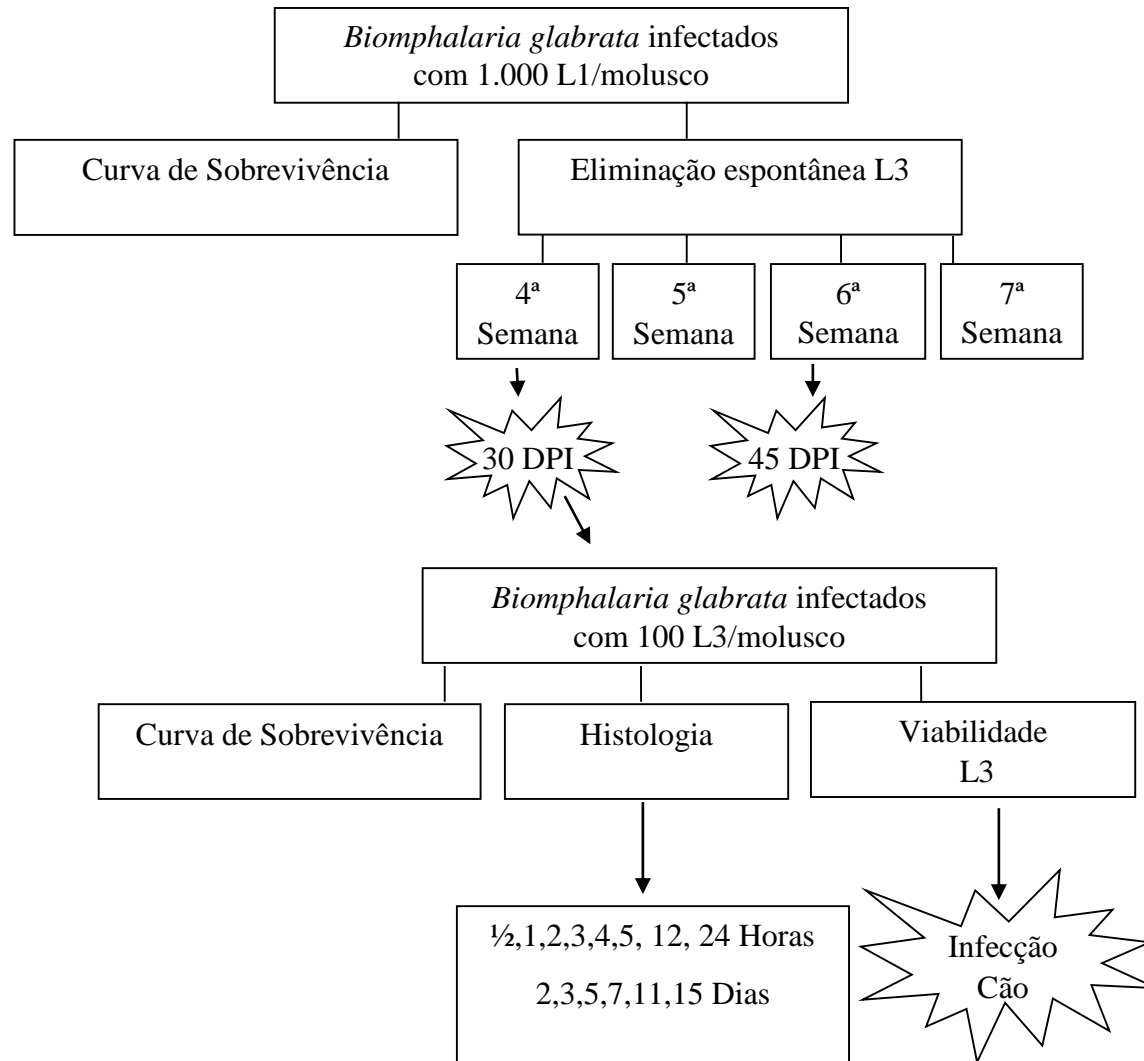
#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro paratênico de *Angiostrongylus vasorum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a cinética de liberação de larvas de terceiro estágio (L3) em *B. glabrata* infectados com larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum*;
- 2) Avaliar a participação de *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*;
  - 2.1 Identificar as vias de penetração de L3 de *A. vasorum* na infecção de *B. glabrata*, por meio de análises histológicas em diferentes tempos de infecção;
  - 2.2 Avaliar a cinética de liberação de L3 em *B. glabrata* infectados com L3 de *A. vasorum*;
  - 2.3 Avaliar a viabilidade das L3 recuperadas do hospedeiro paratênico, por meio da infecção de cães.

Esquema 1 – Desenho experimental adotado nesse projeto.





## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Um resumo do que foi feito neste trabalho, se encontra no esquema 1.

### 4.1 *Angiostrongylus vasorum*

A cepa de *A. vasorum* utilizada no presente trabalho, foi originalmente isolada das fezes de um cão naturalmente infectado, procedente do Município de Caratinga - MG (LIMA *et al.*, 1985) e vêm sendo mantida através de passagens sucessivas em cães, no Biotério de Cães do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG) e em moluscos *B. glabrata*, mantidos no moluscário do Laboratório de Helminologia Veterinária (LABHELVET - ICB - UFMG).

Os protocolos descritos neste trabalho encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG - protocolo 147/2011).

### 4.2. OBTENÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO DE *A. vasorum*

As larvas de primeiro estágio (L1) de *A. vasorum* foram recuperadas a partir de fezes de cães experimentalmente infectados utilizando o aparelho de Baermann modificado (BARÇANTE *et al.*, 2003), composto por um funil de vidro com 15 cm de diâmetro conectado a um tubo de hemólise unidos por um tubo de látex. As fezes foram enroladas em gaze dobrada quatro vezes e colocadas dentro dos funis contendo água aquecida a 42°C. Em função do hidro/termo tropismo positivo das larvas, estas saem das fezes e depositam-se pela força da gravidade no fundo dos tubos de hemólise.

Após um período de 24h, estes tubos foram retirados dos funis, os conteúdos transferidos para tubos de fundo cônico de 15mL e adicionada água afim de tornar o conteúdo mais limpo. Após a transferência do conteúdo, aguardou-se uma hora, para que as larvas pudessem decantar e o sobrenadante foi descartado até um volume de 3 mL e logo em seguida, re-suspendido em 15 mL de água de torneira. Esse processo foi repetido até que o conteúdo ficasse transparente e o volume final ajustado para 3mL. Em seguida, para contagem das L1, o conteúdo foi homogeneizado e três alíquotas de 10µl foram retiradas, depositadas sobre uma lâmina de vidro e levadas ao microscópio estereoscópio para quantificação das larvas vivas.

### **4.3 INFECÇÃO DE MOLUSCOS COM L1 DE *A. vasorum***

As infecções dos moluscos foram realizadas em placas de poliestireno com seis poços. Em cada poço foram colocados 3mL de água de torneira, 1.000 L1 de *A. vasorum* e um molusco *B. glabrata* com tamanho de concha variando entre 12-15mm. Para otimizar a infecção (BARÇANTE, 2006) as placas foram colocadas sob foco luminoso com uma lâmpada de 40W a uma distância de 25 cm, por um período de 24h.

Após esse período, retirou-se a luz e os conteúdos das placas de infecção foram observados em microscópio estereoscópico (40x) para quantificação das larvas que não infectaram os moluscos. Só foram incluídos nos procedimentos experimentais, aqueles moluscos que cujo processo de infecção apresentou um percentual de larvas remanescentes inferior a 10%, ou seja, menos de 100 L1/poço ao término da exposição luminosa. Quando a porcentagem de larvas encontradas nos poços de infecção foi superior a 10 % (mais de 100 L1/poço), os moluscos foram encaminhados para rotina do laboratório (manutenção do ciclo de *A. vasorum*).

Após a infecção, os moluscos foram transferidos para cubas plásticas com 2L de água, mantidas em temperatura ambiente e alimentados com folhas de alface 3 vezes na semana.

## **4.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 E MORTALIDADE DOS MOLUSCOS INFECTADOS**

### **4.4.1 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3**

Para determinar a cinética de liberação espontânea de L3 dos moluscos, foram utilizados 45 *B. glabrata* com tamanho de concha variando entre 12-15 mm, infectados com 1.000 L1 de *A. vasorum*. Após 20 dias de infecção, esses moluscos foram transferidos individualmente para copos de vidro contendo 30 mL de água. Diariamente, os espécimes eram transferidos para um novo recipiente contendo 30 mL de água. Este procedimento foi repetido até a morte dos mesmos. Após a transferência do molusco, manteve-se a água em repouso por 2h, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e posteriormente um volume de 10 mL foi transferido para placas de Petri, para verificação da presença de L3, utilizando microscópio estereoscópico (40x) afim de determinar a cinética de eliminação.

Em relação à moluscos infectados com 100 L3, para determinar a cinética de liberação espontânea de L3 desses moluscos, foram utilizados 30 *B. glabrata* com tamanho de concha

variando entre 12-15 mm, após 24 horas a 30 dias de infecção. A mesma metodologia citada acima foi utilizada (item 4.4.1).

#### **4.4.2 MORTALIDADE DOS MOLUSCOS INFECTADOS COM 1.000L1**

Os tecidos dos moluscos, que morreram durante o período de observação, foram seccionados com auxílio de tesoura cirúrgica colocados sob uma tela de 1 mm de espessura, mantido no interior de um cálice de vidro somente em contato superficial com a água. O cálice foi submerso em água destilada, num banho maria, por um período de 24h com uma temperatura de 37°C (PEREIRA, 2006). Decorrido este período, o conteúdo do cálice foi transferido para placas de Petri para análise e examinado em microscópio estereoscópio (40x) para verificação da presença de larvas de *A. vasorum*. Cada experimento foi realizado em quadruplicata.

#### **4.5 RECUPERAÇÃO DE L3 DE *A. vasorum***

Para a infecção de moluscos com L3 de *A. vasorum*, foram utilizados 80 *B. glabrata*, infectados com 1.000 L1 de *A. vasorum* com um período médio de 30 e 45 dias pós infecção. Coletou-se hemolinfa desses exemplares, centrifugou-se a 80g por 10 minutos, para separar os hemócitos da hemolinfa, e os dois materiais foram congelados para posterior avaliação.

Os tecidos dos moluscos foram separados das conchas e processados conforme descrito no item 4.4.2.

#### **4.6 INFECÇÃO DOS MOLUSCOS COM L3 DE *A. vasorum***

Após recuperação, as larvas foram contadas, o número de 100 L3/molusco foi utilizado para infecção de 120 exemplares de *B. glabrata*, livres de infecção, seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.3. Larvas na posição de “C” foram consideradas mortas (RICHINITTI *et al*, 1999).

#### **4.7 ROTA MIGRATÓRIA E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS**

Para identificar os locais de penetração das L3 nos moluscos, a rota migratória e as possíveis alterações histológicas provocadas pelas larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* em

*B. glabrata*, foram realizadas análises histológicas, utilizando técnicas descritas por Pan (1958) e Plesh *et al.* (1975).

Em cada intervalo, ½, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24h, 2, 3, 5, 7, 11, 15 dias após a infecção, dois exemplares infectados com 100 L3/molusco, tiveram as conchas perfuradas com uma mini furadeira (Storm 12.000RPM) para permitir melhor fixação em formalina (10% w/v em tampão fosfato de sódio - PBS pH 7,4) durante 12h. Após esse período, os moluscos foram transferidos para uma solução de EDTA 10% por um período suficiente para desmineralização das conchas, até que estas se tornassem maleáveis.

Os tecidos foram submetidos à desidratação em uma série crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%) por 30 minutos cada, seguido da diafanização que foi feita em três banhos de xilol (30 minutos cada) e incluídos em parafina. Secções histológicas de 4µm de espessura foram montadas em lâminas de vidro. Posteriormente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas com Entellan.

As imagens das lâminas foram capturadas por uma microcâmera Spot Insign Color adaptada a um microscópio Olympus (BX40) e transferidas para um analisador de imagem. Além da digitalização das lâminas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG (CAPI), analisando-as pelo programa Pannoramic Viewer 3D HISTECH.

#### **4.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS L3 RECUPERADAS DO *B. glabrata* PARATÊNICO**

Para avaliar a viabilidade das L3 recuperadas de *B. glabrata*, que foram infectados com 100 L3 de *A. vasorum*, dois cães sem raça definida, com idade de 60 meses (5 anos) e 3 meses (0,25 anos), peso de 6 kg e 2,5 kg, respectivamente, vermifugados e livres de infecção natural, foram utilizados.

As larvas previamente contadas foram misturadas a patê canino oferecido aos cães. A partir de 12 dias da ingestão, foram realizadas coletas das fezes 3x/semana para realização do método de Baermann e determinação do período pré-patente a partir da recuperação de L1.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados referentes à análise de sobrevivência dos moluscos, foram analisados no GraphPad Prism 5, utilizando comparação entre as curvas de sobrevivência, com pós teste de Log-rank.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 EM *B. glabrata* INFECTADOS COM L1 DE *A. vasorum*

A partir da quarta semana de infecção dos moluscos, com 1.000 larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*, verificou-se a eliminação espontânea de larvas de terceiro estágio (L3) de *A. vasorum*. Embora, sem diferença estatística, verificou-se uma tendência progressiva de queda no número médio de L3 eliminadas. Contudo, a eliminação permaneceu constante até a sétima semana de observação. (Figura 1).

Quanto à mortalidade dos moluscos, observou-se que na quarta semana após infecção, 3% dos moluscos morreram, na quinta semana em relação à semana anterior, esse índice aumentou 10%. Na sétima semana, todos os exemplares morreram (Figura 2). Como observou-se elevada mortalidade de moluscos infectados entre a sexta e sétima semana, optou-se pela recuperação de L3, para infecção de moluscos com 100 L3+ (Larva de terceiro estágio advinda de molusco infectado com 100 L3), entre a quarta e quinta semana (Figura 2).

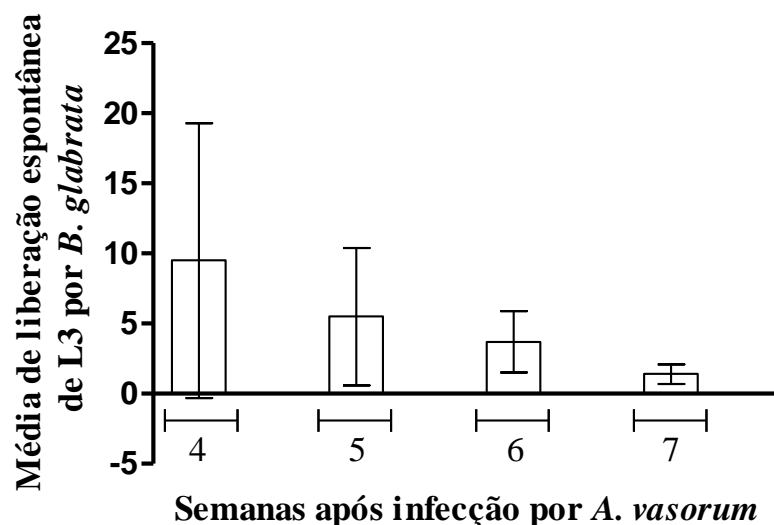


Figura 1 – Número médio de larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, liberadas espontaneamente por moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados com 1.000 larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*. As barras longitudinais representam o desvio padrão. Experimento realizado em quadruplicata com 45 moluscos.

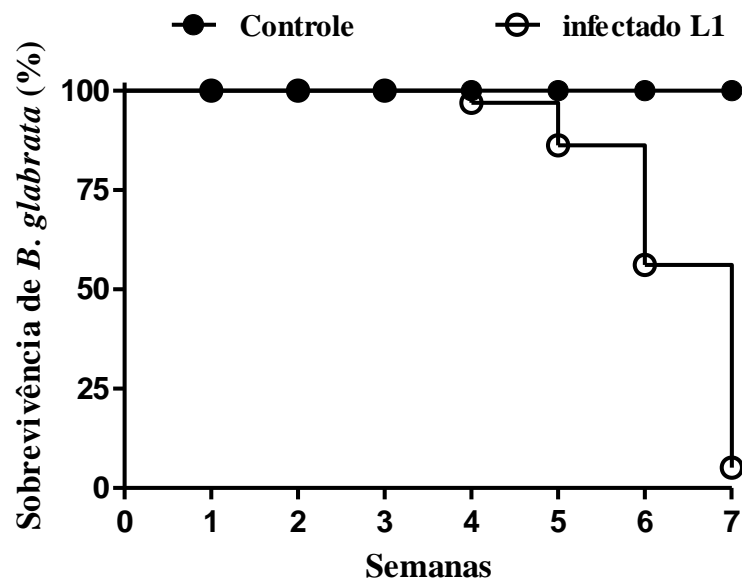


Figura 2 – Sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* infectados com 1.000 larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum*.

Durante todo o período experimental foi possível a recuperação de L3 vivas e ativas, a partir de tecidos de moluscos infectados com 1.000L1 de *A. vasorum*, submetidos ao método de Baermann modificado (Figura 3). Não foi observada diferença significativa no número de larvas recuperadas em relação ao tempo de infecção.

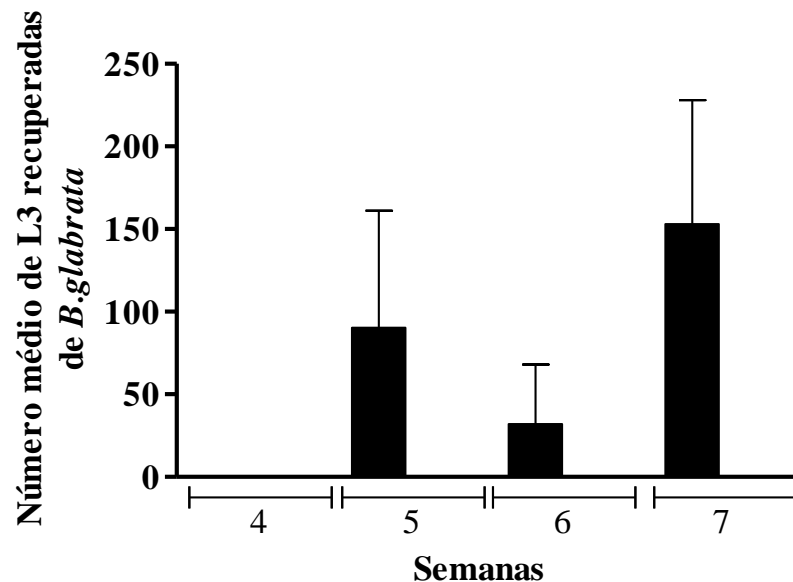


Figura 3 – Número médio de larvas de terceiro estágio (L3) de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas pelo método de Baermann de *Biomphalaria glabrata* infectados com 1.000L1 de *A. vasorum*. Cada ponto representa média e desvio padrão de quatro experimentos independentes.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE L3 EM *B. glabrata* INFECTADOS COM L3 DE *A. vasorum*

Com relação à cinética de eliminação de L3 a partir da infecção com L3+, verificou-se que o número médio de L3+ liberadas espontaneamente até 30 DPI foi de 2,1 L3+/molusco (Figura 4).

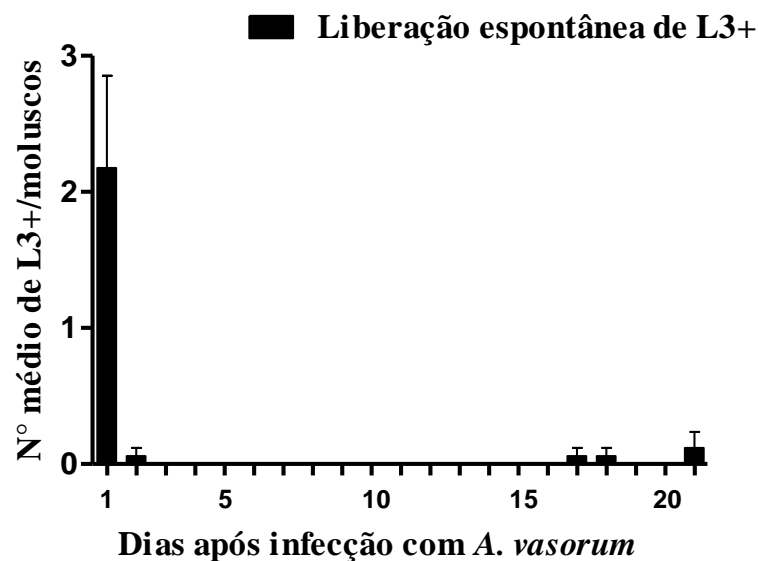


Figura 4 – Número médio de L3+ liberadas espontaneamente de moluscos *Biomphalaria glabrata* infectado com 100 L3/molusco.

Observou-se que após infecção de *B. glabrata* com L3+ de *A. vasorum* entre a primeira e segunda semana, a mortalidade foi de 12% dos moluscos. O padrão de sobrevivência manteve-se da segunda para a terceira semana. No entanto ao final da quarta semana morreram 30% dos moluscos que tiveram contato com a L3+ (Figura 4). Observa-se que a mortalidade do molusco infectado com L3+ (Figura 4) foi 24% maior do que na infecção com 1.000 L1 (Figura 2).



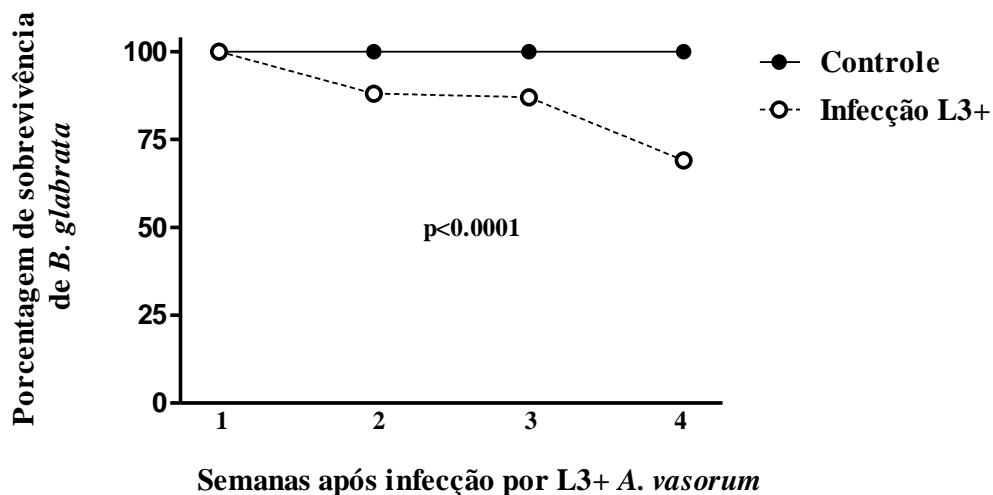


Figura 5 – Sobrevivência em porcentagem de moluscos infectados com 100 L3 de *Angiostrongylus vasorum*.

### 5.3 PARTICIPAÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* COMO HOSPEDEIRO PARATÊNICO DE *A. vasorum*

Após 24h de exposição de moluscos da espécie *B. glabrata* à 100 larvas de terceiro estágio (L3+), advindas de moluscos infectados com 1.000 L1, foi possível verificar que cerca de 80% das larvas penetraram e/ou foram ingeridas pelos moluscos. O percentual de larvas remanescentes na placa, em média, foi de 16,23 L3+/poço, com desvio padrão de 17,52 L3+/poço.

As características morfológicas das larvas recuperadas a partir de moluscos *B. glabrata*, confirmaram que estas eram L3 de *A. vasorum*, apresentando um par de estiletos quitinosos na região anterior do corpo e a cauda apresentando um apêndice digitiforme (GUILHON E CENS, 1973). Em relação à morfometria, 10 larvas foram medidas, verificando-se que as L3+ recuperadas apresentaram-se com comprimento médio de 635,55 $\mu$ m ( $\pm$ 13,46  $\mu$ m) e 30,51 $\mu$ m ( $\pm$ 1,94  $\mu$ m) de largura (Figura 6 A), quando comparadas com as medidas de 10 L3 provenientes de moluscos infectados com L1 de *A. vasorum*, tendo como comprimento médio 554,07 $\mu$ m ( $\pm$ 24,86  $\mu$ m) e 25,75 $\mu$ m ( $\pm$ 0,75 $\mu$ m) de largura (Figura 6 B).



Figura 6 – Larvas de terceiro estágio (L3) de *Angiostrongylus vasorum* recuperadas pelo método de Baermann. A: L3+ proveniente de *B. glabrata* infectado com 100 L3. B: L3 proveniente de molusco *Biomphalaria glabrata* infectado com 1.000 L1. A região circulada em amarelo indica a localização do par de estiletos quitinosos e a região circulada em vermelho, indica a cauda com apêndice digitiforme. Barra: 50µm.

### 5.3.1 VIAS DE PENETRAÇÃO E ROTA MIGRATÓRIA DE L3 EM *B. glabrata*

À análise histológica foi possível verificar a presença de L3+ de *A. vasorum*, na musculatura da região cefalopodal dos moluscos infectados, aos trinta minutos após a exposição às L3+ de *A. vasorum* (Figura 7).

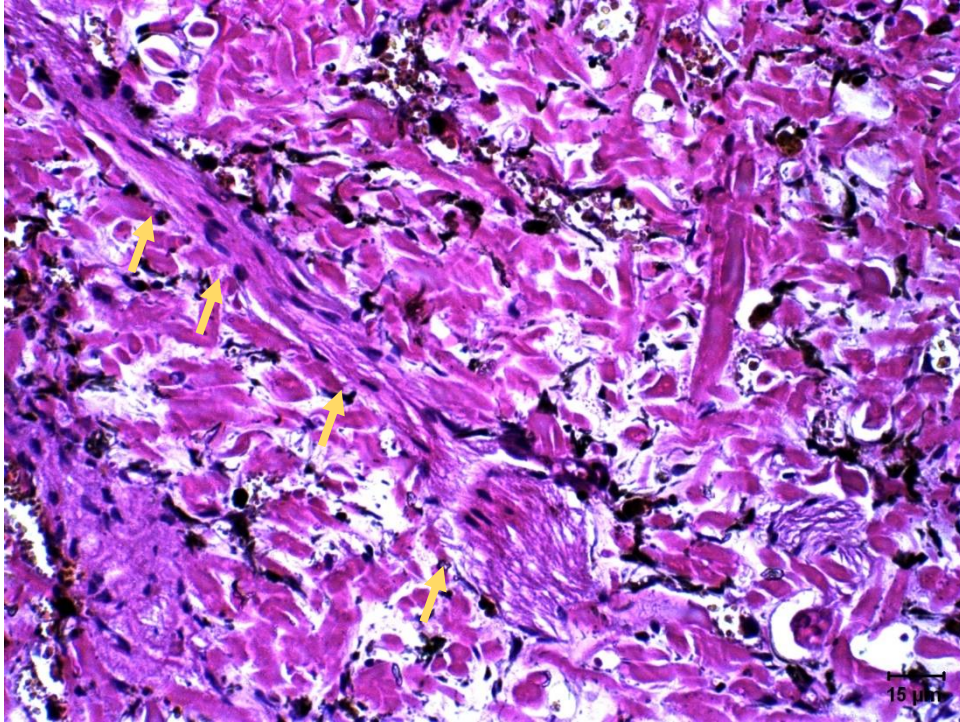


Figura 7 – Larva de terceiro estágio (L3+) (setas amarelas) na musculatura da região cefalopodal, 30 minutos após a exposição de *B. glabrata* à suspensão de 100 L3+ de *Angiostrongylus vasorum*. Aumento: 60x; Barra 15 $\mu$ m; Coloração: HE.

Após uma hora de exposição foi possível verificar que as L3+ destroem do músculo nas áreas de migração e o infiltrado inflamatório é evidenciado quando comparado com 30 minutos, observando-se infiltrado de células maiores (Figura 8). Duas horas após exposição a penetração das L3+ intensifica-se na região cefalopodal, como verificado às três horas após infecção (dados não demonstrados) (Figura 9).

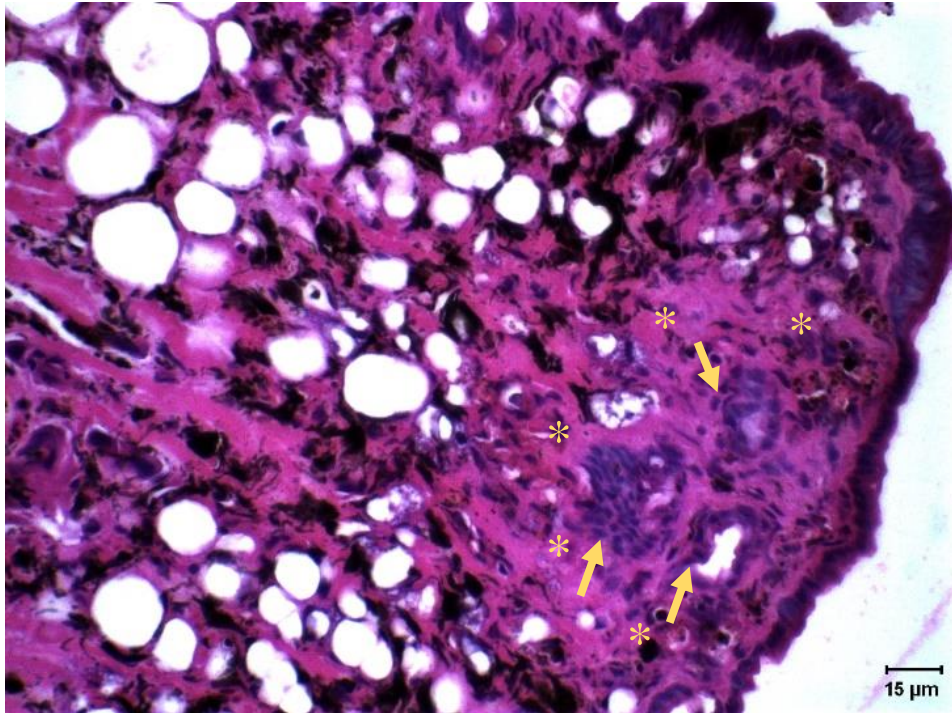


Figura 8 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* uma hora após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com destruição do músculo (asteriscos amarelos). Aumento: 60x; Barra: 15 μm; Coloração: HE.

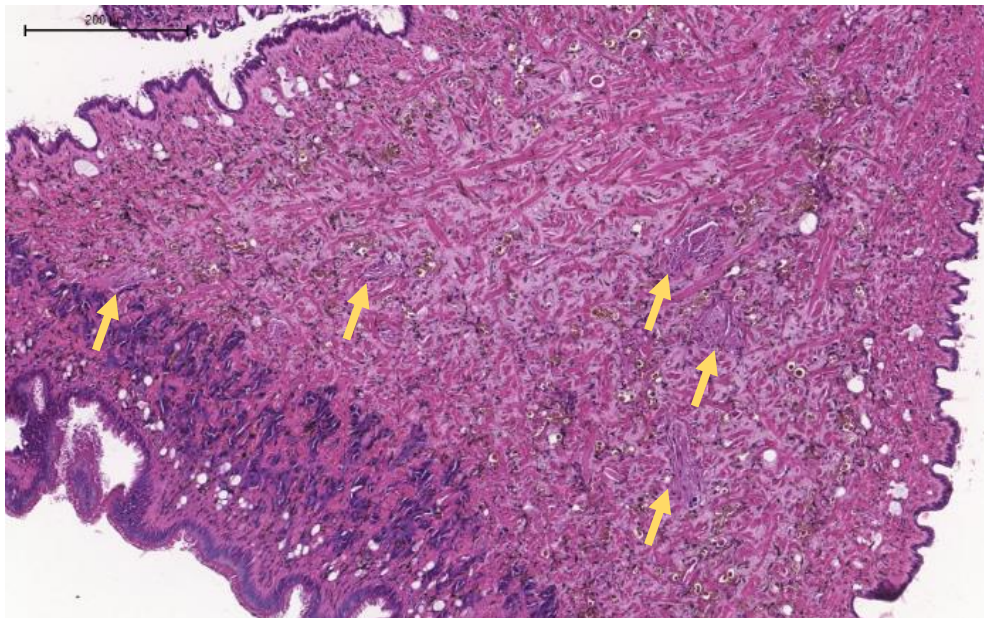


Figura 9 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* duas horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+. Aumento: 10x; Barra: 200 μm; Coloração: HE.

Quatro horas após infecção observou-se L3+ dentro da rádula e do tubo digestivo. Foi possível verificar que quando presentes no tecido muscular as larvas causaram a ruptura das fibras musculares conforme pode ser observado nas Figuras 10, 11 e 12.

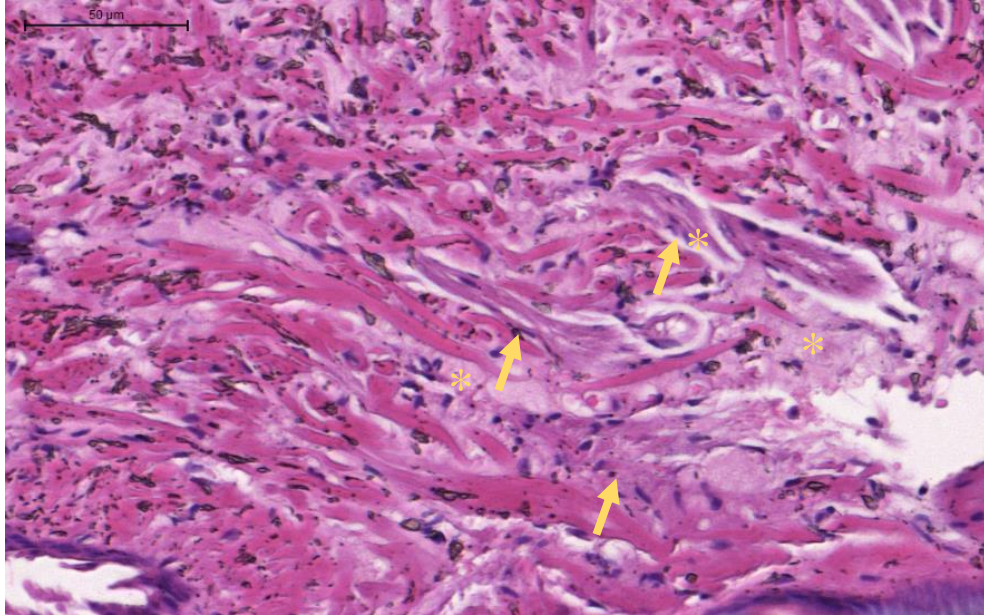


Figura 10 – Larva de terceiro estágio (L3+) (setas amarelas) na região cefalopodal, 4 horas após a exposição de *Biomphalaria glabrata* à suspensão de 100 L3+ de *Angiostrongylus vasorum*. Os asteriscos amarelos indicam o rompimento das fibras musculares da região cefalopodal do molusco. Aumento: 40x; Barra: 50  $\mu$ m; Coloração: HE.



Figura 11 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* no interior da rádula de *Biomphalaria glabrata*, 4 horas após a exposição à suspensão de 100 L3+ de *A. vasorum*. Aumento: 10x; Barra: 200  $\mu$ m; Coloração: HE.

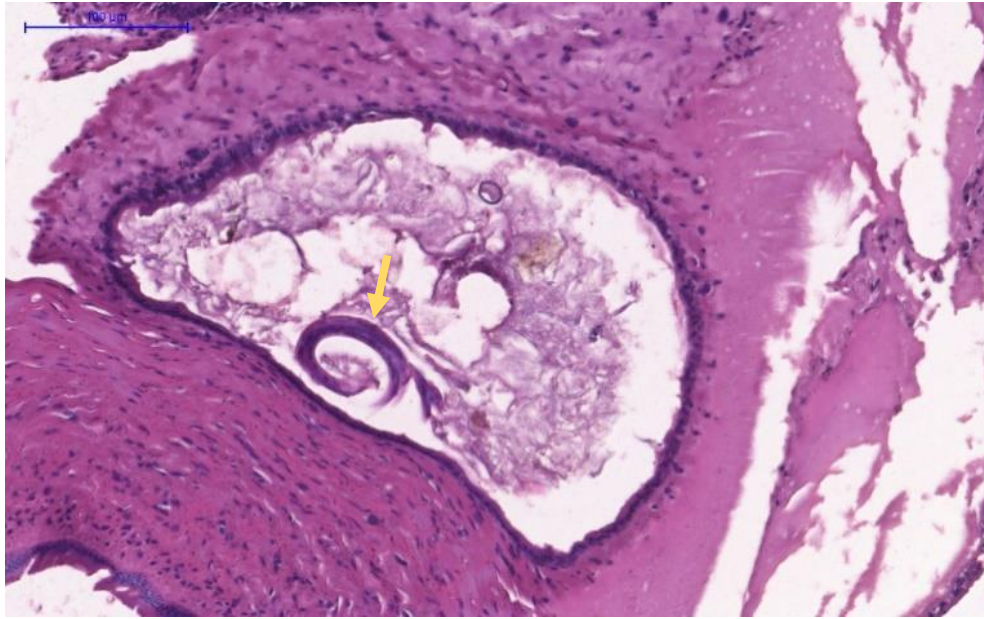


Figura 12 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* no interior do tubo digestivo de *Biomphalaria glabrata*, 4 horas após a exposição à 100 L3+ de *A. vasorum*. Aumento: 20x; Barra: 100μm; Coloração: HE.

Cinco horas após a infecção foi possível verificar a presença de L3+ associada a infiltrado nos tecidos musculares (Figuras 13, 14 e 15).

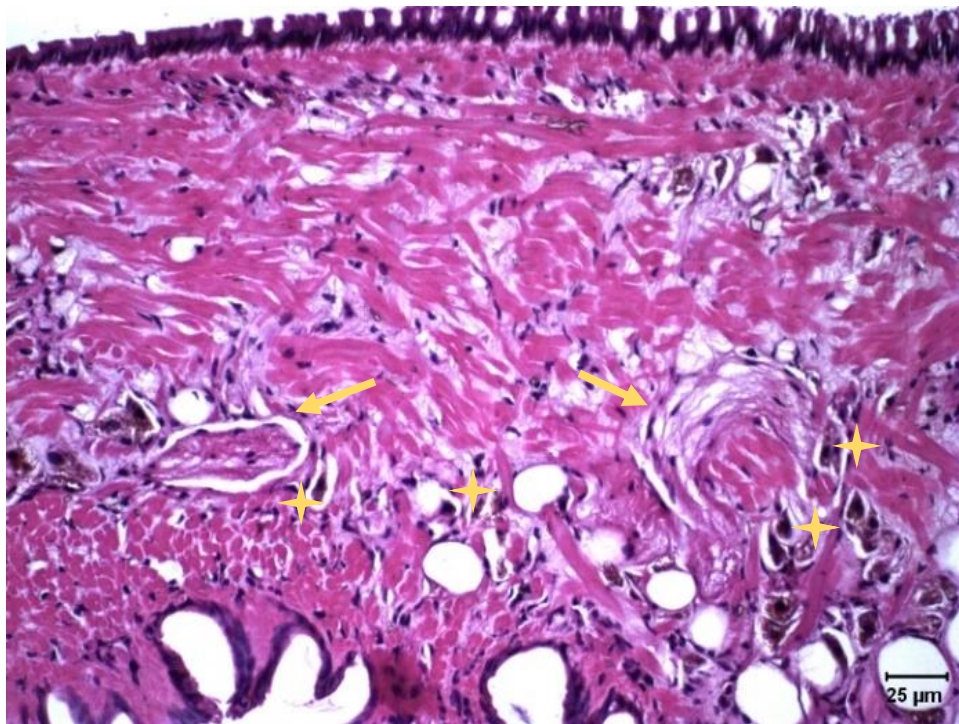


Figura 13 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* cinco horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 40x; Barra: 25μm; Coloração: HE.

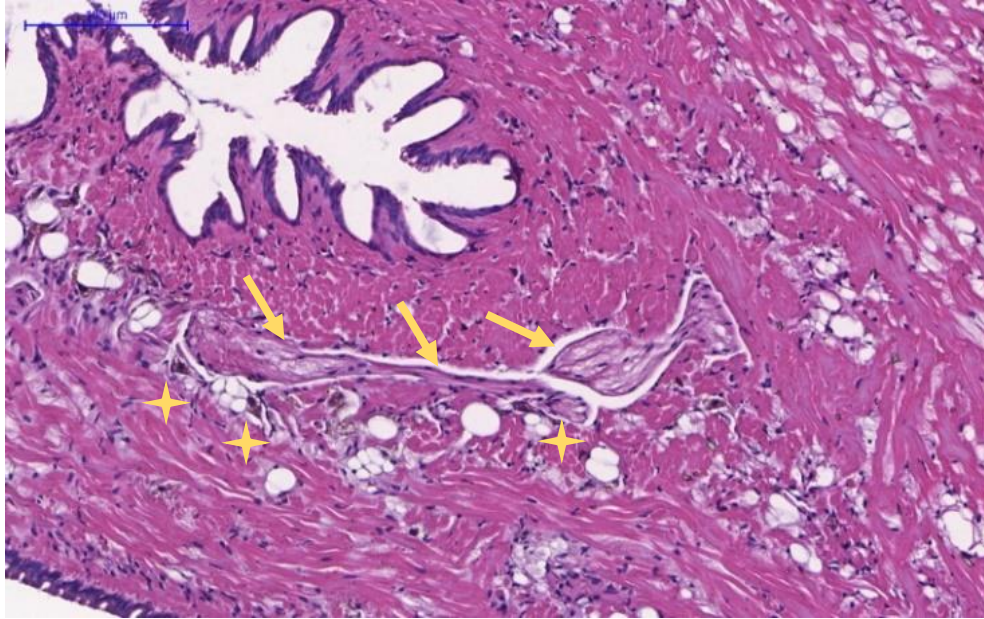


Figura 14 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* cinco horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 20x; Barra: 100 $\mu$ m; Coloração: HE.

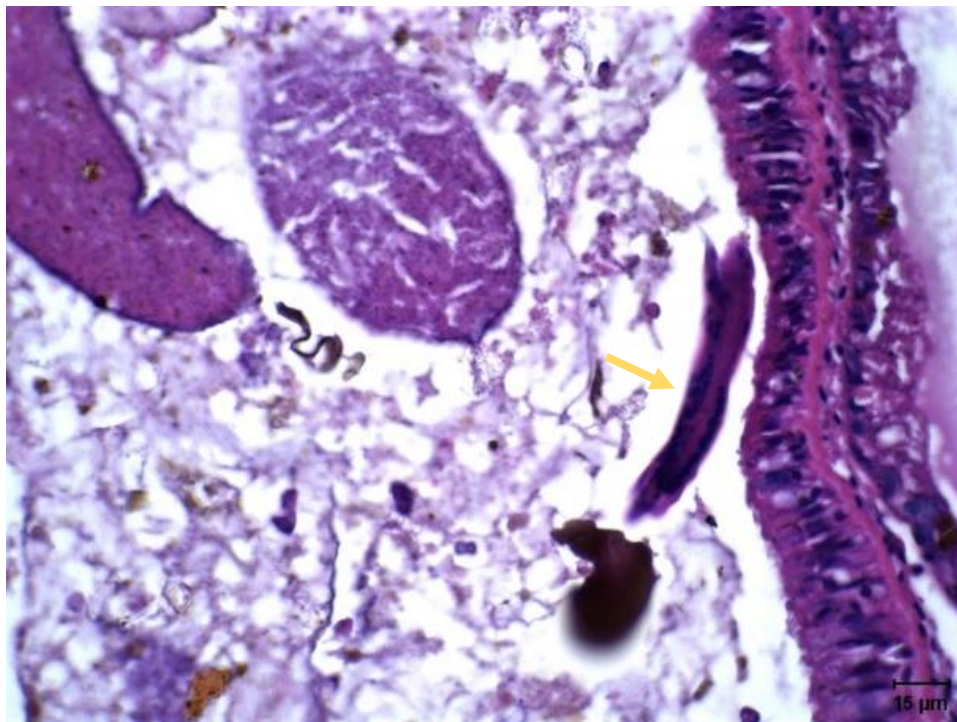


Figura 15 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* no interior do tubo digestivo de *Biomphalaria glabrata*, 5 horas após a exposição à 100 L3+ de *A. vasorum*. Aumento: 60x; Barra: 15 $\mu$ m; Coloração: HE.

Com doze horas após a exposição foi possível verificar a manutenção do padrão observado após cinco horas de exposição, verificando a presença de L3+ associada a infiltrado inflamatório nos tecidos musculares (Figura 16). Dois dias após a exposição observou-se reatividade celular próxima a região com presença L3+ no tecido muscular da região cefalopodal. As destruições das fibras musculares foram observadas, seguindo o mesmo padrão observado nos intervalos anteriores (Figura 17).

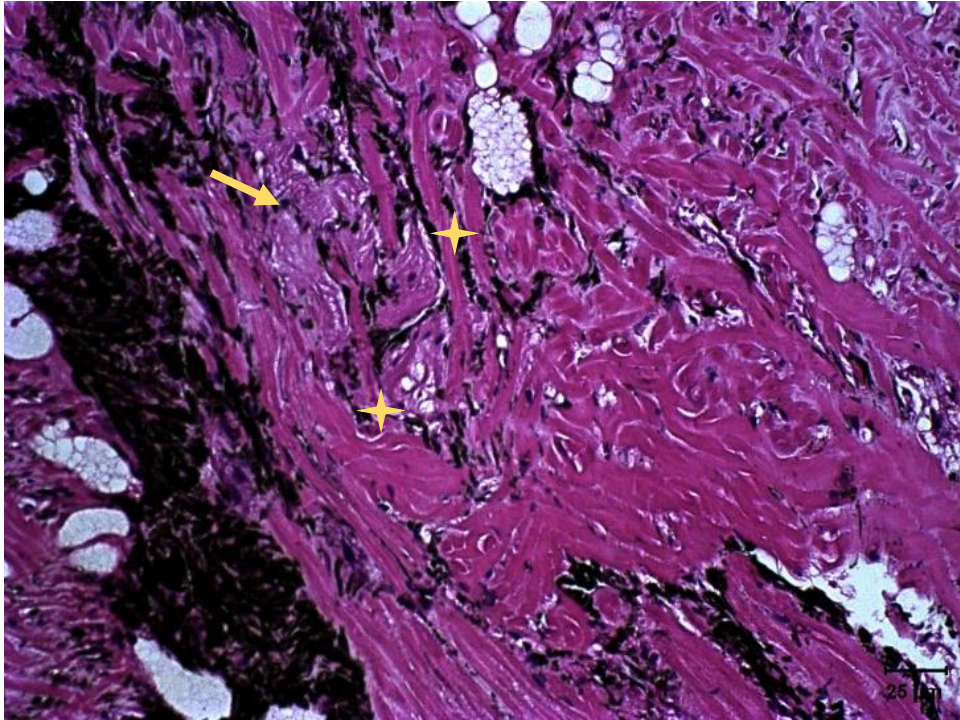


Figura 16 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* 12 horas após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 40x; Barra: 25  $\mu$ m; Coloração: HE.



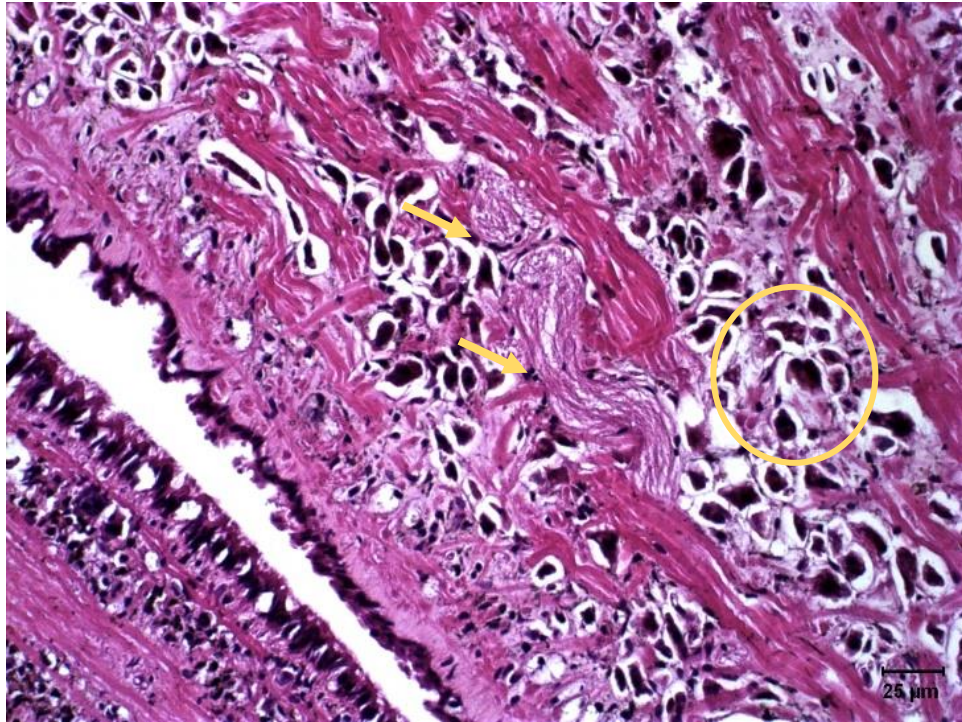


Figura 17 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* na região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata*, 2 dias após a exposição à 100 L3+ de *A. vasorum*, com área de infiltrado inflamatório (círculo amarelo). Aumento: 40x; Barra: 25μm; Coloração: HE.

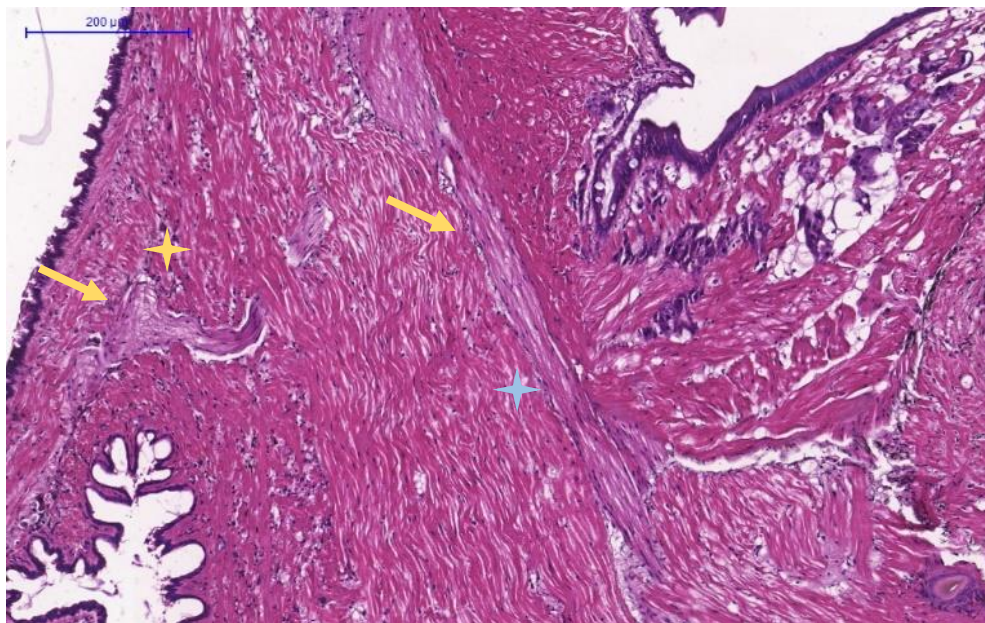


Figura 18 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* na região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata*, 5 dias após a exposição à 100 L3+ de *A. vasorum* e ausência de infiltrado inflamatório (estrela azul). Aumento: 10x; Barra: 200 μm; Coloração: HE.

Ao terceiro dia após infecção, o padrão reacional, frente a presença de L3+ foi semelhante ao verificado ao 2º DPI. Foi possível verificar afastamento das fibras musculares devido a presença das L3+ (dados não demonstrados). Entre o 5º e 7º DPI foi possível observar que as L3+ da região cefalopodal estão envoltas por infiltrados celulares com células muito ativadas ao redor das mesmas, mas também se observa L3+ entre as fibras musculares sem que ocorra infiltrado celular próximo (Figuras 18 e 19).

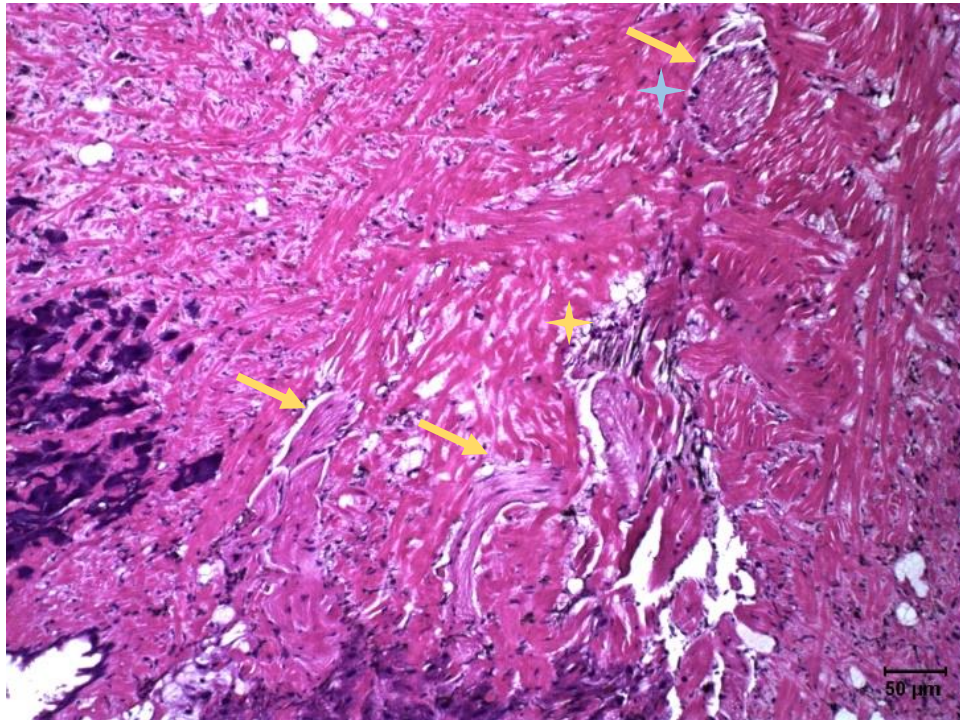


Figura 19 – Larva de terceiro estágio (L3+) (seta amarela) de *Angiostrongylus vasorum* na região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata*, 7 dias após a exposição à 100 L3+ de *A. vasorum* e ausência de infiltrado inflamatório (estrela azul). Aumento: 20x; Barra: 50μm; Coloração: HE.

Entre o 11º e 15º DPI, a atividade do tecido muscular diminuiu (Figuras 20 e 21). Aos 15º DPI verificou-se a destruição das fibras musculares.

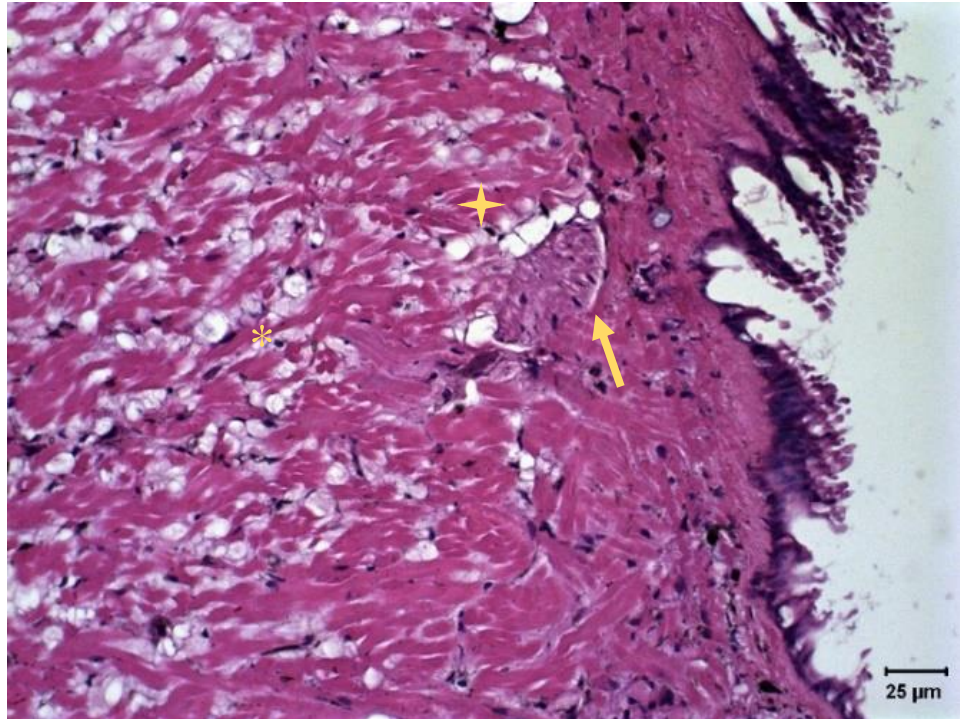


Figura 20 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* 11 dias após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas) e destruição do tecido (asterisco amarelo). Aumento: 40x; Barra: 25  $\mu\text{m}$ ; Coloração: HE.

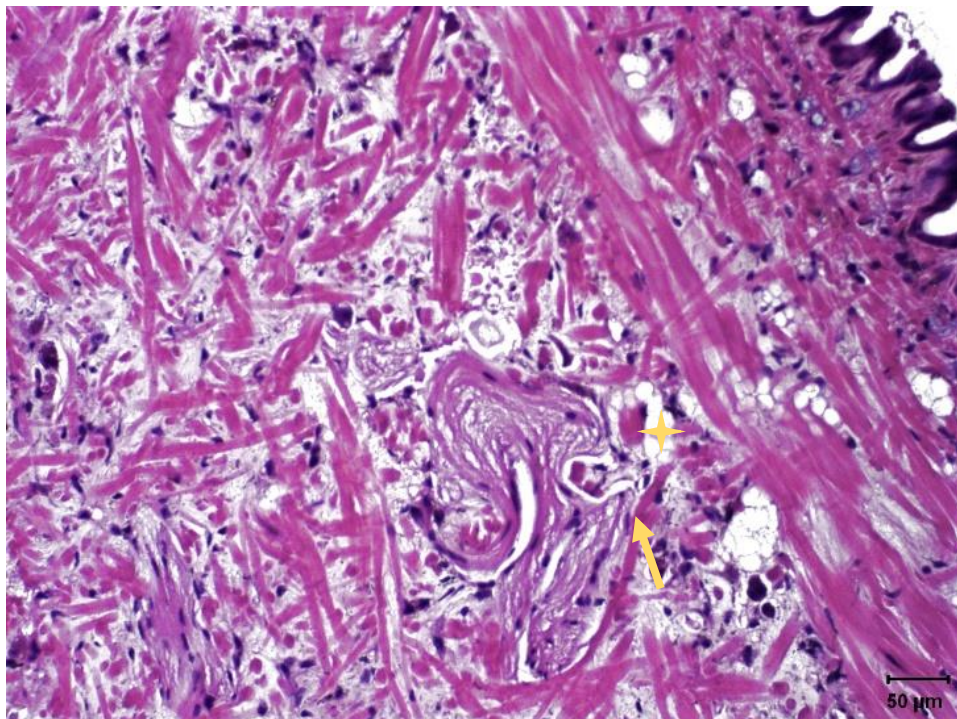


Figura 21 – Região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* 15 dias após a exposição a 100 larvas de terceiro estágio (L3+) de *Angiostrongylus vasorum*. As setas amarelas indicam a presença de L3+ com infiltrado inflamatório (estrelas amarelas). Aumento: 20x; Barra: 50  $\mu\text{m}$ ; Coloração: HE.

### 5.3.2 VIABILIDADE DAS L3+

A viabilidade das L3+ recuperadas pelo método de Baermann, de moluscos previamente infectados com 100L3/molusco, foi comprovada utilizando oito moluscos para infecção dos dois cães utilizados nos experimentos. O número de L3+ recuperadas foi 34 L3+ e 18 L3+, ou seja, média de 4,25 a 2,25 L3+/molusco, respectivamente. Larvas na posição de “C” foram consideradas mortas (RICHINITTI *et al*, 1999). A partir de 12 DPI a eliminação larvária de L1 nas fezes das cadelas, tem sido verificada por meio de Baermann.

Verificou-se a infecção do animal infectado com 34 L3+, a partir da identificação de uma L1 de *A. vasorum*, aos 83 dias de infecção, caracterizando o período pré-patente. Também foi observada a infecção do animal infectado com 18 L3+, a partir da identificação de três L1 de *A. vasorum*, aos 59 dias de infecção.

## 6 DISCUSSÃO

Realizou-se o teste de hospedeiro paratênico em *B. glabrata*, utilizando L3 proveniente de Baermann aos 30DPI, visto que, há um rendimento 10x maior por esta técnica, do que na liberação espontânea, período este com baixa mortalidade dos moluscos. Essas L3+, apresentaram morfometria semelhante ao verificado pela descrição de L3 de *A. vasorum* (GUILHON E CENS, 1973). Esses dados sugerem que estudos futuros que confirmem a infecção de HD por ingestão de hospedeiro paratênico invertebrado, sob condições seminaturais e naturais, é viável, uma vez que, foram recuperadas L3+ dos moluscos infectados.

Quanto a infecção de *B. glabrata* por L3+, observou-se que as larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* podem infectar os moluscos tanto pela via oral quanto percutânea, como já verificado por L1 de *A. vasorum* (GUILHON; AFGHAHI, 1969; BARÇANTE, 2006). No entanto, a maioria das L3+ são encontradas na parte cefalopodal após 30 minutos de infecção até 15 DPI, onde permanecem até o fim do período observado, sugerindo que a invasão tecidual pela L3+ é predominante.

Colella *et al*, (2015) também sugeriram que moluscos gastrópodes infectados com o terceiro estágio larval de alguns protostrongilídeos, podem ser hospedeiros de transporte, como os nematoides, *Aerulostrongylus abstrusus* e *Troglostrongylus brevior*.

Nesse trabalho não se observou a formação de espaço claro ao redor das L3+ como verificado no entorno de L1, L2, L3 de angiostrongilídeos quando os moluscos são infectados com L1 e produzem proteases (MENDONÇA *et al*, 1999; BARÇANTE, 2006). Também em relação a resposta do sistema de defesa do molusco frente a infecção com L3+, observa-se que difere do padrão encontrado na infecção pela L1, como demonstrado por Barçante (2006) quando observou que há infiltrado celular inflamatório no reconhecimento de L1, L2 e L3. Observou-se também, que há dissociação do tecido fibromuscular durante a migração das L3+. No entanto, o infiltrado inflamatório característico e reações perilarvares semelhante a granuloma, não foi observado nos tecidos.

Observou-se baixo número de L3+ recuperadas de *B. glabrata* infectados com L3 de moluscos infectados previamente com L1 de *A. vasorum*. Detectou-se 37 L3 de *A. vasorum* na água do recipiente de experimentação, 24 horas após a infecção, este fato pode ser explicado, por L3+ que possam ter ficado retidas no colar do manto e/ou na concha do molusco.

Em *B. glabrata* infectados com 80 L3+ de *A. vasorum*, observou-se liberação espontânea de L3+ ao longo da infecção, diferente de Colella et al (2015), que somente após digestão química dos tecidos dos moluscos recuperaram L3+ de nematoides. Ainda pelo método de Baermann, recuperou-se nesse trabalho, 10x mais L3+, que os referidos autores, pela técnica de digestão. Esses dados sugerem que no ciclo biológico de *A. vasorum*, HPs invertebrados, apresentam potencial na dispersão desse parasito.

Quanto ao tempo que o molusco pode ser hospedeiro de transporte de *A. vasorum*, novos experimentos precisam ser realizados, visto que, nematoides utilizam em seus ciclos biológicos 15% de HPs, e hospedeiros de transporte invertebrados também podem atuar na dispersão de *A. vasorum*. Confirmando-se a participação de *B. glabrata* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum* por 30 dias pós infecção, será possível definir um importante elo no ciclo de *A. vasorum*.

Quanto à viabilidade das L3+ de *A. vasorum* provenientes de *B. glabrata*, foram detectadas L1 nas fezes das cadelas que foram experimentalmente infectadas. Porém, dar-se-á continuação ao exame diagnóstico por mais tempo, uma vez que na infecção com L3 o período pré-patente pode variar de 28 a 108 dias (CURY; LIMA, 1996). Como a infecção foi feita com L3 paratênica, não se sabe se o cão irá se infectar e/ou se o período pré-patente poderá ser maior do que o observado.

Observa-se então, que esse achado pode ter importância na biologia, dispersão e epidemiologia de *A. vasorum*, já que pode haver a participação de HPs invertebrados. Portanto, novos estudos são necessários para se entender o papel de *B. glabrata* como hospedeiro paratênico de *A. vasorum*, como ocorre a interação da L3+ com o molusco e aspectos da infecção do HD.

## 7 CONCLUSÕES

- *Biomphalaria glabrata* infecta-se com L3 de *Angiostrongylus vasorum* advindas de um molusco previamente infectado com L1;
- As L3+ infectam o molusco por via percutânea e/ou oral;
- L3+ recuperadas de moluscos como HPs são viáveis e capazes de infectar o HD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICATA, J. E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 1965. p. 223-248.
- AZIZ, N. A. A. et al. 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. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 56, 2016.
- BAILLET, C. C. Strongle des vaisseauset du coeur du chein *Strongylus vasorum* (Nobis). **N. Dict. Paract. Med. Vet.**, v.8, p.587-588, 1866.
- BARÇANTE, J. M. P. **Aspectos parasitológicos, clínicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905**. 2004. 195 p. Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- BARÇANTE, T. A. et al. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Parasitology research**, v. 91, n. 6, p. 471-475, 2003.
- BARÇANTE, T. A. **Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. 2006. 179p. Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.
- BARÇANTE, T. A. et al. Analysis of circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* following *Angiostrongylus vasorum* infection using flow cytometry. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p.1-6, 2012.
- BESSA, E. C. de. **Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório**. 1996. 103 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 1996.
- BESSA, E. C. A., et al. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17 (1), p. 29- 41, 2000.
- BLAXTER, M. L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**. v.392, p.71-75. 1998.
- BOLT, G. et al. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v. 79, n. 5, p. 428–430, 1993.
- BOLT, G. et al. Canine angiostrongylosis: a review. **Veterinary Record**, v.135, p.447-452, 1994.
- CARSON, F. L.; MARTIN, J. H. e LYNN, J. A. Formalin fixation for eletron microscopy: are-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology** v.59, p.365-375. 1973.



- CHUBB, J. C.; BALL, M. A.; PARKER, G. A. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. **Trends in parasitology**, v. 26, n. 2, p. 93-102, 2010.
- COAGLIO, A. L. et al. Evaluation of techniques for recovery of *Angiostrongylus vasorum* from *Achatina fulica*, a potential intermediate host. **Revista Patologia Tropical**, v. 45, n. 1, p. 87-97, 2016.
- COLELLA, V. et al. Feline lungworms unlock a novel mode of parasite transmission. **Scientific reports**, v.5, p. 1-6, 2015.
- COSTA, J. O. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: Considerações taxonômicas, patológicas e de diagnóstico imunológico (ELISA) em cães experimentalmente infectados. 1992. 135p. Tese (Doutorado em Doenças Parasitárias) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- COSTA, J. O.; DE ARAUJO COSTA, H. M.; GUIMARAES, M. P. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.154, p.9-16, 2003.
- CURY, M. C.; LIMA W. S. Aspectos clínicos de cães infectados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.1, p. 27-34, 1996.
- DI CESARE, A. et al. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* in the land snail *Helix aspersa*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3649-3655, 2015.
- DUARTE, F. H., et al. Occurrence *Angiostrongylus vasorum* (Raillet, 1866) (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Canidae) in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.4, p. 1086-1088, 2007.
- FALSONE, L. et al. The cockroach *Periplaneta americana* as a potential paratenic host of the lungworm *Aelurostrongylus abstrusus*. **Experimental parasitology**, v. 182, p. 54-57, 2017.
- FEHRINGER, W. T.; FIEDLER, H. H. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, Salvador, v.2, p.110-114, 1977.
- GIANNELLI, ALESSIO, et al. Release of lungworm larvae from snails in the environment: potential for alternative transmission pathways. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003722, 2015.
- GIOVANONNI, M.; FERNADEZ, B.F.; KAVINSKY, L.C. Angiostrongilose do cão. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Paraná, v.28, n.4, p.601-604, 1985.
- GONÇALVES, P.C. *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) novo parasita do cão do Rio Grande do Sul (Brasil) - Nematoda: Metastrongyloidea. **Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria**, v.4, n.1, p.35-40, 1961.
- GUILHON, J. Role des limacidés dans le cycle évolutif d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Comptes Rendus de l' Académie des Sciences**, v.251, p.2252-2253, 1960.

- GUILHON, J. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the Arionidae organism. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.261, p.4225-4227, 1965.
- GUILHON, J.; AFGHAHI, A. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the body of various species of terrestrial mollusks. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v.268, p.434-436, 1969.
- 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.; GAALON, A. Évolution larvaire d'un nematode parasite de pappariel circulatoire du chien dans l'organisme de mollusques dulçaquicoles. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.268, n.3, p.612-615, 1969.
- GUILHON, J.; CENS, B. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Étude biologique et morphologique. **Annals of Parasitology** v.48, p.567-596, 1973.
- JEFFERY, R. A. et al. *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Newfoundland, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 82, n. 1, p. 66-74, 2004.
- JEŻEWSKI, W., et al. Intermediate and paratenic hosts in the life cycle of *Aelurostrongylus abstrusus* in natural environment. **Veterinary parasitology**, v. 198, n. 3-4, p. 401-405, 2013.
- KAMENSKY, S. O Sistematicheskom položhenii roda *Metastrongylus* wost in *Protostrongylus* g. n. sredi ostal'nykh Strongilid. **Sbornik Trudov Khar'kovskogo Veterinarnogo Instituta**, v.10, n.2, p.17-50, 1905.
- LANGENEGGER, J., et al. Ocorrência da infestação por *Angiostrongylus vasorum* em cães do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, v.8, p.246-247, 1962.
- LATHAM, A. D. M., et al. A gastropod scavenger serving as paratenic host for larval helminth communities in shore crabs. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 862-864, 2003.
- LIMA, W.S. et al. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.2, p.233-235, 1985.
- LIMA, W. S.; GUIMARAES, M. P.; LEMOS, I. S. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of the Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. **Journal of helminthology**, v. 68, n. 1, p. 87-87, 1994.
- MALDONADO JR, A.; SIMÕES, R.; THIENGO, S. Angiostrongyliasis in the Americas. In: **Zoonosis**. InTech, 2012.
- MENDONCA, C. L. et al. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 549-556, 1999.
- MORAVEC, F.; SKORIKOVA, B. Amphibians and larvae of aquatic insects as new paratenic hosts of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea), a swimbladder parasite of eels. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, n. 3, p. 217-222, 1998.

- MOZZER, L. R., et al. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2011, 4 p., 2011.
- MOZZER, L. R., et al. The development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822). **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 6, p.755-759, 2015.
- MOZZER, L. R.; LIMA, W. S. *Gallus gallus domesticus*: Paratenic host of *Angiostrongylus vasorum*. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1, p. 81-84, 2015.
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- OLIVEIRA-JUNIOR, S. D., et al. Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.101-106, 2006.
- OKULEWICZ, A. Rola żywicieli paratenicznych w cyklach rozwojowych helmintow. **Wiadomości Parazytologiczne**, v. 4, n. 54, p. 297-301, 2008.
- PAN, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College**, v. 119, n.3, p. 237-299, 1958.
- PARAENSE, W. L. Planorbideos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. (Ed.) *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1970. p.13-30.
- PATEL, Z., et al. Molecular identification of novel intermediate host species of *Angiostrongylus vasorum* in Greater London. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4363-4369, 2014.
- PAULA-ANDRADE C. *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Protostrongylidae): Aspectos do desenvolvimento dos estádios evolutivos em *Melanoides tuberculata* (Caenogastropoda: Thiaridae), *Bradybaena similis* (Stylommatophora: Xanthonychidae) e *Sarasinula marginata* (Soleolifera: Veronicellidae).2012. 104p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012.
- PAZ, R. J. **Biologia e Ecologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil)**. 1997. 123 P. Tese de Mestrado - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 1997.
- PEDRASSANI, D. et al. *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) as paratenic host of the giant kidney worm *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) in São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina state, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 74-77, 2009.
- PEREIRA, C. A. J., et al. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3,p. 224-233, 2006.
- PLESCH, B.; JANSE, C.; BOER, H. H. Gross Morphology and Histology of the musculature of the Freshwater Pulmonate *Lymnaea stagnalis*. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 25, n.3, p. 332-352, 1975.

RICHINITTI, L. M. Z; FONSECA, N. A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. The effect of temperature on mobility of *Angiostrongylus costaricensis* third stage larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 4, p. 225-228, 1999.

ROSEN, L.; ASH, L. R.; WALLACE, G. D. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **American Journal of Veterinary Research**, v.31, n.1, p.131-143, 1970.

SAUERLÄNDER R, ECKERT J. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 44, n. 1, p. 59-72, 1974.

SERRES, E. Entozoaires trouvés dans o'oirelette droit du coeur, le ventricule correspondant et l'artère pulmonaire du chien. **J. Vet. Midi (Toulouse)**, v.2, p.70-72, 1854.

SZÉKELY, C. Paratenic hosts for the parasitic nematode *Anguillicola crassus* in Lake Balaton, Hungary. **Diseases of aquatic organisms**, v. 18, n. 1, p. 11-20, 1994.

TRAVASSOS, L. Nematódeos novos. **Boletim Biológico São Paulo**, v.6, p.52-61, 1927.

WANG, Q. P. et al. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 389-395, 2012.