

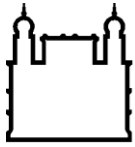
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO FILOGENÉTICO, BIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE  
ISOLADOS DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (CHEN, 1935)  
PROVENIENTES DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DO  
BRASIL.

TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

*TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE*

Estudo Filogenético, Biológico e Morfológico de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M772 Monte, Tainá Carneiro de Castro

Estudo filogenético, biológico e morfológico de isolados de  
*Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes áreas  
geográficas do Brasil / Tainá Carneiro de Castro Monte. – Rio de Janeiro,  
2014

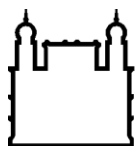
xvi, 87 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 61-77

1. *Angiostrongylus cantonensis*. 2. Filogenia molecular. 3. Haplótipos.  
4. Infecção experimental. 5. Análise comparativa. I. Título.

CDD 616.832



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AUTOR: TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE**

### **ESTUDO FILOGENÉTICO, BIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE ISOLADOS DE ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS PROVENIENTES DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DO BRASIL.**

**ORIENTADOR: Dr. Arnaldo Maldonado Júnior**

**Aprovada em: 25 / 02 / 2014**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Claudia Portes Santos Silva - **Presidente** (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

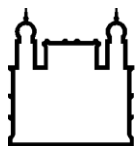
**Prof. Dra.** Alena Mayo Iñiguez (Laboratório de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** Jairo Pinheiro da Silva (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ)

**Prof. Dra.** Simone Chinicz Cohen (Departamento de Helmintologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** José Roberto Machado e Silva (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ)

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Murilo e Maria Madalena, e aos meus irmãos, Talita, Tamara e Tadeu, que sempre me apoiaram e torceram pela minha vitória.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as conquistas e oportunidades.

Aos meus pais, Murilo e Maria Madalena, e aos meus irmãos Talita, Tamara e Tadeu pelo carinho, ajuda e paciência em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Arnaldo Maldonado Júnior pela dedicação, confiança, paciência e por compartilhar conhecimentos.

Ao colaborador Pedro Cordeiro Estrela, pela dedicação e ajuda nas análises filogenéticas realizadas no estudo.

À Raquel Simões, pela ajuda na parte de biologia molecular realizada no trabalho e por todas as dúvidas tiradas durante o Mestrado.

Ao Juberlan Garcia, pela ajuda e pelos conhecimentos na parte de infecção experimental tanto de moluscos quanto de roedores realizada no estudo, e também pelo auxílio no trabalho de campo realizado no Bairro Caju.

À Dra. Rosana Gentile, pela dedicação e auxílio nas análises estatísticas realizadas no estudo.

À Michele Maria dos Santos, pelo o auxílio no trabalho de campo realizado no Bairro Caju.

À Dra. Delir Gomes e ao Dr. Marcelo Knoff, pela utilização do microscópio de câmara clara do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados, para a finalização da minha dissertação.

Ao Rodrigo Mexas, por ter me ajudado na parte de imagens e montagem de prancha.

Aos meus amigos e colegas do LABPMR: Ana Paula Gomes, Raquel Simões, Juliana São Luiz, Camila Lucio, Jonathan Oliveira, Thiago Cardoso, Luana Delfoente, Fernanda Marinho, Mariane Almeida, Patricia Fernandes, Karina Barbirato, Michele Maria, Bernardo Teixeira, Sócrates Neto e Jeiel Gabrir, pela amizade, pelos momentos de risada e pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ pelo auxílio financeiro.

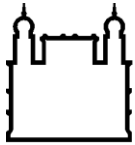
“A mente que se abre a uma nova  
idéia, jamais voltará ao seu  
tamanho original.”

Albert Einstein









Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

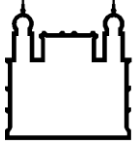
### ESTUDO FILOGENÉTICO, BIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DE ISOLADOS DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* PROVENIENTES DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DO BRASIL.

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Tainá Carneiro de Castro Monte**

*Angiostrongylus cantonensis* é responsável por causar meningoencefalite eosinofílica em humanos e casos já foram registrados em diversas partes do mundo incluindo o Brasil (ES, PE e SP). Nesse estudo, relatamos a variabilidade genética entre isolados de *A. cantonensis* do Brasil utilizando sequências do gene mitocondrial COI. Foram identificados três haplótipos brasileiros de *A. cantonensis*, baseados em oito haplótipos conhecidos (ac1-ac8). O haplótipo brasileiro ac5 ficou agrupado com isolados do Japão e o haplótipo brasileiro ac8 (isolados do RJ, SP, PA e PE) formaram um clado distinto. Foi relatado um novo haplótipo brasileiro, haplótipo ac9, o qual se encontra intimamente relacionado com os haplótipos da China (ac6) e do Japão (ac7). Dois isolados brasileiros de *A. cantonensis*, Olinda e Caju (haplótipos ac8 e ac9, respectivamente) relatados no presente estudo, tiveram sua biologia e morfologia caracterizadas após infecção experimental. Foi observada diferença significativa com maior carga parasitária recuperada nos isolados de Caju e um número significativamente maior de larvas L1 eliminadas nas fezes no início do período patente. Entretanto, quando comparado o total de larvas eliminadas não foi verificada diferença significativa entre os dois isolados. O isolado de Caju apresentou diferença significativa na proporção entre espécimes fêmeas e machos (0,64:1), enquanto que o mesmo não foi observado para o isolado de Olinda (1,16:1). A análise morfométrica revelou que os espécimes machos e fêmeas do isolado de Olinda foram significativamente maiores com relação aos caracteres analisados quando comparados com os espécimes de Caju. A análise morfológica evidenciou pequena variação no nível das bifurcações que unem os raios laterais no lobo direito da bolsa copuladora, entre os dois isolados. A variação genética observada apoia a hipótese que o aparecimento do parasito no Brasil é um resultado de múltiplas introduções de ratos parasitados e pelo molusco *Achatina fulica*, o qual contribui para a dispersão. As variações biológicas, morfológicas e morfométricas entre os dois haplótipos estudados, reforçam a variação observada pelo marcador COI e pela possível influência do isolamento geográfico. Estudos futuros devem ser realizados para verificar a possível presença do haplótipo recentemente relatado, ac9, em outras áreas do país, além da zona portuária da cidade do Rio de Janeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PHYLOGENETIC, BIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* ISOLATES FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL AREAS OF BRAZIL.

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

**Tainá Carneiro de Castro Monte**

*Angiostrongylus cantonensis* is responsible for causing eosinophilic meningoencephalitis in humans and cases have been recorded in various parts of the world including Brazil (ES, PE and SP). In this study, we report the genetic variability among Brazilian isolates of *A. cantonensis* using sequences of the mitochondrial COI gene. We identified three Brazilian haplotypes of *A. cantonensis*, based on eight known haplotypes (ac1-ac8). The Brazilian haplotype ac5, was clustered with isolates from Japan and the Brazilian haplotype ac8 (isolates from RJ, SP, PA and PE) formed a distinct clade. It was reported a new Brazilian haplotype, haplotype ac9, which is closely related to haplotype from China (ac6) and Japan (ac7). Two Brazilian isolates of *A. cantonensis*, Olinda and Caju (haplotypes ac8 and ac9, respectively) reported in this study, had their biology and morphology characterized after experimental infection. Significant differences were observed with higher parasite load recovered in the isolates from Caju and a significantly greater number of L1 larvae eliminated in the feces at the beginning of the patent period. However, when compared to the total larvae eliminated there was no significant difference between the two isolates. The isolates from Caju showed significant difference in the proportion of female and male specimens (0,64:1), but it was not observed for isolates from Olinda (1,16:1). The morphometric analysis showed that male and female specimens from Olinda were significantly higher with respect to the analyzed characters when compared with specimens from Caju. The morphological analysis showed little variation in the level of bifurcations that unite the lateral rays in the right lobe of copulatory bursa, between the two isolates. Genetic variation among isolates supports the hypothesis that the appearance of the parasite in Brazil is a result of multiple introductions of infected rodents and by the mollusc, *Achatina fulica*, which contributes to the dispersion. Biological, morphological and morphometric variation between the two haplotypes of *A. cantonensis* studied, reinforce the observed variation by the COI marker and the possible influence of geographical isolation. Future studies should be performed to verify the possible presence of the haplotype recently reported, ac9, in other areas of the country, beyond the port area of the city of Rio de Janeiro.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Características gerais dos Nematódeos</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Sistemática do gênero <i>Angiostrongylus</i></b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Características gerais da espécie <i>Angiostrongylus cantonensis</i></b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Meningoencefalite eosinofílica.....	6
1.3.2 Hospedeiros Definitivos e Intermediários.....	7
1.3.3 Ciclo Biológico .....	12
1.3.4 Morfologia .....	14
<b>1.4 Filogenia molecular</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Marcadores moleculares.....	15
<b>1.5 Diferenças biológicas e morfológicas entre isolados de         helminhos de mesma espécie</b> .....	<b>20</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Análise molecular</b> .....	<b>26</b>
4.1.1 Coleta de isolados de <i>A. cantonensis</i> .....	26
4.1.2 Extração do DNA .....	26
4.1.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI).....	26
4.1.4 Reação de sequenciamento .....	27
<b>4.2 Análise filogenética molecular</b> .....	<b>29</b>
4.2.1 Análise computacional das sequências nucleotídicas .....	29

4.3	<b>Análise comparativa da biologia e morfologia entre diferentes isolados de <i>A. cantonensis</i></b> .....	<b>30</b>
4.3.1	Isolados de <i>A. cantonensis</i> e infecção experimental de moluscos.....	30
4.3.2	Infecção experimental de roedores, cinética da eliminação de larvas nas fezes e recuperação de helmintos adultos .....	31
4.3.3	Análise morfológica e morfométrica dos helmintos adultos .....	32
4.3.4	Análise estatística dos dados parasitológicos.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1	<b>Filogenia molecular</b> .....	<b>34</b>
5.2	<b>Comparação da biologia e morfologia entre diferentes isolados de <i>A. cantonensis</i></b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
6.1	<b>Relação filogenética entre isolados brasileiros de <i>A. cantonensis</i></b> .....	<b>47</b>
6.2	<b>Comparação da biologia e morfologia entre isolados de helmintos, em particular de <i>A. cantonensis</i></b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE A -</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO: PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF THE BRAZILIAN ISOLATES OF THE RAT LUNGWORM <i>ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS</i> (NEMATODA:METASTRONGYLIDAE) EMPLOYING MITOCHONDRIAL COI GENE SEQUENCE DATA</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Característica geral do Filo Nematoda (Fonte: Schmidt, GD & Roberts, LS. Foundation of Parasitology. Fifth edition).....	3
<b>Figura 2:</b> Perfil cuticular (Fonte: Adaptada por Torres, EJM de Schmidt, GD Roberts, LS. Foundations of Parasitology. Fifth edition).....	3
<b>Figura 3:</b> Distribuição geográfica de moluscos e roedores naturalmente infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e presença de infecção humana no Brasil (Fonte: LABPMR) .....	11
<b>Figura 4:</b> Ciclo biológico do nematódeo <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Fonte: CDC modificado). .....	13
<b>Figura 5:</b> Mapa das localidades brasileiras onde os isolados de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> foram coletados. (1) São Mateus; (2) Freguesia do Ó; (3) Jundiá; (4) Vila Rami; (5) Pirituba; (6) São Gonçalo; (7) Encantado; (8) Túnel Noel Rosa; (9) Caju; (10) Niterói; (11) Queimados; (12) Marituba; (13) Jurunas; (14) Guamá; (15) Olinda. ....	28
<b>Figura 6:</b> Árvore bayesiana inferida da análise filogenética das sequências de <i>Angiostrongylus</i> spp. utilizando 360 pb do gene mitocondrial COI. ....	36
<b>Figura 7:</b> Rede de haplótipos baseada na sequência parcial de 360 pb do gene mitocondrial COI .....	39
<b>Figura 8</b> Média de larvas L1 eliminadas por roedor em 1g de fezes, nos isolados de Caju (RJ) e Olinda (PE). ....	41
<b>Figura 9:</b> Intensidade da infecção dada pela mediana a partir da média semanal de larvas L1 eliminadas por roedor em 1g de fezes. ....	41
<b>Figura 10:</b> Número de espécimes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> machos e fêmeas, recuperados no isolado de Olinda (PE) e Caju (RJ).....	43
<b>Figura 11:</b> Microscopia de luz: vista dorsal da bolsa copuladora de macho de dois isolados geográficos de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> mostrando as diferenças no nível das bifurcações que unem os raios laterais. E= esquerda; D= direita. ....	46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Amostras de *Angiostrongylus cantonensis* isoladas de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Pará (PA) e Pernambuco (PE), utilizadas no estudo. ....29
- Tabela 2:** Valores de “*p*-distance” de haplótipos de *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus vasorum* baseados no gene mitocondrial COI. ....37
- Tabela 3:** Posições de nucleotídeos variáveis dentro de 360pb do gene mitocondrial COI de diferentes haplótipos de *Angiostrongylus cantonensis*. ....38
- Tabela 4:** Número de espécimes de *Angiostrongylus cantonensis* machos e fêmeas recuperados por roedor e sua respectiva razão sexual; número de larvas L1 eliminadas por roedor e a média de eliminação de larvas L1 por fêmea. ....42
- Tabela 5:** Dados morfométricos do comprimento do corpo de três espécimes, machos e fêmeas, de *Angiostrongylus cantonensis* recuperados de cada roedor dos isolados de Olinda (PE) e Caju (RJ), após infecção experimental. ....44
- Tabela 6:** Dados morfométricos de helmintos adultos (15 machos e 15 fêmeas) de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* de Olinda (PE) e Caju (RJ), recuperados da artéria pulmonar, obtidos após 12 semanas de infecção experimental de *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar).....45



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFA	Álcool etílico-Formaldeído-Ácido acético
AIC	Akaike Information Criterion
AICc	Corrected Akaike Information Criterion
ANOVA	Análise de Variância
BIC	Bayesian Information Criterion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHIOC	Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COI	Citocromo c oxidase subunidade I
COI_F	Oligonucleotídeo iniciador Foward
COI_R	Oligonucleotídeo iniciador Reverse
°C	Grau Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
g	grama
HCl	Ácido clorídrico
HKY+G	Hasegawa, Kishino e Yano + distribuição Gamma
IB	Inferência Bayesiana
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS	Internal Transcribed Spacer
LCR	Líquido cefalorraquidiano
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio / Larva infectante

L4	Larva de quarto estágio
L5	Larva de quinto estágio
MANOVA	Análise de Variância Multifatorial
mDNA	DNA mitocondrial
MED	Mediana
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
µL	Microlitro
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
ng/ µL	Nanograma por microlitro
NIH	National Institute of Health
NJ	Neighbor joining
PA	Pará
pb	Pares de bases de nucleotídeos
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	Pernambuco
pmol	Picomol
pmol/µL	Picomol por microlitro
QP3.0	Quantitative Parasitology v3.0
rDNA	DNA ribossomal nuclear
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotação por minuto

rRNA	RNA ribossomal
R1	Roedor 1
R2	Roedor 2
R3	Roedor 3
R4	Roedor 4
R5	Roedor 5
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
SSU	Subunidade menor do gene ribossomal
TrN93	Tamura-Nei
TrN93+G	Tamura-Nei + distribuição Gamma
U	unidade
%	Por cento



# 1. Introdução

## 1.1 Características gerais dos Nematódeos

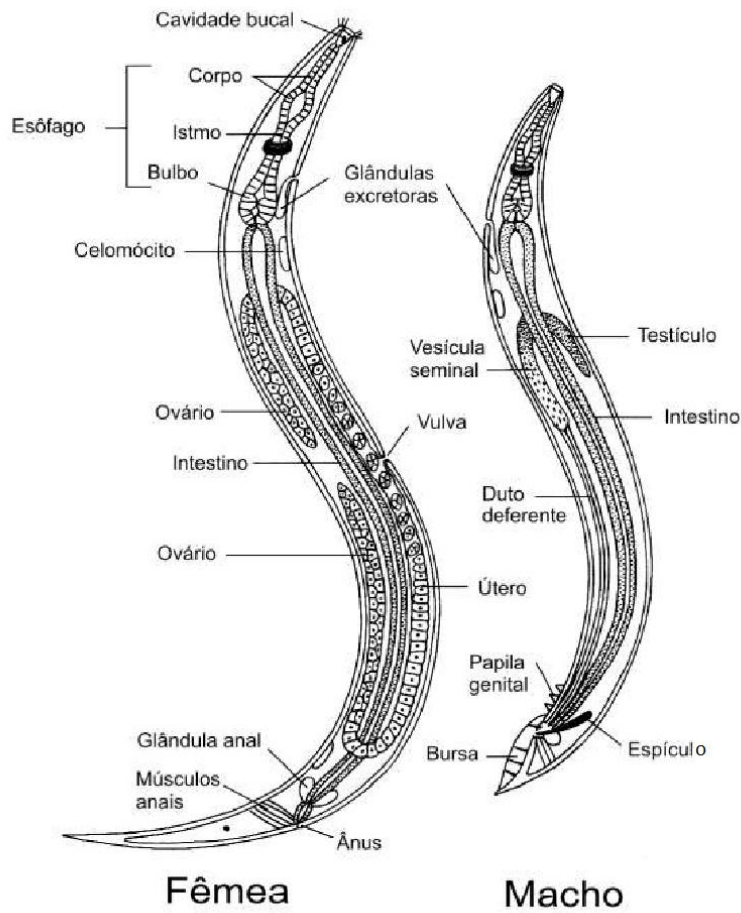
Os nematódeos representam um grupo taxonômico extenso com representantes em diferentes ecossistemas tais como água doce, marinho e solo, e estão entre os principais organismos adaptados ao parasitismo bem sucedidos de plantas e animais. Apresentam estruturas morfológicas relativamente simples e seus corpos cilíndricos não segmentados os distinguem facilmente de outros invertebrados. Algumas espécies parasitas invadem os fluidos corpóreos, tais como o sangue e os canais linfáticos de seus hospedeiros, enquanto outras habitam o trato digestório e respiratório. Em alguns casos, a infecção ocorre em sítios ectópicos (Chitwood & Chitwood, 1974; Smyth, 1994).

Os nematódeos possuem hábitos alimentares bem diversificados, onde alguns se alimentam de microrganismos presentes em vegetais em decomposição e outros se alimentam de plantas. Nos vertebrados, eles podem parasitar os olhos, boca, língua, canal alimentar, fígado, pulmões ou cavidade corporal, frequentemente causando doenças. Estima-se que o grande número de infecções humanas causadas por nematódeos esteja relacionado à eficiência no ciclo de vida desses helmintos ao parasitismo (Chitwood & Chitwood, 1974; Smyth, 1994).

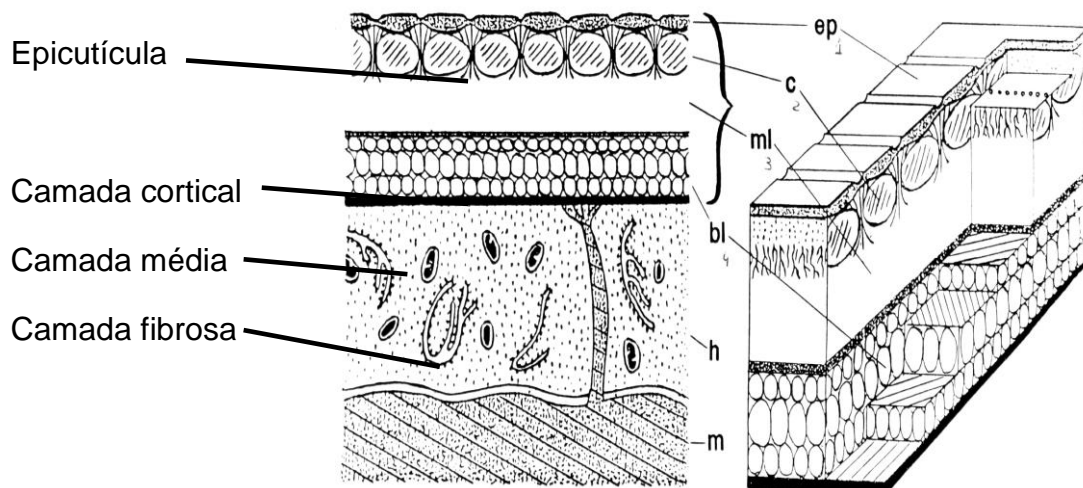
O ciclo de vida varia de muito simples (monoxênico), com a presença de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo, até o extremamente complexo (heteroxênico), necessitando de dois ou mais hospedeiros para completar o ciclo. A maioria dos nematódeos são dióicos (sexos separados) e algumas espécies são monóicas (possuindo os dois aparelhos reprodutores, feminino e masculino), produzindo ovos com revestimentos resistentes. O sistema reprodutor masculino se abre diretamente dentro do reto formando a cloaca, enquanto que o aparelho reprodutor feminino tem a abertura separada, com a presença da vulva situada ventralmente. A maioria dos nematódeos são ovíparos e o sucesso do desenvolvimento de seus ovos fora do hospedeiro depende das condições ambientais, particularmente oxigênio e temperatura. Todas as larvas de nematódeos eclodem na água, solo ou dentro do hospedeiro e devem ser submetidas a uma

série de quatro mudas (L1-L4) antes de alcançarem a maturidade sexual (L5) (Chitwood & Chitwood, 1974; Smyth, 1994).

A morfologia dos nematódeos é consideravelmente simples uma vez que apresentam um alto grau de uniformidade na sua organização estrutural básica. Sua forma é essencialmente um cilindro alongado, dentro do qual existe a musculatura consistindo inteiramente de fibras longitudinais. Há uma abertura bucal, sendo essa normalmente cercada por lábios que carregam órgãos sensoriais (papilas e anfídeos), embora os lábios sejam ausentes em vários grupos. A boca é geralmente terminal, na parte anterior do corpo e é seguida da cavidade bucal, esôfago, intestino e o reto terminando numa abertura cloacal (macho) ou ânus subterminal (fêmea). O corpo é coberto por uma cutícula composta por camadas, sendo elas epicutícula, camada cortical, camada média e camada fibrosa as quais recobrem a epiderme (hipoderme). Geralmente não existem apêndices externos, mas podem ocorrer em formas raras. Sistema nervoso e excretor estão presentes, mas não há sistema circulatório. Apresentam pseudoceloma que é uma cavidade entre a parede corpórea e as estruturas internas, contendo fluido, tecidos fibrosos e células fixas, responsável pela manutenção da pressão hidrostática (Chitwood & Chitwood, 1974; Smyth, 1994) (Figura 1 e 2).



**Figura 1:** Característica geral do Filo Nematoda (Fonte: Schmidt, GD & Roberts, LS. Foundations of Parasitology. Fifth edition).



**Figura 2:** Perfil cuticular (Fonte: Adaptada por Torres, E.J.L. de Schmidt, GD & Roberts, LS. Foundations of Parasitology. Fifth edition).

## 1.2 Sistemática do gênero *Angiostrongylus*

*Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935 é um nematódeo que pertence ao filo Nematoda, da superfamília Metastrongyloidea Lane, 1917 e família Angiostrongylidae Boehm & Gebauer, 1934. Até o momento são conhecidas cerca de 20 espécies do gênero *Angiostrongylus* Kamensky, 1905, sendo consenso que a sistemática da família Angiostrongylidae precisa ser revisada uma vez que várias espécies foram descritas inadequadamente (Anderson, 1978; Cross & Chen, 2007; Maldonado *et al.*, 2012; Cowie, 2013). O sistema de classificação do gênero *Angiostrongylus* se baseia principalmente nas características morfológicas dos raios da bolsa copuladora, na especificidade do grupo de hospedeiros e/ou local onde os parasitos adultos são localizados dentro do hospedeiro (Ubelaker, 1986; Maldonado *et al.*, 2012).

Railliet e Henry em 1907 desconhecendo o trabalho anterior de Kamensky, descreveram o gênero *Haemostrongylus*, que posteriormente foi considerado por Leiper em 1926 sinônimo do gênero *Angiostrongylus* (Ubelaker, 1986).

Dougherty (1946) reorganizou a família Angiostrongylidae e propôs a sinonímia de alguns gêneros com o gênero *Angiostrongylus*, tais como *Haemostrongylus* Railliet e Henry, 1907; *Parastrongylus* Baylis, 1928; *Rodentocaulus* Shul'ts, Orlov e Kutas, 1933; *Pulmonema* Chen, 1935 e *Cardionema* Yamaguti, 1941. Posteriormente Drozd em 1970, reconheceu dois grupos de metastrongilídeos, os quais ele atribuiu "status" de subgênero, sistematizando as espécies conhecidas dentro de dois subgêneros, *Angiostrongylus* e *Parastrongylus*. Chaubaud em 1972, considerou os subgêneros suficientemente distintos, elevando-os como dois gêneros distintos: *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 e *Parastrongylus* Baylis, 1928 (Ubelaker, 1986; Maldonado *et al.*, 2012).

As características morfológicas dos raios laterais da bolsa copuladora são consideradas como caracteres consistentes para distinguir esses dois gêneros, uma vez que o gênero *Angiostrongylus* possui um raio lateral originando independentemente do tronco lateral, com o raio ventrolateral se originando separado dos raios mediolateral e posterolateral, os quais surgem como um único tronco, enquanto que o gênero *Parastrongylus* possui os raios laterais se originando a partir de um tronco comum (Ubelaker, 1986; Maldonado *et al.*, 2012).



### 1.3 Características gerais da espécie *Angiostrongylus cantonensis*

O parasito *A. cantonensis* é um nematódeo neurotrópico e veiculado por alimentos, tendo sido encontrado inicialmente parasitando *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 em Guangzhou (Cantão), China por Chen (1935) habitando o ventrículo direito e artérias pulmonares desses roedores (Chen, 1935; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; OuYang *et al.*, 2012). Esse helminto é reconhecido como o principal agente etiológico de centenas de casos de meningoencefalite eosinofílica humana e que tem como principal manifestação clínica a meningite eosinofílica (Alicata, 1991; Wang *et al.*, 2008; Cowie, 2013). Essa zoonose é considerada uma parasitose emergente, uma vez que tem se constatado sua expansão tanto geográfica quanto do número de novos hospedeiros intermediários favorecendo a colonização de novos ambientes (Hollingsworth & Cowie 2006; Tunholi-Alves *et al.*, 2012; Cowie, 2013). O primeiro caso humano da doença foi relatado em Taiwan em 1945 (Beaver & Rosen, 1964). Desde então, vários casos da doença em humanos tem sido relatados, e até agora, mais de 2.800 casos foram documentados no mundo inteiro (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

Os humanos adquirem o parasito acidentalmente ou pelo consumo deliberado de moluscos crus ou mal cozidos, que contém a larva infectante de terceiro estágio (L3) (Martin-Alonso *et al.*, 2011; Cowie, 2013). A infecção também pode ocorrer pela ingestão de animais que atuam como hospedeiros paratênicos albergando a larva L3, tais como crustáceos, anfíbios e répteis. Tais hospedeiros podem atuar como mantenedores passivos do helminto, uma vez que não sofrem nenhum desenvolvimento. Porém, permanecem vivos por algum tempo e desempenham papel por aumentarem as oportunidades do mesmo em infectar seus hospedeiros definitivos. A infecção humana pode ocorrer ainda através de vegetais contaminados ou da ingestão de água contaminada contendo larvas infectantes. Humanos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que os helmintos jovens localizados no sistema nervoso central (SNC), na maioria das vezes, não conseguem realizar a migração pulmonar necessária para concluir seu ciclo biológico, permanecendo assim no espaço subaracnóide (SNC) até sua morte. (Crook *et al.*, 1971; John & Martinez, 1975; Foronda *et al.*, 2010; OuYang *et al.*, 2012; Cowie, 2013; Thiengo *et al.*, 2013). Entretanto, tem sido relatado que alguns helmintos aparentemente

conseguem realizar a migração pulmonar e alcançar as artérias pulmonares, porém não se reproduzem (Lindo *et al.*, 2004; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009; Cowie, 2013).

As principais regiões endêmicas onde a presença de *A. cantonensis* foi relatada são Sudeste da Ásia e Ilhas do Pacífico, embora atualmente esteja disperso mundialmente incluindo África, Oceania, Ilhas do Caribe, América do Norte, América Central e mais recentemente América do Sul e Europa (Slom *et al.*, 2002; Luessi *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012; OuYang *et al.*, 2012; Thiengo *et al.*, 2013). A atual distribuição geográfica tem sido atribuída a fatores ambientais e culturais, tais como, condições sanitárias, clima, proximidade de contatos com animais hospedeiros e hábitos alimentares, que favorecem a sobrevivência, o desenvolvimento e a transmissão do parasito (Nishimura & Hung, 1997). Acredita-se que a disseminação inicial desse helminto para as Américas esteja relacionada ao transporte de roedores naturalmente infectados em navios, vindo da Ásia (Pien & Pien, 1999; Diaz, 2008). O aumento do fluxo de comércio global e turismo, assim como a propagação dos hábitos e costumes entre os países, têm facilitado a dispersão de hospedeiros definitivo e intermediário de *A. cantonensis* (Cowie, 2013; Thiengo *et al.*, 2013).

### **1.3.1 Meningoencefalite eosinofílica**

A meningite eosinofílica é a principal manifestação clínica desta doença causada pelo nematódeo *A. cantonensis*. Porém, esse sintoma também pode estar associado a outras infecções parasitárias e bacterianas, drogas e malignidades (Lima *et al.*, 2009; Luessi *et al.*, 2009; Hsueh *et al.*, 2013). A presença do helminto, sua movimentação e sua morte no SNC, e a resposta imune produzida pelo hospedeiro, provavelmente contribuem para os sinais e sintomas da doença. A maioria dos pacientes apresenta meningite caracterizada pela presença de eosinófilos tanto no líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquido quanto no sangue periférico. Outros sintomas associados a essa parasitose são encefalites com sinais neurológicos severos, rigidez de nuca, febre, náusea, vômito, hiperestesia, parestesia, distúrbio de consciência, visão turva, coma e até mesmo a morte. Os sintomas clínicos podem ocorrer entre dois a 35 dias após a infecção com um tempo médio de incubação de aproximadamente duas semanas (Pien & Pien, 1999; Tsai *et al.*, 2001; Luessi *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Espírito-Santo *et al.*, 2013; Murphy & Johnson, 2013).

A presença de eosinófilos no LCR associado à história de exposição à larva infectante do parasito, como a ingestão de moluscos crus ou mal cozidos, pode ser a base para o diagnóstico presuntivo da doença. Dessa forma, a presença de 10 ou mais eosinófilos/mm<sup>3</sup> ou eosinófilos representando pelo menos 10% do total de leucócitos no LCR, é um dos resultados mais sugestivos para o diagnóstico (Lima *et al.*, 2009; Sawanyawisuth *et al.*, 2012; Espírito-Santo *et al.*, 2013). A recuperação de larvas do parasito no LCR é considerado padrão ouro à nível de diagnóstico, mas raramente é efetuado (Tsai *et al.*, 2001; Luessi *et al.*, 2009).

A maioria das infecções é de baixa gravidade e a recuperação do paciente ocorre de forma espontânea sem terapia específica. Porém, em casos severos da doença podem ocorrer sequelas neurológicas permanentes ou evoluir para coma, com mortes principalmente em crianças (Re III & Gluckman, 2001; Tsai *et al.*, 2001; Lindo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Murphy & Johnson, 2013). O tratamento da doença ainda não é bem definido e normalmente é realizado com medidas de apoio. Estas nos casos mais graves, incluem punções lombares normalmente realizadas a fim de diminuir a pressão intracraniana, aliviando as dores de cabeça (Pien & Pien, 1999; Re III & Gluckman, 2001; Chen *et al.*, 2011). O uso de anti-helmíntico de amplo espectro, tal como albendazol, associado a corticosteroides e outros fármacos anti-inflamatórios tem sido proposto, a fim de minimizar a resposta inflamatória que é exacerbada por antígenos liberados a partir da morte do parasito. (Lai *et al.*, 2005; Chen & Lai, 2007; Luessi *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Casos humanos já foram registrados em diversas partes do mundo incluindo o Brasil, onde foram relatados casos no Estado do Espírito Santo, no município de Cariacica, seguido dos Estados de Pernambuco, nos municípios de Olinda e Escada, e São Paulo, na cidade de São Paulo (Caldeira *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Thiengo *et al.*, 2010; Espírito-Santo *et al.*, 2013; Thiengo *et al.*, 2013).

### **1.3.2 Hospedeiros Definitivos e Intermediários**

Roedores murídeos são os principais hospedeiros definitivos naturais enquanto que os moluscos gastrópodes representam os principais hospedeiros intermediários (Vitta *et al.*, 2011; Hollingsworth *et al.*, 2013). *R. norvegicus* e *R. rattus* tem sido relatados como os hospedeiros definitivos naturais do parasito na África, Austrália, América do Norte e em alguns países asiáticos (Maldonado *et al.*,

2010) e com menor frequência os roedores *Bandicota indica* Bechstein, 1800 e *Melomys littoralis* Lönnberg, 1916 têm sido encontrados parasitados pelos helmintos na Ásia (Acha & Szyfres, 2003). Nas Américas em geral, a presença de *R. rattus* e *R. norvegicus* infectados por *A. cantonensis* confirma o endemismo dessa zoonose em Cuba, Estados Unidos, Jamaica, Porto Rico, República Dominicana, Haiti e Brasil (Aguiar *et al.*, 1981; Lindo *et al.*, 2002; Leone *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2011; Monte *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

No Brasil, *R. norvegicus* e *R. rattus* foram encontrados naturalmente infectados pelo helminto no Estado do Pará, e *R. norvegicus* foi encontrado naturalmente infectado nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Caldeira *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2011; Monte *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013; Cognato *et al.*, 2013; Thiengo *et al.*, 2013) (Figura 3). A prevalência de *A. cantonensis* em roedores é variável e não sugere especificidade entre espécies do gênero *Rattus* (Wang *et al.*, 2008; Thiengo *et al.*, 2013).

Diferentes espécies de moluscos gastrópodes terrestres e de água doce estão envolvidos no ciclo de vida de *A. cantonensis* como hospedeiros intermediários. Tem sido demonstrado que duas espécies de moluscos exóticos, o caramujo gigante africano, *Achatina fulica* Bowdich, 1822 e o caracol de água doce sul-americano, *Pomacea canaliculata* Lamarck, 1822, representam um dos principais hospedeiros intermediários da angiostrongilíase no Brasil e China, respectivamente (Lv *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2011; Monte *et al.*, 2012; Thiengo *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Outra espécie do gênero *Pomacea*, *Pomacea lineata* Spix 1827, também está vinculada à transmissão de *A. cantonensis* no Brasil (Thiengo *et al.*, 2010; Thiengo *et al.*, 2013).

*A. fulica* foi introduzido recentemente nos trópicos e subtropicais, e tem sido considerada uma importante peste nessas regiões. Adicionalmente ao impacto nos ecossistemas e competição com moluscos terrestres nativos, esse molusco pode atuar como hospedeiro intermediário de nematódeos (Carvalho *et al.*, 2003; Thiengo *et al.*, 2008; Thiengo *et al.*, 2010). Neuhauss *et al.* (2007), realizaram estudo no Sul do Brasil com objetivo de avaliar a susceptibilidade de *A. fulica* ao helminto *A. cantonensis* através de infecção experimental, e observaram que os moluscos

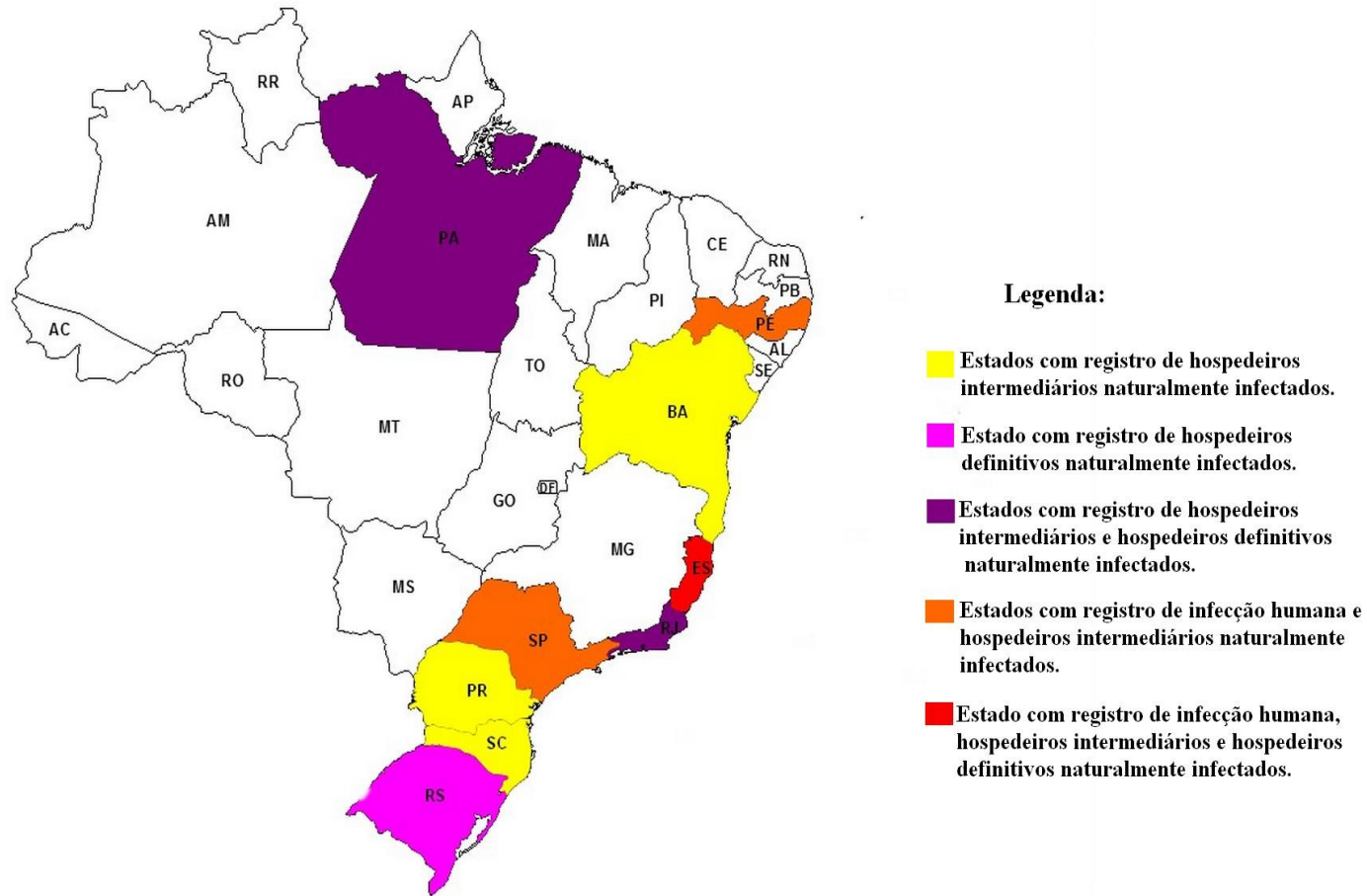
infectados apresentaram uma baixa carga parasitária, assumindo dessa forma que *A. fulica* não representaria um risco na transmissão do parasito nessa região.

Posteriormente, estudos mostraram que o molusco *A. fulica* foi encontrado naturalmente infectado por *A. cantonensis* em diversas regiões do Brasil como Sul, Sudeste, Norte e Nordeste sendo considerado um dos principais hospedeiros do parasito no país (Caldeira *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2010; Thiengo *et al.*, 2010; Monte *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013; Thiengo *et al.*, 2013). Adicionalmente, Tunholi-Alves *et al.* (2013) infectando *A. fulica* com até três meses de idade, demonstraram alta susceptibilidade dessa espécie ao parasito. Devido ao seu sucesso como espécie invasora, sua distribuição abrange quase todos os Continentes (África, Américas, Leste e Sul da Ásia e Oceania). Atualmente, o Brasil tem vivido a fase explosiva da invasão do molusco estando presente em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal (Thiengo *et al.*, 2007; Zanol *et al.*, 2010; Thiengo *et al.*, 2013; Thiengo, comunicação pessoal).

Caldeira *et al.* (2007) mostraram a presença de outras espécies de moluscos naturalmente infectados por larvas L3 de *A. cantonensis* no Estado brasileiro do Espírito Santo, tais como, *Subulina octona* Bruguiere, 1792, *Sarasinula marginata* Semper, 1885 e *Bradybaena similaris* Ferussac, 1821. Carvalho *et al.* (2012), observaram que além de *A. fulica*, as mesmas espécies de moluscos avaliadas no estudo anterior foram encontradas naturalmente infectadas por larvas L3 de *A. cantonensis* nas regiões portuárias do Brasil (Figura 3). Dentre os moluscos encontrados infectados nesse estudo, *A. fulica* foi o molusco que apresentou o menor número de indivíduos infectados (66% dos moluscos coletados estavam infectados) enquanto que as demais espécies coletadas se apresentaram com mais de 70% dos indivíduos infectados. Esses estudos confirmam a não especificidade de *A. cantonensis* para seu hospedeiro intermediário e mostram a importância de outras espécies de gastrópodes relacionados à transmissão do parasito.

A presença do molusco *Parmarion martensi* Simroth, 1893 foi relatada nas Ilhas do Havaí, e esse molusco também tem sido considerado um importante vetor na transmissão de *A. cantonensis* devido a sua alta densidade populacional, comportamento de escalada, atração por alimentos associados a habitações humanas e carga parasitária potencialmente alta (Hollingsworth *et al.*, 2007;

Hollingsworth *et al.*, 2013). A ingestão do molusco *Ampullarium canaliculatus* foi considerada a principal causa de meningite eosinofílica em humanos causada por *A. cantonensis* em Taiwan em 1998 e 1999, mostrando também seu papel na transmissão do parasito em Kaohsiung, Taiwan (Tsai *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Distribuição geográfica de moluscos e roedores naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis* e presença de infecção humana no Brasil (Fonte: LABPMR).

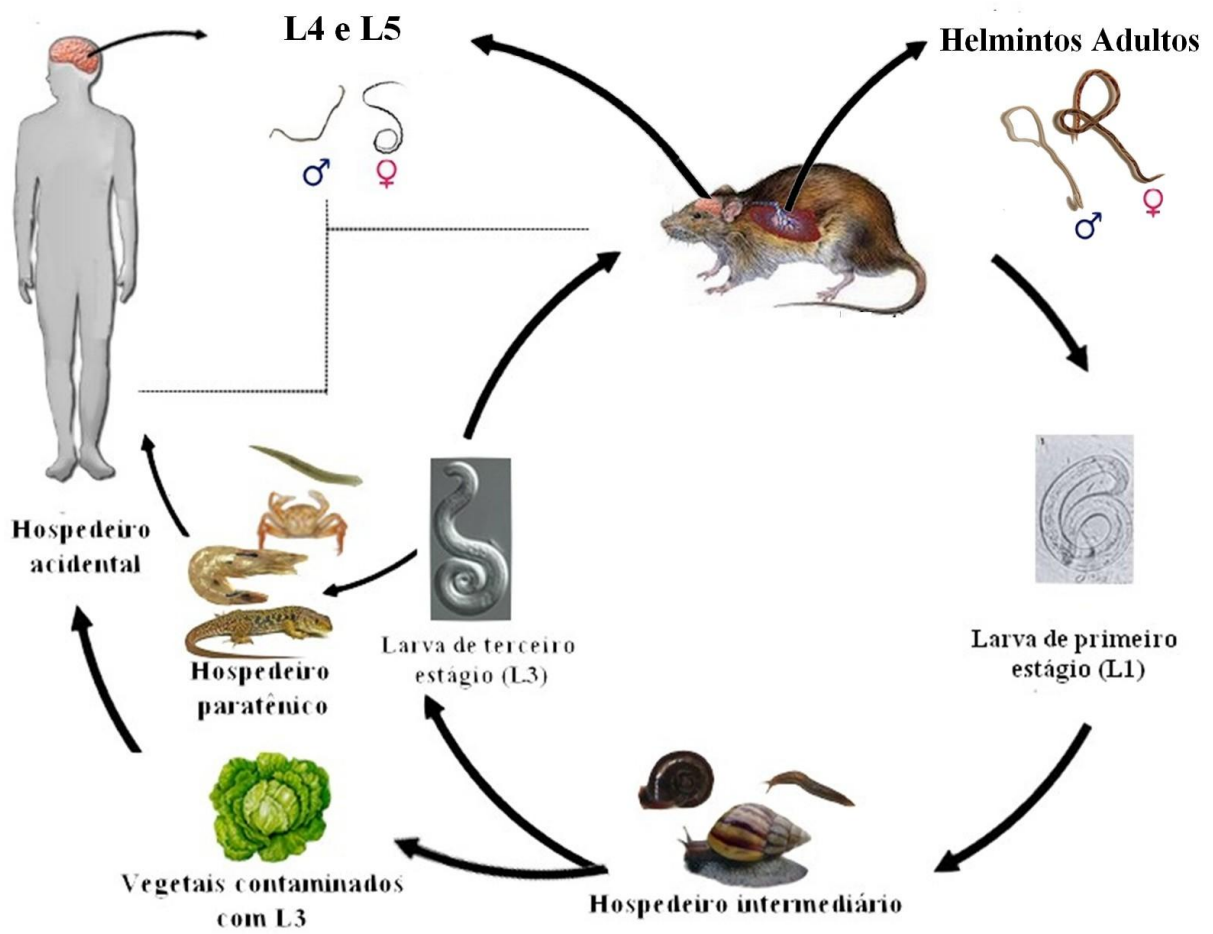
### 1.3.3 Ciclo Biológico

O ciclo de vida do nematódeo *A. cantonensis* é heteroxênico, requerendo ambos hospedeiros, definitivo e intermediário. Nos roedores (hospedeiros definitivos) infectados com *A. cantonensis*, o helminto adulto fêmea faz a postura de seus ovos nas artérias pulmonares, os quais são levados pela circulação até os pulmões. Os ovos são transportados para os capilares e invadem os espaços aéreos onde a larva de primeiro estágio (L1) eclode. Estas penetram nos alvéolos e são carregadas até trato respiratório superior, onde são deglutidas e subsequentemente excretadas com as fezes aproximadamente 6 a 8 semanas após a infecção (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Moluscos se tornam infectados pela ingestão da larva L1 presente nas fezes ou pela penetração dessas larvas através da parede corporal ou poro respiratório. Dentro dos moluscos, passa pelo estágio larvar L2 dando origem a L3 (larva infectante) em torno de 20 dias (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Thiengo *et al.*, 2013). A larva infectante ingerida pelo roedor, penetra no estômago e atinge o sistema porta hepático e/ou mesentérico linfático. Posteriormente, são distribuídas por todo o corpo pela circulação arterial, chegando ao sistema nervoso central (SNC) onde a larva passa por dois estágios larvais (L4-L5), se desenvolvendo em helmintos jovens adultos (larva L5) no espaço subaracnóide. Estes helmintos posteriormente entram na veia cerebral e são levadas para o coração e artérias pulmonares. Nesse local, os helmintos adultos se tornam sexualmente maduros, aproximadamente 35 dias após a infecção, e larvas L1 podem ser achadas nas fezes do hospedeiro em torno de 42 dias após a infecção (Wang *et al.*, 2012; Thiengo *et al.*, 2013).

A larva L3 também pode alcançar hospedeiros paratênicos, se estes ingerirem hospedeiros intermediários infectados, e acidentalmente humanos através da ingestão tanto de hospedeiros intermediários quanto de hospedeiros paratênicos contendo a larva infectante. No caso de infecção humana, a larva infectante se move ativamente ou é transportada pelo sistema vascular até o sistema nervoso central (SNC) (Luessi *et al.*, 2009) (Figura 4). O helminto não completa o ciclo de vida em humanos, embora permaneça no SNC causando meningite eosinofílica ou se movendo para o globo ocular causando angiostrongilíase ocular (Wang *et al.*, 2011).





**Figura 4:** Ciclo biológico do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: CDC modificado).

### 1.3.4 Morfologia

Os helmintos adultos de *A. cantonensis* são caracterizados por ter um corpo filiforme em ambos os sexos, afinando na extremidade anterior. Fêmeas são maiores e mais robustas que os machos. A vesícula cefálica é ausente, a abertura oral é simples com um pequeno denticulo, circular e cercada por seis papilas (duas dorsais, duas laterais e duas ventrais), dois anfídeos e dois deirídeos laterais na altura do esôfago. O esôfago é claviforme, o poro excretor é posterior ao esôfago e o anel nervoso é anterior ao meio do mesmo. Nas fêmeas, os túbulos uterinos são espiralados em torno do intestino de coloração escura resultante da digestão da hemoglobina, que são facilmente vistos através da cutícula transparente. Na extremidade posterior da fêmea há uma cauda curta e arredondada, sem expansão da cutícula e papilas, e é levemente curvada ventralmente com a vulva abrindo próxima ao ânus como uma abertura transversal ligeiramente elevada. Nos machos, a bolsa copuladora (órgão copulador masculino) é pequena e levemente assimétrica. Os raios ventroventrais são menores que os raios ventrolaterais, com uma origem comum, bifurcando na metade proximal e não alcançando as margens bursais. Os raios laterais surgem de um tronco comum, com o raio ventrolateral sendo em forma de fenda e menor do que os outros raios laterais. O raio mediolateral direito é mais fino do que o raio mediolateral esquerdo, com o raio mediolateral direito e posterolateral bifurcando no meio do tronco e o raio mediolateral esquerdo e laterolateral no terço distal. O raio dorsal é espesso, bifurcando em três ramos, com raio externodorsal digitiforme separado na base. O gubernáculo é presente (Chen, 1935; Maldonado *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

### 1.4 Filogenia Molecular

A ocorrência de *Angiostrongylus* tanto no homem quanto em animais de companhia enfatiza a importância na identificação taxonômica das espécies desse gênero. Contudo, nematódeos são muito conservados morfológicamente e até mesmo os níveis taxonômicos mais elevados do filo tem sido confundidos pela ausência de caracteres facilmente conhecidos, fazendo com que a identificação correta tanto dos helmintos adultos como das larvas baseado apenas nas características morfológicas muitas vezes se torne inconsistente, uma vez que a

descrição morfológica e morfométrica pode ser influenciada pelo hospedeiro. (Santos, 1985; Ubelaker, 1986; Blouin *et al.*, 1998; Gasser & Newton, 2000).

A análise molecular permite a identificação de organismos através da análise de um pequeno segmento do genoma, representando uma abordagem promissora para o diagnóstico da diversidade biológica, e técnicas moleculares tem mostrado que várias espécies são na verdade espécies crípticas (Blouin, 2002; Hebert *et al.*, 2003). Marcadores genéticos são amplamente usados para identificação de parasitos, tanto para discriminação molecular de espécies complexas assim como para o grau de parentesco entre as mesmas. A amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) de segmentos de DNA ribossomal nuclear (rDNA) ou DNA mitocondrial (mDNA) tem sido uma abordagem frequentemente utilizada para a identificação do táxon que se deseja estudar (Anderson, 2001).

A análise molecular tem sido empregada para diferenciação de espécies no gênero *Angiostrongylus*. O Polimorfismo de fragmentos de amplificação de DNA após digestão com enzimas de restrição (RFLPs) revelou-se de grande utilidade na diferenciação entre as espécies *A. cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* Moreira & Céspedes, 1971 e *Angiostrongylus vasorum* Baillet, 1866 (Caldeira *et al.*, 2003). Jefferies *et al.* (2009) demonstra a relevância do estudo de sequências nucleotídicas para a diferenciação de isolados de *A. vasorum* da Europa e Brasil, através da análise da seqüência do gene citocromo c oxidase I e ITS-2. Costa *et al.* (2003) publicaram uma redescrição de *A. vasorum* do Brasil e incluiu *Angiostrongylus raillieti* Travassos, 1927 como sinônimo desta espécie baseado nas semelhanças morfológicas. Porém, na caracterização molecular dos isolados de *A. vasorum* da Europa e do Brasil, verificou-se a existência de dois genótipos distintos.

Verifica-se portanto, a importância de se utilizar ambas as análises, morfológica e molecular, a fim de se obter uma identificação fidedigna entre os isolados estudados.

#### **1.4.1 Marcadores moleculares**

O DNA ribossomal nuclear (rDNA) de organismos eucariotos compreende uma família multigênica que consiste de repetições de sequências, normalmente encontradas em cromossomos específicos. Cada unidade compreende genes que

codificam para sequências de RNA ribossomal (18S, 5.8S, 28S) bem como sequências espaçadoras entre regiões codificantes. Os processos moleculares envolvidos na evolução do rDNA consistem na mudança mutacional e suas sequências exibem padrões de evolução não independente de sequências repetitivas, resultando numa maior similaridade de sequências intraespecífica que interespecífica (Elder & Turner, 1995; Gasser & Newton, 2000).

A subunidade menor do gene ribossomal (SSU) 18S rRNA é variável para permitir a diferenciação de espécies de nematódeos intimamente relacionados e é um dos marcadores moleculares mais utilizados em diversas aplicações tais como, análises filogenéticas e triagem da biodiversidade (Gasser & Newton, 2000; Fontanilha & Wade, 2008). As sequências do gene ribossomal geralmente são fáceis de acessar devido às regiões flanqueadoras altamente conservadas, permitindo o uso de primers universais e seu arranjo repetitivo dentro do genoma fornece uma grande quantidade de moldes de DNA para as reações de PCR. Nos últimos anos, e com o aumento das sequências disponíveis para o estudo de filogenia molecular, alguns problemas se tornaram aparentes. Dentre eles, a incapacidade do gene 18S em conseguir resolver as relações filogenéticas, que decorre em parte da sua pouca variabilidade entre os clados (Meyer *et al.*, 2010).

Fontanilha & Wade (2008), realizaram estudo onde o gene 18S rRNA foi sequenciado para várias espécies do gênero *Angiostrongylus*. As sequências mostraram que *A. cantonensis* tem uma sequência única que pode ser usada para distingui-lo de outras espécies dentro do gênero *Angiostrongylus*. A maioria dos sítios variáveis estavam dentro das primeiras 480 pb da extremidade 5' e *A. cantonensis* apresentou uma sequência única nessa região, demonstrando que estas primeiras 480 pb do gene 18S rRNA podem ser consideradas um marcador adequado para identificar esse parasito e o diferenciar de outras espécies (Abouheif *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2010).

Sequências do “Internal Transcribed Spacer” (ITS-1 e ITS-2) ribossomal também são marcadores moleculares comumente utilizados para discriminar espécies de nematódeos (Powers *et al.*, 1997; Gasser & Newton, 2000; ; Blouin, 2002; Liu *et al.*, 2011). As regiões ITS tem sido uma escolha frequente, pois são o loci nuclear mais variável e por apresentarem uma disponibilidade de primers

universais que identificam a maioria dos nematódeos (Blouin, 2002). Além disso, a variação intraespecífica nas sequências é normalmente baixa, menor que 1%, comparado com os altos níveis de variação interespecífica, sendo considerado um confiável marcador genético para a identificação de espécies de nematódeos (Gasser & Newton, 2000). Adicionalmente, foi observado por Liu et al. (2011) em estudo com isolados de *A. cantonensis* da China, onde as variações intraespecíficas das sequências não excederam 1,3% enquanto que as variações interespecíficas entre *A. cantonensis* e outras espécies de *Angiostrongylus* foram mais altas, com um valor mínimo de diferença entre sequências de 15%. As regiões ITS são comparativamente mais variáveis que as regiões codificantes do gene 18S rRNA e por isso tem sido utilizado para diferenciação de espécies intimamente relacionadas (Qvarnstrom *et al.*, 2010).

O genoma mitocondrial de metazoários consiste de 12-13 genes codificando para proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. Marcadores genéticos derivados do DNA mitocondrial (mtDNA) tem se revelado promissores para o diagnóstico molecular. Acredita-se que evolui independentemente do genoma nuclear e por ser herdado matematicamente é um marcador importante para resolução de parentesco. O DNA mitocondrial (mtDNA) evolui mais rapidamente em nematódeos quando comparado com o DNA nuclear. Dado que o mtDNA sofre mutações com maior frequência, ele tem sido explorado para estudos relacionados a genética populacional em que se pretende compreender as relações genéticas dentro e entre populações de uma espécie e os processos que irão gerar esses padrões, conseguindo distinguir vários clados e espécies em um nível taxonômico mais baixo. (Viney, 1998; Blouin, 1998; Gasser & Newton, 2000; Lv *et al.*, 2011).

A variação média de sequências de mtDNA entre indivíduos de uma mesma espécie situa-se em 2% e a máxima diferença observada entre par de indivíduos que foram claramente membros do mesmo cruzamento populacional é de 6%. O nível de variação das sequências do gene ITS observada entre indivíduos de uma mesma espécie é quase a mesma que a observada entre suas repetições dentro de indivíduos, tipicamente menor ou igual a 1%. Portanto, as sequências do gene ITS podem não ser um marcador tão útil quanto as sequências do mtDNA para identificação de espécies crípticas de um pequeno número de indivíduos (Blouin *et al.*, 1998; Blouin, 2002). Morgan & Blair (1998) em estudo filogenético de

trematódeos usando tanto mtDNA quanto sequências do gene ITS, mostraram que o mtDNA evolui mais rapidamente que o ITS e apresenta maior utilidade para distinguir espécies intimamente relacionadas. Além disso, mtDNA em trematódeos parece evoluir de uma maneira similar ao dos nematódeos.

Recentemente, Guardone et al. (2013) em estudo molecular com espécies de nematódeos da família Trichiuridae, utilizou como marcadores moleculares tanto o gene nuclear ribossomal (18S rRNA) quanto o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), onde foi observado que o gene COI se mostrou melhor marcador para evidenciar as divergências interespecíficas quando comparado com o gene 18S rRNA, que é altamente conservado entre diferentes espécies.

A delimitação de espécies por caracteres moleculares passa pelo desenvolvimento e padronização de técnicas de identificação molecular. Um dos padrões recomendados a nível internacional foi denominado de código de barras de DNA ou “barcodes”. A utilização padronizada do gene codificador da citocromo c oxidase subunidade I (COI) tem se mostrado uma ferramenta eficiente na identificação e resolução de espécies crípticas em metazoários devido a duas importantes vantagens. Em primeiro lugar, os primers univesais para esse gene permitem a recuperação da extremidade 5’ representativas da maioria, se não todos, filos animais. Em segundo lugar, COI parece fornecer uma visão filogenética mais fidedigna devido à alta incidência de substituição de bases na terceira posição nucleotídica, levando a uma taxa de evolução molecular que é cerca de três vezes maior do que em qualquer outro gene mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005; Ekrem *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Stahls & Savolainen, 2008; Linares *et al.*, 2009; Eamsobhana *et al.*, 2010).

Eamsobhana et al. (2010) realizaram estudo filogenético, baseado nas sequências gênicas de COI, entre quatro espécies de *Angiostrongylus* (*A. costaricensis*, *A. cantonensis*, *A. vasorum* e *Angiostrongylus malaysiensis* Bhaibulaya & Cross, 1971 e de isolados geográficos de *A. cantonensis* provenientes da Tailândia, China e Havaí. Foi observado que *A. costaricensis* é mais relacionado filogeneticamente a *A. vasorum*, enquanto que *A. cantonensis* é mais relacionado a *A. malaysiensis*. Em relação aos isolados geográficos de *A. cantonensis*, observou-se dois sub-clados, um que apresentava os isolados de *A. cantonensis* provenientes

da China e Havaí e outro que apresentava os isolados monofiléticos provenientes da Tailândia. Posteriormente, Gasser et al. (2012) em estudo com o genoma mitocondrial de *A. vasorum* e de outras espécies de *Angiostrongylus*, observaram que *A. vasorum* estava mais relacionado filogeneticamente a *A. cantonensis* do que a *A. costaricensis*.

Simões et al. (2011) utilizando sequências de COI, observou que isolados de *A. cantonensis* do Rio de Janeiro produziram um único haplótipo, os quais formaram um clado com baixa distância genética com isolados de *A. cantonensis* provenientes da China. Tokiwa et al. (2012) analisando um grande número de isolados geográficos de *A. cantonensis* do continente Asiático, confirmou que os isolados do Rio de Janeiro são mais similares com os isolados de *A. cantonensis* provenientes do Japão. Subsequentemente, em estudo realizado por Moreira et al. (2013) com isolados de *A. cantonensis* provenientes do Estado do Pará, demonstrou que estes isolados são similares aos isolados do Japão, uma vez que esses espécimes produziram um único haplótipo, com alto valor de suporte estatístico, com os isolados de *A. cantonensis* do Rio de Janeiro.

O genoma mitocondrial completo de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* foi analisado em estudo realizado por Lv et al. (2012), a fim de se comparar o genoma dessas duas espécies e esclarecer sua relação filogenética e a posição no filo Nematoda, mostrando que o genoma mitocondrial do gênero *Angiostrongylus* apresentou variações consideráveis em diferentes genes, os quais devem fornecer uma base para identificar marcadores para estudo de genética populacional e alvos para novos ensaios de diagnóstico.

As sequências de COI podem ser um marcador útil para a diferenciação de isolados geográficos de *A. cantonensis* e para descoberta de espécies crípticas. O DNA mitocondrial tem sido considerado efetivo em descobrir espécies crípticas quando dados de sequências de pequenos tamanhos de amostras são utilizados. Sequências de COI, portanto, podem ser utilizadas para diferenciar isolados geográficos e para estudos filogenéticos de *A. cantonensis* (Eamsobhana et al., 2010; Simões et al., 2011; Monte et al., 2012; Tokiwa et al., 2012; Eamsobhana et al., 2013; Moreira et al., 2013).

## 1.5 Diferenças biológicas e morfológicas entre isolados de helmintos de mesma espécie

Estudos experimentais entre isolados de uma mesma espécie de helminto e entre espécies diferentes, já foram realizados com o objetivo de verificar diferenças patológicas, biológicas e morfológicas (Magalhães *et al.*, 1975; Andrade & Sadigursky, 1985; Martinez *et al.*, 2003; Maldonado Jr. *et al.*, 2001; Maldonado Jr. *et al.*, 2005).

Alguns estudos comparativos com trematódeos tem investigado a ocorrência de variação dentro do gênero *Schistosoma* e *Echinostoma* Rudolphi, 1809. Andrade & Sadigursky (1985), realizaram estudo comparativo com isolados de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 provenientes da Bahia e de Porto Rico através de infecção experimental de camundongos, a fim de avaliar diferenças na recuperação de esquistossômulos pulmonares e helmintos adultos, contagem de ovos nos intestinos e fígado, exame histopatológico e mortalidade. Não foram observadas diferenças significativas nesses parâmetros e que as variações individuais dentro de um mesmo isolado, embora mínimas, foram maiores que as observadas no conjunto entre os isolados da Bahia e Porto Rico.

De forma semelhante, Martinez *et al.* (2003) também realizaram estudo com isolados brasileiros de *S. mansoni* dos Estados do Pará, Rio Grande do Norte e Pernambuco através de infecção experimental em *Mus musculus* Linnaeus, 1758, para observar diferenças biológicas e morfológicas avaliando o período pré-patente, cinética de eliminação de ovos nas fezes, contagem de ovos no intestino, infectividade e características fenotípicas dos helmintos adultos. Todas as cepas tiveram passagens sucessivas nos seus hospedeiros experimentais (intermediário e definitivo) o que reduziria a sua variabilidade (redução do polimorfismo genético), esperando então que não ocorressem mudanças biológicas e/ou morfológicas nos helmintos adultos (Bain & Philipp, 1991). Porém, foram observadas diferenças tanto biológicas quanto morfológicas, mesmo quando estas são mantidas por várias gerações em condições de laboratório.

Maldonado Jr. *et al.* (2001) e Maldonado Jr. *et al.* (2005) realizaram estudo com o trematódeo *Echinostoma paraensei* Lie & Bash, 1967 comparando isolados de Belo Horizonte (Minas Gerais) e Sumidouro (Rio de Janeiro), e isolados de dois



municípios do Estado do Rio de Janeiro, Rio Bonito e Sumidouro, respectivamente. Foi observado por Maldonado Jr. et al (2001) que o isolado de Sumidouro, recentemente isolado do seu hospedeiro vertebrado natural, *Nectomys squamipes* Brants, 1827, apresentou morfologia similar quando comparada com o isolado de Belo Horizonte, isolada em 1967 e desde então mantida em condições de laboratório (Lie & Basch, 1967). Foi observado também, que essas características morfológicas poderiam diferencia-las de outras espécies do gênero. Maldonado Jr. et al (2005) analisaram alguns parâmetros biológicos nos isolados comparados, tais como análise da carga parasitária, cinética de distribuição dos helmintos no intestino, número de ovos no útero, pesos úmidos e medidas relacionadas ao helminto. Os isolados apresentaram algumas diferenças biológicas, com relação à carga parasitária, longevidade e distribuição dos helmintos no hospedeiro, porém apresentaram similaridade em relação à morfometria, sugerindo que as diferenças nos parâmetros biológicos estejam relacionadas ao isolamento geográfico e as condições ambientais de transmissão.

Estudos comparativos em relação às taxas de desenvolvimento de dois isolados de *A. cantonensis* foram realizados por Hayneman & Lim (1966). Posteriormente em estudo realizado por Maldonado et al. (2010), a identificação taxonômica de *A. cantonensis* foi baseada em parâmetros morfológicos e morfométricos obtidos de estudos anteriores (Chen, 1935; Macherras & Sandars, 1955; Alicata, 1963; Yousif & Ibrahim, 1978). Isolados geográficos de *A. cantonensis* de dois municípios do Estado do Rio de Janeiro (Barra do Piraí e São Gonçalo) e um município do Estado de Santa Catarina (Joinville) foram estudados. Para comparação, isolados de *A. cantonensis* provenientes de Akita (Japão) e Pernambuco foram também analisados (Thiengo *et al.*, 2010).

Foram observadas diferenças morfológicas nos raios da bolsa copuladora do isolado de São Gonçalo quando comparado com os isolados provenientes do Japão e Pernambuco. As características morfológicas da bolsa copuladora do isolado de Barra do Piraí são similares as observadas para os isolados de Cantão (Ásia) e Pernambuco, enquanto que essas mesmas características morfológicas observadas no isolado de São Gonçalo encontra similaridade com isolados da África, demonstrando dessa forma, a existência de variação morfológica intra-específica.

Entretanto, poucos estudos com a finalidade de analisar as características biológicas e morfológicas entre os isolados desse nematódeo foram realizados.

## 2. Justificativa

*Angiostrongylus cantonensis* é responsável por causar meningoencefalite eosinofílica em humanos e outros animais, sendo considerada uma doença infecciosa emergente. O aumento do número de casos humanos e sua distribuição geográfica cada vez mais abrangente em vários continentes fazem com que tanto o parasito quanto seus hospedeiros, definitivo e intermediário, sejam alvo de estudos. No Brasil, a partir da entrada do caramujo exótico africano, *A. fulica*, na década de 80, inicia-se o relato de casos humanos da doença. Até o momento já foram relatados casos em três Estados, dentre eles Espírito Santo, Pernambuco e mais recentemente em São Paulo. Dessa forma, a vigilância, o controle e a prevenção em relação a essa zoonose se fazem necessárias a fim de evitar novos casos dentro do país.

Estudos taxonômicos são de vital importância para a identificação da presença da espécie *A. cantonensis* no ambiente, determinando a existência de focos de transmissão do parasito em reservatórios vertebrados e em moluscos. A presença destes é tão importante quanto à presença em todos os estados da federação do caramujo africano invasor, *A. fulica*, encontrado naturalmente infectado, o que propicia naturalmente um maior contato entre o parasito e o homem. Contudo, a identificação correta tanto dos helmintos adultos como das larvas baseado apenas nas características morfológicas muitas vezes se torna inconclusiva uma vez que a descrição morfológica das características do corpo, podem sobrepor-se a diversas espécies do gênero *Angiostrongylus*.

A análise molecular tem contribuído para diferenciar espécies do gênero *Angiostrongylus*, como observado em estudos recentes. Além disso, a inferência filogenética de isolados geográficos de *A. cantonensis* de diferentes regiões asiáticas, foi realizada com a finalidade de avaliar a variação genética desses parasitos culminando com a descoberta de novos haplótipos. Destacamos, portanto, a necessidade de utilizar análises biológicas, morfológicas e moleculares, a fim de se caracterizar e comparar as possíveis diferenças entre os isolados circulantes no Brasil.

Essa dissertação engloba duas abordagens. A primeira relata a análise molecular e filogenética de isolados de *A. cantonensis* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil, que foi publicado na revista *Parasites & Vectors* em Novembro/2012, e o mesmo encontra-se em anexo. A segunda abordagem é o estudo comparativo da biologia e morfologia de dois isolados brasileiros de *A. cantonensis*, que está em fase de finalização para submissão.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar a variabilidade de isolados de *A. cantonensis* oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil, utilizando características biológicas, morfológicas e moleculares.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar a diferenciação molecular empregando sequências moleculares parciais do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) dos diferentes isolados de *A. cantonensis* do Brasil e comparar com sequências moleculares já disponíveis no GenBank (isolados da China, Japão e Tailândia), determinando sua relação filogenética.
- Determinar e comparar as características biológicas e morfológicas de dois isolados de *A. cantonensis* (ac8 e ac9) encontrados no Brasil.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Análise Molecular

#### 4.1.1 Coleta de isolados de *A. cantonensis*

Foram coletados espécimes de *A. cantonensis* provenientes de 15 localidades diferentes de quatro Estados brasileiros, sendo elas São Mateus, Freguesia do Ó, Jundiá, Vila Rami e Pirituba (Estado de São Paulo); São Gonçalo, Encantado, Túnel Noel Rosa, Caju, Niterói e Queimados (Estado do Rio de Janeiro); Marituba, Jurunas e Guamá (Estado do Pará) e Olinda (Estado de Pernambuco) (Figura 5), com as devidas coordenadas geográficas apresentadas na Tabela 1. Os espécimes foram obtidos a partir de *R. norvegicus* e *R. rattus* naturalmente infectados ou a partir de infecção experimental de larvas L3 de *A. cantonensis* obtidas de *A. fulica* naturalmente infectado. As coletas dos espécimes foram realizadas entre os anos de 2009 e 2011 (Tabela 1).

#### 4.1.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o corpo inteiro de 15 isolados de *A. cantonensis*. Cada isolado correspondeu a uma das 15 localidades onde foram realizadas as coletas. A extração foi realizada através do QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Biotecnologia), utilizando o protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado pelo nanodrop em 230 nm (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 Uniscience) obtendo os valores da quantificação em nano gramas por microlitros (ng/μl). O DNA extraído foi mantido a -20°C até o uso.

#### 4.1.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI)

Para a amplificação da região parcial do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), foram utilizados os oligonucleotídeos previamente descritos COI\_F 5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3' e COI\_R 5' TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3' (Bowles *et al.*, 1992; Jefferies *et al.*, 2009).

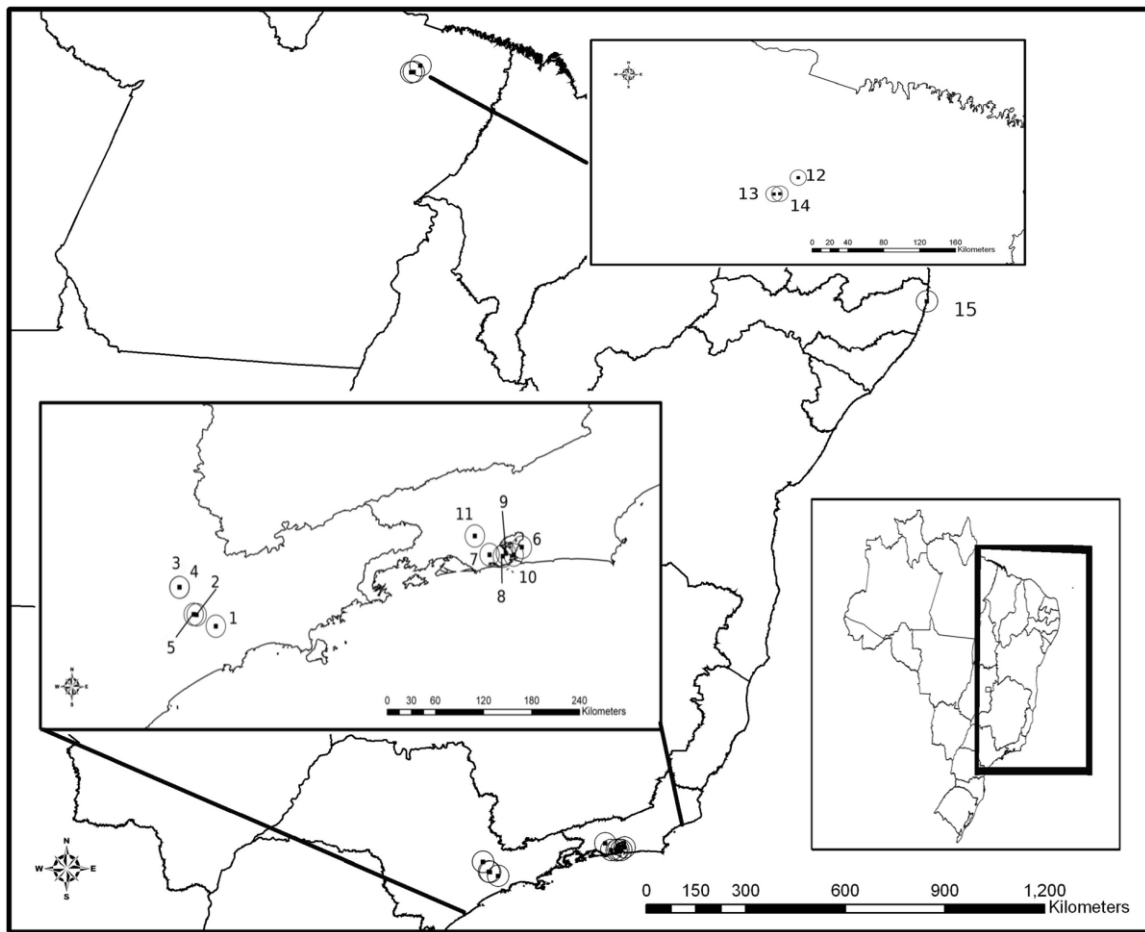
As reações foram realizadas utilizando o kit Invitrogen e com o volume final de 50 μL, contendo: 1 pmol/μL de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 μL de tampão de

reação a 10 X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTPs, 1,5U de Taq DNA polimerase e 20-30 ng de DNA. As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler – Eppendorf Termociclador) e submetidas às seguintes condições de amplificação: pré-aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e por último, extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para detecção dos produtos amplificados foi utilizado o método de eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram coradas com Brometo de etídio e visualizadas sob luz ultravioleta. A purificação dos produtos de PCR foi realizada através do QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Biotecnologia), utilizando o protocolo do fabricante. O produto de PCR purificado foi armazenado em 4°C até o uso.

#### **4.1.4 Reação de sequenciamento**

As amostras foram encaminhadas para a reação de sequenciamento de nucleotídeos, as quais foram realizadas utilizando BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) e analisadas pela plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ em um sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) (Sanger *et al.*, 1977).



**Figura 5:** Mapa das localidades brasileiras onde os isolados de *Angiostrongylus cantonensis* foram coletados. (1) São Mateus; (2) Freguesia do Ó; (3) Jundiaí; (4) Vila Rami; (5) Pirituba; (6) São Gonçalo; (7) Encantado; (8) Túnel Noel Rosa; (9) Caju; (10) Niterói; (11) Queimados; (12) Marituba; (13) Jurunas; (14) Guamá; (15) Olinda.



**Tabela 1:** Amostras de *Angiostrongylus cantonensis* isoladas de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Pará (PA) e Pernambuco (PE), utilizadas no estudo.

Localid. geográfica	Origem	Data da coleta	Coordenadas geográficas	CHIOC	Acesso GenBank	Haplótipo
São Mateus – SP	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°35'40.18"S, 46°28'28.39"W	35788	JX471064	ac8
Freguesia do Ó –SP	<i>Achatina fulica</i>	2010	23°29'00.77"S, 46°41'22.91"W	35832	JX471058	ac8
Jundiá – SP	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°12'54.44"S, 46°52'49.69"W	35789	JX471062	ac8
Vila Rami – SP	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°12'52.43"S, 46°52'59.14"W	35834	JX471067	ac8
Pirituba – SP	<i>Achatina fulica</i>	2010	23°28'44.40"S, 46°43'23.24"W	35724	JX471054	ac5
São Gonçalo – RJ	<i>Rattus norvegicus</i>	2011	22°48'26.7"S, 48°00'49.1"W	35703	JX471066	ac8
Encantado – RJ	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°49'30"S, 43°02'30"W	35723	JX471057	ac8
Túnel Noel Rosa –RJ	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°54'35.87"S, 43°15'12.97"W	35721	JX471068	ac8
Caju – RJ	<i>Rattus norvegicus</i>	2011	22°52'58.13"S, 43°13'07.35"W	35831	JX471055	ac9
Niterói – RJ	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°53'55.11"S, 43°07'53.97"W	35829	JX471059	ac5
Queimados – RJ	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°42'85"S, 43°34'06"W	35725	JX471060	ac5
Marituba – PA	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°36'60.7"S, 48°34'49.4"W	35722	JX471065	ac8
Jurunas – PA	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°47'34.3"S, 48°49'24.8"W	35833	JX471063	ac8
Guamá – PA	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°47'24.2"S, 48°45'71.3"W	35830	JX471061	ac8
Olinda – PE	<i>Achatina fulica</i>	2009	08°00'32.25"S, 34°51'07.95"W	35661	JX471056	ac8

## 4.2 Análise filogenética molecular

### 4.2.1 Análise computacional das sequências nucleotídicas

O número de acesso do GenBank das sequências de *A. cantonensis* obtidas no estudo estão apresentados na Tabela 1. O alinhamento e a edição das sequências foram feitas utilizando Clustal W no programa MEGA versão 5 (Thompson *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 2011). Para a análise de similaridade das sequências obtidas com as sequências previamente depositadas no banco de dados, foi utilizada a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Alfschul *et al.*, 1990) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (“National Institute of Health”), Maryland, EUA ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). A variação nucleotídica e “*p*-distance” foram calculadas utilizando o alinhamento resultante realizado no software MEGA versão 5. As sequências alinhadas foram submetidas à análise de “Neighbor-joining” (NJ), também utilizando o programa MEGA versão 5, e à Inferência Bayesiana (IB) utilizando o programa MrBayes 3.2.0 (Ronquist *et al.*, 2012).

O modelo evolutivo aplicado para Inferência Bayesiana foi o modelo de evolução de sequência HKY+G e foi escolhido através do Critério de Informação Bayesiana (BIC), Critério de Informação Akaike (AIC) e Critério de Informação Akaike Corrigido (AICc), nos quais BIC e AICc indicaram a escolha do mesmo modelo evolutivo e foram calculados com topologias otimizadas por máxima verossimilhança como implementado pelo programa MrAIC (Akaike, 1974; Nylander, 2004). Na análise de distância por “Neighbor-joining”, os valores de bootstrap foram estimados utilizando 1000 replicações com o modelo evolutivo TrN93+G. Diferentes modelos evolutivos foram utilizados em ambas as árvores filogenéticas desde que o modelo HKY+G considera a frequência de mudanças transicionais entre purinas e pirimidinas sendo a mesma. Como não há forma analítica para estimar distância por este modelo evolutivo, foi utilizado o modelo TrN93+G (Tamura & Nei, 1993).

Os valores de probabilidade posterior na Inferência Bayesiana foram estimados utilizando a análise de Cadeia de Markov Monte Carlo com 10.000.000 de gerações com amostragem de dados a cada 500 gerações. Sequências do gene COI de *Angiostrongylus* spp. foram obtidas do banco de dados GenBank, com os respectivos números de acesso apresentados na árvore bayesiana (Figura 6), sendo elas: sequências de *A. cantonensis* proveniente do Japão, China, Taiwan, Tailândia e Brasil; *A. vasorum* proveniente do Reino Unido e *A. costaricensis*. Sequência de *Metastrongylus salmi* Geddoelst, 1823 foi utilizada como grupo externo. Haplótipos de isolados de *A. vasorum* provenientes do Brasil (*A. vasorum* 5421, 5641 e 5642) foram reconstruídas a partir de informações publicadas (Jefferies *et al.*, 2009).

#### **4.3 Análise comparativa da biologia e morfologia entre diferentes isolados de *A. cantonensis***

##### **4.3.1 Isolados de *A. cantonensis* e infecção experimental de moluscos**

Dois isolados de *A. cantonensis* foram analisados referentes a dois haplótipos distintos: *A. cantonensis* isolado de *A. fulica* naturalmente infectados provenientes do município de Olinda (Pernambuco), correspondente ao haplótipo ac8, o qual o ciclo foi mantido desde o ano de 2010 em *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 no Laboratório de Patologia, IOC/FIOCRUZ (Thiengo *et al.*, 2010) e *A. cantonensis* isolado de *R. norvegicus* naturalmente infectados provenientes do Bairro Caju (Rio

de Janeiro; zona portuária), correspondente ao haplótipo ac9, que foi obtido através de trabalho de campo realizado em Dezembro/2012 e o ciclo foi mantido em condições experimentais no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ.

Os moluscos *B. glabrata*, infectados com *A. cantonensis* proveniente de Olinda, foram picados e digeridos artificialmente em uma solução de HCl a 0,7% por duas horas a 37°C, conforme a técnica de Wallace & Rosen (1969). As amostras digeridas foram colocadas no aparato de Baermann para que as larvas L3 fossem recuperadas, utilizando a técnica Baermann-Moraes empregada para decantar e separar larvas L3 (Willcox & Coura, 1989). Os materiais coletados do fundo do funil de Baermann foram centrifugados por 10 minutos a 3,000 rpm (1,512 x g). O sedimento foi colocado em placa de Petri, analisado no microscópio estereoscópico (Zeiss MC80DX – Stemi SV6) para detecção e coleta de larvas L3 para a posterior infecção experimental dos roedores.

As larvas L1 de *A. cantonensis* recuperadas das fezes de *R. norvegicus* naturalmente infectados coletados no Bairro Caju (Rio de Janeiro), foram utilizadas para fazer a infecção experimental de moluscos *B. glabrata*. Um total de 102 moluscos foram expostos individualmente a 1.000 larvas L1 onde permaneceram durante 48 horas. Após esse período, esses moluscos foram colocados em aquários plásticos com 22cm de comprimento por 14,5cm de largura e 12,5cm de altura contendo 4 litros de água desclorada (trocada quinzenalmente); 0,5 gramas de substrato e alimentados uma vez por semana com alface fresca. Após 40 dias foi realizada a sua digestão artificial como descrito anteriormente e realizada a técnica de Baermann-Moraes para a recuperação de larvas L3 (Willcox & Coura, 1989), que foram utilizadas na subsequente infecção experimental dos roedores.

#### **4.3.2 Infecção experimental de roedores, cinética da eliminação de larvas nas fezes e recuperação de helmintos adultos**

Cinco *R. norvegicus* da linhagem Wistar (CEUA n° LW-24/10), foram infectados via oral com 50 larvas L3 de cada isolado e marcados individualmente para sua diferenciação (R1,R2,R3,R4 e R5). Foi avaliado o período pré-patente, o número de larvas L1 eliminadas nas fezes e a taxa de recuperação de helmintos adultos (machos e fêmeas) nos dois isolados. Foram coletados diariamente 1g de

fezes dos roedores dos dois isolados a partir do 35° dia após a infecção para avaliar o início de eliminação de larvas L1 nas fezes, determinando o período pré-patente. Após isso, as coletas das fezes foram realizadas em dias intercalados até o 90° dia após infecção, para avaliar e comparar os dados parasitológicos dos dois isolados.

No 90° dia de infecção os roedores foram eutanasiados através de câmara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foram colocados em decúbito dorsal sobre a mesa de necropsia e foram retirados órgãos tais como pulmão e coração. Os órgãos foram colocados em placas de Petri e lavados com solução salina a 0,9% (NaCl 0,9 g, água destilada 100 ml). O coração e pulmão de cada roedor foram analisados quanto à presença de helmintos adultos para que ocorresse a recuperação dos mesmos. Os helmintos recuperados foram fixados em AFA (álcool etílico 70% 93 ml, formaldeído 37% 5 ml, ácido acético glacial 2 ml) a 65°C (Amato *et al.*, 1991), para a posterior análise morfológica e morfométrica.

#### **4.3.3 Análise morfológica e morfométrica dos helmintos adultos**

Um total de 15 machos e 15 fêmeas de cada isolado foram aferidos nos seguintes caracteres: comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago, distância do anel nervoso à extremidade anterior, distância do poro excretor à extremidade anterior, comprimento do espículo (macho), comprimento e largura do gubernáculo (macho), distância da vulva à extremidade posterior (fêmea) e distância do ânus à extremidade posterior (fêmea). Para a análise morfológica e morfométrica dos helmintos adultos, foi realizada a clarificação com lactofenol e montados sobre lâmina e lamínula para serem analisados com auxílio de microscópio de luz (Zeiss Standard 20), acoplado câmara clara, onde foram desenhados e medidos.

#### **4.3.4 Análise estatística dos dados parasitológicos**

Os dados parasitológicos de cada roedor foram analisados a partir da 7ª semana após infecção, se estendendo até a 12ª semana após infecção. Os parâmetros parasitológicos foram calculados pelo programa estatístico Quantitative Parasitology 3.0 (QP3.0) (Reiczigel & Rózsa, 2005), onde a intensidade da infecção foi dada pela mediana (MED) calculada a partir da média semanal de larvas eliminadas por roedor em 1g de fezes, utilizando o Teste da Mediana de Mood (Rózsa *et al.*, 2000).

A proporção entre helmintos machos e fêmeas de cada isolado foi comparada através de teste do Chi-quadrado. A carga parasitária e o total de larvas L1 dos roedores infectados foram comparados entre os dois isolados através de teste T. A diferença de eliminação de larvas L1 entre as semanas foi comparada através da Análise de Variância (ANOVA) para os dados do isolado de Olinda. Para os dados do isolado de Caju, esta comparação foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, uma vez que a distribuição dos dados não foi normal. A diferença de eliminação de larvas L1 entre os dois isolados foi feita através da Análise de Variância Multifatorial (MANOVA).

A morfometria dos helmintos adultos entre os dois isolados foi comparada através de teste T para cada medida, exceto para as medidas cujas distribuições não foram normais, onde utilizou-se o teste de Mann-Whitney. A comparação do comprimento dos helmintos entre roedores para cada isolado foi feita através de Análise de Variância (ANOVA). Foi investigada a relação entre o número total de helmintos recuperados e o comprimento do corpo através de Correlação de Pearson. Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk. As análises foram feitas no programa estatístico PAST versão 2.10 (Hammer *et al.*, 2001), com exceção da MANOVA que foi realizada no programa BioEstat versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

## 5.Resultados

### 5.1 Filogenia molecular

As sequências parciais do gene mitocondrial COI foram determinadas para 15 isolados geográficos provenientes do Brasil e apresentaram um comprimento variando entre 440-460pb. Foram alinhados 360pb do gene COI para compará-lo com outras sequências previamente disponíveis no banco de dados GenBank. As sequências analisadas revelaram que em 338pb (93,9%) as posições nucleotídicas foram invariáveis, enquanto que em 22 sítios (6,1%) foram variáveis, dos quais quatro sítios foram informativos para parcimônia, e a sequência de aminoácidos não apresentou nenhuma variabilidade em 120 aminoácidos codificados gerando três haplótipos de COI, ac5, ac8 e ac9, baseado em oito haplótipos distintos, como mencionado em estudo anterior (Tokiwa *et al.*, 2012). O haplótipo ac5 foi descrito anteriormente na Ásia, enquanto que os haplótipos ac8 e ac9 representam dois isolados novos, referentes apenas às sequências de *A. cantonensis* provenientes do Brasil (Figura 6). Além disso, o haplótipo ac9 foi relatado pela primeira vez no presente estudo.

As árvores filogenéticas inferidas usando os dois métodos evolutivos mostrou uma topologia similar embora com algumas poucas diferenças em nós envolvendo *A. vasorum* e *A. cantonensis* de Túnel Noel Rosa (Rio de Janeiro). A árvore bayesiana, apresentada com a raiz condensada e com valores de probabilidade posterior e de bootstrap para NJ nos nós, mostrou um valor de suporte nodal maior do que a árvore de NJ enraizada em *M. salmi* baseada no modelo de distância TrN93 (Figura 6). Os valores de bootstrap dos ramos com diferentes topologias mencionadas acima, não foram incluídos na árvore bayesiana.

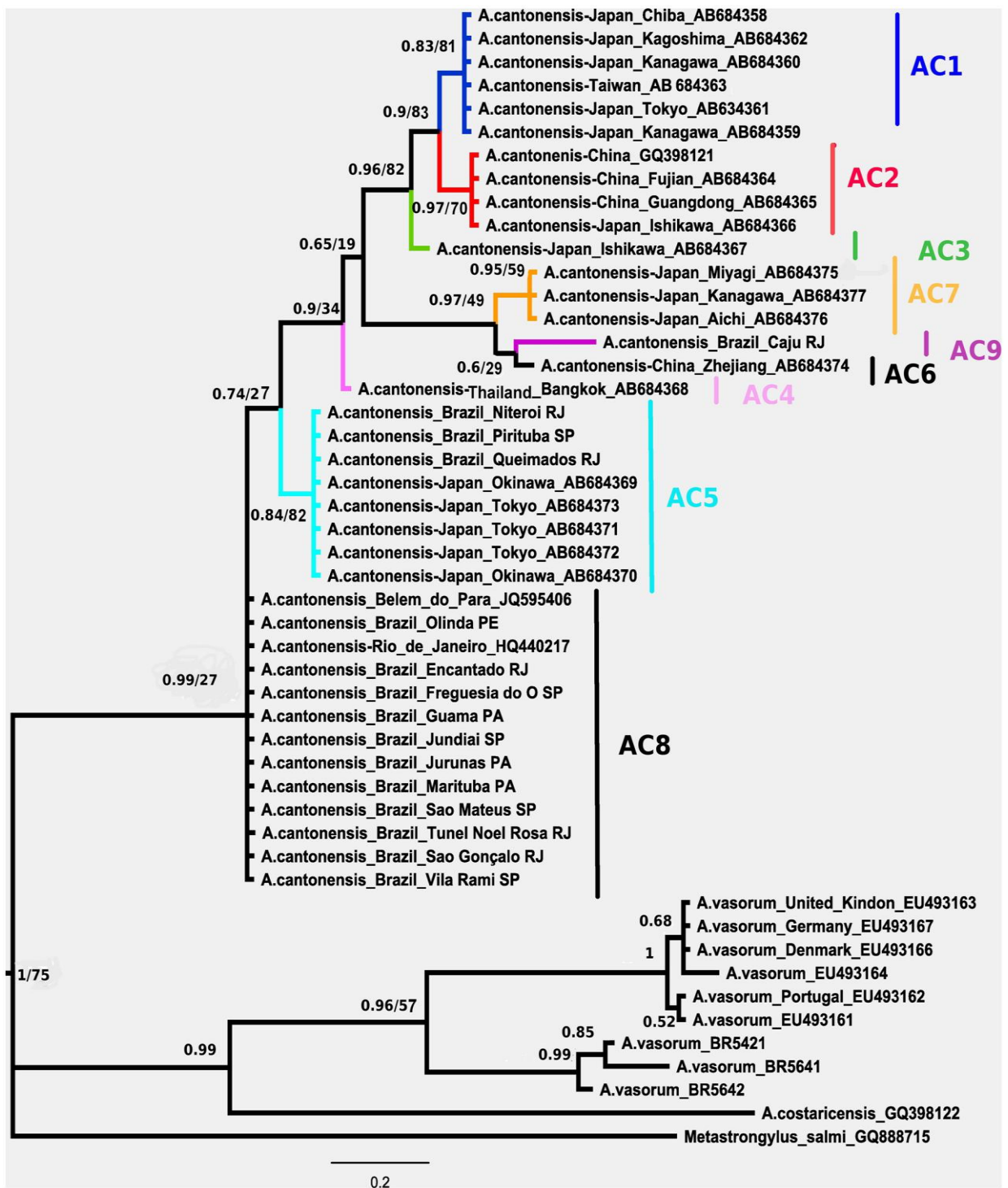
As espécies de *Angiostrongylus* foram agrupadas em dois clados principais, sendo que as sequências de *A. cantonensis* foram monofiléticas. O clado correspondente às sequências de *A. cantonensis* foi suportado com baixo valor de bootstrap de 27% para NJ e alto valor de probabilidade posterior de 0,99 para IB. Dentro de *A. cantonensis*, os isolados geográficos correspondendo aos haplótipos brasileiros ac5 e ac8 foram os primeiros a ramificar, com baixo valor de bootstrap de 27% para NJ e valor de probabilidade posterior de 0,74 para IB. O haplótipo

brasileiro ac9 se apresentou fortemente relacionado com o haplótipo chinês ac6 e com haplótipo japonês ac7, apresentando valores de bootstrap de 49% para NJ e elevado valor de probabilidade posterior de 0,97 para IB.

Apenas um isolado de *A. cantonensis*, Caju (Estado do Rio de Janeiro), nomeado haplótipo ac9, formou um clado com o haplótipo ac6, proveniente da China (Zhejiang) e com haplótipo ac7 proveniente do Japão (Miyagi, Kanagawa e Aichi). Os isolados de Queimados e Niterói (Estado do Rio de Janeiro) e Pirituba (Estado de São Paulo) constituíram um clado com isolados do Japão (Okinawa e Tokyo), correspondendo ao haplótipo ac5. O haplótipo ac8 correspondeu aos outros isolados brasileiros provenientes da região Sudeste: Jundiaí, Freguesia do Ó, São Mateus, Vila Rami (Estado de São Paulo), Túnel Noel Rosa, Encantado, São Gonçalo e cidade do Rio de Janeiro (GenBank: HQ440217) (Estado do Rio de Janeiro); Região Norte: Guamá, Jurunas, Marituba e Belém (GenBank:JQ595406) (Estado do Pará); e Região Nordeste: Olinda (Estado de Pernambuco), formando um clado distinto.

As espécies intimamente relacionadas tiveram os valores de “*p*-distance” interespecíficos, variando de 12,2% (entre *A. cantonensis* e *A. vasorum*) a 19,0% (entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis*). Valores de distância intraespecífica entre *A. cantonensis* variaram de 0,8% (entre os haplótipos ac1 e ac2) a 6,4% (entre os haplótipos ac5 e ac9) (Tabela 2).

A variação nucleotídica entre o clado que inclui os haplótipos ac5 e ac8 consistiu de quatro passos mutacionais, enquanto que os passos mutacionais entre os clados contendo o haplótipo ac9 foram de 21 e 19 para os haplótipos ac5 e ac8, respectivamente. Além disso, os passos mutacionais entre o haplótipo ac9 e os haplótipos ac6 e ac7 foram sete e nove, respectivamente (Tabela 3 e Figura 7).



**Figura 6:** Árvore bayesiana inferida da análise filogenética das sequências de *Angiostrongylus* spp. utilizando 360pb do gene mitocondrial COI .

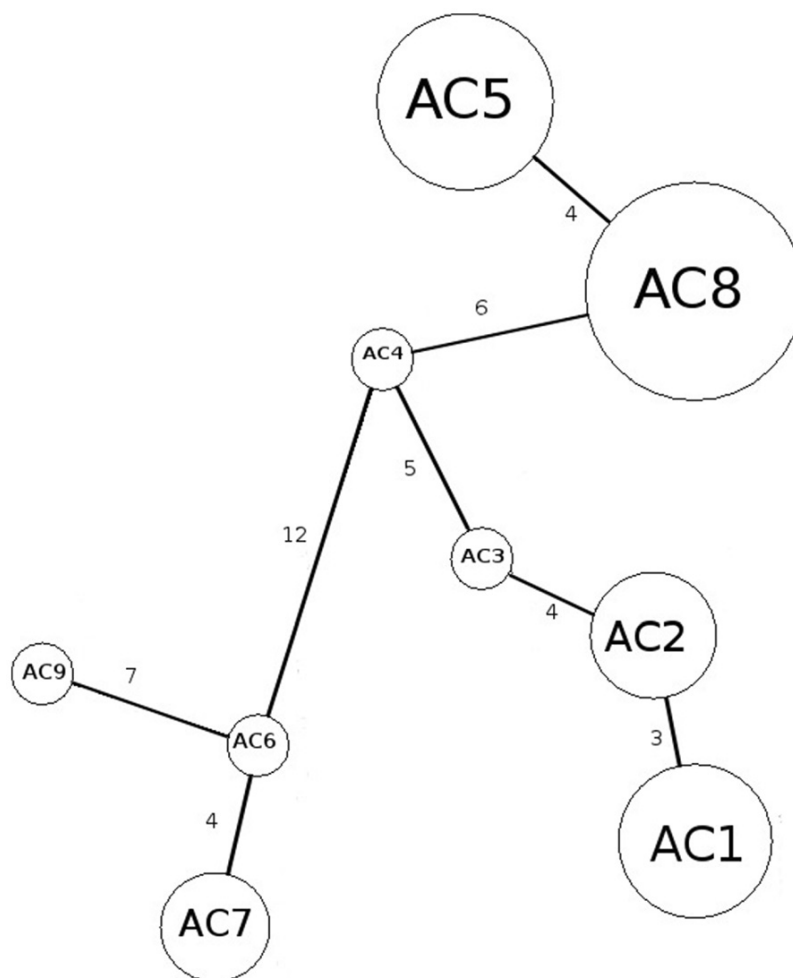


**Tabela 2:** Valores de “*p*-distance” de haplótipos de *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus vasorum* baseados no gene mitocondrial COI.

	ac1	ac2	ac3	ac4	ac5	ac6	ac7	ac8	ac9	ACO	AV42	AV21
<i>A. cantonensis</i> ac1	-											
<i>A. cantonensis</i> ac2	<b>0,008</b>	-										
<i>A. cantonensis</i> ac3	0,011	0,011	-									
<i>A. cantonensis</i> ac4	0,020	0,020	0,014	-								
<i>A. cantonensis</i> ac5	0,038	0,038	0,032	0,017	-							
<i>A. cantonensis</i> ac6	0,051	0,051	0,044	0,035	0,054	-						
<i>A. cantonensis</i> ac7	0,051	0,051	0,044	0,035	0,048	0,011	-					
<i>A. cantonensis</i> ac8	0,038	0,038	0,032	0,017	0,011	0,054	0,048	-				
<i>A. cantonensis</i> ac9	0,054	0,054	0,048	0,044	<b>0,064</b>	0,020	0,026	0,057	-			
<i>A. costaricensis</i> GQ398122	0,176	0,189	<b>0,190</b>	<b>0,190</b>	<b>0,190</b>	0,185	0,176	0,172	0,167	-		
<i>A. vasorum</i> BR5642	0,155	0,151	0,147	0,134	0,130	0,142	0,146	0,126	0,130	0,169	-	
<i>A. vasorum</i> BR5421	0,156	0,152	0,147	0,135	0,143	0,142	0,146	0,127	0,131	0,169	0,008	-
<i>A. vasorum</i> BR5641	0,146	0,142	0,138	0,130	0,138	0,142	0,145	<b>0,122</b>	0,126	0,178	0,023	0,017

**Tabela 3:** Posições de nucleotídeos variáveis dentro de 360pb do gene mitocondrial COI de diferentes haplótipos de *Angiostrongylus cantonensis*.

	022	025	031	034	073	076	100	109	118	130	136	160	169	181	187	193	211	229	232	235	244	268	280	289	292	295	298	301	304	310	313	358			
Haplótipos																																			
ac1	A	G	A	A	A	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	G	G	A	G	A	A	T	A	T	T	G	A	C	G	A	G	A			
ac2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.
ac3	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
ac4	.	.	G	G	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
ac5	.	.	G	G	.	G	.	C	C	.	A	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	G	.	G	.	G	T	A	.	.	.	.	.	.
ac6	G	T	G	G	G	.	A	.	.	.	A	.	G	C	.	A	A	.	A	G	.	.	.	.	G	A	.	T	.	.	.	.	.	G	
ac7	G	T	G	G	G	.	A	.	.	A	A	.	G	.	.	A	A	.	A	.	.	.	G	.	G	A	.	T	.	.	.	.	.	G	
ac8	.	.	G	G	.	G	.	.	C	.	A	A	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	G	.	G	.	G	T	.	G	.	.	.	.	.
ac9	G	T	G	G	G	.	A	.	.	.	A	.	G	.	T	A	A	.	A	G	G	.	.	.	.	.	.	T	.	G	A	G			



**Figura 7:** Rede de haplótipos baseada na sequência parcial de 360pb do gene mitocondrial COI

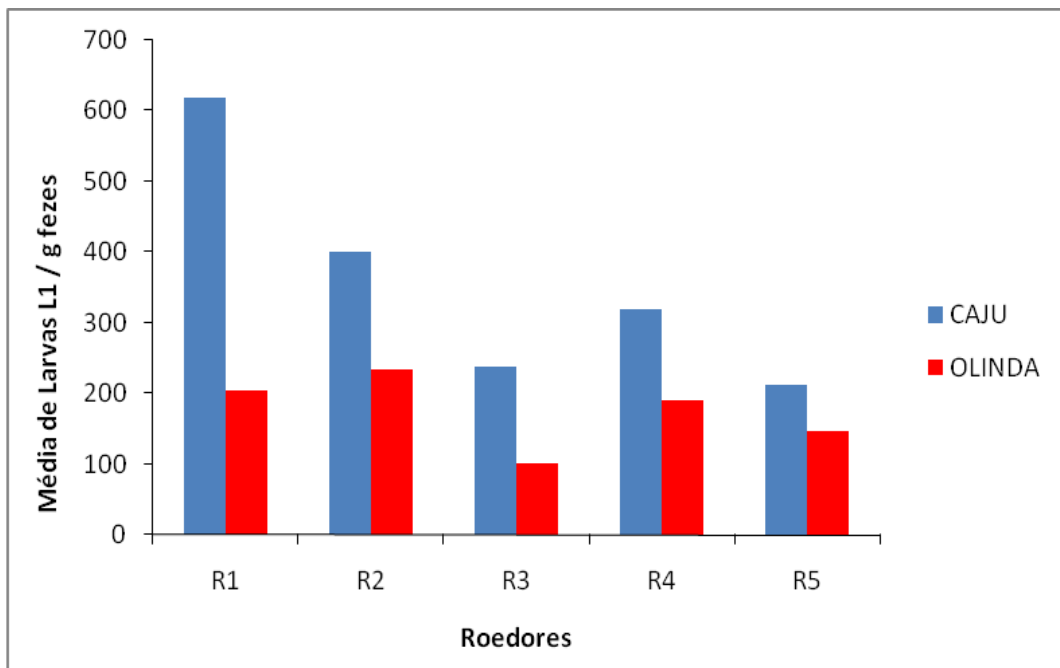
## 5.2 Comparação da biologia e morfologia entre diferentes isolados de *A. cantonensis*

Dos cinco roedores infectados experimentalmente com cada isolado de *A. cantonensis*, todos foram positivos eliminando larvas L1 nas fezes (Figura 8 e 9). O isolado de Olinda apresentou um período pré-patente variando entre 43 e 44 dias após infecção e de forma similar, o isolado de Caju apresentou o período pré-patente variando entre 42 e 43 dias após a exposição. Foi observado um aumento progressivo na eliminação de larvas L1 nas fezes até a 9<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> semana após infecção para os isolados de Caju e Olinda, respectivamente. Nas semanas seguintes, foi observada uma flutuação na eliminação de larvas L1 para o isolado de

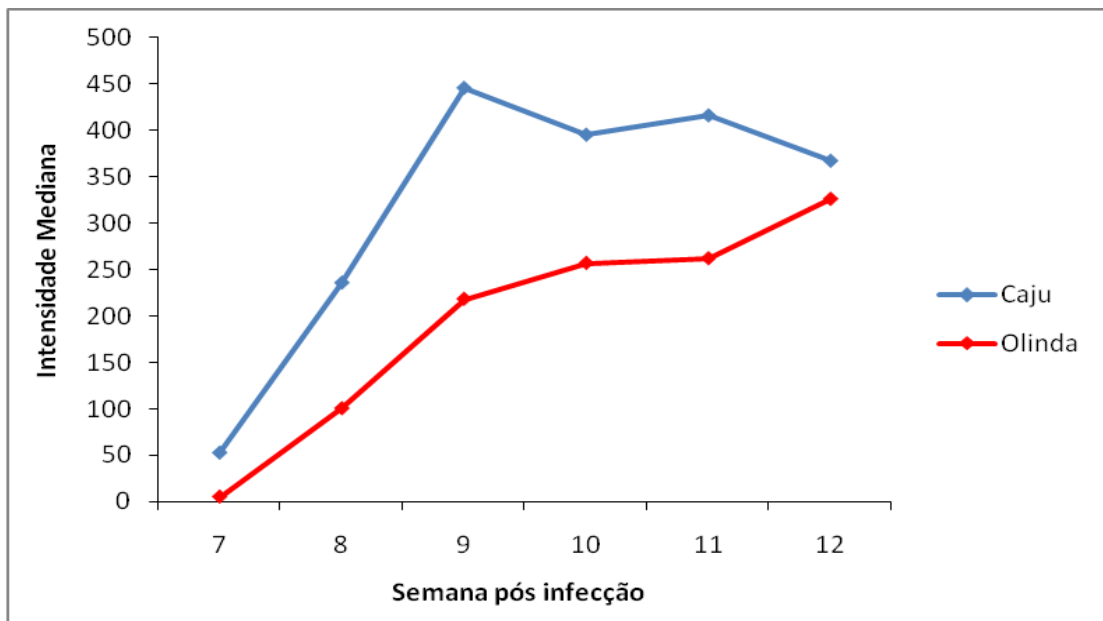
Caju, enquanto que para o isolado de Olinda foi observado um aumento menos intenso se desenvolvendo sem tendência a queda (Figura 9).

A comparação do total de larvas L1 eliminadas entre os dois isolados não foi significativa ( $T = -2,303$ ;  $p = 0,08$ ), enquanto que a diferença na eliminação de larvas em cada isolado entre as semanas foi estatisticamente significativa com a progressão da infecção, tanto para o isolado de Olinda ( $F = 14,08$ ;  $df = 5$ ;  $p = 1,772E-06$ ) quanto para o isolado de Caju ( $H = 15,73$ ;  $p = 0,0076$ ). Foi observada também uma diferença significativa na eliminação de larvas L1 entre os dois isolados quando comparados para mesma semana, que apresentaram perfis diferentes ( $F = 8,66$ ;  $gl = 5,48$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 9 e Tabela 4).

Foi observada diferença estatística significativa entre helmintos fêmeas e machos no isolado de Caju ( $\chi^2 = 3,549$ ;  $p = 0,05$ ), porém no isolado de Olinda não houve diferença significativa para os mesmos dados ( $\chi^2 = 0,252$ ;  $p = 0,616$ ), apresentando uma razão sexual de 0,64:1 e 1,16:1, respectivamente. Diferença estatística significativa também foi observada na comparação da carga parasitária recuperada dos roedores entre os dois isolados ( $T = -2,779$ ;  $p = 0,049$ ) (Figura 10 e Tabela 4).



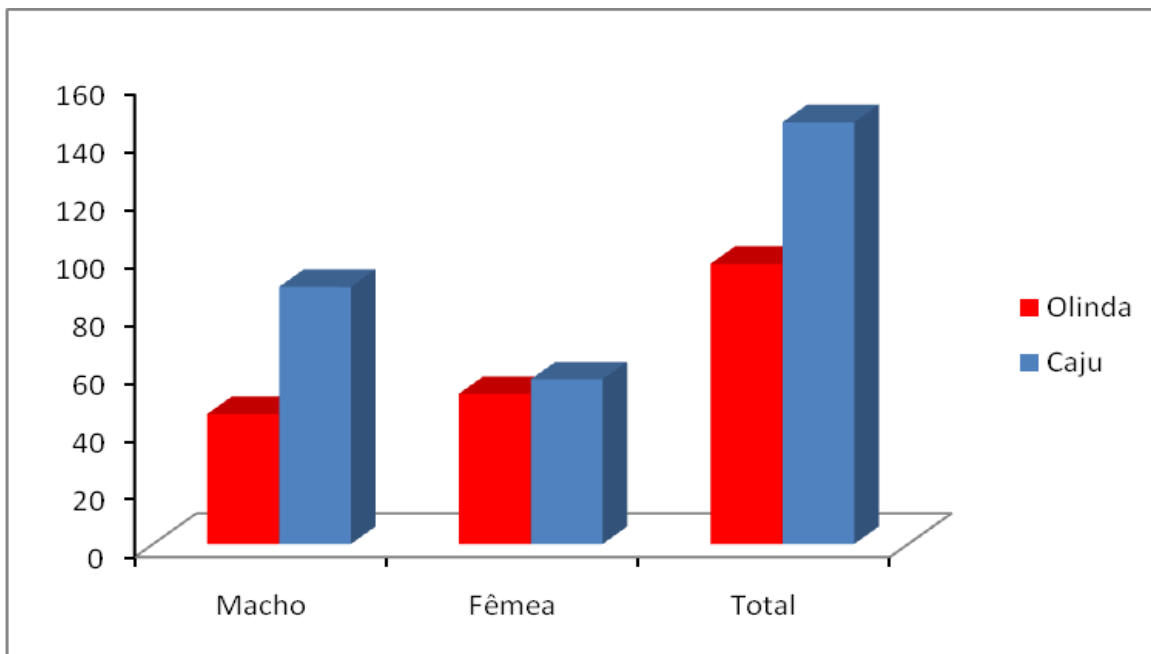
**Figura 8:** Média de larvas L1 eliminadas por roedor em 1g de fezes, nos isolados de Caju (RJ) e Olinda (PE).



**Figura 9:** Intensidade da infecção dada pela mediana a partir da média semanal de larvas L1 eliminadas por roedor em 1g de fezes.

**Tabela 4:** Número de espécimes de *Angiostrongylus cantonensis* machos e fêmeas recuperados por roedor e sua respectiva razão sexual; número de larvas L1 eliminadas por roedor e a média de eliminação de larvas L1 por fêmea.

Localidades	Olinda					Caju				
	Roedores	Espécimes ♂	Espécimes ♀	Razão Sexual	Total de Larvas L1	Média Larvas L1/♀	Espécimes ♂	Espécimes ♀	Razão Sexual	Total de Larvas L1
R1	8	7	0,88:1	2086	298	12	7	0,58:1	10503	1500,43
R2	9	17	1,89:1	4471	263	15	13	0,87:1	6805	523,47
R3	6	7	1,17:1	1911	273	16	9	0,57:1	4033	448,11
R4	8	14	1,75:1	3612	258	21	10	0,48:1	5444	544,4
R5	14	7	0,5:1	2772	396	25	18	0,72:1	3622	201,22
Total	45	52	1,16:1	2970,4 ±1073,23	297,6 ±57,12	89	57	0,64:1	6081,4 ±2771,51	643,53 ±498,09



**Figura 10:** Número de espécimes de *Angiostrongylus cantonensis* machos e fêmeas, recuperados no isolado de Olinda (PE) e Caju (RJ).

Com relação à morfometria dos helmintos, não foi observada diferença significativa em relação ao comprimento do corpo dos helmintos provenientes de diferentes roedores, tanto machos (Olinda  $p= 0,638$ ; Caju  $p= 0,947$ ) quanto fêmeas (Olinda  $p= 0,282$ ; Caju  $p= 0,504$ ), dentro de um mesmo isolado (Tabela 5).

Quando analisada a diferença da morfometria do comprimento do corpo, largura do corpo, comprimento do esôfago, distância do anel nervoso à extremidade anterior, distância do poro excretor à extremidade anterior, comprimento do espículo (macho), comprimento e largura do gubernáculo (macho) e distância da vulva e ânus à extremidade posterior (fêmea) entre os dois isolados, foi observada diferença significativa no comprimento do corpo ( $T= -8,758$ ;  $p= 4,7E-07$ ;  $n=15$ ), no esôfago ( $U= 41$ ;  $p= 0,001$ ;  $n=15$ ) e no espículo ( $T= -2,115$ ;  $p= 0,05$ ;  $n=15$ ) entre os machos dos dois isolados. Quando comparado os caracteres entre as fêmeas dos dois isolados foi observada diferença significativa no comprimento do corpo ( $T= -9,649$ ;  $p= 1,452E-07$ ;  $n=15$ ), esôfago ( $U= 55$ ;  $p= 0,01$ ;  $n=15$ ) e distância do ânus à extremidade posterior ( $U= 40$ ;  $p= 0,002$ ;  $n=15$ ) (Tabela 6).

Não foi observada correlação significativa entre o comprimento do corpo dos helmintos e o total de helmintos recuperados tanto para o isolado de Olinda ( $R=0,736$ ;  $p=0,156$ ) quanto para o isolado de Caju ( $R=0,129$ ;  $p=0,836$ ).

**Tabela 5:** Dados morfométricos do comprimento do corpo de três espécimes, machos e fêmeas, de *Angiostrongylus cantonensis* recuperados de cada roedor dos isolados Olinda (PE) e Caju (RJ), após infecção experimental.

Compr. do corpo	Localidades			
	Olinda		Caju	
	♂	♀	♂	♀
R1	24,9 ± 1,54	36,67 ± 3,60	20,57 ± 2,23	25,69 ± 0,40
R2	24,67 ± 0,31	32,13 ± 1,01	20,59 ± 0,40	27,69 ± 0,34
R3	25 ± 1,47	34,17 ± 1,99	20,07 ± 1,56	25,95 ± 2,89
R4	23,73 ± 0,51	33,53 ± 3,15	19,76 ± 1,43	25,99 ± 1,01
R5	24,93 ± 1,21	34,77 ± 0,68	20,38 ± 1,18	26,38 ± 1,00

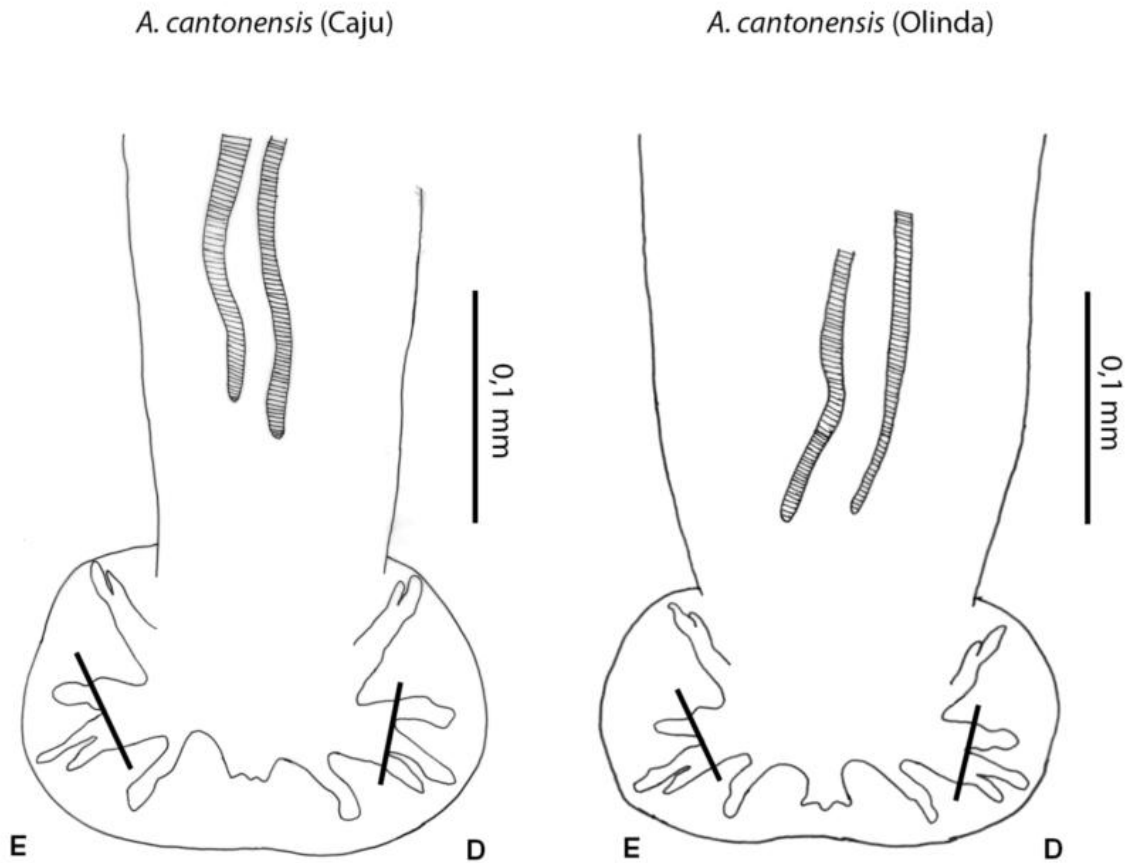


**Tabela 6:** Dados morfométricos de helmintos adultos (15 machos e 15 fêmeas) de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* de Olinda (PE) e Caju (RJ), recuperados da artéria pulmonar, obtidos após 12 semanas de infecção experimental de *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar).

Estados	PE		RJ	
Localidades	Olinda		Caju	
	♂	♀	♂	♀
Comprimento corpo	24,65 ± 1,07	34,25 ± 2,54	20,27 ± 1,30	26,34 ± 1,44
Largura	0,34 ± 0,05	0,41 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,42 ± 0,06
Esôfago	0,28 ± 0,03	0,3 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02
Anel nervoso	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03
Poros excretor	0,3 ± 0,09	0,32 ± 0,05	0,35 ± 0,07	0,32 ± 0,06
Espículo	1,29 ± 0,08	-	1,23 ± 0,09	-
Gubernáculo	0,05 x 0,01	-	0,06 ± 0,02	-
Vulva-cauda	-	0,20 ± 0,05	-	0,19 ± 0,02
Ânus-cauda	-	0,08 ± 0,03	-	0,06 ± 0,02

Com relação à análise morfológica através da microscopia de luz, foi observada uma pequena variação no nível das bifurcações que unem os raios laterais no lobo direito da bolsa copuladora dos helmintos machos. No isolado de Olinda, tanto nos raios laterais do lobo esquerdo quanto do lobo direito, foi visualizado uma diferença no nível entre as bifurcações. Enquanto que no isolado de Caju, as bifurcações que unem os raios laterais do lobo direito se apresentaram praticamente no mesmo nível, e as bifurcações que unem os raios laterais do lobo esquerdo, apresentaram diferença no nível entre as mesmas, embora tal diferença

ainda seja menor do que a observada para os isolados de Olinda. Variações também foram observadas nos raios ventrais e dorsais, entre os dois isolados. Os espécimes do isolado de Olinda apresentaram os raios ventrais menores e mais finos, e raios dorsais mais proeminentes, quando comparados com os espécimes de Caju (Figura 11).



**Figura 11:** Microscopia de luz: vista dorsal da bolsa copuladora de macho de dois isolados geográficos de *Angiostrongylus cantonensis*, mostrando as diferenças no nível das bifurcações que unem os raios laterais. E= esquerda; D= direita. Linha do nível das bifurcações (\_\_\_\_\_).

## 6. Discussão

### 6.1 Relação filogenética entre isolados brasileiros de *A. cantonensis*

No presente estudo, isolados de *A. cantonensis* provenientes de diferentes localidades geográficas do Brasil foram analisados utilizando sequências parciais do gene mitocondrial COI, permitindo estimar a sua variabilidade. Todas as sequências do Brasil foram monofiléticas com sequências provenientes da Ásia. Tokiwa et al. (2012), distinguiu oito haplótipos, nomeando-os de ac1 a ac8. A maioria das sequências brasileiras corresponderam ao haplótipo ac5 ou ao haplótipo ac8. Um novo haplótipo foi descrito neste estudo, nomeado ac9, monofilético com o haplótipo Chinês ac6. A variação intraespecífica observada entre os isolados brasileiros variou de 0,8% (entre os haplótipos ac1 e ac2) a 6,4% (entre os haplótipos ac5 e ac9). Esses valores estão em concordância com os achados de Blouin (2002), que mostraram que os níveis de variação de sequências do DNA mitocondrial entre nematódeos de uma mesma espécie é inferior a 10%.

Com relação ao gênero *Angiostrongylus*, Gasser et al. (2012) mostraram diversidade nucleotídica quando comparado os genomas mitocondriais entre as espécies (*A. vasorum*, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*), apesar do gene COI ter se apresentado como um dos genes mitocondriais mais conservados. As sequências de aminoácidos concatenadas revelaram identidade variando entre 65,7 – 81,5% entre as três espécies. Recentemente, um estudo da variabilidade genética de sequências do gene mitocondrial COI entre populações do nematódeo *Enterobius vermicularis* Leach, 1853 realizado por Ferrero et al. (2013), mostrou a presença de 22 haplótipos em amostras provenientes da Dinamarca, dos quais vários foram idênticos ou intimamente relacionados com amostras coletadas da Alemanha, Grécia e Japão, sendo as sequências dos quatro países monofiléticas. A análise molecular mostrou uma distância de 2% entre as mesmas, porém *E. vermicularis* dos quatro países pertenceram a populações diferentes, evidenciando que o gene COI é útil para estudos de genética de populações (Blouin, 2002).

A análise molecular e filogenética utilizando genes mitocondriais tem sido amplamente utilizada para confirmação de espécies de helmintos quando apenas a análise morfológica não consegue confirmar e/ou esclarecer a nível taxonômico, como por exemplo, mostrado por Alasaad et al. (2012) em estudo com o nematódeo *Setaria cervi* Rudolphi, 1819 utilizando sequências parciais do gene COI, a fim de se caracterizar o parasito e determinar sua posição filogenética em relação a outros helmintos filarioides. Foi observado que a distância "p" entre *S. cervi* e outras espécies do gênero *Setaria* variou de 8–10% e que as sequências desse gênero foram monofiléticas, confirmando que *S. cervi* é membro do gênero *Setaria*. Além disso, recentemente Georgieva et al. (2013) em estudo com espécies crípticas do trematódeo *Echinostoma*, empregando a análise de NJ e IB, observou que os isolados de *Echinostoma revolutum* Froelich, 1802 europeus e os obtidos da América do Norte formaram duas linhagens irmãs, apresentando alta divergência inter-linhagens (distância "p": 4,9-6,8%), indicando que os isolados norte-americanos representam uma espécie críptica do complexo de espécies "revolutum".

Em estudo anterior realizado na China com os nematódeos *Trichinella* spp. , Yang et al. (2008) também mostraram através de sequências parciais do gene mitocondrial COI, a variabilidade genética entre diferentes espécies do gênero *Trichinella* Railliet, 1895. Foram relatadas também diferenças genéticas entre isolados da China, onde um dos isolados utilizados foi divergente, apresentando identidade variando entre 47,5 – 53,9% com os demais isolados utilizados no estudo, podendo representar uma nova cepa ou espécie, mostrando dessa forma a importância desse gene para a identificação de espécies e isolados.

Atualmente, Zhou et al. (2013) realizou estudo sobre a variabilidade genética do nematódeo *Baylisascaris schroederi* McIntosh, 1939 coletados de pandas que habitavam diferentes montanhas na China. Utilizaram a sequência completa do gene mitocondrial citocromo b e análises filogenéticas através de IB e máxima parcimônia, obtendo também diversidade genética de três populações de *B. schroederi*, com alta diversidade de haplótipos e baixa diversidade nucleotídica.

Jabbar et al. (2013), em estudo com o nematódeo *Protostrongylus rufescens* Leuckart, 1865, analisaram o genoma mitocondrial completo através da técnica “long-PCR amplification” seguida de sequenciamento e análise filogenética através de IB, que mostrou que *P. rufescens* estava intimamente relacionado com outros nematódeos da Ordem Strongylida como *Aelurostrongylus abstrusus* Railliet, 1898, *A. vasorum*, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, revelando identidades de 37- 92,4% entre essas espécies. Da mesma maneira, Liu et al. (2013), mostraram que através do sequenciamento do genoma mitocondrial completo do nematódeo *Spirocercia lupi* Rudolphi, 1809, utilizando também a técnica de “Long-PCR” e sequenciamento, foi possível reavaliar as relações taxonômicas dentro da Ordem Spirurida Chitwood, 1933, mostrando através de IB que *S. lupi* (Thelaziidae) está intimamente relacionado com as famílias Setariidae e Onchocercidae Leiper, 1911. Esses estudos enfatizam a importância dos genes mitocondriais como bons marcadores tanto para estudo da variabilidade genética de helmintos quanto para estudos de genética de populações, epidemiológicos e biológicos.

Os dados observados no presente estudo mostraram que o isolado de *A. cantonensis* proveniente do Caju (Estado do Rio de Janeiro) é restrito a área portuária e acredita-se ter entrado no país através do comércio com a Ásia. O fator que pode ter restringido a dispersão do haplótipo ac9 para outros lugares do país, é a ausência do principal hospedeiro intermediário, *A. fulica*, no local onde os ratos foram capturados. De fato, foi relatado a presença apenas do hospedeiro intermediário infectado *Omalonyx* sp. (Thiengo, comunicação pessoal).

De forma semelhante, os isolados brasileiros de Pirituba (Estado de São Paulo), Queimados e Niterói (Estado do Rio de Janeiro), os quais correspondem ao haplótipo ac5 relatado inicialmente ocorrendo no Japão, podem ter entrado no país através do Rio de Janeiro ou São Paulo também a partir do continente asiático. Essa hipótese também é considerada para o haplótipo mais abundante no Brasil, haplótipo ac8, mostrando a possível dispersão a partir da área de chegada para a região Sudeste, Nordeste e Norte, provavelmente através do caramujo africano, *A. fulica*.

Do mesmo modo, Araujo (1967) mostrou em estudo sobre a helmintofauna em *R. norvegicus* na cidade de São Paulo que todos os ratos capturados estavam parasitados por 1 a 11 espécies de helmintos. Interessantemente, na composição da comunidade de helmintos não havia relato da ocorrência de espécies do gênero *Angiostrongylus*. Além disso, Pessôa & Martins (1982) relataram que não encontraram infecção por *A. cantonensis* em roedores coletados no Estado brasileiro da Bahia, o que sugere reintroduções recentes do parasito no país.

*Achatina fulica* tem sido considerado uma peste nas regiões tropicais e subtropicais onde foi introduzido. No Brasil, esse caramujo exótico se estabeleceu no Estado do Paraná em 1980, provavelmente trazido a partir da Indonésia para fins comerciais que não foram bem sucedidos (escargot). A alta capacidade reprodutiva e a tendência dos criadores de moluscos em liberar esses espécimes para a vida silvestre são as razões prováveis para a rápida invasão dessa espécie para áreas aonde não existiam anteriormente (Thiengo *et al.*, 2007; Zanol *et al.*, 2010). Esse caramujo é atualmente encontrado na maioria dos Estados brasileiros e fatores tais como hábitos alimentares vorazes contribuem para a eliminação da fauna de caramujos nativos, reduzindo os recursos disponíveis e aumentando a competição por espaço físico. A ausência de predadores, também contribui para a alta dispersão desses caramujos (Ohlweiler *et al.*, 2010).

A presença elevada de *A. cantonensis* no país é provavelmente um resultado da rápida disseminação do hospedeiro intermediário, *A. fulica*, contribuindo para a dispersão desse parasito e infecção do hospedeiro definitivo (Thiengo *et al.*, 2010). Esse fenômeno é descrito como uma das causas primárias da dispersão de meningoencefalite eosinofílica (Maldonado *et al.*, 2010). Por outro lado, precisa ser considerado o papel dos roedores na dispersão desse parasito, uma vez que recentemente foi relatado a presença de *R. norvegicus* naturalmente infectado no Estado do Rio Grande do Sul, aonde ainda não há presença de *A. fulica* naturalmente infectado (Cognato *et al.*, 2013).

A variação genética observada entre os isolados brasileiros apoia a hipótese de que o surgimento de *A. cantonensis* no Brasil, é resultado de introduções

múltiplas de roedores parasitados e moluscos que atuam como hospedeiros intermediários. Estes foram provavelmente transportados em navios devido ao comércio com a África e Ásia durante o período de colonização europeia (Thiengo *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2010) e dispersado pelo transporte humano, se tornando endêmico em áreas portuárias (Tokiwa *et al.*, 2012). Dessa forma, um estudo de filogeografia de *A. cantonensis* é importante para localizar a origem geográfica dessas introduções, especialmente dos haplótipos ac8 e ac9.

## **6.2 Comparação da biologia e morfologia entre isolados de helmintos, em particular de *A. cantonensis***

Poucos estudos comparativos da biologia e/ou morfologia do nematódeo do gênero *Angiostrongylus* foram feitos até o momento (Maldonado *et al.*, 2010; Schnyder *et al.*, 2010; Thiengo *et al.*, 2010). No Brasil, já existem relatos da presença de *A. cantonensis* em várias regiões do país tanto no hospedeiro definitivo quanto no hospedeiro intermediário, naturalmente infectado (Maldonado *et al.*, 2010; Monte *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013; Thiengo *et al.*, 2013). Além disso, casos de infecção humana também foram relatados em três Estados brasileiros desde 2007 (Caldeira *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Thiengo *et al.*, 2010; Espírito-Santo *et al.*, 2013; Thiengo *et al.*, 2013). Como verificamos a presença de três haplótipos do parasito no Brasil, procedemos à comparação de dois haplótipos encontrados no país (ac8 e ac9), investigando se a variabilidade a nível molecular poderia ser um marcador das características biológicas e da morfologia do nematódeo.

Diferenças significativas em algumas características biológicas foram observadas quando comparado o isolado de *A. cantonensis* oriundo de Olinda (Pernambuco), mantida em condições de laboratório desde 2010, e o isolado de *A. cantonensis* oriundo do Bairro Caju (cidade do Rio de Janeiro), mantida em condições de laboratório desde 2012, após infecção experimental de roedores. Em relação ao isolado de Caju, verificou-se uma maior eliminação de larvas L1 em 1g de fezes e carga parasitária maior, com cerca de 60% de recuperação de helmintos adultos quando comparado com o isolado de Olinda, que apresentou aproximadamente 40% de recuperação de helmintos adultos, embora o número de

larvas L1 utilizadas na infecção dos roedores tenha sido o mesmo. Com relação à morfometria, foram observadas também diferenças significativas em alguns caracteres dos helmintos adultos quando comparado os dois isolados, tais como, o comprimento do corpo, esôfago e espículo entre os helmintos machos e comprimento do corpo, esôfago e a distância do ânus à extremidade posterior entre as fêmeas. Além disso, quando analisada a morfologia de espécimes machos dos dois isolados por microscopia de luz, foi observada uma variação entre o nível das bifurcações que unem os raios laterais da bolsa copuladora.

Estudo realizado por Thiengo et al. (2010), a partir de infecção experimental de *R. norvegicus* com larvas L3 de *A. cantonensis* obtidas de *A. fulica* naturalmente infectados do Estado de Pernambuco (Olinda), mostraram que o resultado das análises morfométricas dos helmintos adultos de Pernambuco estão em concordância com os resultados da morfometria realizada no presente estudo com os helmintos adultos do isolado de Olinda (PE), tanto para os helmintos machos quanto fêmeas. Já os resultados da morfometria dos helmintos adultos, obtidos para os isolados de Caju (cidade do Rio de Janeiro; zona portuária), foram mais similares aos observados nos isolados de *A. cantonensis* provenientes do Japão, apoiando a hipótese do parasito ter entrado no país através do comércio com a Ásia e possivelmente sugerindo que a variação intraespecífica observada a nível molecular, pode indicar variação a nível biológico (Monte *et al.*, 2012).

Variações morfológicas e morfométricas entre diferentes isolados geográficos de *A. cantonensis* do Brasil (São Gonçalo e Barra do Piraí, Rio de Janeiro, e Joinville, Santa Catarina) foram observadas por Maldonado et al. (2010). De acordo com os resultados, os valores morfométricos encontrados para os espécimes de São Gonçalo e Barra do Piraí (RJ), foram equivalentes aos obtidos para os espécimes de Caju no presente estudo. Com relação à análise morfológica por microscopia de luz, foi observado que as diferenças no nível das bifurcações que unem os raios laterais do lado direito da bolsa copuladora nos espécimes do isolado de Caju, também foram observadas para os espécimes de Barra do Piraí, sugerindo a possível presença do haplótipo ac9 em outras localidades do Estado do Rio de Janeiro e não



apenas restrito a zona portuária, sendo necessários mais estudos para confirmação dessa hipótese.

Bain & Philipp (1991), relatam que a taxa de polimorfismo genético em populações naturais de parasitos sofre redução de sua variabilidade quando em condições de laboratório, sendo esperada também reduzida variabilidade biológica e morfológica. De acordo com Sorensen et al. (1999) em estudo com isolados de *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904 de diferentes localidades, utilizando DNA mitocondrial como marcador genético, constataram baixo nível de variabilidade genética, atribuindo a este fato o longo período de manutenção do isolado em laboratório.

Li et al. (2004), observaram em estudo realizado na China utilizando sequências do gene mitocondrial COI do nematódeo *Necator americanus* Stiles, 1092 mantido por mais de 100 gerações em laboratório e *N. americanus* isolados do campo, observaram a existência de pouca diversidade genética entre os isolados e que o isolado mantido em laboratório representou apenas um haplótipo de COI, sendo o mais abundante identificado na China. Isto sugeriu a ocorrência de restrição da diversidade populacional e que o outro haplótipo existente na infecção original possa ter sido perdido, estando em concordância com a perda de variabilidade genética relatada nos estudos descritos anteriormente.

Contraditoriamente ao presuposto, em estudo comparativo das características biológicas de três isolados brasileiros do trematódeo *S. mansoni*, sendo que um destes havia sido recentemente obtido e outros dois mantidos por mais tempo em condições de laboratório, verificaram que o isolado recente apresentou menor número de ovos eliminados nas fezes assim como menor número de helmintos adultos recuperados, se apresentando menos patogênico que os isolados mantidos em condições experimentais por mais tempo (Yoshioka et al., 2002).

Interessantemente, Martinez et al. (2003) utilizando também três isolados brasileiros de *S. mansoni*, mantidas em condição de laboratório por 5 e 20 anos, não evidenciaram diferenças significativas na recuperação de helmintos adultos quando

utilizadas o mesmo número de cercárias de cada linhagem na infecção experimental, embora tenham sido observadas algumas diferenças significativas relacionadas a distribuição de ovos no intestino, eliminação e viabilidade dos ovos. As alterações morfológicas e morfométricas foram mais significativas nos helmintos de ambos os sexos quando comparado com os dados biológicos.

Apesar disso, Euzébio Jr. et al. (2012) observaram diferenças significativas em aspectos biológicos quando comparou três isolados de *S. mansoni* do Brasil, isolados em datas diferentes e mantidos em condições de laboratório. As diferenças foram no número de helmintos adultos recuperados e percentual de helmintos adultos recuperados relacionado com o números de cercárias penetrantes. Diferenças também foram vistas com relação a reações granulomatosas (patogenicidade) que cada isolado causou. Diante disso, sugere-se que mesmo após passagens seriadas, as diferenças naturais (biológicas e/ou morfológicas) de diferentes isolados podem ser expressas, mesmo com sua manutenção prolongada em condições de laboratório.

Com relação à razão sexual, as variações biológicas podem estar relacionadas a fatores genéticos, ambientais e espaciais. Além disso, nem sempre sistemas biológicos apresentam a razão sexual de 1:1. Em helmintos dioicos, o número de fêmeas pode ser favorecido em pequenas populações, porém essa tendência pode mudar caso a intensidade de infecção aumente, como observado em estudos anteriores. (Poulin, 1997; D'Ávila et al., 2012; Rishniw et al., 2012). Poulin (1997) analisou a relação entre a razão sexual e a prevalência ou intensidade de infecção em espécies de nematódeos, observando uma tendência em ter mais fêmeas do que machos. Além disso, em populações experimentais de nematódeos, a intensidade de infecção foi correlacionada negativamente com a razão sexual, sendo pela possibilidade de se controlar as variáveis nessas condições ou pela intensidade de infecção ser em média duas vezes maior do que no ambiente.

Semelhante aos estudos citados anteriormente, no presente estudo o isolado de Olinda apresentou intensidade de infecção menor quando comparado com o isolado de Caju, havendo um maior número total de fêmeas do que o número total

de machos. Interessantemente, para o isolado de Caju o número de machos superou o número de fêmeas, onde houve maior intensidade de infecção. Acredita-se que esse declínio no número de fêmeas para o isolado de Caju, possa estar relacionado a uma competição intraespecífica por nutrientes (requerem mais nutrientes que os machos) ou pela influência do ambiente na determinação sexual, conforme citado em estudos anteriores (Tingley & Anderson, 1986; Stien, 1996; Poulin, 1997; D'Ávila *et al.*, 2012). Poulin (1997) cita que as fêmeas sobrevivem por mais tempo após a infecção do que os machos, e por isso há uma maior proporção de fêmeas. Porém, diferenças na mortalidade entre os sexos decorrentes de respostas adaptativas podem ocorrer. Essas variações relacionadas à razão sexual observadas nos dois isolados estudados reforça que a variação intraespecífica observada a nível molecular, pode indicar variação a nível biológico.

Diferenças morfológicas e morfométricas observadas entre diferentes isolados de helmintos podem estar relacionadas ao isolamento geográfico, como foi mostrado por Gharamah *et al.* (2012) em estudo com o nematódeo de importância veterinária, *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1803, obtidos de cabritos e ovelhas da Malásia e Yemen, constataram variação morfológica entre as populações dos dois países principalmente nas medidas do corpo, papila cervical e comprimento do espículo, sugerindo que essas diferenças podem estar relacionadas a ausência de deslocamento dos hospedeiros entre os países.

De maneira semelhante, em estudo anterior de comparação morfológica de helmintos machos de diferentes isolados do nematódeo *Brugia malayi* Brug, 1927, originadas de diferentes países asiáticos realizado por Bain *et al.* (1988), foram observadas diferenças morfológicas em alguns caracteres, como por exemplo, a ornamentação cuticular da região posterior que diferiu de acordo com a origem geográfica. Tais diferenças pareceram ser suficientes para considerar a existência de patologias distintas vinculadas a *B. malayi* de diferentes regiões, mostrando a possível influência do isolamento geográfico na variabilidade desses isolados, inclusive em sua patogenicidade.

Variações biológicas possivelmente relacionadas ao isolamento geográfico também foram observadas para os diferentes isolados brasileiros do trematódeo *E. paraensei*, (Rio Bonito e Sumidouro, localidades rurais no Estado do Rio de Janeiro), onde foi observada diferença significativa na carga parasitária, na longevidade e na localização dos helmintos no hospedeiro, embora os dados morfométricos tenham sido similares. Esses achados sugerem que essa variação nos parâmetros biológicos encontrados entre diferentes isolados também pode ser resultado de isolamento geográfico e de condições ambientais de transmissão (Maldonado *et al.*, 2005). Essa hipótese relacionada à influência do isolamento geográfico na variabilidade de diferentes isolados pode apoiar as diferenças biológicas e morfométricas significativas observadas no presente estudo, onde os isolados analisados são originados de regiões diferentes da Ásia e tem se mantido isolado no Brasil pela presença de isolamento do hospedeiro definitivo ou intermediário, parasitados pelos haplótipos estudados.

A influência de espécies de hospedeiros nas características morfológicas de parasitos já foi demonstrada anteriormente para espécies de cestódeo do gênero *Echinococcus* Rudolphi, 1801, onde a variação fenotípica estava relacionada com as diferenças ambientais entre as espécies de hospedeiros intermediários, sendo úteis para estudos epidemiológicos (Lymbery, 1998). De forma semelhante, a relação entre espécies de hospedeiros e os padrões morfométricos de helmintos de populações naturais e de helmintos obtidos através de infecção experimental do trematódeo *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 foram analisados por Valero *et al.* (2001). Foram observadas variações significativas na morfometria quando comparada as populações naturais de helmintos obtidas de hospedeiros diferentes (ovelha, gado e porco), revelando que as espécies de hospedeiro definitivo influenciam no tamanho dos helmintos adultos de *F. hepatica*, e que essa influência não persiste no modelo experimental utilizando roedores como hospedeiros, onde não foram observadas diferenças significativas na morfometria.

Diferentemente, Maldonado *et al.* (2001) em infecção experimental com o trematódeo *E. paraensei* verificaram a ausência de variação morfológica e

morfométrica de helmintos adultos quando infectados diferentes hospedeiros como *R. norvegicus*, *M. musculus*, *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 e o hospedeiro natural, *N. squamipes*, sugerindo dessa forma que as variações fenotípicas podem ser inerentes ao helminto investigado.

Diferentes hospedeiros também podem influenciar nas características biológicas do parasito como observado por Sonibare et al. (2011), com a infecção experimental pelo nematódeo *H. contortus*. Raças diferentes de cabritos apresentaram diferenças na perda de peso, na contagem de ovos eliminados nas fezes, na carga parasitária e na contagem de eosinófilos, quando infectados com o mesmo número de larvas infectantes do nematódeo e mantidos sob as mesmas condições experimentais. Tais resultados foram relacionados à imunidade adquirida (resistência) que diferentes tipos de hospedeiro podem apresentar ao parasito.

No presente estudo, os espécimes estudados dos dois isolados foram obtidos a partir da infecção experimental de *R. norvegicus* que é o hospedeiro definitivo natural, minimizando os efeitos de adaptação ao hospedeiro. Tanto os moluscos utilizados quanto os roedores eram da mesma linhagem e foram mantidos sob as mesmas condições experimentais (temperatura, alimentação, entre outras). Mesmo dessa forma, apresentaram diferenças significativas tanto nas características biológicas quanto na análise morfométrica de alguns caracteres quando comparados os isolados, evidenciando a presença de variação intraespecífica a nível biológico, morfológico e morfométrico mesmo não havendo influências ambientais ou de espécies de hospedeiros.

As variações biológicas, morfológicas e morfométricas observadas entre diferentes isolados de *A. cantonensis* do Brasil referentes a dois haplótipos, podem ser identificadas pelo marcador molecular COI e podem decorrer do isolamento geográfico a que tem sido submetido no país, mantendo as características de origem de cada isolado. De forma similar, a variabilidade biológica e morfológica pode ser observada entre diferentes isolados de diferentes espécies de helmintos, não somente para nematódeos. Além disso, estudos futuros devem ser realizados para

verificar a possível presença do haplótipo recentemente relatado, ac9, em outras áreas do país, além da zona portuária da cidade do Rio de Janeiro.

## 7. Conclusões

- Os isolados brasileiros correspondentes ao haplótipo ac5 pertencem ao mesmo clado do haplótipo ac5 descrito anteriormente no Japão.
- O haplótipo ac8, descrito anteriormente no Brasil, formou um clado distinto e mais próximo ao haplótipo ac5.
- O haplótipo ac9, presente apenas no Estado do Rio de Janeiro e descrito inicialmente neste trabalho, se mostrou fortemente relacionado com os haplótipos ac6 da China e ac7 do Japão.
- Os haplótipos ac8 e ac9 apresentaram diferenças nas características biológicas, tais como infectividade, fecundidade e razão sexual, e apresentaram diferenças morfométricas e morfológicas que permitiram a caracterização dos mesmos.
- O gene mitocondrial COI revelou-se um marcador apropriado para caracterização dos isolados de *A. cantonensis* circulantes no Brasil, permitindo identificar três haplótipos (ac5, ac8 e ac9).

## 8.Perspectivas

- Realizar estudos experimentais para testar a sensibilidade de *A. cantonensis* (haplótipos ac5, ac8 e ac9) aos fármacos utilizados no tratamento da meningoencefalite eosinofílica.
- Realizar estudos com outros marcadores moleculares para verificação da presença do haplótipo ac9 em outras áreas do Brasil, além da zona portuária da cidade do Rio de Janeiro, e também verificação da presença de outros haplótipos, além do ac9, na zona portuária.
- Avaliar a patogenicidade de cada haplótipo circulante no país em condições experimentais (Histopatologia e Bioquímica).



## 9.Referências Bibliográficas

1. Abouheif E, Zardoya R, Meyer A. Limitations of metazoan 18S rRNA sequence data: implications for reconstructing a phylogeny of the animal kingdom and inferring the reality of the Cambrian explosion. **J Mol Evol.** 1998; 47(4):394-405.
2. Acha PN, Szyfres, B. Zoonoses and Communicable Diseases Man and Animals. Pan American Health Organization, Scientific and Tech. Publications, Washington, DC. 3 ed. v(1 & 2), 2003.
3. Aguiar P, Morera P, Pascual J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. **Am J Trop Med Hyg.** 1981; 30(5):963-5.
4. Akaike H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Trans Autom Control.** 1974; 19:716-23.
5. Alasaad S, Pascucci I, Jowers MJ, Soriguer RC, Zhu XQ, Rossi L. Phylogenetic study of *Setaria cervi* based on mitochondrial cox1 gene sequences. **Parasitol Res.** 2012; 110(1):281-5.
6. Alfschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** 1990; 215:403-10.
7. Alicata JE. Incapability of vertebrates to serve as paratenic host for the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. **J Parasitol.** 1963; 49:48.
8. Alicata JE. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. **Parasitol Today.** 1991; 7(6):151-3.
9. Amato JRF, Boeger WA, Amato SB. Protocolos para laboratório – Coleta e processamento de parasitas e pescados. 1 ed. Rio de Janeiro. Imprensa Universitária, UFRRJ. 1991. 81p.
10. Anderson RC. Keys to genera of superfamily Metastrongyloidea. In: Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S. **CIH Keys to the nematodes parasites of vertebrates.** Farnham Royal, Bucks: Commonwealth Agricultural Bureaux, UK. 1978; p.1-40.

11. Anderson TJC. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **Trends in Parasitology**. 2001; 17(4):183-8.
12. Andrade ZA, Sadigursky M. Um estudo comparativo das cepas Feira de Santana (Bahia) e Porto Rico do *Schistosoma mansoni* na infecção experimental do camundongo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1985; 80(1):37-40.
13. Araujo P. Helmintos de *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) da cidade de São Paulo. **Rev Fac Farm Bioquim S. Paulo**. 1967; 5(1):141-59.
14. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007.
15. Bain O, Chandrasekharam SA, Partono F, Mak JW, Zheng HJ, Seo BS, Wu SH. Discrimination of geographic strains of periodic *Brugia malayi* by cuticular ornamentation of male. **Ann Parasitol Hum Comp**. 1988; 63(3):209-23.
16. Bain O, Philipp M. Animal models in the study of the phenomenon of parasitism: filariae and other parasites. **Ann Parasitol Hum Comp**. 1991; 66(1):64-8.
17. Beaver PC, Rosen L. Memorandum on the first report of *Angiostrongylus* in man, by Nomura and Lin, 1945. **Am J Trop Med Hyg**. 1964; 13:589-90.
18. Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB. Substitution bias, Rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. **Mol Biol Evol**. 1998; 15(12):1719-27.
19. Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **Int J Parasitol**. 2002; 32:527-31.
20. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Mol Biochem Parasitol**. 1992; 54(2):165-73.
21. Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CLFG, Graeff-Teixeira C, Silva MCF, Bem R, Maurer R, Lima WS, Lenzi HL. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* e *A. vasorum* by polymerase chain

reaction – restriction fragment length polymorphism. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(8):1039-43.

22. Caldeira RL, Mendonca CLF, Gouveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota EM, Pecora IL, Medeiros AM, Carvalho SO. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102(7):887-9.

23. Carvalho OS, Teles HMS, Mota EM, Mendonça CLGF, Lenzi HL. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca:Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2003; 36(6):743-45.

24. Carvalho OS, Scholte RGC, Mendonça CLF, Passos LKJ, Caldeira RL. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2012; 107(6):740-6.

25. Chabaud A. Description the *Stefanskostrongylus dubosti* n sp. parasite of Potamogale and attempt at classification of Angiostrongylinae nematodes. **Ann Parasitol Hum Comp.** 1972; 47(5):735-44.

26. Chen HT. Un nouveau nematode pulmonaire. *Pulmonema cantonensis*, N.G., N sp. des rats de Canton. **Ann Parasitol Hum Comp.** 1935; 18(7):312-7.

27. Chen KM, Lai SC. Biochemical and pathological evaluation of albendazole/thalidomide co-therapy against eosinophilic meningitis or meningoencephalitis induced by *Angiostrongylus cantonensis*. **J Antimicrob Chemother.** 2007; 59(2):264-76.

28. Chen CY, Kuo CC, Lo CP, Huang MY, Wang YM, Wang WY. Eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **Q J Med.** 2011; p.1-3. doi:10.1093/qjmed/hcr261.

29. Chitwood BG, Chitwood MB. **Introduction to Nematology.** University Park Press, Baltimore. 1974.

30. Cognato BB, Morassutti AL, Silva AC, Graeff-Teixeira C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2013; 46(5):664-5.
31. Costa JO, Araujo-Costa HM, Guimarães MP. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus kamensky*, 1905 and *Angiocaulus schulz*, 1951. **Revue Méd. Vét.** 2003; 154(1):9-16.
32. Cowie RH. Biology, Systematics, Life Cycle, and Distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of Rat Lungworm Disease. **Hawaii J Med Public Health.** 2013; 72(6 supl 2):6-9.
33. Crook JR, Fulton SE, Supanwong K. The infectivity of third *Angiostrongylus cantonensis* larvae shed from drowned *Achatina fulica* snails and the effect chemical agents of infectivity. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.** 1971; 65(5):602-5.
34. Cross JH, Chen ER. Angiostrongyliasis. In: Murrell KD, Fried B (ed) **Food-borne parasitic zoonoses.** Springer US. 2007; p.263-90.
35. D`Ávila S, Bessa ECA, Souza-Lima S, Rodrigues MLA. Biased sex ratio and niche restriction in *Baruscapillaria obsignata* (Madsen 1945) (Nematoda, Capillariidae) from *Columba livia* (Aves, Columbidae). **J Helminthol.** 2012; 86:401-5.
36. Diaz J. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. **J La State Med Soc.** 2008; 160(6):333-42.
37. Dougherty E. The genus *Aelulostrongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongylidae) and its relatives with description of parafilaroides gen. Nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus* sp. nov. **Proc Helminthol Soc Wash.** 1946; vol 13, pp.16-26.
38. Drozd J. Révision de le systématique du genre *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 (Nematoda:Metastrongyloidea). **Ann Parasitol Hum Comp.** 1970; 45(5):597-603.

39. Eamsobhana P, Lim PE, Solano G, Zhang H, Gan X, Yong HS. Molecular differentiation of *Angiostrongylus* taxa (Nematoda: Angiostrongylidae) by cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences. **Acta Trop.** 2010; 116:152-6.
40. Eamsobhana P, Lim PE, Yong HS. Genetic diversity of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, the major cause of eosinophilic meningitis. **Hawaii J Med Public Health.** 2013; 72(6 supl 2):15-7.
41. Ekrem T, Willassen E, Stur E. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. **Mol Phylogenet Evol.** 2007; 43:530-42.
42. Elder JF, Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **Q Rev Biol.** 1995; 70:297-320.
43. Espírito-Santo MCC, Pinto PLS, Mota DJG, Gryscek RCB. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2013; 55(2):129-32.
44. Euzébio Jr. AA, Zuim NRB, Linhares AX, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM. Experimental evaluation of the pathogenicity of different strains of *Schistosoma mansoni*. **Interdiscip Perspect Infect Dis.** 2012; 2012:953524.
45. Ferrero MR, Roser D, Nielsen HV, Olsen A, Nejsum P. Genetic variation in mitochondrial DNA among *Enterobius vermicularis* in Denmark. **Parasitology.** 2013; 140(1):109-14.
46. Fontanilha IKC, Wade CM. The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying 3<sup>rd</sup> juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*. **Acta trop.** 2008; 105:181-6.
47. Foronda P; López-González M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Costa N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). **Acta Trop.** 2010; 114:123-7.

48. Gasser RB, Newton SE. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. **Int J Parasitol.** 2000; 30:509-34.
49. Gasser RB, Jabbar A, Mohandas N, Schnyder M, Deplazes P, Littlewood DTJ, Jex AR. Mitochondrial genome of *Angiostrongylus vasorum*: comparison with congeners and implications for studying the population genetics and epidemiology of this parasite. **Infect Genet Evol.** 2012; 12(8):1884-91.
50. Georgieva S, Selbach C, Faltynkova A, Soldanova M, Sures B, Skirnisson K, Kostadinova A. New cryptic species of “*revolutum*” group of *Echinostoma* (Digenea:Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. **Parasit Vectors.** 2013; 6:64.
51. Gharamah AA, Rahman WA, Siti Azizah MN. Morphological variation between isolates of the nematodes *Haemonchus contortus* from sheep and goat populations in Malaysia and Yemen. **J Helminthol.** 2012; 26:1-7.
52. Graeff-Teixeira C, da Silva ACA, Yoshimura K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. **Clin Microbiol Rev.** 2009; 22(2):322-48.
53. Guardone L, Deplazes P, Macchioni F, Magi M, Mathis A. Ribosomal and mitochondrial DNA analysis of Trichiridae nematodes of carnivores and small mammals. **Vet Parasitol.** 2013; 197(1-2):364-9.
54. Hajibabaei M, Dewaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Mackie PM, Hebert PDN. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2005; 360:1959-67.
55. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica.** 2001; 4(1):9.

56. Hayneman D, Lim BL. Comparison of developmental rates of two strains of *Angiostrongylus cantonensis* in the same laboratory-bred final host. **Med J Malaya**. 1966; 20(4):343-4.
57. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc R Soc Lond B**. 2003; 270:313-21.
58. Hollingsworth RG, Cowie RH. Apple snails as disease vectors. In: Joshi R, Sebastian L. (Eds.), Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Muñoz, Nueva Ecija. 2006. pp.121–32.
59. Hollingsworth RG, Kaneta R, Sullivan JJ, Bishop HS, Qvarnstrom Y, Silva AJ, Robinson DG. Distribution of *Parmarion* cf. *martensi* (Pulmonata: Helicarionidae), a new semi-slug on Hawaii Island, and its potential as a vector for human angiostrongyliasis. **Pacific Science**. 2007; 61(4):457-67.
60. Hollingsworth RG, Howe K, Jarvi SI. Control measures for slug and snail hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, with special reference to the semi-slug *Parmarion martensi*. **Hawaii J Med Public Health**. 2013; 72(6 suppl 2):75-80.
61. Hsueh CW, Chen HS, Li CH, Chen YW. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in an adolescent with mental retardation and pica disorder. **Pediatr Neonatol**. 2013; 54(1):56-9.
62. Jabbar A, Mohandas N, Jex AR, Gasser RB. The mitochondrial genome of *Protostrongylus rufescens* – implications for population and systematic studies. **Parasit Vectors**. 2013; 6(1):263.
63. Jefferies R, Shaw SE, Viney ME, Morgan ER. *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages. **Parasitology**. 2009; 136:107-15.
64. John DT, Martinez AJ. Central nervous system infection with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Am J Pathol**. 1975; 80(2):345-8.

65. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2005; 102(23):8369–74.
66. Lai SC, Jiang ST, Chen KM, Hsu JD, Shyu LY, Lee HH. Efficacy of albendazole-GM6001 co-therapy against *Angiostrongylus cantonensis*-induced meningitis in BALB/c mice. **Acta trop**. 2005; 93(3):267-73.
67. Leone S, De Marco M, Ghirga P, Nicastrì E, Esposito M, Narciso P. Eosinophilic meningitis in a returned traveler from Santo Domingo: case report and review. **J Travel Med**. 2007; 14(6):407-10.
68. Li TH, Guo XR, Xue J, Hu L, Qiang HQ, Xue HC, Bin Z, Hawdon JM, Xiao SH. Comparison of mitochondrial cytochrome oxidase 1 DNA sequences *Necator americanus* hookworms maintained for 100 generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and hookworms from natural human infection. **Acta trop**. 2004; 92(1):71-5.
69. Lie KJ, Basch PF. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda:Echinostomatidae). **J Parasitol**. 1967; 53(6):1192-9.
70. Lima ARMC, Mesquita SG, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS, Teixeira AO, Costa ZRS, Ferreira MLB. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. 2009; 67(4):1093-6.
71. Linares MC, Soto-Calderó ID, Lees DC, Anthony NM. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: a test of the DNA barcoding approach. **Mol Phylogenet Evol**. 2009; 50(3):485-95.
72. Lindo J, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard M, Sullivan J, Bishop H, Robinson D, Holtz T, Robinson R. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after outbreak of human eosinophilic meningitis Jamaica. **Emerging Infectious Diseases**. 2002; 8(3):324-6.



73. Lindo JF, Escoffery CT, Reid B, Codrington G, Cunningham-Myrie C, Eberhard ML. Fatal autochthonous eosinophilic meningitis in a Jamaican child caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **Am J Trop Med Hyg.** 2004; 70:425-8.
74. Liu CY, Zhang RL, Chen MX, Li J, Ai L, Wu CY, Zhu XQ, Lin RQ. Characterisation of *Angiostrongylus cantonensis* isolates from China by sequences of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. **J Anim Vet Adv.** 2011; 10(5):593-6.
75. Liu GH, Wang Y, Song HQ, Li MW, Ai L, Yu XL, Zhu XQ. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Spirocerca lupi*: sequence, gene organization and phylogenetic implications. **Parasit Vectors.** 2013; 6:45.
76. Luessi F, Sollors J, Torzewski M, Muller HD, Siegel E, Blum J, Sommer C, Vogt T, Thomke F. Eosinophilic Meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Germany. **J Travel Med.** 2009; 16(4):292-4.
77. Lv S, Zhang Y, Liu HX, Yang K, Steinmann P, Chen Z, Wang LY, Utzinger J, Zhou XN. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 2009; 3(2):1-8.
78. Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Yang GJ, Yang K, Zhou XN, Utzinger J. The emergence of angiostrongyliasis in the People's Republic of China: the interplay between invasive snails, climate change and transmission dynamics. **Freshwater Biol.** 2011; 56(4):717-34.
79. Lv S, Zhang Y, Zhang L, Liu Q, Liu HX, Hu L, Wei FR, Steinmann P, Graeff-Teixeira C, Zhou XN, Utzinger J. The complete mitochondrial genome of the rodent intra-arterial nematodes *Angiostrongylus cantonensis* and *Angiostrongylus costaricensis*. **Parasitol Res.** 2012; 111(1):115-23.
80. Lymbery AJ. Combining data from morphological traits and genetic markers to determine transmission cycles in the tape worms, *Echinococcus granulosus*. **Parasitology.** 1998; 117(2):185-92.

81. Mackerras MJ, Sandars DF. The life history of rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae). **Aust J Zool.** 1955; 3:1-21.
82. Magalhães LA, Alcântara FG, Carvalho JF. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Rev Saude Publica.** 1975; 9(1):1-5.
83. Maldonado Júnior A, Loker ES, Morgan JAT, Rey L, Lanfredi RM. Description of the adult worms of a new brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitol Res.** 2001; 87(10):840-8.
84. Maldonado Júnior A, Vieira GO, Garcia JS, Rey L. Biological aspects of new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. **Parasitol Res.** 2001; 87(10):853-9.
85. Maldonado Júnior A, Zeitone BK, Amado LA, Rosa IF, Machado-Silva JR, Lanfredi RM. Biological variation between two brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. **J Helminthol.** 2005; 79(4):345-51.
86. Maldonado Júnior A, Simões RO, Oliveira APM, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, Monteiro SS, Torres E JL, Thiengo SC. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2010; 105(7):938-41.
87. Maldonado Júnior A, Simões R, Thiengo S. Angiostrongyliasis in the Americas. In: Morales-Lorenzo J. Zoonosis. 1ed. In Tech. 2012. p. 303-20.
88. Martin-Alonso A, Foronda P, Quispe-Ricalde MA, Feliu C, Valladares B. Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in Wild Rodents from the Canary Islands. **PLoS ONE.** 2011; 6(11):1-5.

89. Martinez EM, Neves RH, Oliveira RMF, Machado-Silva JR, Rey L. Características biológicas e morfológicas de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2003; 36(5):557-64.
90. Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B. Fast evolving 18S rRNA sequences from *Solenogastres* (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evol Biol.** 2010; 10(70):3-12.
91. Monte TCC, Simões RO, Oliveira AP, Novaes CF, Thiengo SC, Silva AJ, Estrela PC, Maldonado Jr. A. Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda:Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. **Parasit Vectors.** 2012; 5:248.
92. Moreira VLC, Giese EG, Melo FTV, Simões RO, Thiengo SC, Maldonado Júnior A, Santos JN. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta trop.** 2013; 125:90-7.
93. Morgan JAT, Blair D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial COI and ND1 gene for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). **Parasitology.** 1998; 116:289-97.
94. Murphy GS, Johnson S. Clinical aspects of eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. **Hawaii J Med Public Health.** 2013; 72(6 supl 2):35-40.
95. Neuhauss E, Fitarelli M, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102(1):49-52.
96. Nishimura K, Hung T. Current views on geographic distribution and modes of infection of neurohelminthic diseases. **J Neurol Science.** 1997; 145:5-14.

97. Nylander JAA. MrAIC.pl. Program distributed by the author. Uppsala. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.
98. Ohlweiler FP, Guimarães MCA, Takahashi FY, Eduardi JM. Current distribution of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 in the State of Sao Paulo including records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. **Rev Inst Med Trop S. Paulo.** 2010; 52(4):211-4.
99. OuYang L, Wei J, Wu Z, Zeng X, Li Y, Jia Y, Ma Y, Zhan M, Lei W. Differences of larval development and pathological changes in permissive and nonpermissive rodent hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitol Res.** 2012; 111:1547-57.
100. Pessôa SB, Martins AV. Pessôa Parasitologia Médica, 10ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 1982.
101. Pien FD, Pien BC. *Angiostrongylus cantonensis* Eosinophilic meningitis. **Int J Infect Diseases.** 1999; 3(3):161-3.
102. Poulin R. Population abundance and sex ratio in dioecious helminth parasites. **Oecologia.** 1997; 111:375-80.
103. Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PCB, Fleming CC, Szalanski AL, Adams BA, Harris TS. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **J Nematol.** 1997; 29(4):441-50.
104. Qvarnstrom Y, Silva ACA, Teem JL, Hollingsworth HB, Graeff-Teixeira C, Silva AJ. Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer 1-based TaqMan assay. **Appl Environ Microbiol.** 2010; 76(15):5287-9.
105. Reiczigel J, Rózsa L. Quantitative Parasitology 3.0. Budapest. 2005.
106. Re III VL, Gluckman SJ. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in returned traveler: case report and review of the literature. **Clin Infect Dis.** 2001; 33(9):e112-5.

107. Rishniw M, Schukken Y, Greiner E. Sex ratios of *Dirofilaria immitis* in naturally infected dogs show female bias at low worm intensities. **Res Vet Science**. 2012; 93:1324-8.
108. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst Biol**. 2012; 61(3):539:42.
109. Rozsa L, Reiczigel J, Majoros G. Quantifying parasites in samples of hosts. **J Parasitol**. 2000; 86:228-32.
110. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nat Acad Sci USA**. 1977; 74(12):5463-7.
111. Santos CP. Redescricao de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre, *Proechimys* sp., na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongylidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1985; 80:81-3.
112. Sawanyawisuth K, Sawanyawisuth K, Senthong V, Limpawattana P, Pichaphop A, Intapan PM, Maleewong W, Tiamkao S, Jitpimolmard S, Chotmongkol V. How can clinicians ensure the diagnosis of meningitic angiostrongyliasis? **Vector Borne Zoonotic Dis**. 2012; 12(1):73-5.
113. Schnyder M, Fahrion A, Riond B, Ossent P, Webster P, Kranjc A, Glaus T, Deplazes P. Clinical, laboratory and pathological findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitol Res**. 2010; 107(6):1471-80.
114. Simões R, Monteiro F, Sánchez E, Thiengo S, Garcia J, Costa-Neto S, Luque J, Maldonado Júnior A. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**. 2011; 17(7):1331-3.
115. Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, Zambrano CH, Sufit RL, Sakolvaree Y, Chaicumpa W, Herwaldt BL, Johnson S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **N Engl J Med**. 2002; 346(9):668-75.

116. Smith MA, Wood DM, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proc Acad Natl Sci USA**. 2007; 104:4967-72.
117. Smyth, JD. Nematoda: general account. In: Introduction to animal parasitology. 3 ed. Cambridge. 1994. p. 368-85.
118. Sonibare AO, Okewole EA, Otesile EB, Joshua RA. Experimental *Haemonchus contortus* infections and indices of haemonchotolerance in three breeds of Nigerian goats. **Folia Veterinaria**. 2011; 55(4):155-61.
119. Sorensen E, Bogh HO, Johansen MV, McManus DP. PCR-based identification of individuals of *Schistosoma japonicum* representing different subpopulations using a genetic marker in mitochondrial DNA. **Int J Parasitol**. 1999; 29(7):1121-8.
120. Stahls G, Savolainen E. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeropter, Baetidae). **Mol Phylogenet Evol**. 2008; 46:82-87.
121. Stien A, Halvorsen O, Leinaas HP. Density-dependent sex ratio in *Echinomermella matsi* (Nematoda), a parasite of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Parasitology**. 1996; 112:105-12.
122. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol**. 1993; 10(3):512-26.
123. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**. 2011; 28:2731-9.

124. Tingley GA, Anderson RM. Environmental sex determination and density-dependent population regulation in the entomogenous nematode *Romanomermis culicivorax*. **Parasitology**. 1986; 92:431-49.
125. Thiengo SC, Faraco FA, Salgado NC, Cowie RH, Fernandez MA. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. **Biol Invasions**. 2007; 9:693-702.
126. Thiengo SC, Fernandez MA, Torres E JL, Coelho PM, Lanfredi RM. First record of a Metastrongyloidea *Aelurostrongylus abstrusus* larvae in *Achatina* (Lissachatina) *fulica* (Mollusca: Achatinidae) in Brazil. **J Invert Pathol**. 2008; 98:34-9.
127. Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres E JL, Caldeira R, Carvalho OS, Oliveira APM, Simões RO, Fernandez MA, Lanfredi RM. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Trop**. 2010; 115(3):1994-9.
128. Thiengo SC, Simões RO, Fernandez MA, Maldonado Júnior A. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. **Hawaii J Med Public Health**. 2013; 72(6 supl 2):18-22.
129. Thompson J, Higgins D, Gibson T. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**. 1994; 22(22):4673-80.
130. Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung K-C, Suzuki J, Kadosaka T, Takada N, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. **Parasitol Int**. 2012; 61:431-6.
131. Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SSJ, Chen HHL, Tsai TH, Lin WR, Huang CK, Yen MY, Yen CM. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. **Am J Med**. 2001; 111:109-14.

132. Tunholi-Alves VM, Tunholi VM, Pinheiro J, Thiengo SC. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**. 2012; 131:143-7.
133. Tunholi-Alves VM, Alves VMT, Thiengo SC, Garcia J, Maldonado Júnior A, Pinheiro J. Infecção experimental com *Angiostrongylus cantonensis* induz alterações nas atividades das aminotransferases em *Achatina fulica*. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul**; 22-26 out 2013; Florianópolis, Santa Catarina. Brasil.
134. Ubelaker JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. **J Parasit**. 1986; 72(2):237-44.
135. Valero MA, Darce NA, Panova M, Mas-Coma S. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. **Vet Parasitol**. 2001; 102(1-2):85-100.
136. Viney ME. Nematode population genetics. **J Helminthol**. 1998; 72(4):281-3.
137. Vitta A, Natteworanart S, Tattiyapong M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. **Asian Pac J Trop Med**. 2011; 597-9.
138. Wallace GD, Rosen L. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. **Malacologia**. 1969; 7:427-38.
139. Wang Q, Lai D, Zhu X, Chen X, Lun Z. Human Angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**. 2008; 8(10):621-30.
140. Wang QP, Wu ZD, Wei J, Owen RL, Lun ZR. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2011; 11:1328-35.



141. Wang LC, Yen CM, Liu CL, Chen ER, Chao D. Effects of age and splenectomy on heavy infection of *Angiostrongylus cantonensis* in rats. **Exp Parasitol**. 2012; 131: 210-4.
142. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2005; 360(1462):1847-57.
143. Willcox HPF, Coura JR. Nova concepção para o método de Baermann-Moraes-Coutinho. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1989; 84:563-5.
144. Yang Y, Jian W, Pozio E. Analysis of cytochrome c-oxidase (COI) gene of mitochondrial DNA from *Trichinella* spp. in China. **Parasitol Res**. 2008; 103(6):1355-9.
145. Yang TB, Wu ZD, Lun ZR. The apple snail *Pomacea canaliculata*, a novel vector of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*: its introduction, spread and control in China. **Hawaii J Med Public Health**. 2013; 72(6 supl 2):23-5.
146. Yoshioka L, Zanotti-Magalhaes EM, Magalhaes LA, Linhares AX. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2002; 35(3):203-7.
147. Yousif F, Ibrahim A. The first record of *Angiostrongylus cantonensis* from Egypt. **Z Parasitenkd**. 1978; 56:73-80.
148. Zanol J, Fernandez MA, Oliveira APM, Russo CAM, Thiengo SC. O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. **Biota Neotropica**. 2010; 10(3):447-51.
149. Zhou X, Zhang ZH, Wang CD, Sun Y, Gu XB, Wang SX, Peng XR, Yang GY. Analysis of genetic diversity of nematode parasite *Baylisascaris schroederi* from wild giant pandas in different mountain ranges in China. **Parasit Vectors**. 2013; 6:233.

## **10. Apêndices e/ou Anexos**

**APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: PHYLOGENETIC RELANTIONSHIP OF THE BRAZILIAN ISOLATES OF THE RAT LUNGWORM *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* (NEMATODA:METASTRONGYLIDAE) EMPLOYING MITOCHONDRIAL COI GENE SEQUENCE DATA**



## RESEARCH

## Open

# Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data

Tainá CC Monte<sup>1</sup>, Raquel O Simões<sup>1</sup>, Ana Paula M Oliveira<sup>2</sup>, Clodoaldo F Novaes<sup>3</sup>, Silvana C Thiengo<sup>2</sup>, Alexandre J Silva<sup>4</sup>, Pedro C Estrela<sup>1</sup> and Arnaldo Maldonado Júnior<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* can cause eosinophilic meningoencephalitis in humans. This nematode's main definitive hosts are rodents and its intermediate hosts are snails. This parasite was first described in China and currently is dispersed across several Pacific islands, Asia, Australia, Africa, some Caribbean islands and most recently in the Americas. Here, we report the genetic variability among *A. cantonensis* isolates from different geographical locations in Brazil using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences.

**Methods:** The isolates of *A. cantonensis* were obtained from distinct geographical locations of Brazil. Genomic DNAs were extracted, amplified by polymerase reaction, purified and sequenced. A partial sequence of COI gene was determined to assess their phylogenetic relationship.

**Results:** The sequences of *A. cantonensis* were monophyletic. We identified a distinct clade that included all isolates of *A. cantonensis* from Brazil and Asia based on eight distinct haplotypes (ac1, ac2, ac3, ac4, ac5, ac6, ac7 and ac8) from a previous study. Interestingly, the Brazilian haplotype ac5 is clustered with isolates from Japan, and the Brazilian haplotype ac8 from Rio de Janeiro, São Paulo, Pará and Pernambuco states formed a distinct clade. There is a divergent Brazilian haplotype, which we named ac9, closely related to Chinese haplotype ac6 and Japanese haplotype ac7.

**Conclusion:** The genetic variation observed among Brazilian isolates supports the hypothesis that the appearance of *A. cantonensis* in Brazil is likely a result of multiple introductions of parasite-carrying rats, transported on ships due to active commerce with Africa and Asia during the European colonization period. The rapid spread of the intermediate host, *Achatina fulica*, also seems to have contributed to the dispersion of this parasite and the infection of the definitive host in different Brazilian regions.

**Keywords:** *Rattus norvegicus*, *Achatina fulica*, Eosinophilic meningoencephalitis, Molecular phylogeny, Cytochrome c oxidase subunit I, Brazil

\* Correspondence: [maldonad@ioc.fiocruz.br](mailto:maldonad@ioc.fiocruz.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

*Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) is a nematode that lives in the right ventricle and pulmonary arteries of rats. Rodents such as *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* are considered the most important definitive hosts [1]. This nematode is the most common cause of eosinophilic meningoencephalitis in humans [2,3]. The rat lungworm was first described in China infecting these same rodents. Currently, the nematode is dispersed across several Pacific islands, Asia, Australia, Africa, some Caribbean islands and most recently in the Americas [4-6]. The transmission of this nematode has been linked to dispersal of invasive organisms [7]. In particular, the introduction of *Achatina fulica* in Brazil and *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) in China are examples of the importance of exotic snails in the spread of this helminthiasis [5,8,9]. Similarly, the nematode may have *A. fulica* as one of its main intermediate hosts in Brazil [10,11]. Currently, this mollusk is experiencing the explosive phase of invasion, since it has been found in 25 of the 26 Brazilian states and in the Federal District [12]. Humans are accidentally infected by eating raw and undercooked snails that contain the third stage larvae (L3) [13]. The infection can also occur by eating animals that act as paratenic hosts, such as shrimps, crabs, lizards, frogs and terrestrial planarians or through vegetables contaminated by the mucus of infected snails [4]. More recently, the presence of *A. fulica* naturally infected by L3 larvae of *A. cantonensis* in different states of Brazil, such as Espírito Santo, São Paulo, Pernambuco and Santa Catarina, was confirmed by experimental infection in *R. norvegicus* [14]. Cases of human eosinophilic meningoencephalitis have also been reported in the states of Espírito Santo, Pernambuco and São Paulo [5,15,16].

The morphological heterogeneity, such as bursal rays characteristics among Brazilian isolates of *A. cantonensis*, was reported by Maldonado et al. (2010) [14], who have suggested this occurred as a result of distinct entry of the parasite into the country. Recent studies using sequencing of the mitochondrial protein-coding gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) to distinguish *A. cantonensis* isolates confirmed the presence of three geographical isolates in Asia [17]. Subsequently, Simões et al. (2011) [18], using COI data, observed that *A. cantonensis* from Rio de Janeiro, Brazil yield a single haplotype, which formed a clade with low genetic distance to the Chinese isolates. Interestingly, Tokiwa et al. (2012) [7], analyzing a great number of geographical isolates from the Asian continent, proposed that Rio de Janeiro isolates are more similar to *A. cantonensis* isolated from Japan.

In the present study, we analyzed *A. cantonensis* worms from Brazil using the COI gene to assess the

genetic variability of different geographical isolates as well as to determine the phylogenetic relationship among the Brazilian isolates.

## Methods

### Geographical isolates

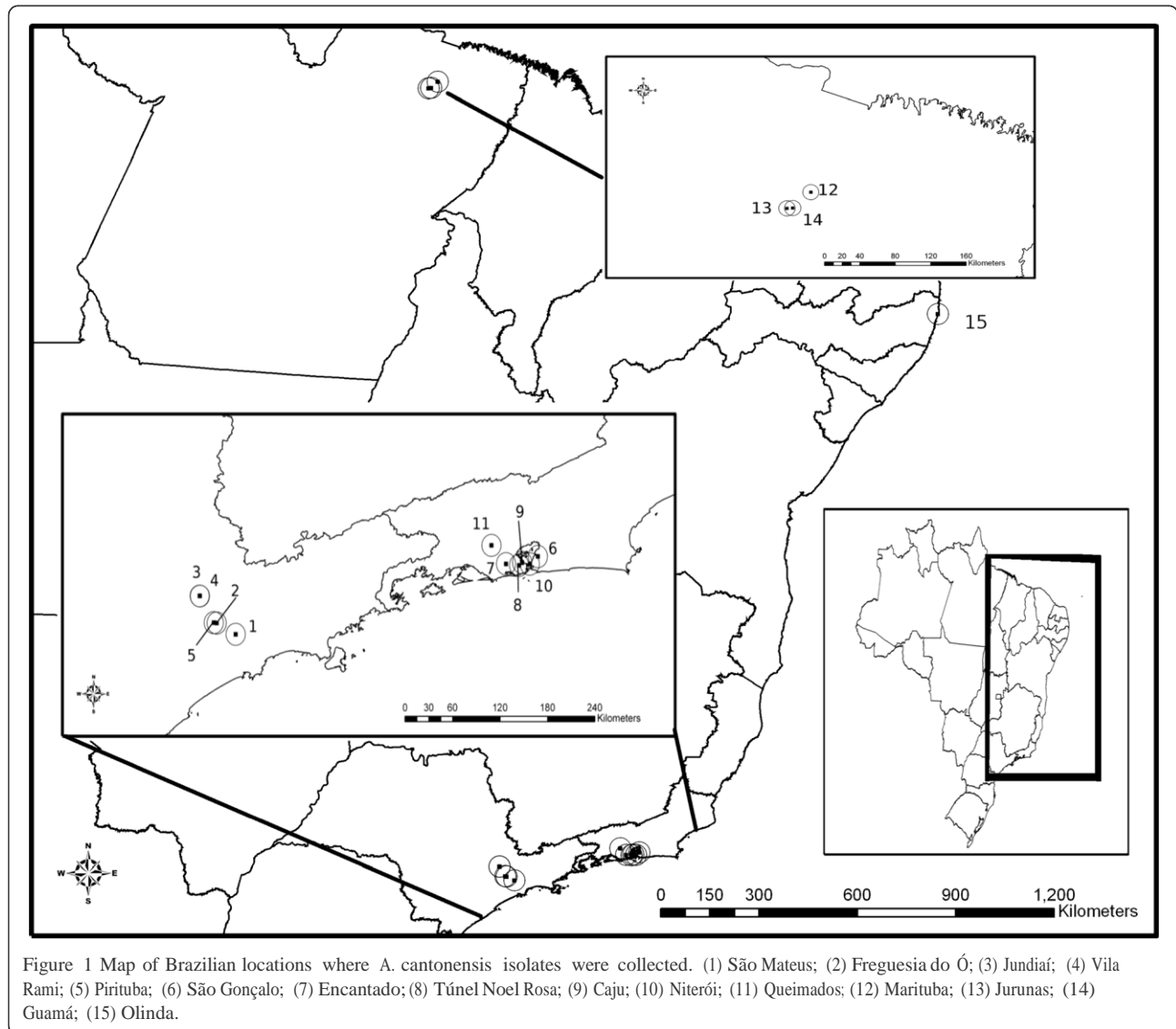
The isolates of *A. cantonensis* were obtained from distinct geographical locations in Brazil (Figure 1), after experimental infection of *R. norvegicus* with L3 larvae recovered from *A. fulica* naturally infected obtained from the National Reference Laboratory of Medical Malacology, Oswaldo Cruz Foundation, or through naturally infected *R. norvegicus* and *R. rattus* (Table 1). Collection permits for rodents were obtained from the animal use ethics committee of Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) (CEUA no. LW 24/10).

### Experimental infection

The snails were individually minced and digested in a 0.7% HCl solution for 6 h. The digested samples were then placed in a Baermann apparatus and allowed to sediment overnight. The L3 nematode larvae obtained from digested snails were administered orally to 3-month-old *R. norvegicus* (Wistar strain) rats (100 L3/animal). Thirty-five days after administration of the larvae, the rodents were euthanized using a CO<sub>2</sub> chamber and adult worms were collected from the pulmonary arteries, washed in physiologic solution and fixed in 70% ethanol or frozen for molecular analysis. The specimens from each isolate were cleared and mounted as temporary slides in lactophenol solution and examined under a light microscope. Taxonomic identification of the nematodes was based on morphological parameters obtained from previous studies [12,14].

### Molecular and phylogenetic analysis

Genomic DNA samples were extracted using the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, according to the manufacturer's protocol. The extracted DNA was stored at 4°C until use. The DNA amplification by polymerase reaction was conducted using the previously described primers COI\_F 5' TTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3' and COI\_R 5' TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3' for a partial region of the COI gene [19,20]. The reaction mixture was prepared in a total volume of 50 µL containing 16.2 µL of water, 5 µL of 10 x PCR buffer (Tris-HCl, KCl), 2.5 µL of MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), 5 µL of dNTP mix (10 mM each), 10 µL of each primer (0.2 mM), 0.3 µL of Taq DNA polymerase (1.5U) and 1 µL of sample DNA. The thermocycler was programmed to incubate the samples for 5 min at 94°C, followed by 40 cycles at 94°C for 30s, 55°C for 30s, 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min. The reaction products were separated by electrophoresis on 1.0% agarose gel, stained with ethidium



bromide and visualized under ultraviolet light. Amplified products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Sequencing reactions were performed using an ABI PrismDyeTerminator Cycle Sequencing Core Kit (Applied Biosystems, USA) as described by Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS/FIOCRUZ). A partial sequence of the COI gene was determined to assess their phylogenetic relationship. All sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database: six sequences of *A. cantonensis* from the state of Rio de Janeiro; five sequences from the state of São Paulo; three sequences from the state of Pará and one sequence from the state of Pernambuco (Table 1).

Alignment and editing of sequences were performed using Clustal W in MEGA version 5 [21,22]. The nucleotide variation and p-distance were calculated using the

resultant alignment in the MEGA version 5 software. The aligned sequences were subjected to neighbor-joining (NJ) analysis, also performed using the MEGA version 5 software, and Bayesian inference (BI), which was performed using the MrBayes 3.2.0 program [23]. The evolutionary model applied to BI was chosen using the Bayesian information criterion (BIC), Akaike information criterion (AIC) and corrected Akaike information criterion (AICc), by which BIC and AICc indicated choice of the same evolutionary model, and were calculated on topologies optimized by maximum likelihood as implemented by the MrAIC program [24-26]. NJ bootstrap values were estimated using 1000 replicates with TrN93+G distances and the BI was performed with the HKY+G model of sequence evolution. Different evolutionary models were used in both trees since the HKY+G model considers the frequency of transitional changes

Table 1 *Angiostrongylus cantonensis* samples isolated from São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Pará (PA) and Pernambuco (PE) used in the present study

Geographic locations	Worm stage	Origins	Date of collection	Geographic coordinates	CHIOC	GenBank accession	Haplotype
São Mateus – SP	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°35'40.18"S, 46°28'28.39"W	35788	JX471064	ac8
Freguesia do Ó – SP	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	23°29'00.77"S, 46°41'22.91"W	35832	JX471058	ac8
Jundiaí – SP	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°12'54.44"S, 46°52'49.69"W	35789	JX471062	ac8
Vila Rami – SP	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2011	23°12'52.43"S, 46°52'59.14"W	35834	JX471067	ac8
Pirituba – SP	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	23°28'44.40"S, 46°43'23.24"W	35724	JX471054	ac5
São Gonçalo – RJ	Adult	<i>Rattus norvegicus</i>	2011	22°49'30"S, 43°02'30"W	35703	JX471066	ac8
Encantado – RJ	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°53'45"S, 43°18'08"W	35723	JX471057	ac8
Túnel Noel Rosa – RJ	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°54'35.87"S, 43°15'12.97"W	35721	JX471068	ac8
Caju – RJ	Adult	<i>Rattus rattus</i>	2011	22°52'58.13"S, 43°13'07.35"W	35831	JX471055	ac9
Niterói – RJ	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°53'55.11"S, 43°07'53.97"W	35829	JX471059	ac5
Queimados – RJ	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2010	22°42'55.20"S, 43°34'06"W	35725	JX471060	ac5
Marituba – PA	Adult	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°36'60.7"S, 48°34'49.4"W	35722	JX471065	ac8
Jurunas – PA	Adult	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°47'34.3"S, 48°49'24.8"W	35833	JX471063	ac8
Guamá – PA	Adult	<i>Rattus rattus</i>	2010	01°47'24.2"S, 48°45'59.15"W	35830	JX471061	ac8
Olinda – PE	Adult	<i>Achatina fulica</i>	2009	08°00'32.25"S, 34°51'07.95"W	35661	JX471056	ac8

between purines and pyrimidines as equal. As there is no analytical form to estimate HKY+G distances, we used TrN93 model [27]. The posterior probabilities (BPP) were estimated using Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis, which was run for 10,000,000 generations with data sampling every 500 generations, discarding the first 1000 sampled trees as burn-in. A BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was performed to clarify any similarities with the sequences obtained and previously published sequences. COI sequences from *Angiostrongylus* spp. were obtained from the GenBank as follows: *A. cantonensis* from Japan, China, Taiwan, Thailand and Brazil; *A. vasorum* from the UK and *A. costaricensis*. Sequences of *Metastrongylus salmi* were used as out-group. Haplotypes for *A. vasorum* isolates from Brazil (*A. vasorum* 5421, 5641, and 5642) were reconstructed from published information [20] (Figure 2).

## Results

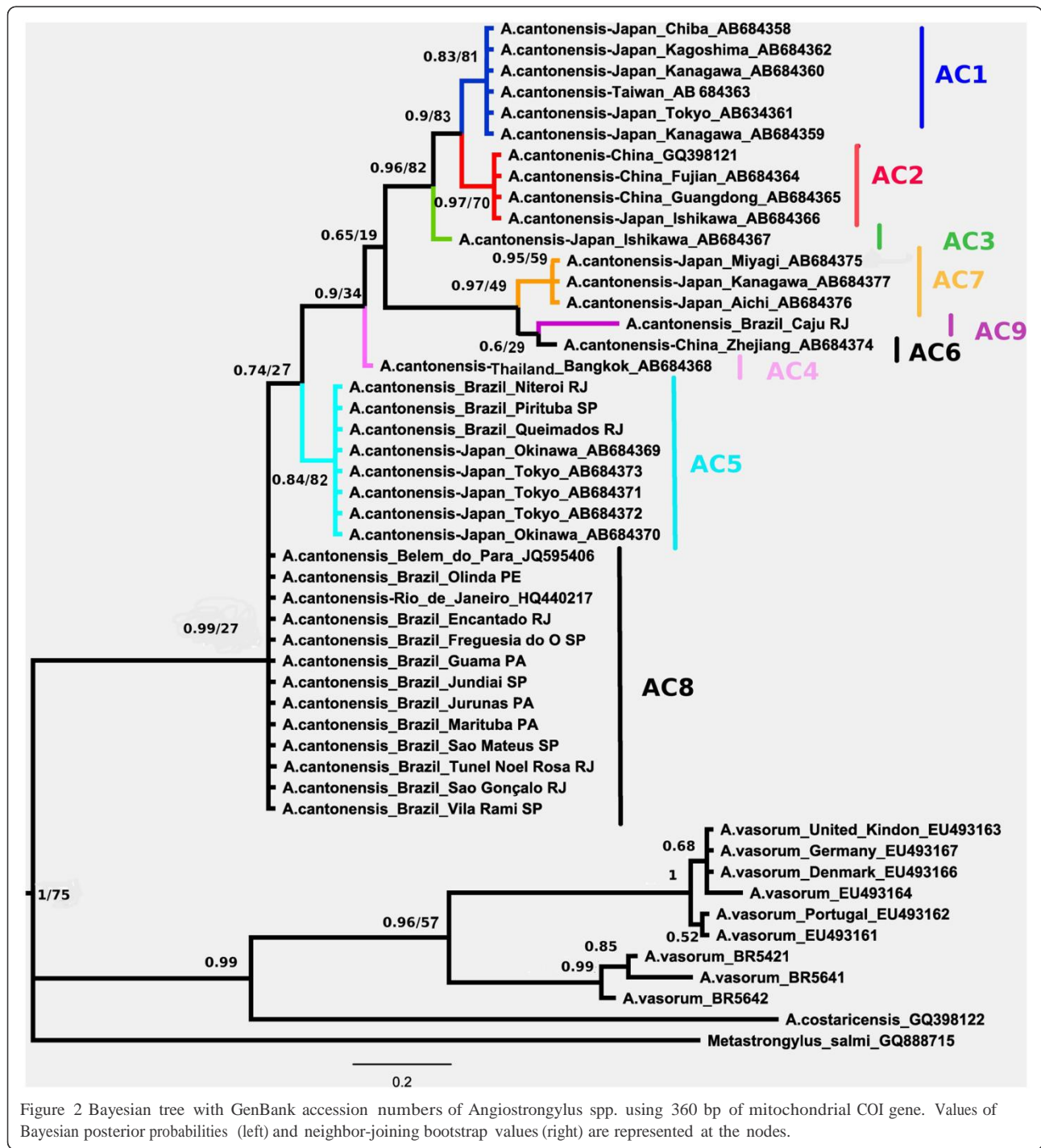
The COI partial sequences of *A. cantonensis* were determined from 15 geographic isolates from Brazil and presented a length varying from 440 to 460 bp. We aligned 360 bp of COI gene to compare it with other sequences previously available in the GenBank database. The sequences analyzed revealed that in 338 bp (93.9%) the positions of the nucleotides were monomorphic or invariable, while 22 sites (6.1%) were variable, of which four sites were parsimony-informative, and the amino acid sequences did not reveal any variability in 120 encoded amino acids, generating three different haplotypes of COI

(ac5, ac8 and ac9) based on eight distinct haplotypes, as mentioned by Tokiwa et al. (2012) [7].

The evolutionary parameters kappa, pi(A), pi(C), pi(G), pi(T) and alpha were estimated through MCMC sampling with lower and upper limits and presented the following values of average and variance respectively: kappa 7.7 / 6.0; pi(A) 0.20 / 0.0002; pi(C) 0.05 / 0.00008; pi(G) 0.30 / 0.0004; pi(T) 0.45 / 0.0006 and alpha 0.15 / 0.0002.

The phylogenetic trees inferred using the two methods showed a similar topology but with some minor differences in six nodes involving *A. vasorum* and *A. cantonensis* from Túnel Noel Rosa (Rio de Janeiro). The Bayesian tree, presented with a condensed root and posterior probabilities at nodes (BPP) and bootstrap values for NJ, can be found in Figure 2 and showed higher nodal support valued than the NJ tree rooted on *M. salmi* based on TrN93 distances (Additional file 1: Figure S2). The bootstrap values of the branches with different topologies mentioned above, were not included in Bayesian tree. The *Angiostrongylus* species were grouped into two major clades. The sequences of *A. cantonensis* were monophyletic. The clade corresponding to *A. cantonensis* was supported with low bootstrap values of 27% for NJ and high posterior probability values of 0.99 for BI. Within *A. cantonensis*, the geographical isolates corresponding to Brazilian haplotypes ac5 and ac8 were the first to branch, with low bootstrap values of 27% for NJ and posterior probability values of 0.74 for BI. The Brazilian haplotype ac9 was clustered in a distinct clade with Chinese haplotype ac6 and Japanese





haplotype ac7, presenting bootstrap values of 49% for NJ and high posterior probability values of 0.97 for BI.

Only one *A. cantonensis* isolate, Caju from the state of Rio de Janeiro, named haplotype ac9, formed a clade with haplotype ac6 from China (Zhejiang) and with haplotype ac7 from Japan (Miyagi, Kanagawa and Aichi). The isolates from Queimados and Niterói (state of Rio de Janeiro) and Pirituba (state of São Paulo) constituted

a clade with isolates from Japan (Okinawa and Tokyo), corresponding to haplotype ac5. The haplotype ac8 corresponded to the other Brazilian isolates from the Southeast region: Jundiaí, Freguesia do Ó, São Mateus, Vila Rami (state of São Paulo), Túnel Noel Rosa, Encantado, São Gonçalo and Rio de Janeiro city (state of Rio de Janeiro) [GenBank: HQ440217]; North region: Guamá, Jurunas, Marituba and Belém (state of Pará) [GenBank:

JQ595406]; and Northeast region: Olinda (state of Pernambuco), forming a distinct clade.

The closely related species had interspecific p-distance values, ranging from 12.2% (between *A. cantonensis* and *A. vasorum*) to 19.0% (between *A. cantonensis* and *A. costaricensis*). Intraspecific distance values among *A. cantonensis* ranged from 0.8% (between haplotypes ac1 and ac2) to 6.4% (between haplotypes ac5 and ac9) (Table 2).

The nucleotide variation between the clade that includes haplotypes ac5 and ac8 consisted of four mutational steps, while the mutational steps between clades containing haplotype ac9 were 21 and 19 from haplotype ac5 and ac8, respectively. In addition, the mutational steps between haplotype ac9 and haplotypes ac6 and ac7 were seven and nine, respectively (Table 3 and Figure 3).

### Discussion

In the present study, Brazilian isolates of *A. cantonensis* were analyzed using mitochondrial COI gene sequences. This allowed evaluation of variability in *A. cantonensis* isolates from different geographical locations in Brazil. All sequences from Brazil were monophyletic with sequences from Asia. Tokiwa et al. (2012) [7], distinguished eight different haplotypes, named ac1 to ac8. Most sequences from Brazilian samples were either ac5 or ac8. Moreover, we described a new haplotype named ac9, monophyletic with Chinese haplotype ac6.

The intraspecific variation observed among the Brazilian isolates ranged from 0.8% to 6.4%. These values are in agreement with the findings of Blouin (2002) [28], which showed that the level of mtDNA sequence variation among nematode individuals of the same species is lower than 10%.

The data observed in this study showed that the *A. cantonensis* isolate from Caju (state of Rio de Janeiro) is restricted to the port area and could have entered the country through trade from Asia. The factor that might have prevented dispersal of haplotype ac9 to other places in the country is the absence of the main intermediate host, *A. fulica*, at the site where the rats were trapped.

Similarly, the Brazilian isolates from Pirituba (state of São Paulo), Queimados and Niterói (state of Rio de Janeiro), which correspond to haplotype ac5 from Japan, are believed to have entered through Rio de Janeiro or São Paulo also from the Asian continent. This hypothesis is also considered for the most abundant Brazilian haplotype (ac8), showing the possible spread from the arrival area to the Southeast, Northeast and North regions, probably through the giant African snail, *A. fulica*.

Likewise, Araujo (1967) [29] showed in a study on helminth fauna in *Rattus norvegicus* in the city of São Paulo that all rats captured were parasitized by 1 to 11 species of helminths. Interestingly, the helminth fauna lacked species of the genus *Angiostrongylus*. Moreover, Pessôa and Martins (1982) [30] reported that J.E. Alicata did not find *A. cantonensis* infection in rodents collected in the Brazilian state of Bahia, suggesting the recent introduction of the parasite in the country.

*A. fulica* has been considered a snail pest in tropical and subtropical regions where it has been introduced. In Brazil, this exotic snail was introduced in the state of Paraná in the 1980s, probably brought from Indonesia for commercial purposes that were not successful (escargot farming). The high reproductive capacity and the tendency for people to release snails into the wild are the probable reasons for the rapid invasion of this species [8,11]. This snail is currently found in most

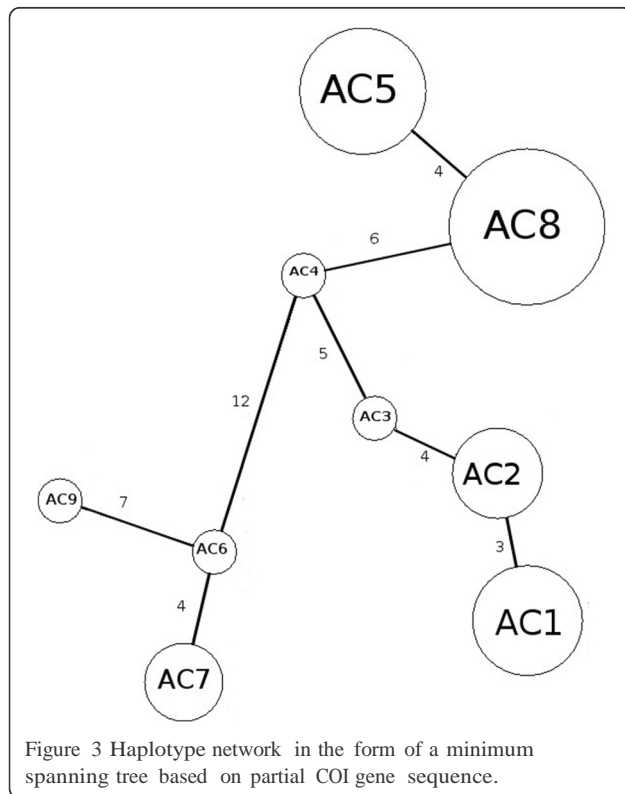
Table 2 p-distance values of haplotypes of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus vasorum* based on mitochondrial COI gene

	ac1	ac2	ac3	ac4	ac5	ac6	ac7	ac8	ac9	ACO	AV42	AV21
<i>A. cantonensis</i> ac1	-											
<i>A. cantonensis</i> ac2	0.008	-										
<i>A. cantonensis</i> ac3	0.011	0.011	-									
<i>A. cantonensis</i> ac4	0.020	0.020	0.014	-								
<i>A. cantonensis</i> ac5	0.038	0.038	0.032	0.017	-							
<i>A. cantonensis</i> ac6	0.051	0.051	0.044	0.035	0.054	-						
<i>A. cantonensis</i> ac7	0.051	0.051	0.044	0.035	0.048	0.011	-					
<i>A. cantonensis</i> ac8	0.038	0.038	0.032	0.017	0.011	0.054	0.048	-				
<i>A. cantonensis</i> ac9	0.054	0.054	0.048	0.044	0.064	0.020	0.026	0.057	-			
<i>A. costaricensis</i> GQ398122	0.176	0.189	0.190	0.190	0.190	0.185	0.176	0.172	0.167	-		
<i>A. vasorum</i> BR5642	0.155	0.151	0.147	0.134	0.130	0.142	0.146	0.126	0.130	0.169	-	
<i>A. vasorum</i> BR5421	0.156	0.152	0.147	0.135	0.143	0.142	0.146	0.127	0.131	0.169	0.008	-
<i>A. vasorum</i> BR5641	0.146	0.142	0.138	0.130	0.138	0.142	0.145	0.122	0.126	0.178	0.023	0.017



Table 3 Variable nucleotide positions within the mitochondrial COI gene from different haplotypes of *Angiostrongylus cantonensis*

	Nucleotide position																															
	022	025	031	034	073	076	100	109	118	130	136	160	169	181	187	193	211	229	232	235	244	268	280	289	292	295	298	301	304	310	313	358
Halplotypes																																
ac1	A	G	A	A	A	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	G	G	A	G	A	A	T	A	T	T	G	A	C	G	A	G	A
ac2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.
ac3	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
ac4	.	.	G	G	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.
ac5	.	.	G	G	.	G	.	C	C	.	A	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	G	.	G	.	G	T	A	.	.	.
ac6	G	T	G	G	G	.	A	.	.	.	A	.	G	C	.	A	A	.	A	G	.	.	.	.	G	A	.	T	.	.	.	G
ac7	G	T	G	G	G	.	A	.	.	A	A	.	G	.	.	A	A	.	A	.	.	.	G	.	G	A	.	T	.	.	.	G
ac8	.	.	G	G	.	G	.	.	C	.	A	A	.	.	.	A	G	.	.	.	.	G	.	G	.	G	T	.	G	.	.	
ac9	G	T	G	G	G	.	A	.	.	.	A	.	G	.	T	A	A	.	A	G	G	.	.	.	.	.	.	T	.	G	A	G



Brazilian states. Factors such as its voracious feeding habits contribute to the extermination of the native snail fauna, reducing the available resources and increasing competition for physical space. The absence of natural pathogens also contributes to the high dispersion of these snails [31].

The increased presence of *A. cantonensis* in the country is likely a result of the rapid spread of its intermediate host, *A. fulica*, contributing to the dispersion of this parasite and infection of the definitive host [12]. This phenomenon is described as one of the primary causes of the spread of eosinophilic meningoencephalitis [14].

The genetic variation observed among Brazilian isolates supports the hypothesis that the appearance of *A. cantonensis* in Brazil is a result of multiple introductions of parasite-carrying rats and the snails that act as intermediate hosts. These were likely transported on ships due to trade with Africa and Asia during the period of European colonization [8,14] and dispersed via human transport, becoming endemic in port areas [7]. At the present moment a phylogeographic study of *A. cantonensis* is essential to locate the geographical origin of these introductions, especially of haplotypes ac8 and ac9.

## Conclusions

In summary, we studied the molecular variation of *A. cantonensis* isolates from different geographical locations

in Brazil based on COI DNA sequences. This study showed that four Brazilian isolates are clustered with isolates from Japan, China and Thailand (haplotypes ac5 and ac9), and 11 Brazilian isolates form a distinct clade (haplotype ac8). In addition, haplotype ac9 represent a new *A. cantonensis* haplotype. The COI gene appears as a good marker for differentiating geographical isolates of *A. cantonensis*. The phylogenetic features of this nematode help to understand how phylogeography can influence the transmission dynamics of this parasite.

## Additional file

Additional file 1: Figure S2. Neighbor-joining tree using 360 bp of mitochondrial COI gene.

## Abbreviations

COI: Cytochrome c oxidase subunit I; L3: Third stage larvae; PDTIS: Genomic Platform-DNA Sequencing; NJ: Neighbor-joining; BI: Bayesian inference; BIC: Bayesian information criterion; AIC: Akaike information criterion; AICc: Corrected Akaike information criterion; TrN+G: Tamura-Nei model with Gamma distributed; HKY+G: Hasegawa-Kishino-Yano model with Gamma distributed; BPP: Posterior probabilities; MCMC: Markov chain Monte Carlo.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

TCCM participated in the study design, carried out laboratory experiments, participated in data analysis and participated in drafting the manuscript. ROS participated in the study design and participated in drafting the manuscript. APMO participated in the laboratory experiments. SCT participated in the study design and drafting the manuscript. CFN participated in the field work. AJS participated in the study design and drafting the manuscript. PCE participated in the study design, participated in data analysis and participated in drafting the manuscript. AMJ participated in the study design, carried out laboratory experiments, participated in data analysis and participated in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Authors' information

Arnaldo Maldonado Júnior has a fellowship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

## Acknowledgements

We are grateful to Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, CAPES (Program of Basic Parasitology – grant 3031/2011) and CNPq, which supported this work and also thank the Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS/FIOCRUZ). PCE was funded by CNPq-PDJ-FIOCRUZ grant 500091/2012-2. We also thank Franklyn Enrique Samudio Acosta for valuable suggestions and Nilson J Melo, Gerônimo N Costa and Jorge M Silva for technical support.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, Rua México 128, Centro 20031-142 Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Center for Global Health, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA.

Received: 18 September 2012 Accepted: 27 October 2012  
Published: 6 November

## References

- Lunn JA, Lee R, Smaller J, Mackay BM, King T, Hunt GB, Martin P, Krockenberger MB, Spielman D, Malik R: Twenty two cases of canine neural angiostrongylosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. *Parasit Vectors* 2012, **70**:1-18.
- Graeff-Teixeira C, Silva ACA, Yoshimura K: Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin Microbiol Rev* 2009, **22**:322-348.
- Chen CY, Kuo CC, Lo CP, Huang MY, Wang YM, Wang WY: Eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *QJM* 2011. doi:10.1093/qjmed/hcr261.
- Foronda P, Lopez-Gonzales M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Costa N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C: Finding of *Parastrostrongylus cantonensis* (chen,1935) in *Rattus rattus* in tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Trop* 2010, **114**:123-127.
- Maldonado AJ, Simões R, Thiengo S: Angiostrongyliasis in the Americas. In *Zoonosis*. Volume 1. 1st edition. Edited by Morales-Lorenzo J. InTech;2012:303-320. doi:10.5572/2125.
- Morassutti AL, Graeff-Teixeira C: Interface molecules of *Angiostrongylus cantonensis*: their role in parasite survival and modulation of host defenses. *Int J Inflam* 2012, **2012**:1-6.
- Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung K-C, Suzuki J, Kadosaka T, Takada N, Kumagai T, Akao N, Ohta N: Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. *Parasitol Int* 2012, **61**:431-436.
- Thiengo S, Faraco F, Salgado N, Cowie R, Fernandez M: Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biol Invasions* 2007, **9**:693-702.
- Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Yang G-J, Yank K, Zhou X-N, Utzinger J: The emergence of angiostrongyliasis in the People's Republic of China: the interplay between invasive snails, climate change and transmission dynamics. *Freshwater Biol* 2011, **56**:717-734.
- Graeff-Teixeira C: Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, **101**:743-744.
- Zanol J, Fernandez MA, Oliveira APM, Russo CAM, Thiengo SC: O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. *Biota Neotrop* 2010, **10**:447-451.
- Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres EJ, Caldeira R, Carvalho OS, Oliveira AP, Simões RO, Fernandez MA, Lanfredi RM: The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop* 2010, **115**:194-199.
- Martin-Alonso A, Foronda P, Quispe-Ricalde MA, Feliu C, Valladares B: Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in Wild Rodents from the Canary Islands. *PLoS One* 2011, **6**:1-5.
- Maldonado AJ, Simões RO, Oliveira APM, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, Monteiro SS, Torres EJM, Thiengo SC: First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, **105**:938-941.
- Caldeira RL, Mendonca CLF, Gouveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS: First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:887-889.
- Lima AR, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ER, Rosa LRS, Duarte FS: Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2009, **67**:1093-1096.
- Eamsobhana P, Lim PE, Solano G, Zhang H, Gan X, Yong HS: Molecular differentiation of *Angiostrongylus* taxa (Nematoda: Angiostrongylidae) by cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences. *Acta Trop* 2010, **116**:152-156.
- Simões RO, Monteiro FA, Sánchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF, Luque JL, Maldonado A: Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:1331-1333.
- Bowles J, Blair D, McManus DP: Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 1992, **54**:165-173.
- Jefferies R, Shaw SE, Viney ME, Morgan ER: *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages. *Parasitology* 2009, **136**:107-115.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731-2739.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP: MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 2012, **61**:539-542.
- Akaike H: A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 1974, **19**:716-723.
- Burnham KP, Anderson DR: Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociol Method Res* 2004, **33**:261-304.
- Nylander JAA: MrAIC.pl. Program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University; 2004.
- Tamura K, Nei M: Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993, **10**:512-526.
- Blouin MS: Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 2002, **32**:527-531.
- Araujo P: Helminthos de *Rattus norvegicus* (Berkenhout,1769) da cidade de São Paulo. *Rev Fac Farm Bioquím S. Paulo* 1967, **5**:141-159.
- Pessôa SB, Martins AV: *Pessôa Parasitologia Médica*, tenth ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
- Ohlweiler FP, Guimarães MCA, Takahashi FY, Eduardo JM: Current distribution of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 in the State of São Paulo including records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2010, **52**:211-214.

doi:10.1186/1756-3305-5-248

Cite this article as: Monte et al.: Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:248.

