

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

Natália do Carmo Gonçalves

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM *ACHATINA FULICA* APÓS INFECÇÃO POR  
*ANGIOSTRONGYLUS VASORUM***

Belo Horizonte  
2023

Natália do Carmo Gonçalves

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM *ACHATINA FULICA* APÓS INFECÇÃO POR  
ANGIOSTRONGYLUS VASORUM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientação: Prof. Dra. Cíntia Ap. de Jesus Pereira

Coorientação: Prof. Dr. Walter dos Santos Lima

Belo Horizonte  
2023

043

Gonçalves, Natália do Carmo.

Atividade enzimática em *Achatina fulica* após infecção por *Angiostrongylus vasorum* [manuscrito] / Natália do Carmo Gonçalves. – 2023.

46 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Dra. Cíntia Ap. de Jesus Pereira. Coorientação: Prof. Dr. Walter dos Santos Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Acetilglucosaminidase. 3. Peroxidase. 4. Caramujos. 5. *Angiostrongylus*. I. Pereira, Cíntia Aparecida de Jesus. II. Lima, Walter dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



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

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO 450/2023/50**

**TÍTULO: "ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM ACHATINA FULICA APÓS INFECÇÃO POR  
ANGIOSTRONGYLUS VASORUM"**

**ALUNA: NATÁLIA DO CARMO GONÇALVES**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: HELMINTOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e seis de maio de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Luciano Aggum Capettinni**

UFMG

**Weslen Fabrício Pires Teixeira**

UFMG

**Walter dos Santos Lima**- Coorientador

UFMG

**Cíntia Aparecida de Jesus Pereira**- Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 26 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Cíntia Aparecida de Jesus Pereira, Professora do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walter dos Santos Lima, Professor do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettinni, Professor do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2319160** e o código CRC **084F36C6**.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser meu alicerce.

À minha família, por me apoiar em todos os meus sonhos e lutar comigo para que tudo corra bem, por me acolher e me amar.

Aos meus amigos, por serem meus confidentes e minha rede de apoio. Por me escutarem e me ajudarem em todos os momentos.

Ao meu companheiro Gilson, que amo muito, por estar comigo em todos os momentos, sendo apoio e acolhimento.

Ao programa de pós-graduação em Parasitologia (ICB/UFMG) e a todos os professores, que muito contribuíram para a minha formação, compartilhando seus saberes.

À Sumara Aparecida Guilherme, que sempre esteve presente, auxiliando-me com muita presteza.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar atividade enzimática de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase-like (NAG-like) e mieloperoxidase-like (MPO-like) em hemócitos e em tecidos da região cephalopodal de *Achatina fulica* infectados por *Angiostrongylus vasorum*. Foram utilizados 120 *Achatina fulica*: 40 moluscos para o Grupo ingestão de L1 – larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*; 40 moluscos para o Grupo inoculação de L1; 40 moluscos para o Grupo controle (Não infectados). Os moluscos foram infectados individualmente com 1000 L1/24h obtidas a partir da técnica de Baermann de cães infectados conforme o protocolo CEUA\_UFMG 227/2022. Após a infecção, os moluscos foram transferidos para aquários, alimentados com alface e ração contendo carbonato de cálcio, sendo observada sua sobrevivência. No 1º, 8º e 30º dias após a infecção foi avaliada a ativação dos hemócitos, por meio da coleta de hemolinfa por punção cardíaca e um grama de tecidos da região cephalopodal e realização de testes enzimáticos. Para os testes da NAG-like e MPO-like, a preparação em 40 mg do tecido ocorreu em soluções com pH semelhantes, no entanto, a evidência da enzima ocorre para o ensaio de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase-like adicionou-se o substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina a 37°C por 10 min e a estimativa da atividade foi a 405 nm. Para o ensaio enzimático de mieloperoxidase-like, o substrato foi 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina e a leitura revelada a 450 nm. Na coloração de peroxidase  $1 \times 10^5$  hemócitos foram monitorados para a expressão de peroxidase resistente ao cianeto após fixar células em formol a 4% com acetona por 30 segundos e corado por 10 min em fósforo tampão contendo 3,3 tetracloridrato de diaminobenzidina (0,25%), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e cianeto de potássio (KCN) - 0,2% ao abrigo de luz. Após análises observou-se que *A. fulica* desafiada por *A. vasorum* apresenta atividade enzimática semelhante a MPO e NAG.

Palavras-chave: N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase-like (NAG-like); Mieloperoxidase-like (MPO-like); Coloração de peroxidase *Achatina fulica*; *Angiostrongylus vasorum*.

## ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the enzymatic activity of N-acetyl- $\beta$ -D-glycosaminidase -like (NAG-like) and myeloperoxidase-like (MPO-like) in hemocytes and in tissues of the cephalopodal region of *Achatina fulica* infected by *Angiostrongylus vasorum*. 120 *Achatina fulica* were used: 40 mollusks for the L1 ingestion Group - first stage larvae of *A. vasorum*; 40 mollusks for the L1 inoculation Group; 40 mollusks for the control Group (Not infected). Mollusks were individually infected with 1000 L1/24h obtained from Baermann's technique from infected dogs according to CEUA\_UFMG protocol 227/2022. After infection the mollusks were transferred to aquariums, fed with lettuce and feed containing calcium carbonate and their survival was observed. On the 1st, 8th, and 30th day after infection, hemocyte activation was evaluated by collecting hemolymph by cardiac puncture and one gram of tissue from the cephalopodal region, and enzymatic tests were performed. For the NAG-like and MPO-like tests, 40 mg of tissue was prepared in solutions with similar pH; however, for the N-acetyl- $\beta$ -D-glycosaminidase assay, the substrate p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glycosamine was added at 37°C for 10 min and the activity was estimated at 405 nm. For the myeloperoxidase-like enzyme assay the substrate was 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine and the reading revealed at 450 nm. For peroxidase staining 1 x 10<sup>5</sup> hemocytes hemocytes were monitored for cyanide-resistant peroxidase expression after fixing cells in 4% formalin with acetone for 30 seconds and stained for 10 min in phosphate buffer containing diaminobenzidine 3,3 tetrachlorhydrate (0.25%), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), potassium cyanide (KCN) - 0.2% under shelter from light. After analysis it was observed that *A. fulica* challenged by *A. vasorum* showed similar enzymatic activity to MPO, NAG.

**Keywords:** N-acetyl- $\beta$ -D-glycosaminidase-like (NAG-like); Myeloperoxidase-like (MPO-like); Eosinophil peroxidase-like (EPO-like); *Achatina fulica* peroxidase staining; *Angiostrongylus vasorum*.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - ESTÁDIOS LARVAIS DE ANGIOSTRONGYLUS VASORUM. A: LARVAS DE A. VASORUM NO ESTÁGIO L1; B: LARVAS DE A. VASORUM NO ESTÁGIO L2; C: LARVAS DE A. VASORUM NO ESTÁGIO L3 11
- FIGURA 2** - PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE A. FULICA DOS GRUPOS 2 E 3 INFECTADOS COM 1000 L1 DE A. VASORUM. 27
- FIGURA 3** - NÚMERO MÉDIO DE LAS L3 RECUPERADAS DE A. FULICA DOS GRUPOS 2 E 3 30 DIAS APÓS A INFECÇÃO COM 1000 L1 DE A. VASORUM. 28
- FIGURA 4** - NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE LIKE (MPO-LIKE) NO HOMOGENATO DA REGIÃO CEPHALOPODAL DE A. FULICA DO GRUPO 1 DURANTE A INFECÇÃO COM 1000 L1 DE A. VASORUM. 29
- FIGURA 5** - N-ACETILGLUCOSAMINIDASE LIKE (NAG-LIKE) NO HOMOGENATO DA REGIÃO CEPHALOPODAL DE A. FULICA DURANTE A INFECÇÃO COM 1000 L1 DE A. VASORUM. 30
- FIGURA 6** - SEQ ARABIC 6A - HEMÓCITOS DE A. FULICA DO GRUPO 1 DURANTE A INFECÇÃO COM 1000 L1 DE A. VASORUM. 31
- FIGURA 7** - SEQ FIGURA \\* ARABIC 6B - PRESENÇA DE GRANULOS POSITIVOS DE PEROXIDASE-LIKE EM HEMOCITOS DE A.FULICA DO GRUPO 1. 31



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>1.1 Aspectos gerais</b> .....	9
<b>1.2 Angiostrongylus Vasorum</b> .....	10
<b>1.3 Distribuição Geográfica de <i>A. Vasorum</i></b> .....	11
<b>1.4 Ciclo Biológico de <i>Angiostrongylus Vasorum</i></b> .....	12
<b>1.5 <i>Achatina Fulica</i></b> .....	14
1.5.1 Distribuição geográfica de <i>Achatina fulica</i> e sua participação como hospedeiro intermediário de helmintos.....	14
<b>1.6 Sistema de defesa interno dos moluscos</b> .....	15
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	21
<b>3.1 Manutenção do parasito</b> .....	21
<b>3.2 Manutenção dos moluscos</b> .....	21
<b>3.3 Obtenção de larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i></b> .....	21
<b>3.4 Infecção de <i>A. fulica</i> com larvas de primeiro estágio de <i>A. vasorum</i></b> .....	21
3.4.1 Delineamento experimental .....	22
<b>3.5 Coleta da hemolinfa e tecido da região cefalopodal de <i>a. fulica</i></b> .....	23
<b>3.6 Determinação do perfil funcional presente no hemócitos e nos tecidos da região cefalopodal de <i>A. fulica</i></b> .....	23
3.6.1 Avaliação de atividade enzimática presentes em hemócitos de <i>Achatina fulica</i> .....	23
3.6.2 Quantificação da determinação de N-acetil-b-D-glicosaminidase like (NAG like) em tecido da região cephalopodal de <i>A. fulica</i> .....	24
3.6.3 Quantificação da mieloperoxidase-like (MPO like ) em tecido da região cephalopodal de <i>A. fulica</i> .....	24
3.6.4 Avaliação da expressão de peroxidase.....	27
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	25
<b>5.1 Carga parasitária e taxa de sobrevivência de <i>A. fulica</i> infectada por larvas de</b>	

<b>primeiro estágio de <i>A. vasorum</i></b> .....	25
<b>5.2 Avaliação de atividade enzimática presentes em hemócitos de <i>Achatina Fulica</i></b> .....	28
5.2.1 N-acetilglucosaminidase like (NAG-like).....	31
5.2.2 Coloração para Peroxidase-like.....	32
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>6.1 Infecção de <i>A. fulica</i> por ingestão e inoculação de larvas de primeiro estágio de <i>A. vasorum</i></b> .....	32
<b>6.2 Avaliação de atividade enzimática presente em <i>Achatina fulica</i></b> .....	33
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais

Os moluscos da classe Gastropoda, do filo Mollusca, distribuem-se pelos ambientes marinhos, água doce e terrestre, e são hospedeiros intermediários de trematódeos e nematódeos parasitos do homem e dos animais, como o *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus vasorum* (Guilhon 1965, Brasil 2007, Lie & Basch 1967, Zakikhani et al 2003, Almeida et al., 2022, 2023).

Os parasitos do gênero *Angiostrongylus* parasitam as artérias pulmonares, mesentéricas ou coração de roedores, insetívoros e carnívoros. Dentre as 18 espécies descritas, duas se destacam por causar zoonoses: *A. cantonensis*, *A. costaricensis*. Há também *A. vasorum* com suspeita de também infectar humanos. Esses nematoides têm importância veterinária e humana.

*Angiostrongylus cantonensis* causa a meningite eosinofílica, na Ásia e sul do Pacífico, com relatos de casos em humanos na América do Sul, incluindo o Brasil (Caldeira et al 2007, Lima et al 2009, Maldonado et al., 2012). Alguns moluscos são descritos como hospedeiro intermediário natural para esse parasito: *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) e *Thelidomus asper* (Lindo et al. 2002), *Achatina fulica* (Zhang et al. 2008, Hu et al. 2011, Fontanilla, Wade 2012, Oliveira et al. 2015). No Brasil, *A. fulica* é encontrado infectado naturalmente nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo, Amazonas e Minas Gerais (Lima et al. 2009, Maldonado et al. 2010, Caldeira et al 2007, Moreira et al. 2013, Almeida et al., 2023). Outros moluscos são hospedeiros intermediários em potencial, uma vez que, experimentalmente, se infectaram como *Pomacea canaliculata* (Tesana et al. 2008, Lv et al. 2009), *Pila polita* (Tesana et al. 2008).

*Angiostrongylus costaricensis*, agente etiológico da angiostrongilose abdominal no homem, é encontrado desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, há relatos de casos humanos nos estados do Rio Grande do Sul (Agostini 1984, Rambo et al. 1997), Paraná (Ayala 1987), Espírito Santo, Minas Gerais (Pena et al. 1995), São Paulo (Zilliotto et al. 1975) e Santa Catarina (Laitano et al. 2001). Os moluscos descritos infectados naturalmente são *Phyllocaulis variegatus*, *Bradybaena similaris* (Rambo et al. 1997, Teixeira et al. 1993), *Belocaulus angustipes*, *Phyllocaulis soleiformis* (Rambo et al. 1997), *Limax maximus*, *Limax flavus* (Teixeira et al. 1993), *Sarasinula linguaeformis* (Laitano et al. 2001) e os infectados

experimentalmente são *Omalonyx* sp. (Montresor et al. 2008), *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* (Lima et al. 1992), *Phyllocaulis variegatus*, *Phyllocaulis soleiformis* e *Phyllocaulis boraceiensis* (Bonetti, Graeff-Teixeira 1998), *Sarasinula marginata* (Mendonça et al. 2008).

*Angiostrongylus vasorum* é um nematodeo que parasita canídeos domésticos e silvestres. O primeiro hospedeiro intermediário descrito foi *Arion* (Guilhon, 1960) e as espécies *Arion distinctus*, *Tandonia sowerbyi*, *Arion distinctus*, *Tandonia sowerbyi*, *Arion rufus*, *Arion flagellus* e *Limacus maculatus* (Patel et al. 2014, Aziz et al. 2016). Outros moluscos foram infectados experimentalmente como, *Arion rufus* (Guilhon 1965), *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Cepaea nemoralis*, *Arianta arbustorum*, *Euparypha pisana*, *Succinea putris*, *Cochlodina laminata*, (Guilhon & Afghahi 1969), *B. glabrata* (Guilhon & Afghahi 1969, Barçante et al. 2003), *B. tenagophila* (Pereira et al., 2006), *Laevicaulis alte*, *B. similaris*, *S. octona*, *Prosopaea javanicum* (Rosen et al. 1970), *A. fulica* (Sauerlander & Eckert 1974, Coaglio et al. 2016), *Omalonyx matheroni* (Mozzer et al. 2011), *Melanooides tuberculata*, *B. similaris* e *Sarasinula marginata* (Paula-Andrade 2012) e *Pomacea canaliculata* (Mozzer et al. 2014, Di Cesare et al. 2015).

Como *A. fulica* infecta-se experimentalmente com *Angiostrongylus* e já foi encontrado como hospedeiro natural desse nematoide no Brasil, especificamente em um parque urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais como demonstrado recentemente por Almeida et. al. (2022), o que mostra a importância de evoluir e aprofundar nos estudos sobre mecanismos de defesa envolvendo esse molusco terrestre na interação com *Angiostrongylus* sp..

## 1.2 *Angiostrongylus Vasorum*

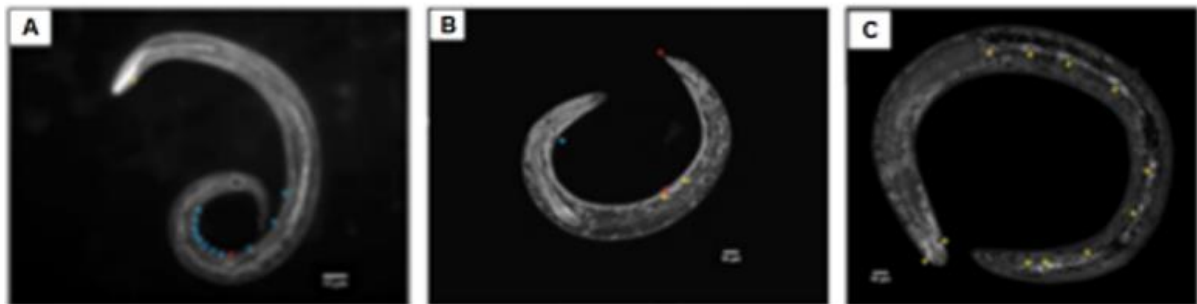
*Angiostrongylus vasorum* é um parasito do ventrículo direito do coração, da artéria pulmonar e suas ramificações, principalmente, de canídeos domésticos e silvestres. Conhecido como “French Heartworm” ou filariose francesa (Conboy 2000, Morgan et al. 2005, Helm et al. 2010), foi descrito pela primeira vez por Serres em 1853, na cidade de Toulouse, França, ao encontrá-lo no sistema circulatório de um cão que morreu subitamente.

Os adultos possuem corpo delgado e alongado, pouco atenuado nas extremidades; a cutícula é fina e transparente, sendo na extremidade cefálica ligeiramente dilatada. A abertura bucal é pequena, arredondada e tem comunicação direta com o esôfago, que é claviforme e ligeiramente mais alargada na porção final. A fêmea mede cerca de 17 mm de comprimento por 0,26 mm de largura, é maior do que o macho, mais robusta e com ovários longos. A vulva fica

anterior ao ânus, possui cauda curta e extremidade posterior arredondada com expansão cuticular em forma de bainha, que se projeta além da cauda. O macho mede em torno 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 264,4 µm de comprimento e 11,2 µm de largura; se caracteriza 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 338,09 µm de comprimento e 12,78 µm de largura, é pouco móvel, fica disposta em arco e apresenta cor amarronzada e, devido à presença de grânulos no interior das células intestinais, possui duas bainhas, que ocupam todo o seu interior. A larva de terceiro estágio (L3), mede cerca de 362,12 µm de comprimento e 19,10 µm de largura, aparece livre das bainhas, sendo mais clara e transparente, com a presença de dois bastões quitinosos dispostos longitudinalmente na extremidade anterior; sua cauda termina com apêndice digitiforme (Guilhon & Cens 1973, Bessa et al. 2000, Mozzer 2010).

Figura 1 - Estádios larvais de *Angiostrongylus vasorum*. A: Larvas de *A. vasorum* no estágio L1; B: Larvas de *A. vasorum* no estágio L2; C: Larvas de *A. vasorum* no estágio L3



Fonte: Pereira *et al.*, 2020

### 1.3 Distribuição Geográfica de *A. Vasorum*

*Angiostrongylus vasorum*, que apresenta distribuição cosmopolita, foi descrito pela primeira vez em cães na França (Guilhon & Cens 1973). Atualmente, ele é encontrado em vários países da Europa, como Mediterrâneo (Poli et al. 1984), Alemanha (Pallaske 1967; Morgan, Shaw 2010, Inglaterra (Jones et al. 1980; Morgan, Shaw 2010; Espanha (Tarazona 1974; Itália (Poli et al. 1984; Del Prete et al. 2015), Portugal (Alho et al. 2016), Suíça (Morgan, Shaw 2010; Hauser et al. 2015; Escócia (Morgan, Shaw 2010), Hungria (Schnyder et al. 2015), Dinamarca (Morgan, Shaw 2010), Suécia (Morgan, Shaw 2010), Holanda (Morgan, Shaw

2010), Finlândia (Elsheikha et al. 2014), Irlanda (Elsheikha et al. 2014), Polônia (Elsheikha et al. 2014) e Turquia (Elsheikha et al. 2014). Na África, em Uganda (Elsheikha et al. 2014). Nas Américas, nos Estados Unidos, no Canadá (Williams et al. 1985; Morgan, Shaw 2010; Elsheikha et al. 2014), na Colômbia (Elsheikha et al. 2014), e no Brasil (Lima et al 1985). Na Oceania, na Austrália (Roberts 1940).

No Brasil, não há dados sobre a prevalência de *A. vasorum*, mas há relatos esporádicos desse parasito em alguns estados. No Rio de Janeiro, relatado por Travassos (1927) o parasito foi recuperado no cachorro do mato (*Cerdocyon thous azarae*) e Langenegger et al. (1962) relatou cães no município do Rio de Janeiro. 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-BA. Lima et al (1985) recuperaram o parasito das artérias pulmonares em 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 primeira infecção natural na cidade de Juiz de Fora, MG, em cachorro do mato (*Cerdocyon thous*).

#### **1.4 Ciclo Biológico de *Angiostrongylus Vasorum***

O parasito possui o ciclo heteroxeno, sendo os canídeos silvestres e domésticos os principais hospedeiros definitivos, já tendo sido encontrado em coiotes e guaxinins. Eles se infectam pela ingestão dos hospedeiros intermediários, moluscos como *A. fulica*, *B. glabrata*, *Subulina octona*, *Helix aspersa*, *A. distinctus*, *T.sowerbyi*, *P. canaliculata*, *Arion lusitanicus*, *Arion ater*, *Arion ater rufus*, *Limax maximus*, *Arion rufus*, *Arion flagellus*, *Limacus maculatus* e *Omalonyx matheroni* (Sauerländer & Eckert 1974, Coaglio et al. 2016, Barçante et al. 2003, Bessa et al. 2000, Di Cesare et al. 2015, Patel et al. 2014, Mozzer et al. 2014, Ferdushy et al. 2010, Ferdushy et al. 2009, Aziz et al. 2016, Mozzer et al. 2011) e dos hospedeiros paratênicos, como a rã (*Rana temporária*) (Bolt et al. 1993) e as aves, como a galinha (*Gallus gallus domesticus*), que, recentemente, foi apontada por Mozzer & Lima (2015) como hospedeiros paratênicos em potencial ao *A. Vasorum*. Além disso, a presença de L3 no ambiente podem contaminar água, alimentos sendo também uma fonte de infecção importante (Guilhon & Cens 1973).

Após a ingestão, a L3 penetra na parede do trato digestório e migra até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda para a larva de quarto estágio (L4), que chega na corrente

sanguínea. Aproximadamente no décimo dia, elas estão alojadas no ventrículo direito e nas artérias pulmonares. 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 e iniciam a postura dos ovos não embrionados. Neste local ocorre o embrionamento dos ovos até o desenvolvimento das L1, que eclodem e atravessam ativamente alvéolos, bronquíolos e brônquios. Com a tosse, as L1 migram para a traqueia e são expelidas no ambiente ou deglutidas, seguindo para o trato digestivo, onde serão eliminada nas fezes a partir do vigésimo oitavo dia de infecção. O adulto pode ser observado nas artérias pulmonares e suas ramificações e no ventrículo direito. O período pré-patente varia entre 28 e 108 dias e o hospedeiro definitivo 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).

Guilhon (1960) demonstrou pela primeira vez como os hospedeiros vertebrados se infectam com *A. vasorum* ao adicionar lesmas do gênero *Arion* de áreas enzoóticas à ração canina, evidenciando, assim, a participação de moluscos no ciclo evolutivo deste parasito.

Por não se conhecer qual a espécie do molusco mais adaptado para manter o ciclo na natureza, vários trabalhos vêm buscando testar em laboratório a susceptibilidade dos moluscos ao parasito. Algumas espécies de moluscos podem ser consideradas como hospedeiro intermediário em potencial para *A. vasorum*, como as lesmas (*Arion ater*, *Arion rufus*, *Arion lusitanicus*, *Deroceras reticulatum*, *Limax flavus*, *Laevicaulus altes*, *Sarasinula marginata*), gastrópodes terrestres (*Achatina fulica*, *Arianta arbustorum*, *Bradybaena similaris*, *Cepaea nemoralis*, *Cochlodina laminata*, *Eceparympha physana*, *Helix pomatia*, *Helix aspersa*, *Prosopaea javanicum*, *Subulina octona*, *Succinea putris*, *Omalonyx matheroni*) e gastrópodes aquáticos (*Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria pfeifferi*, *Physa* sp., *Melanoides tuberculata*, *Pomacea canaliculata*) (Rosen et al 1970, Guilhon & Cens 1973, Sauerlander & Eckert 1974, Barçante et al 2003, 2006, Mozzer et al 2011, Paula-Andrade 2012, Mozzer et al. 2014, Mozzer et al. 2015, Di Cesare et al. 2015, Coaglio et al. 2016).

Em experimentos realizados com moluscos infectados experimentalmente com *A. vasorum*, a recuperação dos estádios larvais varia pouco entre as espécies de hospedeiro intermediário. Nos moluscos *Arion rufus* e *B. glabrata*, a muda de L1 para L2 ocorreu em torno do 7º dia após a infecção (dpi) e da L2 para a L3 exatamente ao 17º dia de infecção (Guilhon 1965, Guilhon & Gaalon 1969). Dessa forma, os autores demonstraram que o desenvolvimento de L1 no molusco ocorre na musculatura e essas realizam poucos movimentos ou ficam praticamente imóveis. As larvas foram recuperadas principalmente nos músculos cefalopodais

e no manto que cobre o pulmão. Em infecções com baixas cargas de nematoides e em infecções com altas cargas parasitárias, as larvas encontravam-se em outros órgãos, como a glândula digestiva e ovotestis. Em outros moluscos testados, como *Omalonyx matheroni*, a L1 foi recuperada até o 4º dpi, a L2 foi recuperada ao 5º dpi e a L3 no 10º dpi (Mozzer et al. 2011). Já em *Subulina octona*, a L1 foi recuperada até o 6º dpi, a L2 no 7º dpi e a L3 no 13º dpi (Bessa et al. 2000). No molusco *Pomacea canaliculata*, a L1 foi encontrada até o 10º dpi, a L2 no 11º dpi e a L3 no 15º dpi.

Sauerlander e Eckert (1974) demonstraram, por infecção experimental, que *A. fulica* é susceptível ao *A. vasorum*, sendo possível recuperar L3 a partir do 17º dia de infecção. As larvas foram recuperadas no pulmão, na região cefalopodal, no manto, na glândula digestiva e no trato gastrintestinal. Coaglio et al (2016), ao realizar experimento com a mesma espécie de molusco e parasito, observou que a L1 foi recuperada até o 5º dpi. Já a L2 começou a ser identificada a partir do 6º dpi e, finalmente, a L3, no 13º dpi.

### **1.5 Achatina Fulica**

O molusco *Achatina fulica*, conhecido como caramujo africano, foi introduzido no Brasil no ano 1980 através de uma feira agrícola no estado do Paraná para ser comercializado como substituto ao *escargot* (*Helix aspersa*). Com os resultados 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 e, atualmente, está presente em 23 dos 26 estados brasileiros, incluindo Minas Gerais (Barçante et al., 2005, Thiengo et al., 2008).

Um dos fatores que proporcionou a dispersão e o estabelecimento do molusco foi o hábito alimentar pouco exigente associado às alterações humanas presentes no meio ambiente, que favoreceu o alto potencial biológico com elevadas taxas de sobrevivência e fecundidade (Albuquerque et al 2008). Esse molusco se encontra em florestas, capoeiras, caatinga e brejos (Eston et al. 2006).

#### **1.5.1 Distribuição geográfica de Achatina fulica e sua participação como hospedeiro intermediário de helmintos**

O molusco *A. fulica* é encontrado naturalmente em regiões costeiras do leste e nordeste da África, como em KwaZulu-Natal, província da África do Sul, em Moçambique, Quênia e



Somália Italiana (Raut & Barker, 2002). Este molusco dispersou para outros locais como Madagascar, Sri Lanka, Japão, Ilhas da Indiana, Austrália, Índia, 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 na agricultura, consome muitas espécies de plantas e hortaliças, modifica habitats e compete com moluscos nativos. *Achatina fulica* é a segunda pior espécie invasora do mundo segundo o Global Invasive Species Database (GISD) e é um vetor importante do *A. cantonensis* em países asiáticos (Sarma et al. 2015).

No Brasil, houve relatos como hospedeiro intermediário para *A. cantonensis* nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Espírito Santo, Amazônia e Minas Gerais (Thiengo et al. 2010, Maldonado et al. 2010, Caldeira et al. 2007, Moreira et al. 2013, Oliveira et al. 2015; Almeida et al., 2023), sendo este parasito de importância médica por causar a meningite eosinofílica no homem. Os casos de meningite eosinofílica do estado do Espírito Santo estão relacionados à ingestão desse molusco. Não há relato de *A. fulica* infectada com *A. costaricensis* ou *A. vasorum*, mas a infecção experimental mostra que esse molusco tem a capacidade de se infectar e desenvolver os parasitos do gênero *Angiostrongylus* sp. (Carvalho et al. 2003, Neuhauss et al. 2007, Coaglio et al. 2016, 2018).

Esse molusco também está associado a outros parasitos de importância médico-veterinária, como *Aelurostrongylus abstrusus*, parasito do pulmão de gatos, com relatos no estado do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Sergipe e Amazônia (Oliveira et al. 2010, Andrade- Porto et al. 2012, Thiengo et al. 2008, Ohlweiler et al. 2010). Outros parasitos encontrados nesse molusco foram larvas de *Rhabditis* sp. e *Strongyluris* sp. (Oliveira et al. 2010), gêneros de parasito encontrados no intestino de anfíbios e répteis.

## 1.6 Sistema de defesa interno dos moluscos

O sistema imune dos invertebrados possui dois componentes principais: a fração celular, constituída pelos hemócitos, e os fatores solúveis, presentes na hemolinfa que funcionam sinergicamente para proteger o indivíduo contra infecções por patógenos (Pereira et al., 2008). Os invertebrados, inclusive os moluscos, são capazes de reconhecer partículas próprias de partículas estranhas, via células, além de componentes humorais da hemolinfa

(Ottaviani 2006). No sistema interno de defesa de *A. fulica*, como de outros moluscos, os hemócitos são as principais células de defesa (Coaglio et al (2018). Estudos de Biswas e Mandal (1999) demonstraram que os granulócitos realizam fagocitose de partículas como carmin, zimosan, bactérias, leveduras e hemácias de ovelhas e humanos. Também observou-se que os hemócitos recuperados de *A. fulica*, previamente inoculados com LPS, induzem a atividade da cascata de coagulação em torno de bactérias em teste *in vitro*. O reconhecimento de patógenos associado ao padrão molecular associado aos patógenos (PAMPs) pelos diferentes padrões de receptores de reconhecimento (PRRs), ativam uma variedade de respostas imune humoral e celular através de cascatas de sinalização. A resposta celular envolve a fagocitose, o encapsulamento e a formação de nódulos, que pode destruir o patógeno diretamente e/ou em associação com fatores humorais. A resposta humoral caracteriza-se pela síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs), ativação da cascata da fenoloxidase (Satyavathiet al. 2014; Coaglio et al., 2018), produção de proteínas formadoras de poros, produção de derivados de nitrogênio e oxigênio, lisozimas (Coaglio et al 2018).

As células circulantes originam, em moluscos, no órgão produtor de hemócito (APO), que se situa entre a cavidade do manto, no pericárdio, na porção sacular dos tubos renais e na cavidade ventricular do coração (Ottaviani 2006, Souza & Andrade, 2006, Souza & Andrade 2012). Nos moluscos, a população celular conhecida por hemócitos, constituem as principais células de defesa, sendo capazes de reconhecer e fagocitar os patógenos. Nesses, há pelo menos uma população de hemócitos na hemolinfa, que realizam a fagocitose de partículas estranhas, que invadem o sistema interno de defesa dos moluscos (Adema et al 1992). O número de hemócitos circulantes varia de acordo com a espécie e a presença de infecções, sendo que alguns estudos apoiam a ideia de que essas células se deslocam da circulação e migram para sítios inflamatórios (Bezerra et al. 1997, Cueto et al. 2015).

Nos gastrópodes são descritos dois tipos de hemócitos, sendo eles os 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, descrito no molusco *Planorbarius corneus*. 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*, *Helix aspera* e *L. stagnalis*. Todos eles apresentam hemócitos morfologicamente semelhantes, 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.

Os hemócitos ativados alteram sua morfologia e transformam-se, passando de células livres em aderentes para formar agregado celular (Satyavathi et al. 2014). Nesse contexto, ocorre a fagocitose, que inicia após o reconhecimento do patógeno, ocorrendo engolfamento e destruição intracelular (Satyavathi et al. 2014). Nos moluscos, as células responsáveis por esse processo são os granulócitos (Ottaviani et al. 2006).

O encapsulamento é um fenômeno onde ocorre uma ligação entre os hemócitos e os patógenos considerados grandes para serem fagocitados, como larvas de parasitos, protozoários, trematodeos e nematoides. Os hemócitos formam uma cápsula de multicamadas ao redor do parasito e este processo é acompanhado por produção de citocinas-like, de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e por melanização, o que pode levar a morte do patógeno (Satyavathi et al. 2014). No encapsulamento, tem sido evidenciada a presença tanto de granulócitos quanto de hialinócitos. Já a nodulação ocorre quando os hemócitos agregam-se e formam multicamadas para aprisionar um grande número de bactérias, fungos e vírus, podendo estar relacionada com a ativação da cascata da fenoloxidase, em alguns invertebrados (Satyavathi et al. 2014).

Os hemócitos, em associação com os componentes solúveis presentes na hemolinfa, potencializam a destruição de parasitos (Pereira 2008). Dentre os componentes solúveis tem-se as lectinas (Ito et al 2011), peptídeos microbianos (Ottaviani et al. 1990, Mitta et al. 2000), derivado de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), derivados de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Ottaviani et al. 1993, Pereira et al 2006), as enzimas lisossomais (Granath & Yoshino 1983) e as citocinas *like*.

Durante o reconhecimento de parasitos, os hemócitos ativados presentes na hemolinfa circulante liberam produtos citotóxicos ( $H_2O_2$ , NO, ONOO<sup>-</sup> (peroxinitrito)), que podem danificar o tegumento de trematódeos (Hahn et al. 2001, Ottaviani 2006).

Outro mecanismo de defesa dos invertebrados, inclusive em moluscos terrestres infectados com *A. vasorum* é a melanização. A ativação da cascata de proPO (pró-enzima de fenoloxidase) se dá por proteases de serina zimogênica, homólogos de serina protease e proteínas de reconhecimento padrão. A fenoloxidase (PO) é uma enzima envolvida no processo fisiológico do sistema imune inato dos invertebrados (Cerenius et al. 2008, Gupta et al. 2005, Le Clec'h et al. 2016, Coaglio et al., 2018).

Além da participação no processo de resposta contra patógenos, a melanização pode estar relacionada a outros mecanismos, como pigmentação de concha em molusco bivalve *Crassostrea gigas* e na proteção contra raios ultravioleta (Li et al 2022).

A fenoloxidase (PO) é produzida, principalmente, nos hemócitos específicos, como a

célula cristal, na mosca da fruta e na monocitoide pertencente a outros insetos. Nos crustáceos, é produzida nos hemócitos tipos granulares, sendo que nos camarões peneídeos, o sistema proPO ocorre nas células semi granulares e granulares. Detectou-se que células, tanto no plasma como nos hemócitos de moluscos como *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Illex argentinus* e *Perna perna* o proPO, ao desgranularem, liberam-se do proPO sem perder a viabilidade (Cerenius et al. 2008, Vlisidou and Wood 2015, Sritunyalucksana e Söderhäll 2000, Aladaileh et al. 2007).

A ativação do proPO se dá pelos PAMPs (padrão molecular associada ao patógeno) como os peptidioglicanos, lipopolissacarídeos de bactérias e o  $\beta$ -1,3- glucano de fungos e, também, por danos causados no tecido do hospedeiro e por enzimas liberadas pelos patógenos (Cerenius et al. 2008, Hu et al. 2016, Vlisidou and Wood 2015). O proPO é um zimógeno, que, ao ser ativado por infecção patogênica ou ferimento, ativa uma cascata de serina protease e ativa, o PPO. Para que ele se torne ativo, uma enzima semelhante a tripsina, a proteinase ativadora de PPO (PAP), cliva o PPO no local de clivagem proteolítica conservado, perto do terminal -N, para assim gerar o PO ativo. Este possui atividade *o*-hidroxilase e *o*-difeno oxidase que converte o substrato monofenólico e *o*- difenólico em *o*-quinona. A quinona age como reticulador em feridas e quando o patógeno é muito grande para ser fagocitado, ocorre um encapsulamento ao redor do parasito. Tal processo é acompanhado pela produção de melanina, resultando em um escurecimento ao redor do parasito, de forma que a cápsula endurece, levando o patógeno à morte (Hu et al. 2016, Fors et al 2014).

Uma vez ativa, a cascata da fenoloxidase contribui no controle da infecção ao converter a tirosina em DOPA, um substrato que é oxidado pelo PO em dopaquinona ou descarboxilado por DOPA descarboxilase para dopamina, resultando na melanização. A fenoloxidase ajuda na melanização, fagocitose, nodulação de patógenos e produz metabolitos tóxicos para eliminar os patógenos (Satyavathi et al. 2014, Sritunyalucksana e Söderhäll 2000).

A ativação da cascata da fenoloxidase produz várias moléculas nocivas aos patógenos, como as proteases, que podem degradar a proteína do hospedeiro, quinonas citotóxicas, moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio. Para tanto, há mecanismos de regulação de duração da atividade de PO, um inibidor de serina protease como a pacifastin presente na lagosta *Pacifastacus leniusculus* as sepins, como a serpin-1j, serpin-3, serpin-6 identificada em *Manduca sexta* (González-Santoyo e Córdoba-Aguilar 2012, Gupta et al. 2005).

Em *Achatina fulica* infectada por *A. vasorum* verificamos em Coaglio et al., (2018) a ativação de PO na hemolinfa, hemócitos e tecido de *A. fulica* infectada com 1000 L1 de *A. vasorum* no período de 0, 1°, 8°, 13° e 30° dias após infecção (dpi). Observou-se atividade de

PO e produção de melanina tecidual em *A. fulica*, variando entre o controle e infectados. Ao 1°dpi observou-se com L-tirosina ( $p < 0,001$ ), L-Dopa ( $p < 0,05$ ) e PPD ( $p < 0,01$ ) aumento de PO coincidente com cristais de melanina. Ao 8° dpi observou-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 a PO dosificada com L-DOPA, L-tirosina. Ao 13° 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 30° dpi a PO com L-tirosina não alterou, sendo que para L-DOPA e PPD aumentou e no tecido decresceu a concentração de melanina. O NO foi crescente até 8° dpi decrescendo até 30° dpi. Sendo assim, sugere-se que via de PO presente em *A. fulica* pode auxiliar no controle da infecção por *A. vasoum*, visto que, esse molusco é pouco suscetível ao parasito (Coaglio et al., 2018).

A superfamília das peroxidases são amplamente distribuídas entre os organismos. É sabido que a heme peroxidase é uma enzima envolvida na melanogênese em moluscos (Timmermans, 1968). Heme peroxidases são enzimas prontamente abundantes que podem ser classificadas em duas famílias principais, nomeadamente peroxidases animais e não animais (Loughran et al. 2008). A heme-peroxidase 2 (HPX2) é um membro da superfamília das peroxidases, possuindo um domínio conservado de heme peroxidase animal. O grupo heme prostético é um derivado da protoporfirina IX, que é um componente essencial do esquema catalítico em heme peroxidases (Singh et al., 2017).

Em *Crassostrea gigas*, a enzima heme-peroxidase 2 (CgHPX2) está presente no colar do manto envolvida no processo de pigmentação das conchas nessas ostras (Min, Li & Hu. 2022). CgHPX2 pertence à categoria de peroxidases animais, que inclui mieloperoxidase (MPO) de mamíferos, lactoperoxidase (LPO), eosinófilo peroxidase (EPO) e peroxidase da tireóide (TPO) (Loughran et al 2008). Análise filogenética da proteína CgHPX2 com peroxidases agrupou-se com peroxidase melanogênica de cefalópodes e de *Sepia officinalis* (Charles 2014). Entretanto, são necessários mais estudos sobre a participação de MPO, EPO e LPO no sistema interno de moluscos. EPO e MPO têm sequências de nucleotídeos e aminoácidos semelhantes e também mostram organização de subunidades de proteínas semelhantes, no entanto a EPO é resistente ao cianeto.

## 2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a participação de *Achatina fulica* no contexto de saúde pública integrada, na medicina humana e na medicina veterinária, deve ser proposta, uma vez que há relatos de infecções naturais desse molusco com larvas de nematóides *Angiostrongylus cantonensis*, *Aelurostrongylus abstrusus*, *Rhabditis* sp. e *Strongyluris* sp. em várias regiões brasileiras.

*Achatina fulica* infecta-se com *A. vasorum* em condições laboratoriais, apresentando susceptibilidade menor do que a verificada em outros moluscos. Sendo assim, é importante elucidar possíveis mecanismos presentes no sistema interno de defesa desse potencial hospedeiro intermediário ao *A. vasorum*.

A superfamília das peroxidases são encontradas desde organismos procariotas até os eucariotas. Em moluscos, as hemes peroxidases participam do processo de melanogênese, no entanto, várias dessas proteínas não tem todas as funções conhecidas. Como *A. fulica* apresenta melanina no entorno das larvas de *A. vasorum* intramolusco, e a biossíntese de melanina é um processo complexo, observar a participação de enzimas semelhantes a mieloperoxidase like (MPO-like), N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase-like (NAG-like) na interação entre esse molusco e o nematóide é importante, uma vez que, na associação entre moluscos e helmintos apresenta várias lacunas a serem elucidadas.

O conhecimento gerado poderá auxiliar estratégias de controle do molusco e das doenças a ele associadas, já que ele pode se tornar um mantenedor de vários ciclos biológicos de helmintos parasitos na natureza, como o já relatado *A. cantonensis* na área urbana da capital mineira.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Manutenção do parasito**

A cepa de *A. vasorum* usada foi isolada de um cão naturalmente infectado proveniente do município de Caratinga - MG em 1985 por Lima e colaboradores. O ciclo do parasito é mantido, desde então, em cães, no canil de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG) e em moluscos *Biomphalaria glabrata* no Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LabHelVet\_ICB\_UFMG) sob protocolo 227/2021.

#### **3.2 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 LabHelVet\_ICB\_UFMG (Coaglio et al., 2013). As gerações dos moluscos permanecem em aquário de 30 cm de altura, 44 cm de comprimento e 44 cm de largura, com argila autoclavada e água, sendo alimentados, duas vezes por semana, com alface e ração suplementada com carbonato de cálcio. Em cada aquário são alocados trinta moluscos. Os ovos depositados no aquário são recolhidos e transferidos para uma cuba de criação. Os moluscos eclodidos receberam os mesmos tratamentos e foram utilizados nos experimentos.

#### **3.3 Obtenção de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum***

Para que se possa obter as L1, foi realizada coleta das fezes dos cães mantenedores da cepa de *A. vasorum*, submetidas à técnica de Baermann (Barçante et al., 2003). em que um funil de vidro é conectado ao tubo de hemólise e unido pelo tubo de látex. A amostra coletada foi enrolada em gazes dobradas e posteriormente colocada dentro do funil com água a 42°C. Após 12 h, o tubo de hemólise foi retirado do aparelho de Baermann, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, lavado 5 vezes em água de torneira para limpeza das L1. Posteriormente, foram homogeneizadas e realizadas contagens de três alíquotas de 10 µL para obtenção do número médio das larvas, que foram utilizadas na infecção dos moluscos.

#### **3.4 Infecção de *A. fulica* com larvas de primeiro estágio de *A. vasorum***

### 3.4.1 Delineamento experimental

Foram formados 3 grupos, alocados em aquários diferentes e composto por 40 moluscos com a concha contendo tamanho aproximado de 4cm. Os experimentos foram feitos em quadriplicata.

Grupo1 ingestão de L1: Utilizou-se 40 moluscos medindo 4cm de concha para infecção individual por ingestão oral de 1000 L1 concentradas em 1mL de água. As larvas foram alocadas no fundo do recipiente de infecção de 4 cm largura por 5 cm de altura e em seguida cada molusco foi colocado em seu respectivo recipiente. Ao longo de cinco horas, os moluscos alocados nos recipientes de infecção foram monitorados para constar se eles estavam em contato com as larvas. Caso estivessem deslocados da suspensão de L1, eram recolocados em contato com as larvas com o auxílio de uma pinça. Para evitar a fuga, após cinco horas, os recipientes foram tampados com outro semelhante de menor tamanho, de forma que este ficasse o mais próximo da concha do molusco, diminuindo sua locomoção. Os recipientes foram selados com fita adesiva, deixando um espaço para permitir a entrada do ar. Os moluscos permaneceram no recipiente de infecção por 24 horas em temperatura ambiente (Coaglio 2013).

Grupo2 inoculação de L1: A inoculação de L1 ocorreu em 40 moluscos medindo 4cm de concha. As L1 foram quantificadas e mantidas em volume de 0,3mL de água com 1.000 L1, aspiradas em um seringa de um mL e inoculadas na região cefalopodal de cada um dos moluscos com auxílio de uma agulha com calibre 21G.

Grupo3 controle: composto por 40 moluscos medindo 4cm de concha, alocados em aquário de mesmas condições, sem infecção.

Após 24 horas, os moluscos infectados e controle foram transferidos para aquários de criação e monitorados por um período de 30 dias. Os recipientes de infecção foram analisados para a contagem das larvas remanescentes e análise da taxa real de infecção nos moluscos. O líquido restante foi transferido para um tubo de 15 mL, centrifugado na quantidade de 180g por 10 minutos, tendo o sobrenadante descartado. Já as larvas presentes no sedimento foram aferidas conforme Pereira et al. (2006). Com um, oito e 30 dias de infecção, 10 moluscos de cada grupo foram eutanasiados para obtenção de hemócitos e tecidos da região cefalopodal, tendo sido utilizados como descrito a seguir. Ao 1º dpi teremos a presença de L1, no 8º L2 e no 30º dpi encontram-se as L3.

Aos 30 dias após a infecção, realizou-se eutanásia. Retirou-se, então, um grama do tecido da região cefalopodal do caramujo. O restante dos tecidos foram submetidos à técnica de Baermann modificada por Barçante et al.(2003). A concha foi quebrada, sendo os tecidos



moles do molusco picotados com auxílio de bisturi e tesoura e transferidos para um recipiente contendo água de torneira. Este material permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas, a fim de observar saída espontânea de L3. Após filtragem do material do Baermann, os restos dos tecidos foram submetidos a digestão química com ácido clorídrico e pepsina 1% conforme Coaglio et al., (2013), com objetivo de recuperar o restante de L3 infectante de *A. vasorum*.

Após os moluscos serem observados por 30 dias, foram eutanasiados e todo seu tecido foi submetido à técnica de Baermann seguida de digestão por ácido clorídrico para posterior contagem de larvas. O material foi analisado em microscópio estereoscópico a fim de recuperar o maior número possível de L3.

### **3.5 Coleta da hemolinfa e tecido da região cefalopodal de *A. fulica***

Para avaliar o comportamento do sistema interno de defesa de *A. fulica* durante a infecção por *A. vasorum*, hemócitos e tecidos da região cefalopodal circulantes foram recuperados após 1, 8 e 30 dias após a infecção (dpi). O tecido foi congelado em freezer a -20°C e os hemócitos, após coletas, foram utilizados para os experimentos no mesmo instante.

A coleta da hemolinfa foi realizada por meio de punção cardíaca em todos os grupos (Coaglio et al., 2018). A concha foi desinfetada com álcool 70% e secada com papel absorvente, em seguida perfurada com uma mini furadeira, na região do coração. Realizou-se a punção do coração com seringa de insulina de 1000 µL (Manoject 50 unit), e a hemolinfa extravasada foi coletada e transferida para filme plástico acondicionado sobre banho de gelo (Coaglio 2013).

Para evitar a aglutinação celular, a hemolinfa foi coletada diretamente em PBS contendo Citrato/EDTA, conforme Pereira et al. (2008). Antes de realizar os testes com a fração celular, a viabilidade dos hemócitos foi estimada por meio da incubação das células em meio PBS contendo 0,4% de Azul de Tripán (diluição 1:10), contagem em câmara de Neubauer, sendo as células coradas de azul consideradas mortas (Martins-Souza, 1999).

### **3.6 Determinação do perfil funcional presente no hemócitos e nos tecidos da região cefalopodal de *A. fulica***

#### **3.6.1 Avaliação de atividade enzimática presentes em hemócitos de *Achatina fulica***

Para compreender o processo de melanogênese presente em *Achatina fulica* desafiado com *A. vasorum* observou-se se nos hemócitos e nos tecidos da região cefalopodal de *A. fulica*

poderiam ter atividade enzimática semelhante à atividade da enzima N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG) encontrada em macrófagos, e da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos.

### 3.6.2 Quantificação da determinação de N-acetil-b-D-glicosaminidase like (NAG like) em tecido da região cephalopodal de *A. fulica*

A amostra do tecido da região cefalopodal, que estava armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foi então descongelada em banho de gelo, sendo 40mg de tecido acondicionado em tubos de polipropileno de 2,0 mL. Em seguida, acrescentou-se 760 $\mu\text{L}$  do tampão contendo solução salina 0,9% com 0,1% v/v Triton X-100 a  $4^{\circ}\text{C}$  e os tecidos foram homogeneizados em homegeneizador de tecidos. A amostra processada foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Desprezou-se o sobrenadante vertendo os tubos lentamente e adicionou-se 600 $\mu\text{L}$  de NaCl 0,2% a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e, em seguida, adicionou-se 600 $\mu\text{L}$  de NaCl 1,6% + glicose 5% a  $4^{\circ}\text{C}$ . Homogeneizou-se as amostras rapidamente utilizando o homegeneizador de tecidos, centrifugando a 10.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Desprezou-se o sobrenadante vertendo os tubos lentamente e adicionando 760 $\mu\text{L}$  do tampão a temperatura ambiente. Homogeneizou-se rapidamente as amostras utilizando o homegeneizador de tecidos. O homogenato foi acondicionado em recipientes de 1,5 mL.

Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi utilizada para análise de MPO no passo seguinte e outra alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi congelada três vezes em nitrogênio líquido e descongelada em água a temperatura ambiente, de maneira alternada. A amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Ensaio enzimático: Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  das amostras em uma placa de 96 poços em duplicata e para o branco foi utilizado o tampão. Em seguida foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do substrato (p- nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. A leitura na leitora de microplaca Polaris a 405 nanômetros.

### 3.6.3 Quantificação da mieloperoxidase-like (MPO like) em tecido da região cephalopodal de *A. fulica*

O sedimento destinado à dosagem de MPO foi homogeneizado e ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos

a 4°C. A atividade de MPO no sobrenadante foi mensurada por meio da variação da absorbância (densidade óptica; DO) a 450nm. Nas amostras (100 µL) foram adicionados 100µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina 1,6mM (TMB-Sigma) preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) junto com 100 µL de tampão fosfato 80 mM (pH 5,4) contendo peróxido de hidrogênio 0,3 mM (Sigma). A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1 M e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca (Polaris). Os resultados expressos em densidade óptica por miligrama.

#### 3.6.4 Avaliação da expressão de peroxidase

Os hemócitos foram monitorados para a expressão de peroxidase resistente ao cianeto conforme descrito por Ten et al., (1989). Resumidamente, 100 µL de hemócitos ( $1 \times 10^5$  hemócitos) de moluscos controle e infectados obtidos por punção cardíaca foram transferidos para lâminas de microscopia, as quais ficaram em câmara úmida por 60 minutos para adesão celular a temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS a temperatura ambiente para retirar o excesso de hemolinfa. Foram então fixadas em formol a 4% com acetona por 30 segundos e corado por 10 min em fosfato tampão contendo 3,3 tetracloridrato de diaminobenzidina (0,25%), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cianeto de potássio (KCN) - 0,2% ao abrigo de luz. As lâminas foram contrastadas em hematoxilina de Delafild e montado com Entelan . As imagens foram capturadas por meio do microscópio Nikon Eclipse E200 equipado com uma câmera digital e pelo software NIS Elements, versão 2.3 por meio da técnica de aprimoramento de contraste de iluminação de campo claro (DIC).

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando análise de variância ou teste t de Student para os dados paramétricos e teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos.

## 5 RESULTADOS

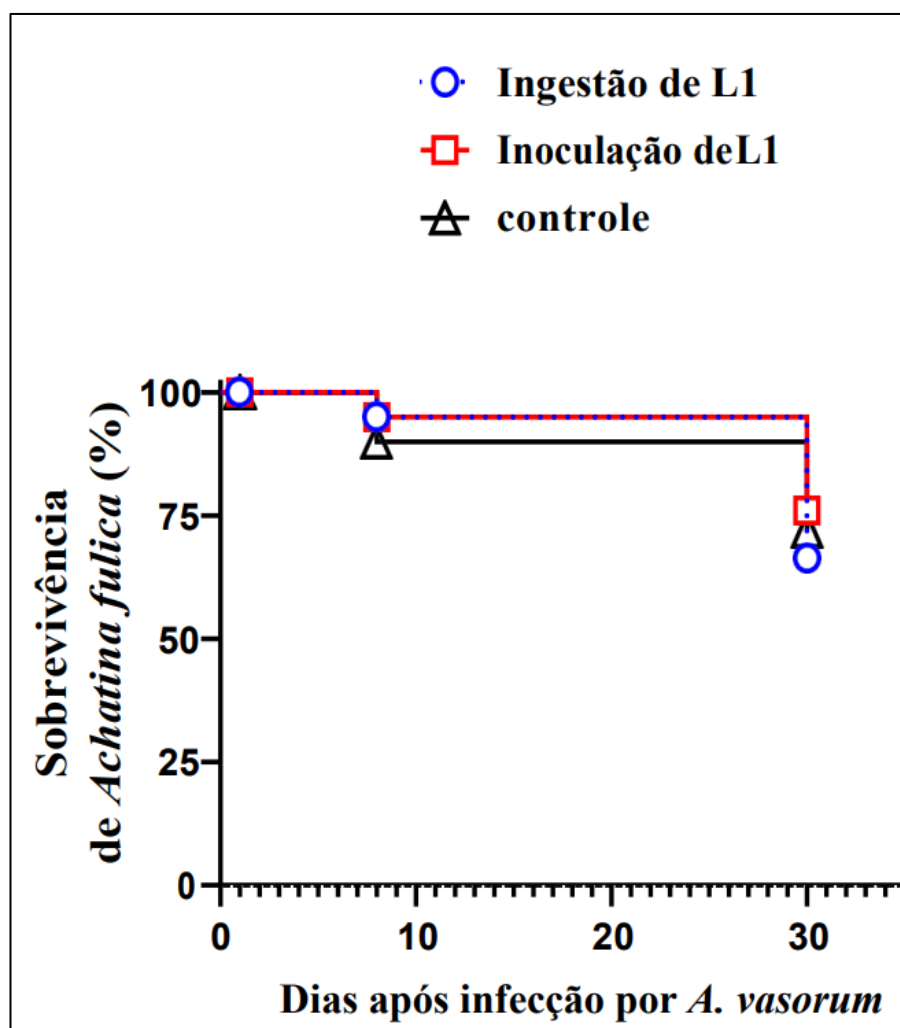
### 5.1 Carga parasitária e taxa de sobrevivência de *A. fulica* infectada por larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*

Observou-se o comportamento de *Achatina fulica* durante o desenvolvimento de L1 ao 1º dpi; de L2 o 8º dpi e de L3 ao 30º dpi de *A. vasorum* no Grupo ingestão de L1; no Grupo inoculação de L1; e no Grupo controle. Foram utilizados de 40 moluscos por grupo experimental e em cada experimento foram infectados 10 por grupo, totalizando quatro experimentos independentes. Ao final utilizou-se 120 infectados e, para cada ponto, foram utilizados 40 moluscos.

Observou-se apenas 1,8% das 1000 L1 nas placas de infecção do Grupo ingestão de L1, ou seja, 98,2% das L1 foram ingeridas. No grupo inoculação não foi observado nenhuma larva nas placas de infecção 24h após a exposição as L1 de *A. vasorum*.

Após a infecção, independente da técnica ingestão de L1 ou inoculação de L1, 30% dos moluscos morreram até 30 dias após a infecção. Entre eles, moluscos que estavam em aquários livres de contato com *A. Vasorum*. Fazendo uso da comparação estatística com Log-rank (Mantel-Cox), não houve diferença significativa (valor de  $p > 0,05$ ) entre as curvas de sobrevivência dos moluscos dos diferentes grupos de infecção (Figura 2).

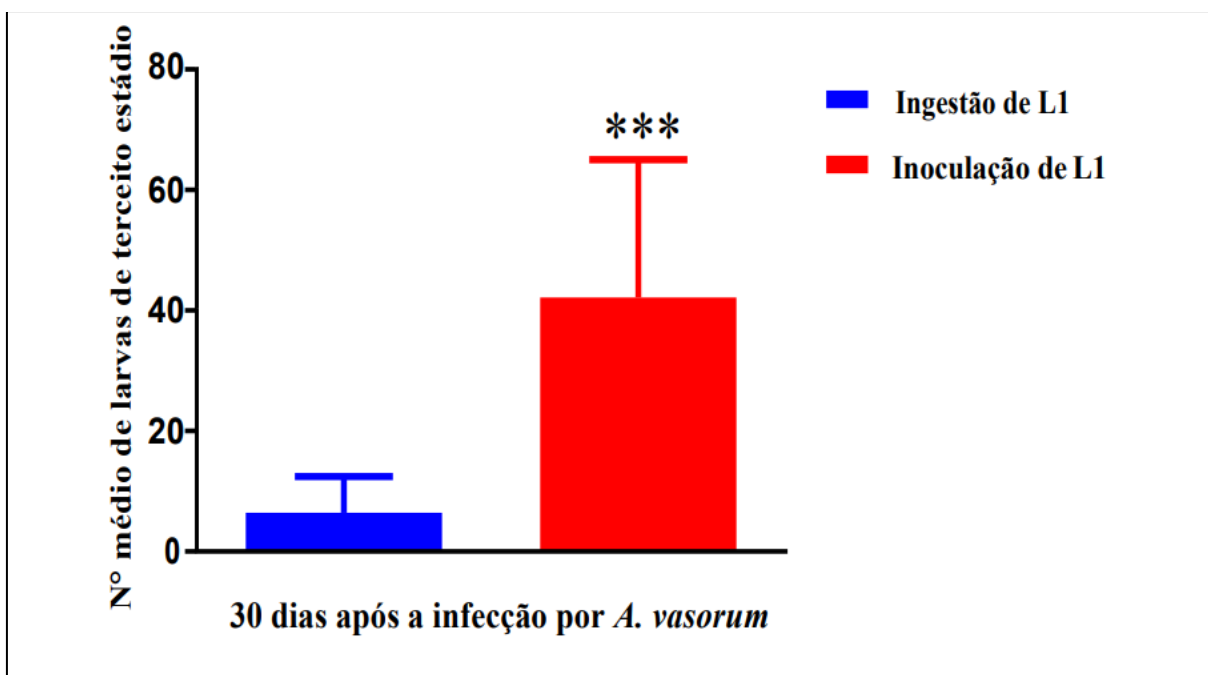
Figura 2 - Porcentagem de sobrevivência de *A. fulica* dos grupos 2 e 3 infectados com 1000 L1 de *A. vasorum*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Cada ponto representa a taxa de sobrevivência nos dias analisados.

Na Figura 3, observa-se que, após 30 dias de infecção por *A. Vasorum*, recuperou-se número médio de  $6,42 \pm 5,99$  L3 nos moluscos que foram infectados por ingestão de L1 de *A.vasorum*. No grupo que as L1 foram injetadas recuperou-se  $42,14 \pm 23,00$  L3 no mesmo período. Estatisticamente, houve uma diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ), evidenciando que, no Grupo de inoculação de L1 recuperou-se sete vezes mais L3 do que no Grupo ingestão oral de L1.

**Figura 3** - Número médio de las L3 recuperadas de *A. fulica* dos grupos 2 e 3 30 dias após a infecção com 1000 L1 de *A. vasorum*.



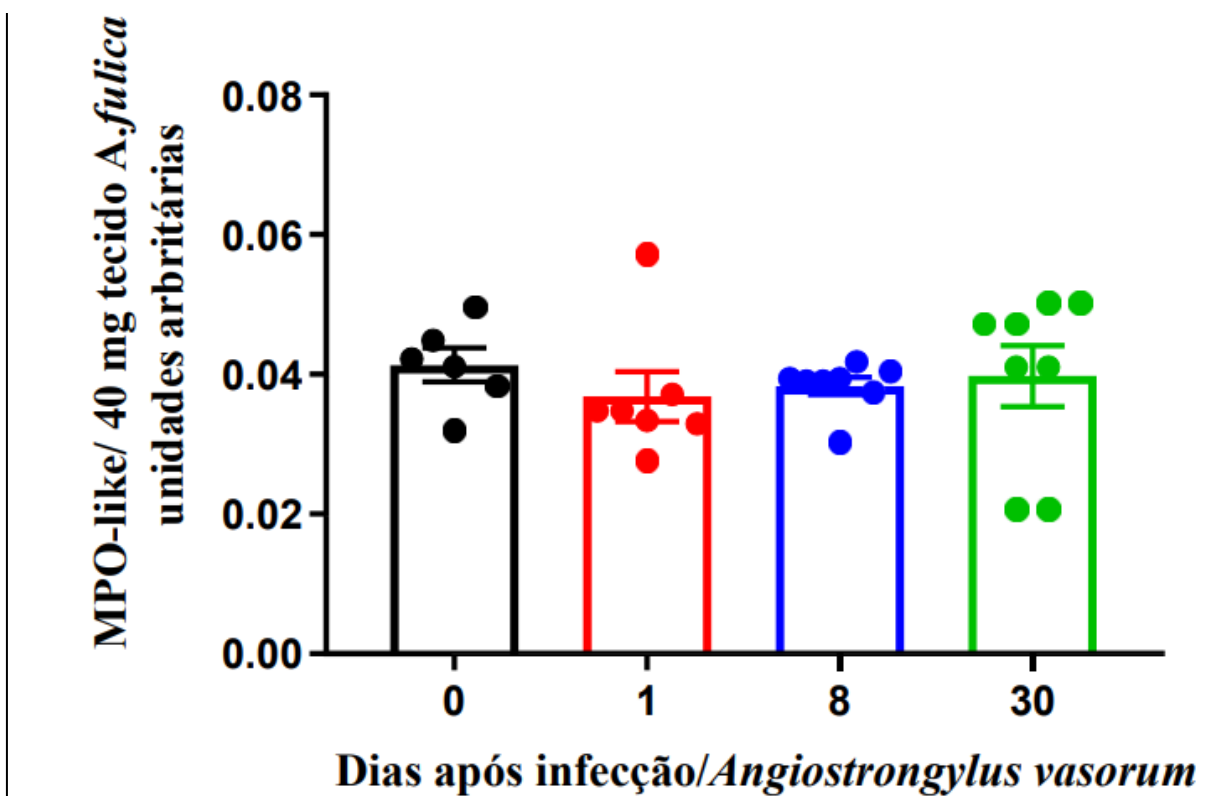
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

**Legenda:** Mann Whitney test : \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao molusco que ingeriram L1. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido após 30 dias após de infecção.

## 5.2 Avaliação de atividade enzimática presentes em hemócitos de *Achatina Fulica*

A quantificação dos níveis de mieloperoxidase-like (MPO-like) no homogenato do tecido cefalopodal de *A. fulica* foi utilizada como uma medida indireta da ativação de hemócitos presentes neste tecido durante a infecção do molusco por *A. vasorum* (gráfico 3). Observou-se que antes do desafio com o *A. vasorum* os níveis médios  $\pm$  desvio padrão foram de  $0,041 \pm 0,005$ . Ao 1º dia após infecção observou-se  $0,036 \pm 0,009$ . Ao 8º dia após a infecção, os níveis detectáveis foram de  $0,038 \pm 0,003$  e, ao 30º dia após a infecção, de  $0,039 \pm 0,012$ . Esses resultados foram homogêneos entre quatro repetições independentes, sendo que em cada ponto utilizou-se de 6-8 *A. fulica* por dia de infecção. Não houve diferença estatisticamente significativa, valor de  $p < 0,05$  entre moluscos controle e moluscos infectados pelo *A. vasorum* (Figura 4).

**Figura 4** - Níveis de mieloperoxidase like (MPO-like) no homogenato da região cephalopodal de *A. fulica* do Grupo 1 durante a infecção com 1000 L1 de *A. vasorum*.

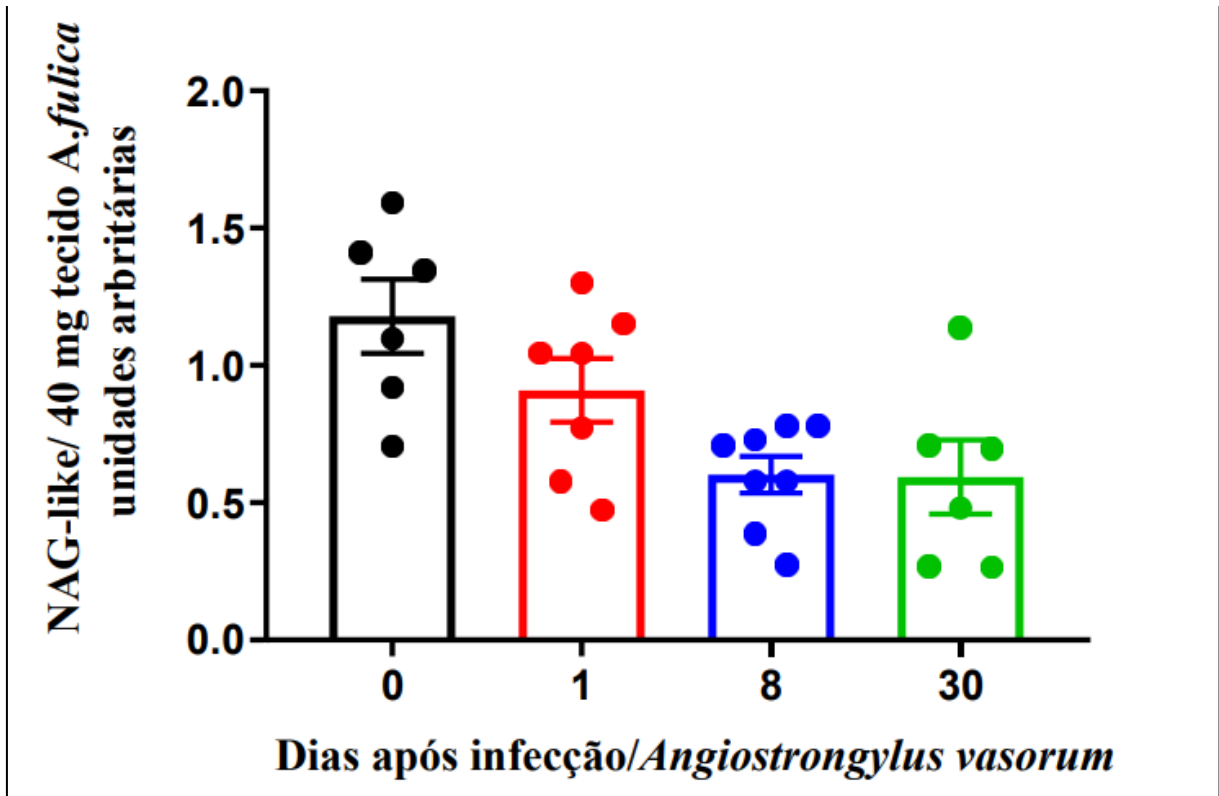


Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido por dias após a infecção.

### 5.2.1 N-acetilglucosaminidase like (NAG-like)

A quantificação dos níveis de N-acetilglucosaminidase like (NAG-like) no homogenato do tecido cephalopodal de *A. fulica* foi utilizada como uma medida indireta da ativação de hemócitos presentes neste tecido durante a infecção do molusco por *A. vasorum* (Figura 5). Observou-se que, antes do desafio com o *A. Vasorum*, os níveis médios  $\pm$  desvio padrão foram de  $1,178 \pm 0,331$ . Ao 1º dia após infecção, observou-se  $0,909 \pm 0,307$ , ao 8º dia após a infecção, os níveis detectáveis foram de  $0,593 \pm 0,003$  e, ao 30º dia após a infecção, foram de  $0,039 \pm 0,330$ . Esses resultados foram homogêneos entre as quatro repetições independentes, sendo que em cada ponto utilizou-se de 6-8 *A. fulica* por dia de infecção. Não houve diferença estatisticamente significativa entre moluscos controle e moluscos infectados pelo *A. vasorum* (Figura 5).

**Figura 5** - N-acetilglucosaminidase like (NAG-like) no homogenato da região cephalopodal de *A. fulica* durante a infecção com 1000 L1 de *A. vasorum*.



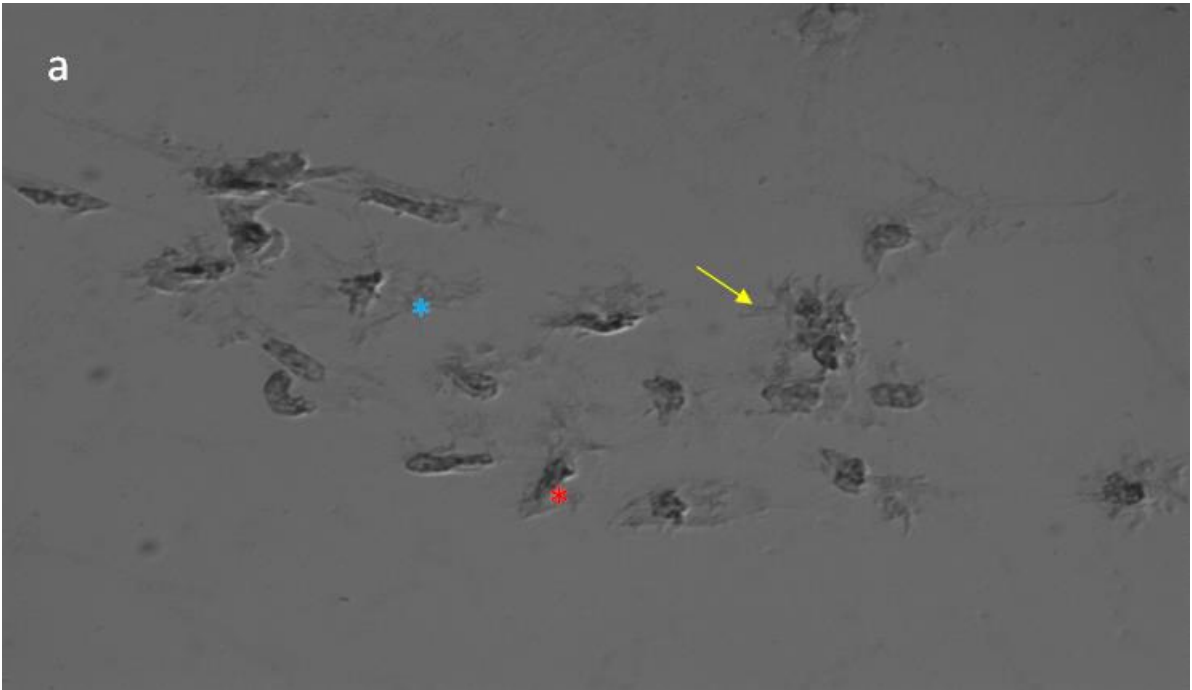
Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido por dias após a infecção.

### 5.2.2 Coloração para Peroxidase-like

Conforme demonstrado na Figura 6a, observou-se, nos hemócitos obtidos de moluscos livres de infecção e infectados, a presença de filópodos (seta amarela), o citoplasma (asterisco azul) e núcleo (asterisco vermelho). Por meio da técnica de Ten et al., (1989) observou-se a presença de peroxidase, que é resistente ao cianeto, em grânulos citoplasmáticos positivos indicados na Figura 6b pelas setas amarela.

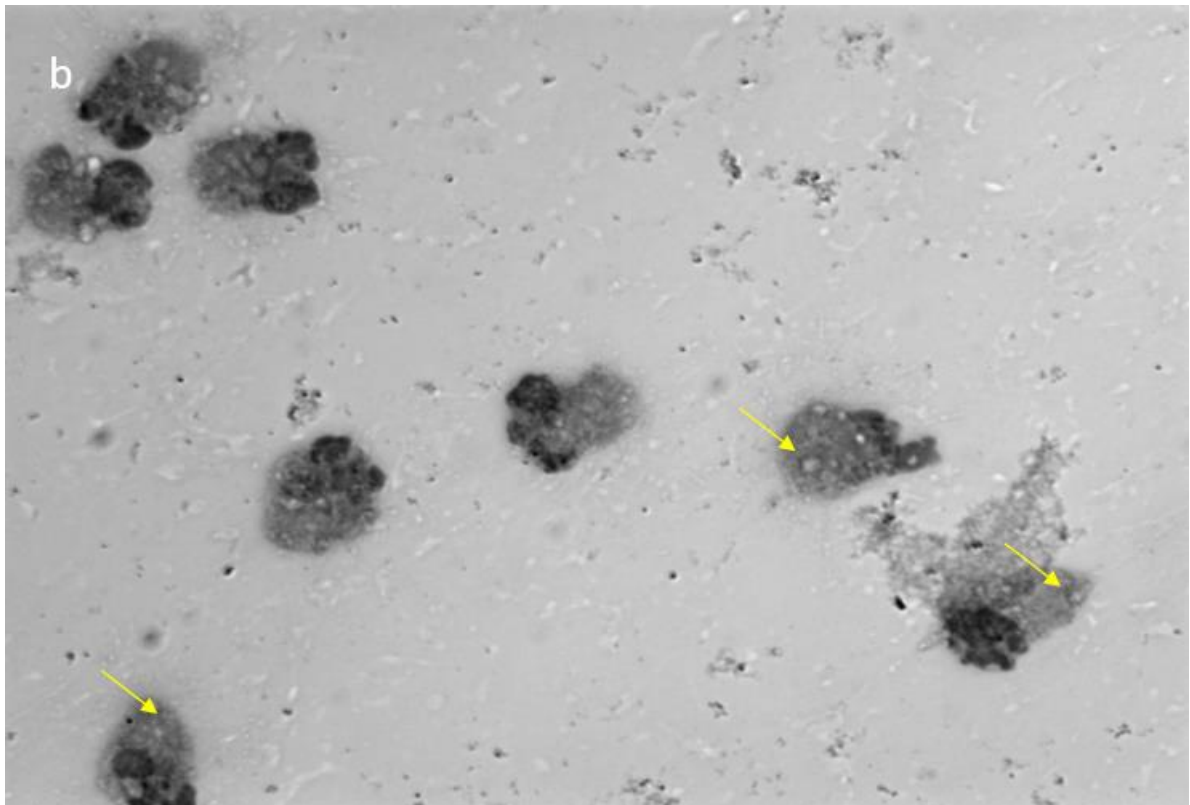


**Figura 6** - SEQ ARABIC 6a - Hemócitos de *A. fulica* do Grupo 1 durante a infecção com 1000 L1 de *A.*



Fonte: Imagem de microscópio de testes laboratoriais da autora, 2023.

**Figura 7** - SEQ Figura \\* ARABIC 6b - Presença de granulos positivos de Peroxidase-like em hemocitos de *A. fulica* do Grupo 1.



Fonte: Imagem de microscópio de testes laboratoriais da autora, 2023.

**Legenda:** Hemócitos aderidos a lâminas de vidro evidenciando a presença de filópodios (seta amarela), citoplasma (asterisco azul) e núcleo (asterisco vermelho) Observa-se nos, o citoplasma (asterisco azul) e núcleo (asterisco vermelho) figura 6a. 6b grânulos citoplasmáticos positivos indicado pela seta amarela.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Infecção de *A. fulica* por ingestão e inoculação de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*

Apesar do ciclo de *Angiostrongylus* sp. ser realizado em diversos moluscos, pouco se sabe sobre a eficiência das vias de infecção nos hospedeiros intermediários. Nesse trabalho, observou-se que a inoculação de L1 de *A. vasorum* na região cefalopodal permite a recuperação de L3 sete vezes maior quando comparado com a infecção por ingestão de L1, sendo portanto uma forma eficiente para a manutenção do ciclo desse parasito em laboratório. Esse fato ainda não havia sido testado em outros estudos que associam *Angiostrongylus* sp. e os moluscos gastrópodes, sendo, portanto, inédita a observação de que a inoculação de L1 nos tecidos da região cefalopodal de *Achatina fulica* produz elevada recuperação de L3.

Ao final do experimento, os moluscos inoculados no Grupo 2, recuperaram um maior número de L3 quando comparados aos moluscos do Grupo 2 que ingeriram as larvas, pois mesmo que estas 2 vias de infecção aconteçam no ambiente a penetração é uma via ativa que acontece com mais frequência.

Resultado oposto foi verificado por Neuhaus et al., (2007) quando observaram que de 10.000 L1 de *A. costaricensis* colocados entre orifício realizado entre a concha e colar do manto *Achatina fulica* recuperou-se 0.002% de L3.

A inoculação das L1 nos tecidos da região cefalopodal dos moluscos proposta no presente trabalho justifica-se pela penetração ativa de larvas L1 de nematódeos metastrogilídeos em seus hospedeiros intermediários. Em moluscos gastrópodes ocorre a penetração ativa e direta nos tecidos expostos, seja por ingestão ou por uma combinação de ambas as vias de infecção (Hobmaier & Hobmaier 1934, Cheng & Alicata 1965, Richards & Merritt 1967). Morera (1973) descreveu que hospedeiros intermediários de *A. costaricensis* se infectam por via oral e Thiengo (1996) demonstrou em *Sarasinula marginata* desafiado com *A. costaricensis* ocorrência simultânea de penetração cutânea e oral.

Essas duas vias de infecção foram confirmadas por Mendonça et al. (1999) em infecção

experimental de *S. marginata* com *A. costaricensis*. Assim, como Montessor et al., (2005) que observaram em *Omalonyx matheroni* as duas formas de infecção por 1000 L1 de *A. costaricensis* por caramujo.

## 6.2 Avaliação de atividade enzimática presente em *Achatina fulica*

Como há algumas evidências de que os hemócitos de moluscos são semelhantes aos granulócitos e/ou aos macrófagos de vertebrados, algumas enzimas constantemente quantificadas em vertebrados foram avaliadas nos tecidos da região cefalopodal de *Achatina fulica* infectada por *A. vasorum*, sendo elas, mieloperoxidase de neutrófilos, N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase de macrófagos.

A N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988). Nesse trabalho ocorreu níveis detectáveis nos tecidos da região cephalopodal de *A. Fulica*, mas que diminuíram com o desenvolvimento do parasito, sugerindo que os níveis da enzima NAG-like e os hemócitos de *A. fulica* não são tão semelhantes ao detectado em macrófagos.

Segundo (Loughran et al., 2008) CgHPX2 pertence à categoria de peroxidases animais que inclui mieloperoxidase (MPO) de mamíferos, lactoperoxidase (LPO), peroxidase de eosinófilo (EPO) e peroxidase da tireóide (TPO). Quanto a dosagem de MPO-like, os resultados da pesquisa detectaram níveis basais nos tecidos da região cephalopodal de *A. Fulica*, que não se elevam com o desenvolvimento intramolusco de L1, L2 e L3. A dosagem de MPO é uma técnica que tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos na lesão e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane et al., 1985; Cross et al., 2003).

Segundo Min, Li & Yu (2022) a peroxidase e a mieloperoxidase de moluscos (*Crassostrea virginica*, *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Lingula anatina*, *Amphibalanus amphitrite*) pertencem a um grupo irmão da peroxidase de vertebrados e estão envolvidas na melanogênese. Por isso, são , necessários mais estudos sobre participação dessas enzimas no reconhecimento de helmintos parasitos que utilizam moluscos como hospedeiros intermediario como *A. fulica* infectada por *A. vasorum*, que apresentam, segundo Coaglio et al., (2018), melanina em torno de larvas L1, L2, e L3 durante o desenvolvimento intramolusco.

## 7 CONCLUSÕES

- Pela primeira vez na literatura observou-se que moluscos *Achatina fulica* apresentam nos tecidos da região cefalopodal atividade enzimática semelhante N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG-like) apontada;
- Pela primeira vez na literatura observou-se que moluscos *Achatina fulica* apresentam nos tecidos da região cefalopodal atividade enzimática semelhante a mieloperoxidase de neutrófilos (MPO-like) apontada;
- A infecção com L1 de *A. vasorum* em *Achatina fulica* por inoculação e ingestão são bem-sucedidas;
- Ocorre maior número de L3 recuperadas na infecção por inoculação;
- A coloração de peroxidase permite uma visualização de grânulos citoplasmáticos positivos nos hemócitos de *Achatina fulica*;

## REFERÊNCIAS

- ACCORSI, A. et al. Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1260–1268, maio 2013.
- ADEMA, C. M. et al. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 16, p. 8691–8696, 5 ago. 1997.
- ADEMA, C. M.; HARRIS, R. A.; VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, n. 1, p. 24–32, 1 jan. 1992.
- ALADAILEH, S. et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 48–63, set. 2007.
- ALADAILEH, S. et al. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, n. 4, p. 470–480, 1 dez. 2007b.
- ALBUQUERQUE, FS.; PESO-AGUIAR, MC.; ASSUNÇÃO-ALBUQUERQUE, MJT. Distribution, feeding behavior and control strategies of the exotic land snail *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) in the northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 837–842, nov. 2008.
- ALHO, A. M. et al. Seroprevalence of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and parasite-specific antibodies in dogs from Portugal. **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2567–2572, 22 mar. 2016.
- ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX, K. A.; FORD, S. E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, n. 2, p. 141–158, ago. 2002.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, abr. 2013.
- ASH, L. R. Diagnostic Morphology of the Third-Stage Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). **The Journal of Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 249, abr. 1970.
- ANDRADE-PORTO M. S. et al. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in the Amazon region. **Acta Amazonas**, v. 42, n. 2, p. 245–250, 2012.
- ANDRADE-PORTO, M.S. et al. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in the Amazon region. **Acta Amazonas**, v. 42, n. 2, p. 245–250, 2012.

- BARBOSA, T. A. et al. Infection by *Angiostrongylus cantonensis* in both humans and the snail *Achatina (Lissachatina) fulica* in the city of Macapá, in the Amazon Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200115, 6 jul. 2020.
- BAHGAT, M. et al. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 6, p. 489–494, 7 mar. 2002.
- BARÇANTE TA 2006. 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, 179 pp.
- 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. e314723, 25 mar. 2012.
- BARÇANTE, T.A. et al. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Springer Nature**, v. 91, n. 6, p. 471–475, 1 dez. 2003.
- BESSA, E. C. et al. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguiere (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revla bras. Zool**, v. 17, n. 1, p. 29–41, 2000.
- BEZERRA, F. S. DE M. et al. QUANTIFICATION OF THE POPULATION AND PHAGOCYTARY ACTIVITY OF HEMOCYTES OF RESISTANT AND SUSCEPTIBLE STRAINS OF *Biomphalaria glabrata* AND *Biomphalaria tenagophila* INFECTED WITH *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 197–202, 1 jul. 1997.
- BISWAS, C.; MANDAL, C. The Role of Amoebocytes in Endotoxin-Mediated Coagulation in the Innate Immunity of *Achatina fulica* Snails. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 49, n. 2, p. 131–138, fev. 1999.
- 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.
- BONETTI, V. C. B. D. DE O.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of molluscs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 289–294, 1 jun. 1998.
- BROUSSEAU, P. et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. **Toxicology**, v. 142, n. 2, p. 145–156, jan. 1999.
- BRIANTI, E. et al. Evidence for direct transmission of the cat lungworm *Troglostrongylus brevior* (Strongylida: Crenosomatidae). **Parasitology**, v. 140, n. 7, p. 821–824, 3 abr. 2013.
- BUTT, D.; RAFTOS, D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 3, p. 299–306, jan. 2008.

- CALDEIRA, R. L. et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887–889, 2007.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S. et al. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 44, n. 1, p. 50–58, 1 maio 2014.
- COAGLIO, L. **Susceptibilidade e comportamento de *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum***. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte, MG, 2013.
- COAGLIO, A. L. et al. Evaluation of techniques for recovery of *Angiostrongylus vasorum* from *Achatina fulica*, a potential intermediate host. **Rev. patol. trop.**, v. 24, p. 87–97, 2016.
- CUETO, J. A. et al. Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123964, 20 abr. 2015.
- DEL PRETE, L. et al. *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum*: the contemporaneous detection in kennels. v. 11, n. 1, 1 dez. 2015.
- DENG, Z.-H. et al. First provincial survey of *Angiostrongylus cantonensis* in Guangdong Province, China. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 1, p. 119–122, 9 set. 2011.
- DONAGHY, L. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 296–301, ago. 2009.
- ELSHEIKHA, H. M. et al. Recent advances in the epidemiology, clinical and diagnostic features, and control of canine cardio-pulmonary angiostrongylosis. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, 27 set. 2014.
- FISCHER, M. L. et al. O caramujo exótico invasor na vegetação nativa em Morretes, PR: diagnóstico da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa aluvial. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, 2006.
- FONTANILLA I, K. C.; WADE, C. M. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in the giant African land snail *Achatina fulica* in French Polynesia detected using the SSU rRNA gene. **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 4, p. 642–645, 1 dez. 2012.
- FORS, L. et al. Differences in Cellular Immune Competence Explain Parasitoid Resistance for Two Coleopteran Species. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108795, 26 set. 2014.
- FRANCO-ACUÑA, D.O. et al. Nematode cysts and larvae found in *Achatina fulica* Bowdich, 1822. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 2, p. 106–110, 1 fev. 2009.
- FURUTA, E.; YAMAGUCHI, K.; SHIMOZAWA, A. The ultrastructure of hemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata). **Anatomischer Anzeiger**, v. 162, n. 3, p. 215–224, 1986.

GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 1–16, 10 nov. 2011.

GUILHON, J.; AFGHAHI, A. [Larval development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the body of various species of terrestrial mollusks]. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles**, v. 268, n. 2, p. 434–436, 13 jan. 1969.

GUILHON, J.; CENS, B. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Etude biologique et morphologique. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 48, n. 4, p. 567–596, 1973.

GUPTA, S.; WANG, Y.; JIANG, H. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 241–248, mar. 2005.

GUST, M. et al. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 393–403, jan. 2013.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 6, p. 531–541, 1 set. 2000.

HATA, H.; KOJIMA, S. *Angiostrongylus cantonensis*: In vitro cultivation from the first-stage to infective third-stage larvae. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 476–482, maio 1990.

HAUSER, M. **Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte GST: Kontamination landwirtschaftlicher Nutzflächen durch Hunde- und Fuchskot**. Disponível em: <https://sat.gstsvs.ch/de/sat/sat-artikel/archiv/2015/082015/dog-and-fox-faecal-contamination-of-farmland.html>. Acesso em: 19 jul. 2022.

HELLIO, C. et al. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 4, p. 433–440, 1 abr. 2007.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33–38, nov. 2003.

HOFFMANN, J. A. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313–1318, 21 maio 1999.

HU, X. et al. Epidemic status of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan island, China. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 275–277, 1 abr. 2011.

HU, Y. et al. The structure of a prophenoloxidase (PPO) from *Anopheles gambiae* provides new insights into the mechanism of PPO activation. **BMC Biology**, v. 14, n. 1, 5 jan. 2016.



HUGHES, T. K. et al. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4426–4429, 1 jun. 1990.

ITO, S. et al. High Molecular Weight Lectin Isolated from the Mucus of the Giant African Snail *Achatina fulica*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 20–25, 23 jan. 2011.

JAYASHANKAR, M.; MURTHY, G. S. S. Record of gut associated nemathelminth in the giant African snail *Achatina fulica* (Bowdich) from Bangalore, India. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p. 144–146, 30 abr. 2013.

KIM, Y. D.; HU, R. C.; MIMMS, L. T. Determination of intrinsic association constant of mouse monoclonal IgM antibody to human hepatitis B surface antigen. **Journal of immunological methods**, v. 120, n. 1, p. 9–15, 1 jun. 1989.

KWON, E. et al. A severe case of *Angiostrongylus eosinophilic* meningitis with encephalitis and neurologic sequelae in Hawa'i. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 41–45, 1 jun. 2013.

LAITANO, A. C. et al. 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.**, p. 95–97, 2001.

LAVINE, M. D., & Strand, M. R.. **Insect Haemocytes and their Role in Immunity**. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12225920/>. Acesso em: 26 de jun. de 2022.

**Lima, W.S., Costa, H.M.A., Guimarães, M.P. and Leite, A.C.R. (1985) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 80, 233-235. - References - Scientific Research Publishing.** Disponível em:

<<https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1310998#:~:text=Lima%2C%20W.S.%2C%20Costa%2C%20H.M.A.%2C%20Guimar%C3%A3es%2C%20M.P.%20and%20Leite%2C>. Acesso em: 19 mai. 2022.

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, mar. 1994.

LOKER, E. S. et al. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 10–24, abr. 2004.

LOPES, D. et al. **REVISTA CIENTÍFICA ELETÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA -ISSN: 1679-7353 Ano VI -Número 11 -Julho de 2008 -Periódicos Semestral**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<[http://www.faeF.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/d5sTT7S1Flq7Rrb\\_2013-6-14-10-15-54.pdf](http://www.faeF.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/d5sTT7S1Flq7Rrb_2013-6-14-10-15-54.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2022.

LÓPEZ, C et al. Larval development of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Angiostrongylidae) in experimentally infected *Cernuella* (*Cernuella*) *virgata* (Mollusca, Helicidae). **Parasitology Research**, v. 95, n. 1, p. 13–16, 1 jan. 2005.

- LUNA-GONZÁLEZ, A. et al. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, n. 4, p. 275–282, 1 out. 2003.
- LV, S. et al. *Angiostrongylus cantonensis*: morphological and behavioral investigation within the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. **Parasitology Research**, v. 104, n. 6, p. 1351–1359, 27 jan. 2009.
- MAGUIRE, O. et al. Quantifying nuclear p65 as a parameter for NF- $\kappa$ B activation: Correlation between ImageStream cytometry, microscopy, and Western blot. **Cytometry Part A**, v. 79A, n. 6, p. 461–469, 25 abr. 2011.
- MAHILINI, H. M.; RAJENDRAN, A. Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 1, p. 20–26, 1 jan. 2008.
- MENDONÇA, C. L. G. F. et al. Development of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 (Nematoda: Angiostrongylidae) larvae in the intermediate host *Sarasinula marginata* (Semper 1885) (Mollusca: Soleolifera). **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 861–865, 1 abr. 2008.
- MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; ROCH, P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. **FEBS Letters**, v. 486, n. 3, p. 185–190, 12 dez. 2000.
- MOREIRA, V. L. C. et al. 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 Tropica**, v. 125, n. 1, p. 90–97, jan. 2013.
- MORGAN, E.; SHAW, S. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and developments in diagnosis and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 12, p. 616–621, 21 out. 2010.
- MOZZER, L. R.; LIMA, W. S. *Gallus gallus domesticus*: Paratenic host of *Angiostrongylus vasorum*. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1–2, p. 81–84, jan. 2015.
- NEUHAUSS, E. et al. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 49–52, 2007a.
- NOVAS, A. et al. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 390–394, 1 mar. 2004.
- OHLWEILER, F. P. et al. Current distribution of *Achatina fulica*, in the State of São Paulo including records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 4, p. 211–214, ago. 2010.
- OLIVEIRA, A. P. et al. *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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 739–744, set. 2015.

PEREIRA, C. A. DE J. et al. New approaches to studying morphological details of intramolluscan stages of *Angiostrongylus vasorum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 2, 2020.

OTTAVIANI, E. Molluscan immunorecognition. **Invertebrate Survival Journal**, v. 3, n. 1, p. 50–63, 15 jun. 2006.

OTTAVIANI, E.; MALAGOLI, D.; FRANCHINI, A. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 34, p. 1–25, 2004.

OTTAVIANI, E. et al. Presence of ACTH and  $\beta$ -endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis. **Regulatory Peptides**, v. 27, n. 1, p. 1–9, jan. 1990.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, n. 2, p. 984–988, 15 set. 1993.

DE PAULA ANDRADE, C. 2012. **Angiostrongylus vasorum (Nematoda: Protostrongylidae): Aspectos do desenvolvimento dos estádios evolutivos em *Melanoides tuberculata* (Caenogastropoda: Thiaridae), *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Xanthonychidae) e *Sarasinula marginata* (Soleolifera: Veronicellidae)**. Tese (Mestrado em Parasitologia) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 104 pp.

PEREIRA CAJ. 2009. **Caracterização da atividade de moléculas solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila* Taim envolvidos na morte dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* cultivados *in vitro***. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 198 pp.

PEREIRA, C. A. DE J. Caracterização da atividade de moléculas solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila* Taim envolvidos na morte dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* cultivados *in vitro*. **repositorio.ufmg.br**, 31 ago. 2009.

PINAUD, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F. C., Olive, M.-A., Allienne, J.-F., ... Gourbal, B.. **A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata***. 2016. Disponível em <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361>. Acesso em: 18 de jul. de 2022

RAMBO, P. R.; AGOSTINI, A. A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil - Prevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate Hosts from Eighteen Endemic Foci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 9–14, jan. 1997.

RAY, M. et al. A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 244–253, jan. 2013.

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

REKHA SARMA, R.; MUNSI, M.; NEELAVARA ANANTHRAM, A. Effect of Climate Change on Invasion Risk of Giant African Snail (*Achatina fulica* Férussac, 1821: Achatinidae) in India. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 30 nov. 2015.

SATYAVATHI, V. V.; MINZ, A.; NAGARAJU, J. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 8, p. 1753–1763, ago. 2014.

SAUERLÄNDER, R. Histologische Vernderungen bei experimentell mit *Angiostrongylus vasorum* oder *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) infizierten Achatschnecken (*Achatina fulica*). **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 49, n. 3, p. 263–280, 1976.

SAUERLÄNDER, R.; ECKERT, J. [The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda) (author's transl)]. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, v. 44, n. 1, p. 59–72, 5 jul. 1974.

SCHNYDER, M. et al. Combined Serological Detection of Circulating *Angiostrongylus vasorum* Antigen and Parasite-specific Antibodies in Dogs from Hungary. **Parasitology Research**, v. 114, n. S1, p. 145–154, 9 jul. 2015.

SEPPÄLÄ, O.; LEICHT, K. Activation of the immune defence of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by different immune elicitors. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2902–2907, 10 jul. 2013.

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; KROESE, F. G. M. Fixed phagocytes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell and Tissue Research**, v. 196, n. 3, p. 545–548, fev. 1979.

SONG, L. et al. *Angiostrongylus cantonensis* in the vector snails *Pomacea canaliculata* and *Achatina fulica* in China: a meta-analysis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 913–923, 1 dez. 2015.

SOUZA RLM 2006. Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção por *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 166 pp.

SOUZA, S. D. S., & Andrade, Z. A.. **On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes**. 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900033>. Acesso em: 03 de mai. de 2022.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 53–69, nov. 2000.

BEDICK, J. C. et al. Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–117, set. 2001.

STOCKDALE WALDEN, H. D. et al. Geographic distribution of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rats (*Rattus rattus*) and terrestrial snails in Florida, USA. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177910, 2017.

- STUEHR, D. J. et al. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 17, p. 7773–7777, set. 1991.
- TEIXEIRA, C. G. et al. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 487–489, 1993.
- TESANA, S. et al. *Angiostrongylus cantonensis*: Experimental study on the susceptibility of apple snails, *Pomacea canaliculata* compared to *Pila polita*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 531–535, abr. 2008.
- THIENGO, S. C. et al. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 18–22, 1 jun. 2013.
- THIENGO, S. C. et al. First record of a nematode *Metastrongyloidea* (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* (*Mollusca*, *Achatinidae*) in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 34–39, maio 2008.
- THIENGO, S. C. et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 194–199, set. 2010.
- THIENGO, S. C.; VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. Redescription of *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *costaricensis* Morera & Céspedes (nematoda, *metastrongyloidea*) from a brazilian strain. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 4, p. 839–844, dez. 1997.
- LEBLEU, B. et al. Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 4, p. 517–529, 1 mar. 2008.
- VAN DER KNAAP, W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitology Today**, v. 6, n. 6, p. 175–182, 1 jun. 1990.
- VASCONCELLOS, M. C. DE; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 582–584, dez. 2001.
- VITTA, A. et al. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 8, p. 597–599, ago. 2011.
- VLISIDOU, I.; WOOD, W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. **FEBS Journal**, v. 282, n. 8, p. 1368–1382, 21 mar. 2015.
- CHENG, T. C.; COMBES, C. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. **Springer Nature**, p. 307–332, 1 jan. 1990.
- QU, Z.-Y. Enzootic *Angiostrongyliasis*, Guangdong, China, 2008–2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1335–1336, jul. 2011.

ZIELONKA, J. et al. Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mitochondrial hydroethidine in mitochondria: Identification of homo- and heterodimers. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 5, p. 835–846, mar. 2008.