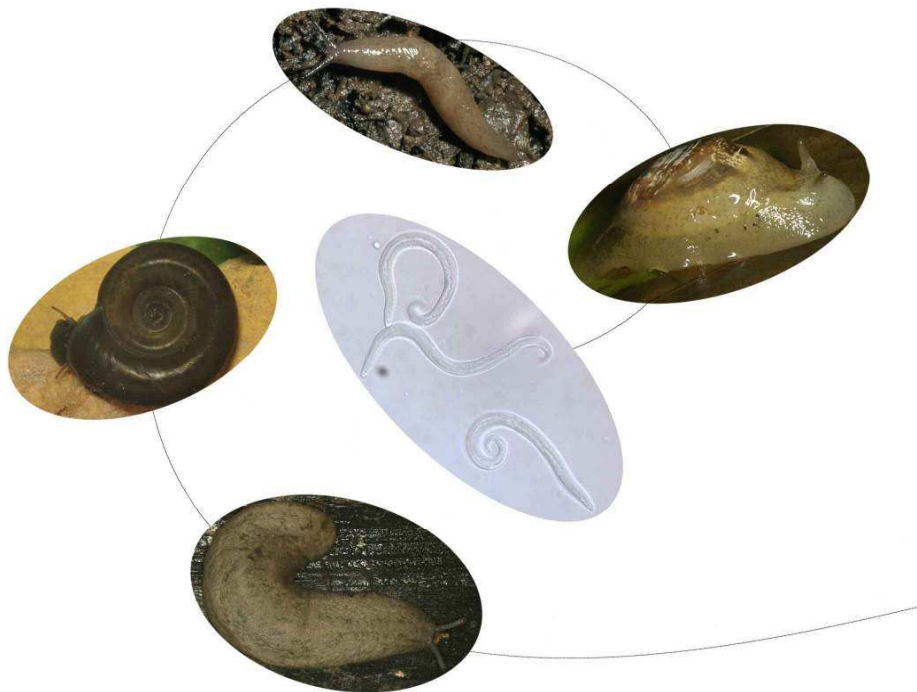


FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA:PROTOSTRONGYLIDAE):
ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA EM *Omalonyx matheroni*
(GASTROPODA: SUCCINEIDAE) E ANÁLISE COMPARATIVA DA
RESPOSTA HEMOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO LARVAR
EM MOLUSCOS PULMONADOS



LÂNGIA COLLI MONTRESOR

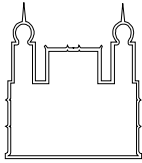
Belo Horizonte - MG
2005

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Mestrado em Ciências da Saúde

Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA: PROTOSTRONGYLIDAE):
ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA EM *Omalonyx matheroni*
(GASTROPODA: SUCCINEIDAE) E ANÁLISE COMPARATIVA DA
RESPOSTA HEMOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO LARVAR EM
MOLUSCOS PULMONADOS

Lângia Colli Montresor

Belo Horizonte - MG
2005



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU

Pós-graduação em Ciências da Saúde

LÂNGIA COLLI MONTRESOR

Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA: PROTOSTRONGYLIDAE): ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA EM *Omalonyx matheroni* (GASTROPODA: SUCCINEIDAE) E ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA HEMOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO LARVAR EM MOLUSCOS PULMONADOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre (Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientadora: Dr^a. Teofânia H.D. A Vidigal

Coorientadores: Dr. Henrique Leonel Lenzi

Dr. Omar dos Santos Carvalho

Belo Horizonte - MG


2005


M811e
2005



Montresor, Lângia Colli

Angiostrongylus costaricensis (Nematoda: Protostrongylidae): Estudo da via migratória em *Omalonyx matheroni* (Gastropoda: Succineidae) e análise comparativa da resposta hemocitária e desenvolvimento larvar em moluscos pulmonados/ Lângia Colli Montresor. – Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisa René Rachou, 2005.

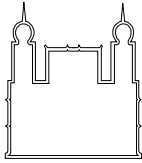
xv; 114 f. : il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 85 

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós  Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou.

1. *Angiostrongylus costaricensis* 2 Reação hemocitária 3. moluscos pulmonados I. Título. II. Vidigal, Teofânia Heloisa Dutra Amorim (Orientadora); III. Lenzi, Henrique Leonel (Co  orientador I), Carvalho, Omar dos Santos Carvalho (Co  orientador II).

CDD – 22. ed. – 571.999



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU

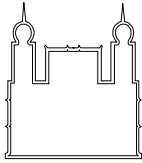
Pós-graduação em Ciências da Saúde

LÂNGIA COLLI MONTRESOR

Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA: PROTOSTRONGYLIDAE): ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA EM *Omalonyx matheroni* (GASTROPODA: SUCCINEIDAE) E ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA HEMOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO LARVAR EM MOLUSCOS PULMONADOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Malacologia e Sistemática Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, de Helminthoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou e no Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro sob orientação da Dra. Teofânia H.D. A Vidigal¹ e coorientação do Dr. Henrique Leonel Lenzi² e Dr. Omar dos Santos Carvalho³. Este trabalho recebeu suporte financeiro da FAPEMIG e da FIOCRUZ.

- ¹ Laboratório de Malacologia e Sistemática Molecular, Departamento de Zoologia, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- ² Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ³ Laboratório de Helminthoses Intestinais, Centro de Pesquisas René Rachou FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Pós-graduação em Ciências da Saúde

LÂNGIA COLLI MONTRESOR

Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA: PROTOSTRONGYLIDAE): ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA EM *Omalonyx matheroni* (GASTROPODA: SUCCINEIDAE) E ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA HEMOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO LARVAR EM MOLUSCOS PULMONADOS

Dissertação defendida e aprovada em 18 de julho de 2005.

Banca examinadora:

Teofânia H. D. A. Vidigal – Presidente

Zilton de Araújo Andrade – Titular

Paulo Marcos Zech Coelho – Titular

Marcos Pezzi Guimarães – Suplente

“A reflexão é um processo de conhecer como conhecemos, um ato de voltar a nós mesmos, a única oportunidade que temos de descobrir nossas cegueiras e reconhecer que as certezas e os conhecimentos dos outros são, respectivamente, tão aflitivos e tão tênues quanto os nossos” .

Humberto R. Maturana e Francisco J. Varela

Dedico este trabalho à minha família, da qual sempre tive grande apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Quando se trata de agradecer, o que me passa pela cabeça é que a contribuição de cada pessoa, naquele determinado momento, tem valor inestimável e que, independentemente da seqüência em que os nomes poderiam ser citados, cada pessoa que contribuiu para a realização deste trabalho teve atuação única e insubstituível. Por razões pessoais, utilizarei o critério cronológico.

Sempre tive grande apoio dos meus pais, Halesia Colli Montresor e Aldo Valério Montresor, na luta pelos meus ideais e, desde que eu era criança me ensinaram a ter garra e a não desistir. Por isto o nome deles sempre virá em primeiro lugar.

Gostaria de enfatizar a influência que tive de minhas avós Olga Colli e Maria Dolores Montresor, exemplos de coragem e perseverança, com quem muito aprendi. Meu avô, Heráclito Colli, sempre foi referência por sua conduta e organização.

No desenvolvimento deste trabalho foi diversas vezes ao Rio de Janeiro onde fui maravilhosamente acolhida pelos meus tios – Maria Inês Montresor, Maria Stella Montresor, Alfredo Rodrigues e Anália Conceição Falcão (Mainha) com os quais tive uma convivência intensa e prazerosa, principalmente no turno da noite.

Quanto à minha escolha profissional, gostaria de agradecer os professores Mario de Maria e Ângelo Machado (UFMG) por terem despertado em mim, ainda nos primeiros períodos da graduação em biologia, o interesse pelos invertebrados. Meu amigo e primo Diego Zorio teve marcante influência em minha formação ao me convidar para passar as férias estagiando em seu laboratório. Aprendi muito com ele. Trabalho com minha atual orientadora Teofânia H.D.A. Vidigal, desde 2000. Durante este tempo aprendi muito e tive a oportunidade de trabalhar com diferentes linhas de pesquisa, inclusive a que originou esta dissertação. Sobre nosso convívio é marcante para mim seu apoio irrestrito e esforço incondicional.

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho, mas o começo desta dissertação se deu de fato pela proposta de realização de um projeto feita pela Dra Teofânia HDA Vidigal e o aceite do Dr Henrique L. Lenzi. Um ano após a aprovação deste projeto na FAPEMIG ingressei no curso de mestrado do CPqRR, com a orientação do Dr Henrique L Lenzi e Omar dos Santos Carvalho, os quais me deram grande apoio, assim como os colaboradores deste projeto – Cristiane LGF Mendonça, Ester M Mota, Luzia FG Caputo.

O convívio agradável facilita muito o trabalho. Nos laboratórios por onde transitei no decorrer deste trabalho fui muito bem acolhida, assim gostaria de agradecer os integrantes do Laboratório de Malacologia UFMG, do Laboratório de Helminoses Intestinais CPqRR, do

Departamento de Patologia – IOC/ FIOCRUZ, do Laboratório de Imagens Científicas – IOC/ FIOCRUZ, do Laboratório de Apoio Didático da Morfologia – UFMG, e do Laboratório de Invertebrados UFMG.

Tive especial ajuda na execução deste trabalho das seguintes pessoas:

Dra Lígia Corrêa e Dr Wladmir Lobato Paraense do Departamento de Malacologia, IOC, FIOCRUZ que cederam os espécimes de *Biomphalaria glabrata* e sempre estiveram à disposição para eventuais dúvidas.

Cristiane L.G.F. Mendonça que, desde o início deste trabalho, esteve presente me orientando em relação a cada dúvida que eu tive.

Olanda de Olinda Pedro e Andréa Natividade da Silva, técnicas do DEPAT, IOC, FIOCRUZ que trabalham na manutenção do ciclo de *A. costaricensis* no e que me ensinaram a rotina do laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho.

Luzia FG Caputo, Alexandra M dos Anjos, Luciana S Souza, Luzia HP Barroso do Laboratório de Histologia, DEPAT, IOC, FIOCRUZ, as quais realizam um trabalho maravilhoso.

Sueleny Silva Ferreira Teixeira, técnica do Moluscário CPqRR, FIOCRUZ, que muito me ensinou, principalmente no trabalho com os camundongos.

Simone da Silva, secretária do laboratório de Helmintoses Intestinais CPqRR, FIOCRUZ teve atuação tão ampla em todos estes anos, que é impossível traduzir em palavras esta pessoa sempre ótima.

Marcílio da Silva Tomaz, Vera Lúcia de Jesus Mariano e Wanderley Alves da Silva, técnicos do biotério do CPqRR, FIOCRUZ.

Daniel Coscarelli, estudante do Laboratório de Malacologia – UFMG, por seu talento na confecção dos desenhos científicos e apoio malacológico.


Mônica Panasco, estudante de doutorado do Departamento de Patologia, IOC, FIOCRUZ, que se mostrou uma grande amiga e que me fez companhia, principalmente no turno da noite e nos finais de semana, quando freqüentemente éramos as únicas pessoas presentes no departamento. Agradeço ainda por ter colaborado na revisão do “abstract”.


Genilton José Vieira, chefe do Laboratório de Imagens Científicas IOC FIOCRUZ, pelos ensinamentos, apoio e amizade.


Karine Sousa, estudante do Laboratório de Malacologia – UFMG, pela colaboração ativa em um momento tão crucial no qual sua ajuda foi imprescindível.


Professor Alfredo Wielloch, Departamento de Zoologia, UFMG que muitas vezes me auxiliou em dúvidas e que facilitou muito meu trabalho ao permitir que eu utilizasse a infra


estrutura de seu laboratório.


 Pedro Paulo de Abreu Manso, técnico do Departamento de Patologia IOC/FIOCRUZ pelo belo trabalho no confocal.



 Segemar Oliveira Magalhães, bibliotecário do CPqRR, pelo auxílio na normatização desta dissertação, elaboração da ficha catalográfica e busca por periódicos.

 Adriano Paglia, Conservation International, que elaborou o gráfico de desenvolvimento larvar (artigo II).

 Maristane Freire Jardim e Kayla Veruska Lopes da Silva, técnicas do Laboratório de Apoio Didático do Departamento de Morfologia.

 Rafaela Domingues, amiga que sempre esteve presente e que acompanhou toda minha trajetória nos últimos anos.

 André Almeida Fernandes, amigo e Técnico do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva E.VET/ UFMG cabe um agradecimento especial já que além do constante apoio técnico laboratorial este ainda realizou um maravilhoso trabalho de documentação científica o qual pode ser observado em diversas fotografias no corpo desta dissertação.

 Ao Dr Henrique L. Lenzi, meu coorientador, gostaria de deixar aqui relatada minha profunda admiração por sua conduta como ser humano e cientista. Mesmo com a quantidade absurda de compromissos que constantemente atribulam sua vida acadêmica, este não deixa ler nem se quer uma palavra do trabalho de seus alunos. A oportunidade de ser orientada por alguém com tamanho conhecimento intelectual, técnico e humano foi para mim o maior dos aprendizados que tive durante este percurso.

Por tanto agradeço a todas estas pessoas e desejo que elas tenham sorte, como eu tive, e encontrem em seus caminhos pessoas bem intencionadas e dispostas a ajudar sempre que for necessário.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Migração larvar no hospedeiro intermediário.....	04
FIGURA 2	Esquema migração larvar em roedor.....	05
QUADRO 1	Posição Sistemática de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	06
PRANCHA 1	Aspectos da morfologia externa e interna de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	13
PRANCHA 2	Aspectos da morfologia externa e interna de moluscos do gênero <i>Deroceras</i>	16
PRANCHA 3	Aspectos da morfologia externa e interna de moluscos do gênero <i>Omalonyx</i>	19
PRANCHA 4	Aspectos da morfologia externa e interna de moluscos do gênero <i>Sarasinula</i>	21
PRANCHA 5	Aspectos do sistema circulatório de um molusco pulmonado.....	26

Desenhos: Daniel Coscarelli (Pranchas 1, 2, 3, 4 e 5)

Fotografias: André Almeida Fernandes (Capa, Pranchas 1, 2, 3 e 4)

LISTA DE TABELAS

1	Primeiro relato de ocorrência de angiostrongilíase abdominal.....	02
2	Espécies de mamíferos que foram encontradas naturalmente parasitadas.....	07
3	Revisão sobre posição sistemática e infecção (natural/ experimental) registrada para diferentes moluscos a <i>A. costaricensis</i>	10

RESUMO

O nematódeo *Angiostrongylus costaricensis* tem como hospedeiros intermediários diversos moluscos pulmonados, no entanto, sua via migratória foi estudada somente em *Sarasinula marginata*. Neste trabalho investigou-se 1) a via migratória do parasita em *Omalonyx matheroni*, 2) a reação tecidual e desenvolvimento larvar em alguns pulmonados (*O. matheroni*, *Biomphalaria glabrata*, *Deroceras* sp. e *S. marginata*), e 3) o potencial como hospedeiro intermediário de *O. matheroni* e *Deroceras* sp.. Espécimes de *O. matheroni* foram infectados com 1200 larvas L1 para preparação de cortes histológicos corados em HE. Para a via migratória foram estudados pontos com 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, 2, 5, 10, 12, 15, 20, 21, 25, 28 e 30 dias de infecção. A análise dos cortes histológicos revelou a ocorrência de infecção oral e cutânea. A via migratória mostrou-se intimamente relacionada às vias do sistema circulatório indicando que as larvas são por estas conduzidas aos diversos órgãos. No estudo comparativo da reação hemocitária nos pulmonados esta diferiu em intensidade e grau de ativação celular. Todas as espécies se tornaram mais responsivas a L2 e à face côncava larvar (ventral). *Deroceras* sp. e *O. matheroni* apresentaram uma camada colágena ao redor dos granulomas, ausente em *S. marginata* e *B. glabrata*. A análise comparativa da resposta hemocitária em gastrópodes pulmonados demonstrou que os aspectos da infecção são muito semelhantes entre as espécies estudadas. No entanto, muitos padrões se mostraram variáveis (intensidade da resposta, ativação celular – morfologia – e presença de colágeno), demonstrando o alto grau de conservação do sistema imunológico inato e a heterogeneidade funcional dos hemócitos. No estudo do desenvolvimento larvar 10 exemplares de cada espécie foram infectados (400L1) e digeridos após 5, 10, 15, 20 e 30 dias. A porcentagem de cada estágio larvar recuperado com 15, 20 e 30 dias, apresentou diferenças significativas (qui-quadrado) entre as espécies. As larvas L3 obtidas de *O. matheroni* e *Deroceras* sp. foram utilizadas para infecção oral de camundongos que, após 30 dias, apresentaram vermes adultos no plexo mesentérico, constatando a infectividade das larvas e o potencial destas espécies como hospedeiras intermediárias.

ABSTRACT

Different species of mollusks are intermediate hosts of the nematode *Angiostrongylus costaricensis*. This work aimed to investigate 1) the migratory route of the nematode in *Omalonyx matheroni*, 2) the hemocytic perilarval reaction and larval development in pulmonate snails (*O. matheroni*, *Biomphalaria glabrata*, *Deroceras* sp. e *S. marginata*) and 3) the potential of *O. matheroni* and *Deroceras* sp. as intermediate hosts. For histological studies *O. matheroni* specimens were infected with 1200 L1 larvae. The migratory route was described by analyzing hematoxylin-eosin stained slides from formalin-processed fixed specimens at 30 minutes, 1, 2, 4, 6 and 8 hours, 2, 5, 10, 12, 15, 20, 21, 25, 28 and 30 days after infection. Larval penetration through the skin and digestive tract were observed for all studied species. The migratory route showed to be highly related to circulatory system, which provides the access ways to many organs and regions of snail's body. The comparative study of hemocytic reaction in pulmonate gastropods showed that although there are many similarities related to the aspects of infection, some patterns are variant (response intensity, cellular activation –morphology and presence of collagen), demonstrating conserved innate immune mechanisms and some functional heterogeneity in mollusk's hemocytes. To follow the larval development, groups of 10 individuals of each species were infected (400 L1) and digested after 5, 10, 15, 20, 30 days. We found significant interspecific differences between the percentages of larval stages recovered 15, 20 and 30 days after infection. Third stage larvae recovered from *O. matheroni* and *Deroceras* sp. were used to infect *Mus musculus*. The presence of adult worms in mesenteric vessels after 30 days of infection demonstrates the potential of both species as intermediate hosts.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A angiostrongilíase abdominal.....	01
1.2 Sobre o parasita <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	03
1.3 Hospedeiros definitivos de <i>A. costaricensis</i>	07
1.4 Hospedeiros intermediários de <i>A. costaricensis</i>	08
1.5 Sobre os moluscos.....	08
1.5.1 Aspectos gerais.....	08
1.5.2 Caracterização dos moluscos utilizados como modelo experimental.....	12
1.5.2.1 Gênero <i>Biomphalaria</i> : Família Planorbidae: Ordem Basommatophora.....	12
1.5.2.2 Gênero <i>Deroceras</i> : Família Limacidae: Ordem Stylommatophora.....	14
1.5.2.3 Gênero <i>Omalonyx</i> : Família Succineidae: Ordem Stylommatophora.....	17
1.5.2.4 Gênero <i>Sarasinula</i> : Família Veronicellidae: Ordem Soleolifera.....	20
1.5.3 Moluscos como hospedeiros de helmintos.....	22
1.5.4 O sistema imunológico pré-infocitário e os moluscos.....	23
1.5.5 As interações molusco – helminto.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
4 ARTIGOS (NO PRELO)	33
4.1 Infecção experimental de <i>Omalonyx matheroni</i> (Gastropoda: Succineidae) por <i>Angiostrongylus costaricensis</i> (Nematoda: Protostrongylidae) e estudos da via migratória parasitária	34
4.2 Estudo comparativo da resposta hemocitária de diferentes espécies de moluscos pulmonados infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> (Nematoda: Protostrongylidae)	56
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÕES	83
7 PERSPECTIVAS.....	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 A angiostrongilíase abdominal

Angiostrongylus costaricensis (Nematoda: Protostrongylidae) é o agente causador da angiostrongilíase abdominal, parasitose descrita por Céspedes et al. (1967) como granuloma entérico com intensa eosinofilia tissular produzido por um strongilídeo. Casos humanos haviam sido observados na Costa Rica entre 1951 e 1967. No entanto, o agente etiológico e os pormenores da doença foram descritos somente em 1971 por Morera & Céspedes.

O quadro patológico da angiostrongilíase abdominal (Graeff & Teixeira et al. 1991b) consiste em comprometimento vascular devido à presença de vermes adultos nas artérias, causando trombose e necrose, granulomas perivulares e eosinofilia. Estas reações são exacerbadas pela presença de antígenos dos ovos, das larvas e dos parasitos adultos. Usualmente as lesões anatômicas – pseudoneoplásicas (predominam o espessamento da parede intestinal) e isquêmico-congestivas (áreas segmentares de congestão e necrose) – se localizam no apêndice cecal, íleo terminal e cecum. A principal sintomatologia é dor abdominal, febre e eosinofilia intensa com ocasional anorexia, náuseas e vômitos (Robles et al. 1968).

A letalidade da parasitose está relacionada à perfuração intestinal a qual resulta em peritonite e sépsis. As taxas de óbito foram calculadas em 1,7% na Costa Rica (Loria & Cortes & Lobo & Sanahuja 1980) e 7,4% no Brasil (Graeff & Teixeira 1986).

O ser humano é hospedeiro acidental e se infecta através da ingestão de L3. Os parasitos adultos se alojam no plexo mesentérico. No entanto, diferentemente dos roedores, não ocorre eliminação de larvas nas fezes humanas devido à retenção dos ovos do parasita na parede intestinal (Morera & Céspedes 1971b). Desta forma não são detectadas evidências da presença do parasita no exame parasitológico de fezes.

O diagnóstico definitivo consiste na observação do quadro patológico acima descrito juntamente com a presença de vermes adultos no plexo mesentérico do paciente após intervenção cirúrgica. No entanto dados coletados através de anamnese, relacionados a informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais constituem importantes indícios da parasitose. O fato de o quadro clínico ser geralmente confundido com apendicite ou abdome agudo, aliado à ausência de um diagnóstico sorológico disponível e à impossibilidade de diagnóstico parasitológico, resulta em prevalência subestimada da parasitose (Fauza et al. 1990). A distribuição geográfica da angiostrongilíase abdominal se encontra na tabela 1.

Tendo em vista que diversos anti-helmínticos causaram agravamento do quadro

clínico em estudos experimentais, não existe um tratamento seguro para esta parasitose, sendo o acompanhamento do paciente a alternativa indicada e em casos de agravamento do quadro é aconselhada a retirada cirúrgica dos vermes adultos.

PAÍS	REFERÊNCIA
Argentina	Demo & Pessat 1986
Brasil	Ziliotto et al. 1975
Colômbia	Malek 1981
Costa Rica	Céspedes et al. 1967
El Salvador	Sauerbrey 1977
Equador	Morera et al. 1983
Estados Unidos	Hulbert et al. 1992
Guadalupe	Juminer et al. 1992
Guatemala	Kramer et al. 1998
Honduras	Sierra & Morera 1972
Martinica	Jeandel et al. 1988
México	Velásquez et al. 1974
Nicarágua	Duarte et al. 1991
Panamá	Sanchez 1992
Peru	Sly et al. 1982
Venezuela	Paredes 1973
Zaire	Baiard et al. 1987

Tabela 1: Primeiro relato de ocorrência de angiostrongilíase abdominal

No Brasil, a angiostrongilíase abdominal tem sido considerada uma parasitose emergente, e conta com aproximadamente 90 casos humanos, sendo 81 diagnosticados pelo Instituto de Patologia de Passo Fundo (comunicação pessoal de Rubens Rodriguez e Aventino Alfredo Agostini a Henrique Leonel Lenzi).

1. 2 Sobre o parasita - *Angiostrongylus costaricensis*

Apesar das controvérsias a respeito da sistemática do gênero, foram reportadas entre 13 e 19 espécies de protostrongilídeos do gênero *Angiostrongylus* que parasitam roedores, musaranhos e carnívoros. Dessas, duas espécies parasitam o homem: *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*. A primeira foi descrita por Chen (1935) em Canton, na China e causa a meningite eosinofílica (Alicata 1962) e ocorre nos países da Ásia e do sul do Pacífico (Alicata 1991). Roedores são os hospedeiros definitivos e moluscos, os hospedeiros intermediários, porém diversos táxons podem atuar como hospedeiros paratêmicos.

A. costaricensis foi descrito por Morera & Céspedes (1971) na Costa Rica. Seu ciclo é heteroxênico envolvendo o parasitismo em moluscos e roedores. Os hospedeiros intermediários são infectados via oral e cutânea pelas L1 presentes nas fezes de roedores (Morera 1973, Thiengo 1996, Mendonça et al. 1999). Esse estágio larvar é muito ativo e mede aproximadamente 260 μm – 290 μm por 14 – 15 μm . No 4º dia tem início a primeira muda. As L2 são imóveis e apresentam acúmulo lipídico, suas dimensões são aproximadamente 370 μm por 36 μm . A segunda muda se dá entre o 11º e o 14º dia e as L3 (460 μm – 480 μm por 28 μm), infectantes para o hospedeiro definitivo, são móveis e não apresentam acúmulo lipídico (Morera 1973) (Fig. 1).

Quanto à eliminação das larvas pelo molusco, os dados da literatura demonstram que se trata de um processo fortuito e mecânico dependendo, aparentemente, de granulomas localizados próximo ao tegumento (Morera & Céspedes 1971b, Conejo & Morera 1988, Mendonça et al. 2003). Devido à contração muscular, os granulomas que envolvem as L3 e se encontram próximo às glândulas do tegumento são rompidos, ocasionando a liberação das larvas para o exterior juntamente com a secreção mucosa (Mendonça et al. 2003). A baixa recuperação larvar no muco observada em infecções naturais (Rambo et al. 1997) e experimentais (Bonetti & Graeff & Teixeira, 1998) reforça o caráter acidental de sua eliminação (Fig. 1).

O hospedeiro definitivo se infecta pela ingestão de moluscos parasitados (Morera 1973) e/ou alimentos com muco contendo L3 (Tesh et al. 1973) (Fig. 2). A terceira muda ocorre no final do 3º e início do 4º dia, e, entre o 5º e o 7º dia, as L4 originam L5. Os vermes adultos atingem as artérias mesentéricas, seu habitat final, a partir do sistema linfático. A oviposição tem início a partir do 18º dia e pode-se observar L1 nas fezes 24 dias após a infecção (Mota & Lenzi, 1995, 2005).

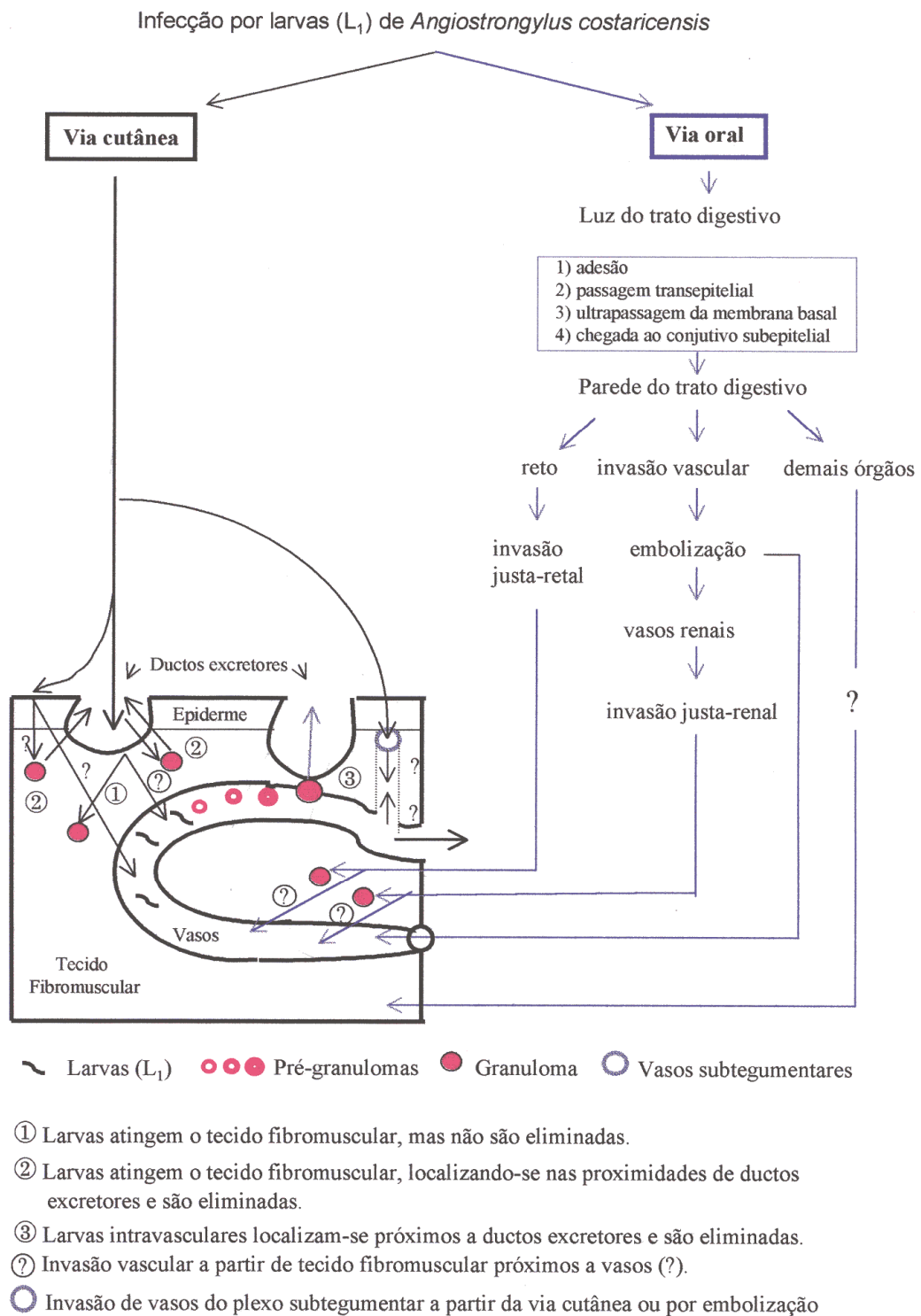


Figura 1: Via migratória no molusco *S. marginata*. Fonte: Mendonça (1999)

Quadro 1: Posição sistemática de *A. costaricensis*:

Reino Metazoa

Filo Nematoda

Classe Secernentea ou Phasmida

Ordem Strongylida

Super família Metastrongyloidea

Família Protostrongylidae

Gênero *Angiostrongylus*

Espécie *Angiostrongylus costaricensis*

(Ruppert 1996, Anderson 1992)

1.3 Hospedeiros definitivos de *A. costaricensis*

Os roedores são os hospedeiros definitivos de *A. costaricensis*, no entanto mamíferos de outras ordens foram encontrados naturalmente infectados. Um grande número de espécies pode ser parasitada por este nematódeo, indicando sua baixa especificidade em relação ao hospedeiro definitivo. A Tabela 2, abaixo, apresenta as espécies de mamíferos que foram encontradas naturalmente parasitadas:

ORDEM	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Rodentia	<i>Sigmodon hispidus</i>	Morera 1971
	<i>Rattus rattus</i>	Morera 1971
	<i>Zygodontomys microtinus</i>	Tesh et al. 1973
	<i>Liomys adspersus</i>	Tesh et al. 1973
	<i>Oryzomys fulvescens</i>	Tesh et al. 1973
	<i>O. caliginosus</i>	Malek 1981
	<i>Proechimys</i> sp	Santos 1985
	<i>R. norvegicus</i>	Morera 1986
	<i>L. salvini</i>	Morera 1986
	<i>Tylomys watsoni</i>	Morera 1986
	<i>Peromyscus nudipes</i>	Morera 1986
	<i>O. albigularis</i>	Morera 1986
	<i>O. nigripes</i>	Graeff Teixeira et al. 1990
	<i>O. ratticeps</i>	Graeff Teixeira et al. 1990
Primates	<i>Saguinus mystax</i>	Monge et al. 1978
	<i>Callithrix penicillata</i>	Monge et al. 1978
	<i>Homo sapiens sapiens</i>	Céspedes et al. 1967
Carnivora	<i>Nasua narica bullata</i>	Sly et al. 1982
	<i>Canis familiaris</i>	Rodriguez et al. 2002

Tabela 2: Espécies de mamíferos encontradas naturalmente parasitadas

O hospedeiro definitivo com maior importância epidemiológica na Costa Rica (Morera 1986) e no Panamá (Tesh et al. 1973) é *S. hispidus*, conhecido popularmente como rato do algodão. Nesses países foi verificada prevalência de infecção de respectivamente 25,9% e 24,0%. Tesh et al. (1973) atribuem as altas taxas de infecção ao hábito alimentar desse roedor, o qual preda invertebrados, inclusive os moluscos, os quais atuam como hospedeiros intermediários do parasito. Do ponto de vista epidemiológico essa espécie de roedor é muito importante uma vez que é freqüente no domicílio e peridomicílio, inclusive em plantações e hortas (Rey 1991) e tem ampla distribuição geográfica (do sul dos Estados Unidos até o norte do Peru). O principal responsável pela manutenção do ciclo no Brasil é *O. nigripes* (Graeff Teixeira et al 1990).

Morera (1986) supõe que os outros mamíferos, que foram encontrados naturalmente parasitados por *A. costaricensis*, apesar da baixa prevalência, podem desempenhar um importante papel na manutenção do ciclo na natureza.

1. 4 Hospedeiros intermediários de *A. costaricensis*

Como em relação a seus hospedeiros definitivos, *A. costaricensis* apresenta baixa especificidade também para os hospedeiros intermediários. Diversas espécies de diferentes ordens de pulmonados foram encontradas naturalmente infectadas, além daquelas que se mostraram susceptíveis em infecções experimentais (Tab. 3). No entanto, os moluscos da ordem Soleolifera, família Veronicellidae têm maior importância epidemiológica e em áreas endêmicas, foram observadas taxas de prevalência de até 50,0 % (Morera 1985).

1. 5 Sobre os moluscos

1.5.1 Aspectos gerais

O filo Mollusca é o terceiro grupo animal de maior sucesso depois dos artrópodes e vertebrados e possui aproximadamente 93.000 espécies (South 1992, Brusca & Brusca 2003). Embora os moluscos sejam celomados protostômios, o celoma é muito reduzido e a principal cavidade do corpo é a hemocele. O sistema circulatório é em geral aberto e na hemolinfa são encontrados as células do sistema interno de defesa (hemócitos, celomócitos, amebócitos) e os pigmentos respiratórios (hemocianina, hemoglobina e ou mioglobina) (Furuta & Yamaguchi 2001, Brusca&Brusca 2003). Lesmas, caracóis ou caramujos pertencem à classe Gastropoda que é dividida em três subclasses: Prosobranchia (Streptoneura), Opisthobranchia e Pulmonata (os dois últimos formando o grupo Euthyneura) (Brusca & Brusca, 2003). Pulmonata compreende principalmente as lesmas e caramujos terrestres hermafroditas e de água doce,

com poucas espécies marinhas. A subclasse é dividida em quatro ordens: Archaeopulmonata, Basommatophora, Stylommatophora e Systellommatophora (Brusca & Brusca, 2003).

A maioria dos gastrópodes terrestres (80%) pertence à subclasse Pulmonata, ordem Stylommatophora. Em muitas regiões do mundo eles dominam a fauna terrestre (Wade et al., 2001; Barker, 2001). São popularmente denominados caramujos ou caracóis e a concha pode estar presente, ausente ou reduzida (externa ou interna).

Em várias famílias de pulmonados a redução progressiva da concha, gerou a “forma de lesma” (sluglike), fenômeno conhecido como limacização. Na ordem Soleolifera: família Veronicellidae a concha é ausente enquanto na ordem Stylommatophora: família Limacidae esta é interna e reduzida. Acredita-se que a redução da concha possibilitou que estas espécies ocupassem habitats em que maioria dos caracóis não pode sobreviver devido à demanda de sais de cálcio. Além disso, a tolerância à dessecação, a compressão do corpo e o aspecto vermiforme possibilitam que esses moluscos se abriguem em fendas no solo (South 1992).

Nos Stylommatophora, os olhos estão na extremidade dos tentáculos posteriores. Segundo Paraense (1981), esse grupo se encontra mais restrito às regiões tropical e subtropical. Nessa ordem são encontrados grupos que apresentam limacização e que por tanto têm aparência semelhante às lesmas, no entanto, não são conhecidos como lesmas verdadeiras (pertencentes à ordem Soleolifera), pois apresentam concha (externa reduzida ou interna), cavidade pulmonar e recolhem os tentáculos invertendo-os, e não contraindo-os (Malek 1985).

South (1992) reporta que os danos causados por esses Stylommatophora sluglike em muitas culturas agrícolas têm sido avaliados em alguns países da Europa e vêm aumentando nos últimos 30 anos. Informações sobre a importância econômica das lesmas são difíceis de serem obtidas pela ausência de trabalhos específicos. Entretanto, esse autor listou as três espécies de “lesmas” estilomatóforas mais destrutivas em culturas agrícolas: *Deroceras reticulatum*, *Arion ater* e *Limax maximum*.

Tabela 3 : Revisão sobre posição sistemática e tipo de infecção registrada para diferentes moluscos ao *A. costaricensis*

Espécie	Ordem	Família	Infecção experimental	Infecção natural	Distribuição no Brasil
<i>Achatina fulica</i>	Stylommatophora	Achatinidae	Carvalho et al. (2003)		Espécie africana introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país.
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Basommatophora	Planorbidae	Ubelaker et al. (1980), Lima et al. (1992b).		Amplamente distribuída no Brasil (Paraense 1972, 1986, Paraense et al. 1983, Carvalho et al. 1998).
<i>B. straminea</i>	Basommatophora	Planorbidae	Lima et al. (1992b)		Distribuição mais densa nas áreas costeiras do sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais. Encontrada também em outros estados (Paraense 1972, 1986, Paraense et al. 1983)
<i>B. tenagophila</i>	Basommatophora	Planorbidae	Lima et al. (1992b).		Distribuída por larga faixa costeira, desde o sul da Bahia até Chui no Rio Grande do Sul. Populações isoladas encontradas no Distrito Federal e Minas Gerais (Paraense 1986).
<i>Bradybaena similares</i>	Stylommatophora			Gracff Teixeira et al. (1993), Rambo et al. (1997).	Espécie asiática introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país. (Araújo 1989).
<i>Deroceras laeve</i>	Stylommatophora	Agriolimacidae	Maurer et al. (2002)		Espécie europeia introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país.
<i>Helix aspersa</i>	Stylommatophora	Helicidae		Thiengo et al. (1993).	Espécie europeia introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país.
<i>Limax flavus</i>	Stylommatophora	Agriolimacidae		Gracff Teixeira et al. (1993), Rambo et al. (1997).	Espécie europeia introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país.
<i>L. maximus</i>	Stylommatophora	Agriolimacidae		Gracff Teixeira et al. (1993).	Espécie europeia introduzida no Brasil e de ampla distribuição no país.
<i>Megalobulimus sp.</i>	Stylommatophora	Megalobulimidae	Gracff Teixeira et al. (1991)		Ocorrência em vários estados brasileiros (Oliveira et al 1984).
<i>Belocaulus angustipes</i>	Soleolifera	Veronicellidae		Rambo et al. (1997).	
<i>Phyllocaulis boracaiensis</i>	Soleolifera	*Veronicellidae	Bonetti & Gracff Teixeira (1998)		Ocorre no Sul do Brasil de Minas Gerais a Santa Catarina (Bonetti & Gracff Teixeira 1998).
<i>P. soleiformis</i>	Soleolifera	*Veronicellidae	Bonetti & Gracff Teixeira (1998)	Thiengo et al. (1993), Gracff Teixeira et al. (1994), Rambo et al. (1997)	

1.5.2 Caracterização dos moluscos utilizados como modelo experimental

Para a realização das infecções experimentais foram selecionados moluscos de gêneros representantes das principais ordens de Pulmonata (Basommatophora, Stylommatophora e Soleolifera). A seguir serão caracterizados todos os gêneros que foram utilizados como modelo experimental no estudo da interação de *A. costaricensis* com os moluscos pulmonados.

1.5.2.1 Gênero *Biomphalaria*: Família Planorbidae: Ordem Basommatophora

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são pulmonados aquáticos (subclasse: Pulmonata) pertencentes à família Planorbidae, ordem Basommatophora (basis, base; ommatos, olho; pherein, portar). Essa ordem está representada nas águas continentais da América do Sul tropical pelas famílias Chiliniidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Planorbidae (Paraense 1981).

Algumas espécies da família Lymnaeidae (gênero *Lymnaea*) podem atuar como hospedeiras intermediárias da *Fasciola hepatica*, trematódeo causador da fasciolose (Magalhães et al. 2004). Nas Américas e na África os moluscos do gênero *Biomphalaria* atuam como hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. Estes moluscos possuem concha plano50spirar que pode variar em diâmetro nos adultos entre 7mm à 40mm e largura entre 2mm e 15mm (Paraense 1972). Na cabeça projetam50 dois tentáculos e na base desses encontram50 os olhos (Basommatophora).

As bionfalárias são hermafroditas capazes de realizar autofecundação e fecundação cruzada. Na região do colo estão presentes as duas aberturas genitais separadamente (Prancha 1, Fig. 1A). As figuras 1B e 1C (Prancha 1) mostram o posicionamento dos órgãos e do sistema reprodutor desses moluscos (Paraense & Deslandes 1955, Paraense 1972). Quando criados em isolamento, se reproduzem por autofecundação por muitas gerações. Porém, nas populações de campo ou de laboratório, a fecundação cruzada é priorizada. O número de ovos por desova varia de um a mais de 100 e a eclosão normalmente se inicia sete dias após a postura. Esses planorbídeos são dotados de notável precocidade sexual uma vez que, 30 dias após a eclosão, podem alcançar a maturidade sexual (Paraense 1953, 1955, 1972, 1976a). Essa espécie é susceptível ao *A. costaricensis* em infecções experimentais (Tab. 3).



Fig 1.A: *Biomphalaria glabrata*, escala: barra = 5mm

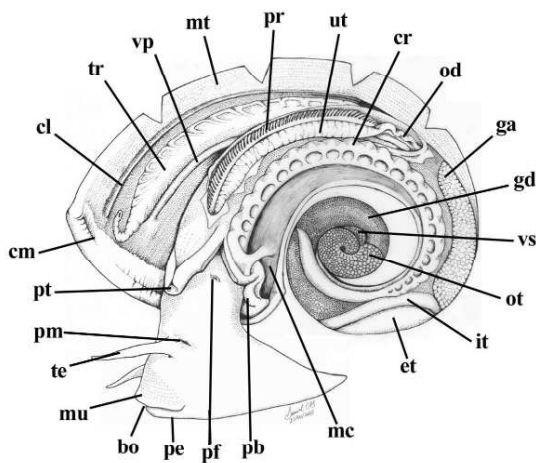


Fig 1.B: Anatomia Interna, lado esquerdo

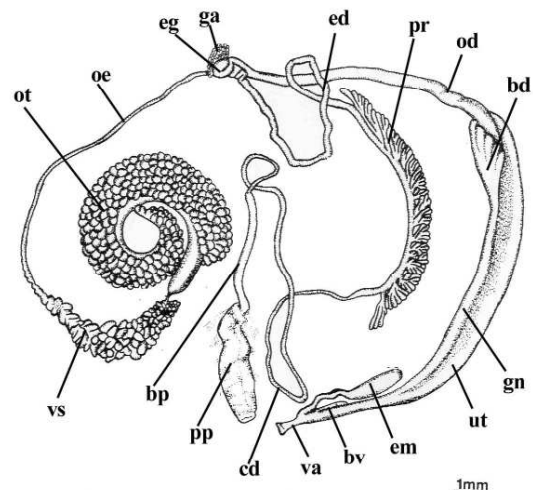



Fig 1.C: Sistema Reprodutor (Paraense 1975)
Legenda modificada

Legenda: **bd** - Bolsa do Oviduto, **bo** - Boca, **bp** - Bainha do Penis, **bv** - Bolsa Vaginal, **ed** - Espermiduto, **eg** - Encruzilhada Genital, **cm** - Colar do Manto, **cl** - Crista Lateral, **cr** - Crista Retal, **em** - Espermateca, **et** - Estômago, **ga** - Glândula de Albúmem, **gd** - Glândula Digestiva, **gn** - Glândula Nidamental, **it** - Intestino, **mc** - Musculo Columelar, **mu** - Mufla, **mt** - Manto, **od** - Oviduto, **oe** - Ovispermiduto, **ot** - Ovoteste, **pb** - Pseubranquia, **pe** - Sola do Pé, **pf** - Poro Genital Feminino, **pm** - Poro Genital Masculino, **pp** - Preucio do Penis, **pr** - Próstata, **pt** - Pneumostoma, **te** - Tentáculo, **tr** - Tubo Renal, **ut** - Útero, **va** - Vagina, **vp** - Veia Pulmonar, **vs** - Vesicula Seminal



Ilustração: Daniel Coscarelli


Fonte: Vidigal *et al* (em prep)

1.5.2.2 Gênero *Deroceras*: Família Limacidae: Ordem Stylommatophora

Os exemplares da família Limacidae passaram pelo processo de limacização (descrito acima), apresentando, portanto, morfologia externa semelhante à das lesmas (as lesmas “verdadeiras” são da ordem Soleolifera). O gênero *Deroceras* (Prancha 2, Fig. 2A) inclui espécimes pequenos (5  cm de comprimento) com concha interna vestigial (coberta pelo manto) localizada na região dorsal anterior do animal. São moluscos hermafroditas, com poro genital único e abertura anal na lateral anterior, à direita do corpo. As figuras 2B e C (Prancha 2), mostram o posicionamento dos órgãos desses moluscos, bem como seu sistema reprodutor.

Amplamente distribuído na Europa, o gênero *Deroceras* foi introduzido em várias regiões do mundo. Algumas espécies têm sido encontradas na América do Norte, Austrália e são consideradas pragas na Inglaterra (South 1992). Estão entre as espécies introduzidas amplamente distribuídas na América do Sul, inclusive no Brasil (Fernandes 1982, Chiaridia et al. 2004). Moluscos deste gênero atuam como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* (Alicata 1965) e, em relação a *A. costaricensis*, foram recuperadas larvas de metastrongilóides a partir de espécimes coletados em áreas endêmicas na região sul do Brasil (Maurer et al. 2002).

Alguns autores referem  ao gênero *Deroceras* como integrante da família Agriolimacidae. Entretanto, revisões recentes consideram *Limax* e *Deroceras* representantes da família Limacidae (South 1992). A denominação *Deroceras* (Rafinesque  Schmaltz, 1820) tem sido utilizada por muitos autores americanos e europeus. Entretanto, autores britânicos têm se referido ao gênero como *Agriolimax* (Morch, 1865).

Quanto ao aspecto reprodutivo, esses moluscos são hermafroditas e protoândrios. A fecundação cruzada é usual embora autofecundação seja observada em culturas de laboratório. Stephenson (1968) reporta que a maturidade sexual pode ser atingida antes que os indivíduos alcancem o crescimento total. É referido que a 15°C alguns indivíduos desse gênero podem ovipor com 118 dias e 2,5 cm de comprimento. Sobre a influência da temperatura na eclosão dos ovos, South (1992) relata experimentos, mostrando que a 20  21°C os ovos de *D. reticulatum* eclodem em 18 a 22 dias, ocorrendo variações de acordo com as condições ambientais e a espécie (20 a 40 dias). Geralmente, em uma mesma desova, o tempo de eclosão dos ovos pode variar, bem como o número de ovos e o período de incubação, entre e dentro das espécies. Para *D. reticulatum* são atribuídos 500 ovos por ano, com uma média de 22 ovos por desova. Em condições favoráveis, esses moluscos podem se

reproduzir continuamente durante todo o ano (South 1992). Stephenson (1968) comenta que a longevidade depende da espécie, atingindo 9 a 13 meses em *A. reticulatus*. Heller (2001) ressalta que a considerável variação no número de ovos entre espécies está relacionada ao tamanho e idade do animal parental, condições ambientais e competição intra e interespecífica.

Prancha2: *Deroceras* sp.



Fig 2.A: *Deroceras* sp.

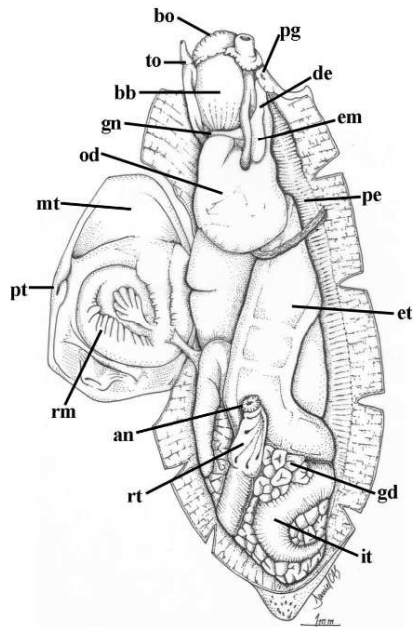


Fig 2.B: Anatomia Interna, vista dorsal

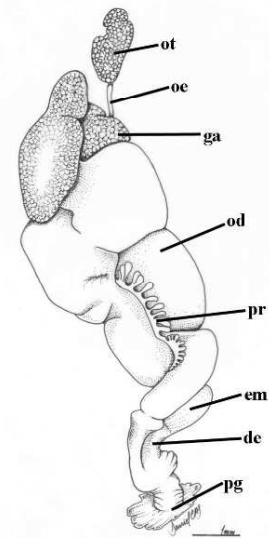


Fig 2.C: Sistema Reprodutor, vista ventral

Legenda: **an** – Ânus, **bb** – Bulbo Bucal, **bo** – Boca, **de** – Ducto da Espermateca, **em** – Espermateca, **et** – Estômago, **ga** – Glândula de Albúmem, **gd** – Glândula Digestiva, **gn** – Gânglios Nervosos, **it** – Intestino, **mt** – Manto, **od** – Oviduto, **oe** – Ovispermiduto, **ot** – Ovoteste, **pe** – Sola do Pé, **pg** – Poro Genital, **pr** – Próstata, **pt** – Pneumostoma, **rm** – Rim, **rt** – Reto, **to** – Tentáculo Óptico.

Ilustração: Daniel Coscarelli

Fonte: Vidigal *et al* (em prep)

1.5.2.3 Gênero *Omalonyx*: Família Succineidae: Ordem Stylommatophora

A família Succineidae apresenta grande variação morfológica e é amplamente distribuída no mundo. Os moluscos do gênero *Omalonyx* (Fig.3A), são pulmonados terrestres hermafroditas, herbívoros e reproduzem-se por autofecundação ou fecundação cruzada (Barker, 2001). O formato corporal é semelhante ao de lesmas (slug-like), com pequena concha dorsal de formato ovóide, externa, localizando sobre a região visceral à qual é presa, em sua circunferência, por uma pequena projeção do manto. No colo, no lado direito do animal, está localizada, anteriormente, a abertura genital única. O pneumóstoma encontra-se posteriormente a essa, seguido da abertura do ânus. As figuras 3B e 3C (Prancha 3) mostram o posicionamento dos órgãos e o sistema reprodutor (anatomia interna).

Os succineídeos são considerados como um grupo especial por compartilharem características morfológicas com representantes considerados mais primitivos como os Basommatophora e Opisthobranchia. A posição sistemática dos succineídeos dentro dos Stylommatophora tem sido objeto de discussão (Patterson 1971, Barker, 2001). Patterson (1971) ressalta a importância do estudo dessa família. Dutra-Clarke et al. (2001) usando dados moleculares afirmam que os succineídeos ocupam uma posição chave na elucidação das etapas na evolução dos pulmonados.

Segundo Patterson (1971) o gênero *Omalonyx* encontra-se nas regiões do Caribe, nas Américas Central e do Sul. Segundo Tiller (1981) *Omalonyx* (*Omalonyx*) *unguis* é a espécie tipo (Fischer, 1874) e provavelmente ocorre em todas as regiões da bacia do Paraná e do Paraguai. Tiller (1981), enfatizando que o gênero é amplamente distribuído na América do Sul, chama atenção ainda para o reduzido número de estudos. Muitas espécies dessa família ocorrem em pântanos, brejos e margem de lagos e podem ser encontradas em solo úmido ou sobre vegetação emergente de sistemas de água doce. Considerando esses aspectos muitas vezes essas espécies são incorretamente caracterizadas como anfíbias. Entretanto, como a respiração se dá estritamente através do ar e não existe dependência da água para a alimentação ou reprodução, esses moluscos são terrestres. Várias espécies são conhecidas por se dispersarem passivamente sob a lâmina d'água (Barker, 2001).

Estudos sobre os aspectos reprodutivos básicos de *Omalonyx* estão em andamento (Montresor et al. Manus. in prep.). No entanto, experimentos preliminares demonstram que, em condições de laboratório, a sua primeira postura ocorre aproximadamente aos $75,4 \pm 5,83$ dias de vida, quando apresentam uma massa corpórea de $0,388 \pm 0,07$ g. O intervalo entre as posturas em exemplares jovens é de $3,2 \pm 1,2$ dia. Cada desova obtida contém em média

18,25 ± 5,8 ovos, sendo que 96% deles eclode com 18 ± 3,5 dias após a postura. A período que decorre desde o início até o final da eclosão das desovas é de 3,11 ± 1,55 dia. A longevidade máxima observada em condições de laboratório foi de 335 dias. Em nossas observações, em laboratório, temos verificado que esses moluscos são muito sensíveis a variações de temperatura.

Quanto à importância parasitológica do gênero *Omalonyx* (d'Orbigny, 1835), em 1921 Lutz encontrou no Rio de Janeiro espécimes infectados por *Leucochloridium*, um trematódeo digenético parasito de aves aquáticas. No entanto, exemplares da família Succineidae (gênero *Succinea*) são referidos como hospedeiros intermediários da *F. hepatica* (Pessoa & Martins 1977).

Prancha 3: *Omalonyx* sp.



Fig 3.A: *Omalonyx matheroni*

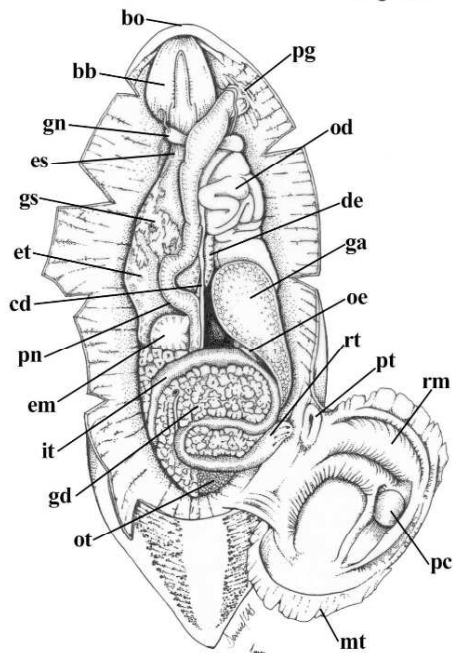


Fig 3.B: Anatomia Interna, vista dorsal

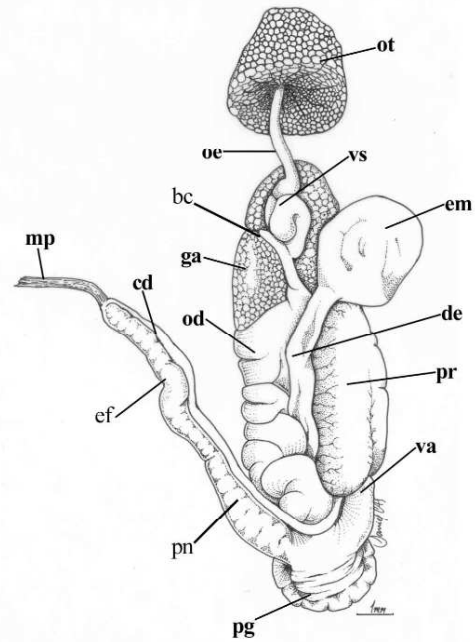


Fig 3.C: Sistema Reprodutor, vista ventral

Legenda: **bb** – Bulbo Bucal, **bc** - Bolsa Copulatória, **bo** – Boca, **cd** – Canal Deferente, **de** – Ducto da Espermateca, **em** – Espermateca, **ef** - Epifalo, **es** – Esôfago, **et** – Estômago, **ga** – Glândula de Albúmem, **gd** – Glândula Digestiva, **gn** – Gânglios Nervosos, **gs** – Glândula Salivar, **it** – Intestino, **mp** – Músculo Retrator do Pênis, **mt** – Manto, **od** – Oviduto, **oe** – Ovispermiduto, **ot** – Ovoteste, **pc** – Pericárdio, **pg** – Poro Genital, **pn** – Pênis, **pr** – Próstata, **pt** – Pneumostoma, **rm** – Rim, **rt** – Reto, **ut** – Útero, **va** – Vagina, **vs** – Vesícula Seminal.

Ilustração: Daniel Coscarelli

Fonte: Vidigal *et al* (em prep)

1.5.2.4 Gênero *Sarasinula*: Família Veronicellidae: Ordem Soleolifera

A família Veronicellidae Gray, 1840 pertence à ordem Soleolifera Simroth, 1890 (também conhecida como Systellommatophora Pilsbry, 1948). Sua ocorrência é pantropical, sendo encontrada nas Américas desde do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile, predominando a ocorrência nas Antilhas, norte dos Andes e sul do Brasil (Thomé 1975a, 1993). Segundo Thomé (1975b), a posição filogenética da família está em discussão, admitindo-se dentro da ordem Soleolifera a família Onchiidae e Rathousiidae. Essa ordem é considerada a mais primitiva entre os Pulmonata ou um ramo aberrante dentro dessa classe, contudo é mencionada também como próxima aos Opisthobranchia. De fato, Tillier et al (2002), analisando vários caracteres morfológicos no seu estudo sobre as relações evolutivas dentro dos Euthyneura, reporta a não definição de caracteres sinapomórfico para os Systellommatophora.

Esses animais se caracterizam pela ausência de concha, mesmo na fase embrionária. O corpo é coberto totalmente pelo manto e na região cefálica encontram-se dois pares de tentáculos, sendo os inferiores bifurcados e com função tátil e os superiores omatóforos contráteis. O ânus é posterior e as aberturas genitais são distanciadas (masculina na frente, na base do tentáculo e a feminina na metade longitudinal do hiponoto direito) (Thomé & Lopes 1973, Thomé 1975b). Essa família é considerada como praga em algumas culturas e sua importância como hospedeira de parasitoses humanas, como a angiostrongilíase abdominal, tem sido amplamente investigada (Thomé 1993). Chiaradia et al (2004) referem a implicação agrícola e epidemiológica da presença de lesmas em hortas. As figuras 4A, 4B e 4C (Prancha 4) ilustram o aspecto externo de *S. marginata* e o posicionamento dos órgãos e do sistema reprodutivo.

Os dados de biologia básica disponíveis referem-se à espécie *S. linguiformes*. Chiaradia et al (2004) relatam que, em condições de laboratório, essa espécie alcança a fase reprodutiva com aproximadamente 179 dias, realiza posturas a cada 20 dias, com aproximadamente 49 ovos por desova e com período de incubação de 16 dias, aproximadamente. Sabe-se que esses dados podem variar de acordo com a espécie, porém, na ausência de estudos em *S. marginata*, foram apresentados resultados de outra espécie do mesmo gênero.

Prancha 4: *Sarasinula* sp.



Fig 4.A: *Sarasinula* sp.

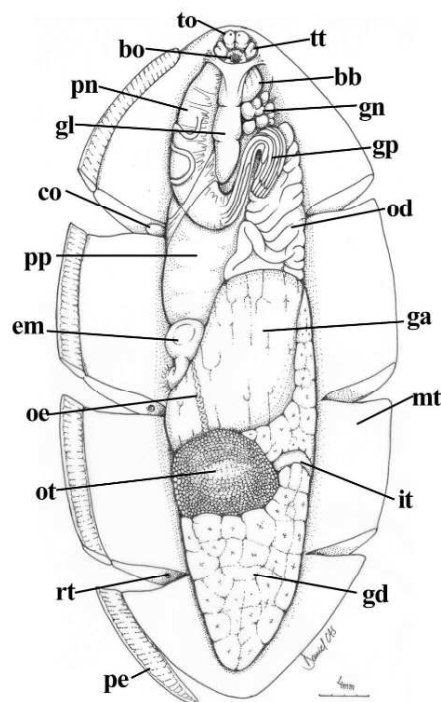


Fig4.B: Anatomia Interna, vista ventral

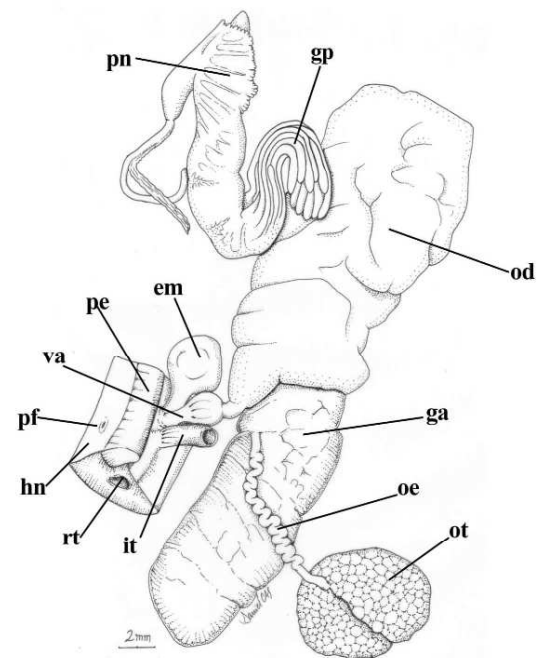


Fig4.C: Sistema Reprodutor, vista ventral

Legenda: bb - Bulbo Bucal, bo - Boca, co - Coração, em - Espermateca, ga - Glândula de Albúmem, gd - Glândula Digestiva, gn - Gânglios Nervosos, gl - Glândula Podal, gp - Glândula peniana, hn - Hiponoto, it - Intestino, mt - Manto, od - Oviduto, oe - Ovispermiduto, ot - Ovoteste, pe - Sola do Pé, pf - Poro Genital Feminino, pn - Pênis, pp - Papo, rt - Reto, to - Tentáculo Óptico, tt - Tentáculo Tátil, va - Vagina.

Ilustração: Daniel Coscarelli

Fonte: Vidigal *et al* (em prep)

1.5.3 Moluscos como hospedeiros de helmintos

A classe Gastropoda consiste no principal grupo que se encontra relacionado à maior parte dos parasitos de interesse médico e veterinário, os quais incluem nematódeos e platelmintos. Apesar dos moluscos atuarem como hospedeiros intermediários e/ ou definitivos de diversos helmintos, as doenças causadas por trematódeos digeneicos são mais numerosas e apresentam maior distribuição em relação àquelas atribuídas aos nematódeos (Malek 1980, South 1992).

A esquistossomose e a fasciolose são exemplos de parasitoses de grande abrangência causadas por trematódeos. É importante ressaltar que a esquistossomose mansoni atinge milhões de pessoas no mundo, inclusive no Brasil, onde se verifica a existência de diversas áreas endêmicas (WHO 1993, 1998, Katz & Peixoto 2000, Coura & Amaral 2004). A fasciolose atinge principalmente rebanhos de bovinos e ovinos, porém, casos humanos vêm sendo registrados em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil (Lessa et al. 2000, Mas⁵⁰ Coma et al 2001).

Outros gastrópodes podem ser citados como hospedeiros de trematódeos de interesse médico, como algumas espécies da família Hydrobiidae, que são hospedeiros intermediários de helmintos trematódeos do gênero *Paragonimus* e espécies do gênero *Oncomelania*, hospedeiras do *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904. *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Bradybaenidae) atua no ciclo de *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1882 (Trematoda: Dicrocoeliidae) Os pulmonados da ordem Basommatophora têm grande importância na transmissão de trematódeos digeneicos a seus hospedeiros definitivos (Malek 1980, 1985, Souza & Lima 1997).

No que se refere aos nematódeos, os moluscos têm importância como hospedeiros de dois grupos, os metastrongilóides e os rhabditídeos. Das 61 espécies de nematódeos que sabidamente têm moluscos como hospedeiros intermediários, 49 são *Metastrongyloidea* (Ordem: Strongylida) e, das 47 espécies que utilizam moluscos como hospedeiros definitivos, 33 pertencem à ordem Rhabditida (Grewal et al. 2003). Assim sendo, a maioria dos nematódeos da superfamília *Metastrongyloidea*, antes de atingir o hospedeiro vertebrado, desenvolvem seus estádios larvares iniciais em moluscos gastrópodes ⁵⁰terrestres e/ ou de água doce (Malek 1980). As espécies mais estudadas são *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* e *A. vasorum*, em decorrência do interesse médico e/ ou veterinário desses parasitas.

Uma característica incomum da super família *Metastrongyloidea* é sua baixa

especificidade em relação ao hospedeiro intermediário. Há décadas foi reportado que larvas de *A. cantonensis*, parasito causador da meningite eosinofílica, são infectantes para uma ampla variedade de moluscos de água doce e terrestre (Malek & Cheng, 1974). *A. costaricensis* também tem apresentado essa característica (Tab. 3).

South (1992) faz uma revisão sobre a participação de gastrópodes como hospedeiros intermediários de parasitos (trematódeos, cestódeos e nematódeos), que atingem animais domésticos e selvagens. De fato, a lesma *Arion ater* é mencionada como hospedeira intermediária do cestódeo *Hymenolepis multiformis*.

1.5.4 O sistema imunológico pré-linfocitário e os moluscos

Os invertebrados constituem mais de 90% de todas as espécies encontradas no planeta Terra, demonstrando assim a eficiência de seus mecanismos de defesa, comumente designados de primitivos ou inferiores devido ao desconhecimento a respeito de seus aspectos moleculares (Beck & Habicht 1996, Beck 1998, Hoffmann 2004). Até os mais antigos protozoários têm a capacidade de distinguir entre o próprio e o não próprio (Beck 1998). No entanto, diferentemente dos vertebrados, os invertebrados não apresentam linfócitos, moléculas para o reconhecimento específico especializado como imunoglobulinas (e seus receptores) e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Beck 1998). Os invertebrados apresentam unicamente o sistema imunológico inato (pré-linfóide), o qual é filogeneticamente conservado e encontrado presente na maior parte dos organismos multicelulares, constituindo a primeira forma de defesa (Takeda & Akira 2003).

Recentemente, Sadaaki & Lee (2005) fizeram uma revisão, referindo o conhecimento atual sobre o sistema de defesa de invertebrados e suas estratégias para detectar e responder a antígenos de superfícies como a lipossacarídeos, ácidos lipoprotéicos, lipoproteínas, peptidoglicanos e β -glucanos. Eles destacaram os principais sistemas biológicos de defesa dos invertebrados, ressaltando que esses também são encontrados em vertebrados. Isso indica que provavelmente o sistema de reconhecimento dos epítomos acima referidos, por parte de vertebrados, tenha surgido em um estágio anterior da sua evolução.

A presença de patógenos desencadeia mecanismos celulares e humorais no sistema de defesa inato dos invertebrados (Beck 1998). Uma característica desse sistema, também encontrada nos vertebrados, é a capacidade de discriminar entre antígenos próprios e um grande número de antígenos de patógenos potenciais, utilizando um número restrito de receptores (Aderem & Ulevitch 2000). A estratégia do sistema inato não é apresentar ligantes para o maior número de antígenos possíveis e sim reconhecer algumas estruturas altamente

conservadas presentes em um grande número de patógenos (Medzhitov & Janeway 2000).

A resposta celular é mediada por hemócitos (ou celomócitos ou amebócitos) fagocíticos que se aglutinam (e/ ou encapsulam) ao redor dos patógenos e geram intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), bem como as enzimas associadas (NADPH, NOS), lectinas, moléculas semelhantes a citocinas (citokine-like) e diversos peptídeos, que atuam em bactéria e fungos. Existem evidências de que os elementos citotóxicos da cascata proteolítica da melanina podem ser empregados como forma de defesa, principalmente no caso dos parasitos metazoários. Dessa forma, os componentes celulares e humorais do sistema imunológico dos invertebrados atuam conjuntamente durante os processos de resposta a patógenos (Beck 1998, Nappi & Ottaviani 2000).

O filo Mollusca é o segundo maior grupo de invertebrados. Seu sucesso adaptativo é um indicativo de sua capacidade de sobrevivência, e alguns mecanismos de resistência a patógenos têm sido reportados como uma vantagem seletiva (Fletcher & Cooper-Willis 1982, Hoffam et al. 1999, Salzet 2001). O sistema imunológico dos moluscos, como descrito acima para os invertebrados, não apresenta linfócitos e compreende elementos celulares e humorais, que atuam conjuntamente (Van der Knaap & Loker 1990, Coelho 1995).

Segundo Van der Knaap & Loker (1990) existem quatro tipos de células de defesa nos moluscos, sendo três tipos fixos e um circulante. As células fixas são: células endoteliais bloqueadoras de antígenos, células reticulares e as células porosas.

Células endoteliais: revestem os vasos sanguíneos e são importantes na primeira fase da defesa. A presença de receptores de carboidratos proporciona a adesão de partículas estranhas, facilitando o seu reconhecimento pelos hemócitos circulantes, impedindo a disseminação de microorganismos (Van der Knaap & Loker 1990). Células reticulares: estão ancoradas ao tecido por fibrilas extracelulares e apresentam lisossomos amplos, um proeminente complexo de Golgi e, ocasionalmente, retículo endoplasmático dilatado. Possuem uma grande capacidade de fagocitose, particularmente, de material não próprio (Sminia et al. 1974, Van der Knaap & Loker 1990). Células porosas: apresentam núcleo grande e redondo e nucléolo consistente, com inúmeros grânulos pretos. Essas células estão relacionadas com a endocitose seletiva de proteínas. Segundo Van der Knaap & Loker (1990) ainda não está clara a participação delas nas infecções por trematódeos. As células circulantes são denominadas hemócitos ou celomócitos ou amebócitos, são encontradas na hemolinfa e são as consideradas as principais células de defesa dos moluscos. Elas têm papel primordial na defesa contra larvas de trematódeos digeneicos. Como o sistema circulatório básico dos

moluscos é em geral aberto, os hemócitos podem mover-se livremente para dentro e fora dos tecidos (Van der Knaap & Loker 1990). Generalizando, o sistema circulatório aberto da maioria dos moluscos é caracterizado por um coração, contido no pericárdio que consta de uma aurícula, que recebe o sangue da veia pulmonar e de um ventrículo, que o impele através da aorta. Esta se divide em troncos arteriais cujas ramificações levam o sangue para as vísceras e para a região cabeça – pé (Prancha 5). Na ausência de um sistema capilar, o sangue que atinge estes locais insinua-se através dos espaços pseudovasculares do tecido conjuntivo. No seu retorno, o sangue acumula-se em três grandes espaços, os seios cefalopodal, visceral e subrenal, de onde é propelido através da parede pulmonar para ser reoxigenado e encaminhado para as veias renal e pulmonar, e desta última para o coração (Paraense 1973).

Dois tipos de hemócitos (celomócitos, amebócitos) têm sido identificados na hemolinfa de gastrópodes e o significado funcional da heterogeneidade morfológica e bioquímica tem sido discutido (Van der Knaap & Loker 1990, Humphries & Yoshino 2003). Os hialinócitos: pequenos hemócitos (5 – 8 μm) esféricos, com núcleos grandes, envolvidos por finas camadas citoplasmáticas. Apresentam pouca tendência em formar pseudópodes e pouca estrutura lisossomal. Representam 10% dos hemócitos circulantes. Os granulócitos, hemócitos grandes (7 – 15 μm) e polimórficos compreendem mais de 90% das células circulantes, formam pseudópodes e são ativos na fagocitose sendo consideradas as células mais importantes nas infecções por trematódeos (Van der Knaap & Loker 1990, Barraco et al. 1993, Bayne et al. 2001). Os granulócitos de Gastropoda foram considerados células funcionalmente semelhantes a macrófagos de mamíferos (Bayne 1980a).

Prancha 5: Sistema Circulatório de Stylommatophora

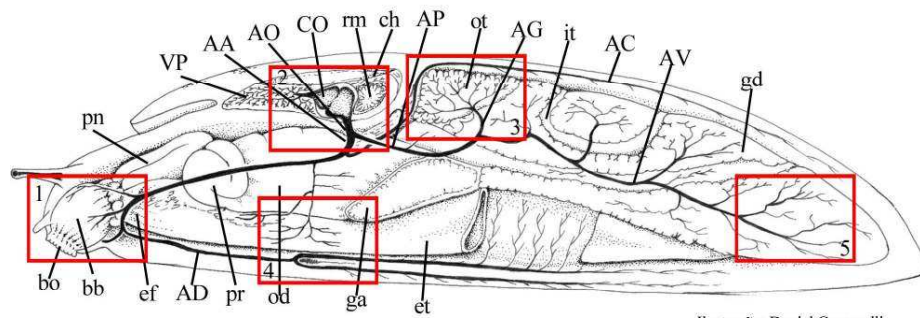
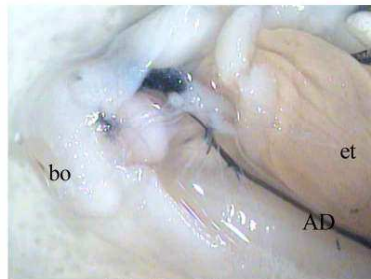
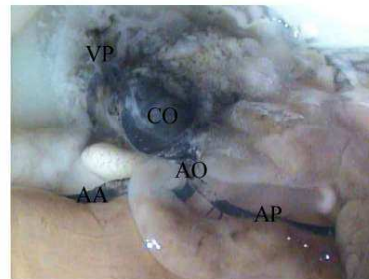


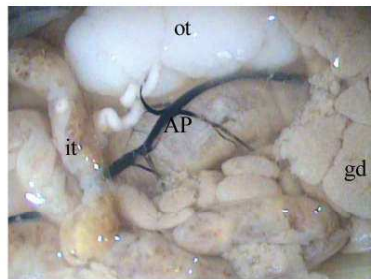
Ilustração: Daniel Coscarelli



1: Região cefálica



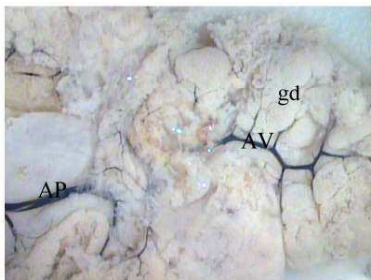
2: Coração



3: Ovoteste



4: Região podal



5: Glândula Digestiva, parte final do corpo

Legenda do Sistema Circulatório: AA, Aorta Anterior; AC, Arteria Anterior Dorsal, AG, Arteria da Gonoda; AO, Aorta; AP, Aorta Posterior; AV, Arteria Visceral; CO, Coração; VP, Veias Pulmonares.

Legenda da Anatomia: bb, Bulbo Bucal; bo, Boca; ch, Concha Interna; ef, Esofago; et, Estômago; ga, Glândula de Albumen; gd, Glândula Digestiva; it, Intestino; ot, Ovoteste; pn, Penis; pr, Próstata; rm, Rim.

Fonte: Vidigal *et al* (em prep)

Trabalhos recentes têm reforçado a importância dos hemócitos em diversos processos biológicos dos moluscos. Os processos de fagocitose, de encapsulação e a expressão de diversos receptores de membrana e moléculas sinalizadoras têm reforçado seu papel na transdução de sinais do sistema imunológico inato (Humphries & Yoshino 2003). As funções imunoneuroendócrinas (Ottaviani 2004) e de síntese de matriz extracelular (Franchini & Ottaviani 2000) também têm sido atribuídas aos hemócitos.

Furuta & Yamaguchi (2001) reportaram que vários sítios de hematopoiese (termo dado à formação de células sanguíneas) têm sido descritos em gastrópodes e que, nestes animais terrestres, a formação dos hemócitos ocorre nos tecidos e sistema vascular. Jeong et al (1983) reportam que o órgão hemotopoiético ou APO (Amebocyte Productor Organ – APO) é formado por um pequeno número de ameboblastos primários restritos as células epiteliais que formam o pericárdio. Eles se localizam em um tecido frouxo, formado por extensões de músculos e por células fibroblásticas..

1.5.5 As interações molusco – helminto

Tendo em vista a importância epidemiológica das várias formas de esquistossomose e fasciolose, o estudo da relação molusco/ helminto, inclusive no que se refere à resposta tecidual ao parasito, enfatiza as parasitoses, envolvendo pulmonados da ordem Basommatophora e trematódeos digenéticos (Newton, 1952; Van der Knaap & Loker 1990, Borges, 1998; Yakovleva et al. 2001, Bayne et al. 2001). De fato, a complexidade do sistema trematódeo-molusco tem sido intensamente estudada (Van der Knaap & Loker 1990, Bayne et al. 2001, Sorensen & Mincella 2001, Webster & Davies 2001, Lewis et al. 2001, Jones et al. 2001). A associação entre *B. glabrata* e *S. mansoni* é um desses sistemas e, do ponto de vista celular e molecular, é uma relação complexa que envolve, principalmente, os hemócitos circulantes. A resistência desses caramujos à infecção por esse trematódeo tem sido atribuída à capacidade dos hemócitos de circunscrever e destruir o miracídio recém penetrado. A capacidade dos hemócitos de responder a agentes quimiotáticos tem sido demonstrada (Van der Knaap & Loker 1990).

Lodes & Yoshino (1990) mostraram que a acumulação de hemócitos ao redor dos esporocistos de *S. mansoni* está associada à liberação de produtos por parte do agente parasitário, que estimulam a motilidade dos hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata*, mas inibem a motilidade de hemócitos de cepas susceptíveis. Bezerra et al. (1997) demonstraram que o número de hemócitos em duas espécies de *Biomphalaria* livres de infecção, tanto na linhagem resistente quanto susceptível foram semelhantes. Entretanto, após

5 horas de infecção, a diminuição do número de hemócitos foi mais intensa nas linhagens resistentes. Esses autores relacionaram a diminuição de hemócitos circulantes em *Biomphalaria* com seu recrutamento para o local da infecção, concluindo que a quimiotaxia e a encapsulação do esporocisto primário por hemócitos circulantes são fenômenos que ocorrem em poucas horas, sendo fundamentais para o sucesso do parasito no molusco hospedeiro. O contato de hemócitos com o tegumento do parasito (esporocisto no caso) resulta em sua encapsulação e, em alguns casos, em sua destruição. Bayne et al (1984) mostraram, *in vitro*, que hemócitos de *B. glabrata* resistentes e susceptíveis são capazes de encapsular os esporocistos, porém, somente em linhagens resistentes, são capazes de causar algum dano ao tegumento do esporocisto. Van der Knaap & Loker (1990) destacaram que a encapsulação não resulta inevitavelmente na morte do parasito e ressaltaram o pouco conhecimento existente sobre a regulação desse fenômeno.

A emissão agressiva de pseudópodes pelos hemócitos de linhagens resistentes pode, talvez, destruir diretamente o tegumento sincicial de esporocistos que atua como uma estrutura necessária para a aquisição de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico (Van der Knaap & Loker 1990).

Os mecanismos através dos quais os hemócitos destroem o parasito ainda não foram completamente elucidados (Adema et al. 1997). Várias lacunas ainda devem ser preenchidas para melhor entendimento da associação molusco-*Trematodéos*. De fato, Araque et al. (2003), estudando a interação *B. glabrata* e *S. mansoni* através da microscopia fotônica e pela técnica de criofatura com uso de réplica, discutiram a atividade de hemócitos e os fatores necessários ao seu estímulo. Ressaltaram que os resultados obtidos suportam a hipótese de que essas células migram, independentemente de sua compatibilidade com a larva (miracídio) e que a o arranjo em várias camadas celulares em volta do miracídio é consistente com a resposta de encapsulação observada em tecidos de moluscos (Loker et al.1982).

Vários sistemas molusco-*Helminto* (principalmente os parasitos de animais domésticos e de humanos) são conhecidos. O entendimento dessa interação é essencial não só para compreensão da doença, mas também para o entendimento da biologia do parasito no hospedeiro, das alterações provocadas e para a elucidação de aspectos relativos à evolução do sistema imunológico e do parasitismo.

Nematódeos metastrongilóides têm sido reportados como agentes infectantes de moluscos, os quais são seus hospedeiros intermediários (Cheng & Alicata 1965). No entanto o sistema, Mollusca-*Nematoda* é bem menos estudado que o Mollusca-*Trematoda*.

Estudando o processo de encapsulação em *B. glabrata* infectados com *A. cantonensis* por microscopia, Harris & Cheng (1975) ressaltaram que o parasito é encapsulado, mas não destruído. Richard & Meritt (1967) têm descrito a formação de nódulos em *B. glabrata* parasitada com L3 de *A. cantonensis* bem como sua rota de infecção. Harris & Cheng (1975) mostraram a resposta celular de *B. glabrata* a *A. cantonensis* evidenciada pela agregação de amebócitos e fibroblastos na encapsulação larval. Analisando a interação entre outras espécies de moluscos e esse nematóide, constataram diferenças no fenômeno de encapsulação e destacaram que, para o bivalve *Crassostrea virginica* e *A. cantonensis*, não ocorre encapsulação larvar, embora reação celular seja observada. De fato, Yakovleva et al. (2001) verificaram que as estratégias de defesa diferem entre gastrópodes e bivalves.

O estudo da relação entre os nematódeos da superfamília *Metastrongyloidea* e os moluscos tem muito a acrescentar ao conhecimento dos mecanismos de defesa dos invertebrados. Tendo em vista que várias espécies de gastrópodes podem atuar como hospedeiros intermediários desses parasitos, é possível a realização de estudos comparativos, abordando diversos aspectos do parasitismo. Uma característica intrigante no modelo (molusco – metastrongilóide) é a manutenção da integridade dos parasitos no interior da cápsula celular que os circunda (Hobmaier & Hobmaier 1934, Harris & Cheng 1975). Mendonça et al. (1999, 2003) também observaram que, em *S. marginata*, os granulomas que envolvem as larvas de *A. costaricensis*, não afetam o seu desenvolvimento, ao contrário, parece que contribuem para a manutenção de sua integridade e facilitam sua eliminação para o exterior do hospedeiro. Esse fenômeno indica que os parasitos são capazes de utilizar em seu benefício o sistema de defesa dos invertebrados, o qual é bem menos complexo que o sistema imunológico dos vertebrados (Doenhoff et al. 1986, Damian 1987, Lenzi 1997).

2 JUSTIFICATIVA

A angiostrongilíase abdominal é uma parasitose emergente cujo estudo dos aspectos do desenvolvimento do parasito em seu hospedeiro intermediário é essencial para seu entendimento. Os seguintes aspectos foram levados em consideração na elaboração desse trabalho: 1) A baixa especificidade de *A. costaricensis*, que tem como hospedeiros moluscos de várias espécies; 2) Abundância e distribuição das espécies estudadas (peridomicílio, pragas em cultivo de hortaliças), fato que implica diretamente no grau de importância epidemiológica de uma espécie; 3) Inexistência de estudos comparativos sobre via migratória, reação hemocitária e desenvolvimento larvar de *A. costaricensis* em moluscos representantes de diferentes grupos taxonômicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- 1) Descrever aspectos da via migratória de *A. costaricensis* em moluscos do gênero *Omalonyx* através da análise seriada de cortes histológicos.
- 2) Comparar a resposta hemocitária e o desenvolvimento larvar de *A. costaricensis*, em diferentes tempos de infecção, em espécies representantes das principais ordens de moluscos pulmonados.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 *A. costaricensis*

- Definir a via migratória de *A. costaricensis* em molusco do gênero *Omalonyx*, enfocando os sítios de penetração e desenvolvimento larvar.
- Caracterizar, morfológicamente, as alterações seqüenciais que ocorrem durante o desenvolvimento de L1 a L3, focando na reação hemocitária justa ou peri-larval.
- Comparar os resultados obtidos com os disponíveis para *S. marginata*.

3.2.2 Em relação ao gênero *Omalonyx*

- Infectar moluscos com L1 de *A. costaricensis*
- Verificar potencial infectante das L3 recuperadas desses moluscos através da infecção oral de camundongos *Mus musculus*.
- Estudar a migração larvar em exemplares infectados através de cortes histológicos seriados.
- Estudar as reações teciduais e celulares (hemocitária) do molusco no processo de penetração, maturação e migração (L1 a L3).

3.2.3 Em relação aos moluscos dos gêneros *Biomphalaria*, *Deroceras*, *Omalonyx* e *Sarasinula*

- Acompanhar o desenvolvimento das larvas de *A. costaricensis* nessas espécies através da digestão de exemplares infectados experimentalmente.

- Analisar morfológica e sequencialmente (em diferentes tempos de infecção) a resposta celular (hemocitária) perante infecção por *A. costaricensis* nesses representantes das principais ordens de pulmonados.

4 ARTIGOS (NO PRELO)

4.1 Artigo 1: Infecção experimental de *Omalonyx matheroni* (Gastropoda: Succineidae) por *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae) e estudos da via migratória parasitária

4.2 Artigo 2: Estudo comparativo da resposta hemocitária de diferentes espécies de moluscos pulmonados infectados com *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae)

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Omalonyx matheroni* (GASTROPODA:
SUCCINEIDAE) POR *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA:
PROTOSTRONGYLIDAE) E ESTUDO DA VIA MIGRATÓRIA PARASITÁRIA *

Lângia C Montresor^{*}, Teofânia HDA Vidigal^{*/+}, Cristiane LGF Mendonça^{*}, Omar S
Carvalho^{*}, Ester M Mota^{**}, Luzia FG Caputo^{**}, Henrique L Lenzi^{**}

Laboratório de Malacologia e Sistemática Molecular, Depto de Zoologia ICB/UFMG,
Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG,
Brasil* Laboratório de Helminthoses Intestinais, CPqRR Fiocruz, **Depto de Patologia,
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

O nematódeo *Angiostrongylus costaricensis* pode ter como hospedeiros intermediários diversos moluscos, no entanto, sua via migratória foi estudada somente em *Sarasinula marginata*. Neste trabalho investigou-se o potencial de *Omalonyx matheroni* como hospedeiro intermediário e a via migratória do parasito nessa espécie. Espécimes de *O. matheroni* foram infectados com 1200 larvas L1 para preparação de cortes histológicos corados em HE e PMAcrossirius e recuperação de L3. As L3 obtidas desses moluscos foram utilizadas para infecção oral de camundongos que, ao final de 30 dias, apresentaram vermes adultos no plexo mesentérico constatando a infectividade das larvas e o potencial de *Omalonyx* como hospedeiro. Para a via migratória foram estudados pontos com 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, 2, 5, 10, 12, 15, 20, 21, 25, 28 e 30 dias de infecção. A análise dos cortes histológicos revelou a ocorrência de infecção oral e cutânea. O percurso seguido pelas larvas, após penetração (via migratória) está anatomicamente relacionado com a vascularização, indicando que as larvas são passivamente conduzidas pela circulação. aos diversos órgãos. A reação tecidual em *O. matheroni* difere daquela de *S. marginata* pela rara presença de granulomas, maior ativação das células na presença de L2 transicionais e neossíntese de colágeno na periferia da reação celular.

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis* – via migratória – hospedeiro intermediário –
Omalonyx matheroni

Apoio financeiro: Fapemig, Fiocruz e PibicUFMG

⁺ Corresponding author. Fax: + 55 51 3499291973.867390.3495. teo@icb.ufmg.br

* Este trabalho será traduzido e submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Estudos abordando a infecção de moluscos pelo nematódeo *A. costaricensis* Morera & Céspedes 1971, causador da angiostrongilíase abdominal, têm sido realizados por diversos autores (Morera & Ash 1971, Conejo & Morera 1988, Thiengo 1996, Bonetti & Graeff⁵⁰ Teixeira 1998, Rambo et al. 1997, Mendonça et al. 1999, 2003). Os moluscos da família Veronicellidae são considerados os principais responsáveis pela manutenção do ciclo em áreas endêmicas na Costa Rica (Morera & Ash 1971), Equador (Morera et al. 1983), Honduras (Kaminsky et al. 1987), Nicarágua (Duarte et al. 1992) e Brasil (Graeff⁵⁰ Teixeira et al. 1989, Rambo et al. 1997, Bonetti & Graeff⁵⁰ Teixeira 1998, Laitano et al. 2001). Entretanto, diversas espécies pertencentes a outras famílias de pulmonados foram encontradas naturalmente infectadas (Graeff⁵⁰ Teixeira et al. 1993, Rambo et al. 1997), além daquelas que se mostraram hospedeiras potenciais após infecções experimentais (Ubelaker et al. 1980, Lima et al. 1992). Apesar do ciclo do parasito poder ser realizado em diversos moluscos, sua via⁵⁰ migratória foi descrita somente no veronicelídeo *Sarasinula marginata* (Pulmonata: Soleolifera: Veronicellidae) (Mendonça et al. 1999). Por tanto, não se conhece o padrão de reação celular do hospedeiro, nem os sítios de migração, maturação e eliminação do parasito em moluscos de outras famílias.

Os moluscos do gênero *Omalonyx* (Pulmonata: Stylommatophora: Succineidae) são terrestres, vivem na vegetação emergente de cursos de água doce (South 1992, Barker 2001) e ocorrem nas regiões do Caribe, nas Américas Central e do Sul (Patterson 1971, Tillier 1981). No entanto, devido a seu padrão de cores (camuflagem), sua visualização no campo é dificultada, implicando em carência de pesquisas malacológicas e em distribuição subestimada do gênero. Desde que iniciamos os trabalhos com esses moluscos, já o encontramos em diversos cursos d'água com vários graus de impactação, bem como em hortaliças oriundas de diferentes estabelecimentos comerciais. A implicação epidemiológica e econômica da presença de moluscos em hortas foi recentemente discutida por Chiaradia et al.(2004). Deve⁵⁰ ressaltar que a disponibilidade de abrigo, alimento e umidade fazem dos locais de horticultura um ambiente apropriado para a sobrevivência e reprodução de diversas espécies de moluscos (South 1992), o que explica a ocorrência de diversos gêneros, inclusive *Omalonyx*, em hortaliças.

Em estudos utilizando diferentes populações/ cepas de *Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*, foram observadas alterações em aspectos da resposta do hospedeiro ao parasito em função da localidade e espécie dos organismos utilizados (Newton 1952, Guaraldo et al. 1981, Godoy 1997, Borges et al. 1998).

Tendo em vista a baixa especificidade de *A. costaricensis* em relação ao hospedeiro

intermediário, a distribuição coincidente do parasito e de moluscos do gênero *Omalonyx* em algumas localidades da América do Sul e o fato da via migratória ter sido estudada apenas em moluscos da família Veronicellidae, o presente trabalho estudou a relação entre *A. costaricensis* e *O. matheroni*. Neste artigo foi investigada a potencialidade de *O. matheroni* na manutenção do ciclo do referido nematódeo, o padrão reacional do molusco à infecção e aspectos da via migratória parasitária. Os dados obtidos foram comparados com aqueles disponíveis para *S. marginata* (Mendonça et al. 1999, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Hospedeiro Intermediário Foram utilizados espécimes de *O. matheroni* criados em laboratório a partir de parentais provenientes da Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN) Feliciano Miguel Abdala (19° 43' 55" S 41° 49' 03" W), município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil.

Parasito As larvas L1 de *A. costaricensis* foram oriundas do ciclo mantido no Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) através de passagens sucessivas em lesmas (*S. marginata*) e roedores (*Sigmodon hispidus*).

Infecção dos moluscos Após quatro dias de jejum os moluscos foram individualmente alimentados com fragmento de alface coberto com fezes de camundongos sadios e um concentrado contendo 1200 L1 de *A. costaricensis* (Morera 1973). As larvas foram obtidas por sedimentação em funil (Willcox & Coura 1989) de fezes de *S. hispidus* com aproximadamente 30 dias de infecção. O material foi centrifugado por cinco minutos em tubos de Falcon a 3000 RPM e, ressuspenso em quatro a 10 ml de água desclorada para a quantificação do número de larvas.

Potencial de *O. matheroni* como hospedeiro intermediário Para verificar se as larvas L3 oriundas de *O. matheroni* são infectantes, um grupo de 10 exemplares foi sedado e morto após 20 dias de infecção. As larvas recuperadas por sedimentação em funil (Wallace & Rosen 1969) foram utilizadas na infecção “per os” de *Mus musculus swiss albinus*. Cada camundongo foi infectado com sete a 10 L3. Após 30 dias de infecção, 10 animais foram sacrificados. Durante a necropsia, o plexo mesentérico e suas ramificações, e a vascularização porta-hepática foram analisados em busca de vermes adultos de *A. costaricensis*.

Histologia No estudo da via migratória foram analisados moluscos com 30 minutos (min.), 1, 2, 4, 6 e 8 horas, 2, 5, 10, 12, 15, 20, 21, 25, 28 e 30 dias de infecção (1 espécime por ponto). Dois espécimes não infectados constituíram o controle negativo. Para a confecção dos

cortes histológicos, os moluscos foram fixados em Formalin^{Millonig} de Carson (Carson et al. 1973), incluídos em parafina e submetidos a cortes seriados de 5^{µm} de espessura. Uma a cada seis lâminas foi corada com Hematoxilina^{Eosina}. Para a verificação da constituição dos agregados hemocitários (glicoproteínas, colágeno, proteoglicanos), lâminas de espécimes com 20 dias de infecção foram submetidas às seguintes colorações: Tricromática de Masson, Picrossirius, Picrossírius com Fast Green (PIFG), Reticulina de Gomori, PAS^{Alcian Blue pH 1,0 e 2,5} e Ácido fosfomolíbico^{Picrossirius (PMA^{PSR})} (Dolber & Spach, 1993) ^{EW} Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio óptico de campo claro Olympus CH30 com câmera analógica PM^{CB5B}, exposímetro PM^{PBK3} e negativo Kodak Pro Image 100 ASA. As lâminas coradas em PMA^{Picrossirius}^{EW} foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 meta Zeiss), em modo de reflexão.

RESULTADOS

Recuperação de parasitos adultos em camundongos ^{EW}As larvas L3 recuperadas de *O. matheroni*, com 20 dias de infecção por *A. costaricensis*, desenvolveram^{EW} em vermes adultos, os quais, após 30 dias de infecção encontravam^{EW} alojados no plexo mesentérico e suas ramificações nos 10 camundongos necropsiados (Fig. 1).

Análise dos cortes histológicos ^{EW}A análise dos cortes histológicos em microscópio óptico de campo claro possibilitou que se fizesse as seguintes observações:

^{EW}Penetração oral. Foram encontradas larvas no lúmen do trato digestivo (Fig. 2) com 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas de infecção, sendo que com seis horas houve uma diminuição significativa no número de larvas observado, que reduziu^{EW} ainda mais com oito horas. Após dois dias de infecção, as larvas desapareceram do lúmen do trato digestivo. A penetração através do trato digestivo foi evidenciada com 30 min., 1, 2 e 4 horas de infecção pela detecção de larvas em contato com a camada superficial do epitélio da mucosa (Fig. 3), em situação transepitelial (Fig. 4) e, após transpor a membrana basal do epitélio, localizadas na camada conjuntiva subepitelial (Fig. 5). As larvas penetraram aleatoriamente em qualquer segmento do trato digestivo, não havendo um sítio preferencial. Algumas larvas penetraram na glândula digestiva através de seu ducto (Fig. 6, 7, 8).

^{EW}Penetração cutânea. Foram observadas larvas dissociando o epitélio e penetrando no tegumento, com 30 min. de infecção (Fig. 9). Um grande número de larvas se encontrava no pé (Fig. 10) e na região ventral do animal com 30 minutos de infecção, fato que reforça a ocorrência da infecção cutânea.

De 30 min. até o 30º dia de infecção, foram vistas larvas no tecido fibromuscular do manto, inclusive próximo e no interior de glândulas mucosas, apresentando ou não reação pré-granulomatosa ao seu redor (Fig. 11, 12, 13 e 14). A partir dos primeiros 30 minutos até a 8ª hora de infecção foram notadas larvas livres nos seios/ vasos do sistema circulatório (Fig. 11). Ocasionalmente, algumas dessas larvas ficaram retidas no sistema circulatório, por reação celular, até os pontos mais tardios da infecção (15 a 30 dias) (Fig. 16 e 17).

A presença de larvas nos diferentes órgãos do molusco está esquematizada na tabela I.

Reação perilarvar. Todos os pontos foram analisados em relação à reação hemocitária e verificou-se que essa teve início com quatro horas de infecção (Fig. 18). Neste ponto, os hemócitos eram pequenos, apresentavam os núcleos aproximados, baixa eosinofilia citoplasmática, contorno periférico indefinido, dificultando a individualização entre células adjacentes. Com dois dias de infecção, não havia alteração significativa na morfologia dos hemócitos, mas a reação celular estava mais organizada, passando a constituir estruturas pré-granulomatosas, com padrão nodular (Fig. 11). No 5º dia, a maior parte das larvas se encontrava no estágio de L2 e os hemócitos, localizados principalmente na face côncava da larva, exibiam citoplasma mais acidófilo e volumoso e núcleo levemente achatado (Fig. 19). A presença de L2 transicionais (transição para L3), caracterizadas pela presença de vacúolos basais em células epiteliais intestinais, foi evidenciada com 10 dias de infecção (Fig. 20). A partir desse ponto, a reação tornou-se progressivamente mais intensa, atingindo seu maior grau entre 12/ 15 dias. Nesse período, os hemócitos evidenciavam citoplasma eosinofílico, volumoso, microvacuolizado, núcleos deslocados para a periferia, bordos citoplasmáticos bem definidos, possibilitando individualizar as células participantes do agregado celular (Fig. 21). No entanto, essa confluência de hemócitos (“ativados”) em direção da concavidade das L2 transicionais não resultou em encapsulação das larvas e a maioria das reações nodulares não progrediu para granulomas (Fig. 13). Com o decorrer da infecção e o aparecimento das L3, os hemócitos modificaram novamente sua morfologia, passando a apresentar morfologia semelhante àqueles encontrados antes do surgimento das L2 transicionais. O diâmetro das reações pré-granulomatosas diminuiu, bem como o número de larvas com reação celular ao seu redor. Reações pré-granulomatosas relacionadas às larvas ocorreram de dois a 30 dias de infecção, culminando, eventualmente, na formação de granulomas bem configurados, com periferia fibroblastóide (Fig. 12). Durante todo o período estudado, foram encontradas larvas com diferentes graus de reação celular, no mesmo ponto de infecção (Fig. 12, 13, 14, 22). As larvas de qualquer estágio de desenvolvimento e em qualquer período da infecção estavam sempre envoltas por um espaço ou túnel perilarvário.

As características tintoriais e alguns aspectos histoquímicos dos agregados hemocitários corados com várias colorações estão especificadas na tabela 2. As colorações indicaram que esses agregados não apresentavam, internamente, fibras colagênicas, reticulares e proteoglicanos de baixa e alta sulfatação, mas apenas glicoproteínas neutras no citoplasma de hemócitos. Neossíntese de colágeno foi detectada em tecido adjacente aos granulomas, fazendo limite entre a periferia dos granulomas e o tecido fibromuscular não afetado pela reação hemocitária. O grupo controle não apresentou alterações histológicas.

Coloração	Característica tintorial
Tricromática de Masson (Fig. 23)	Colágenos (-)
Picrossirius (Fig. 24)	Colágenos intersticiais (-)
PIFG (Fig. 25)	Colágenos intersticiais (-)
Reticulina de Gomori (Fig. 26)	Fibras reticulares (-)
Picrossirius-EMA (Fig. 27)	Colágenos intersticiais (-) Deposição em tecido periférico (+)
PAS (+)	Glicoproteínas neutras (+)
Alcian Blue pH 1,0 (Fig. 28)	Proteoglicanos alta sulfatação (-)
Alcian Blue pH 2,5 (Fig. 29)	Proteoglicanos baixa sulfatação/ Ácido hialurônico (-)

Tabela 2: Características dos agregados hemocitários em *O. matheroni* reveladas por diversas colorações seletivas e/ou especiais. (+) positivo, (-) negativo.

DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o molusco pulmonado *O. matheroni*, da família Succineidae e ordem Stylommatophora é susceptível à infecção por *A. costaricensis*, reagindo às larvas com mobilização e ativação de hemócitos. Foi demonstrada também, pela primeira vez, a via migratória do *A. costaricensis* nesse molusco.

Através da recuperação de parasitos adultos no plexo mesentérico de *M. musculus*, infectados com larvas L3 oriundas de *O. matheroni*, comprovou-se a potencialidade desse

molusco para atuar como hospedeiro de *A. costaricensis*. Moluscos da família Succineidae (gênero *Succinea*) são hospedeiros intermediários de *Fasciola hepática* (Pessoa & Martins 1977) e o gênero *Omalonyx* atua como hospedeiro intermediário de *Leucochloridium*, outro trematódeo digenético, parasito de aves. (Lutz, 1921). Os dados aqui obtidos reforçam a importância dessa família na transmissão de helmintos.

A baixa especificidade do parasito em relação ao hospedeiro intermediário, associada à distribuição coincidente do gênero *Omalonyx* e da parasitose, indica a possibilidade desses moluscos atuarem como hospedeiro natural do nematódeo.

A análise dos cortes histológicos demonstrou a ocorrência concomitante das vias de infecção cutânea e oral (Fig. 2 e 9). A via oral foi observada com 30 min, 1, 2, 4, 6 e 8 horas de infecção, pela presença de L1 na luz do trato digestivo (Fig. 2). As larvas atravessaram a parede do trato digestivo em etapas bem definidas: aderindo ao epitélio (Fig. 3), transpondo-o (Fig. 4) e invadindo o conjuntivo subepitelial (Fig. 5). As três etapas observadas foram descritas por Mendonça et al. (1999), em *S. marginata*, que, assim como no presente estudo, também constataram não existir preferência na penetração das larvas por um segmento específico do trato digestivo. Essa observação também foi feita estudando-se os hospedeiros definitivos do parasito (Mota & Lenzi, 2005, in press), demonstrando que esta é uma característica de *A. costaricensis*.

A via cutânea de infecção foi claramente evidenciada, tanto pela presença de larvas no tecido fibromuscular do manto nas primeiras horas de infecção (Fig. 10), quanto pela observação de larvas, dissociando o epitélio e penetrando no tegumento após 30 minutos de infecção (Fig. 9). Em *S. marginata*, os ductos foram considerados um sítio preferencial de penetração larvar, pois nesse modelo as glândulas do tegumento são multicelulares e secretam seu conteúdo através de ductos comuns a várias células (Mendonça et al. 1999). As glândulas do tegumento de *O. matheroni* são unicelulares, não constituindo assim orifícios propícios à penetração larvar. Provavelmente o processo de penetração se dá pela liberação de proteases, que dissociam complexos juncionais das células epiteliais, atuando como fatores de espalhamento (spreading factors) ou enzimas de digestão extracorpórea (Lee, 1965). Essa característica invasiva é utilizada também pelo *A. costaricensis* para invadir tecidos de hospedeiros vertebrados, prescindindo de mecanismos de interação ligante-receptor. As proteases agem como fatores de virulência, de modo semelhante ao que ocorre com várias bactérias patogênicas. Por exemplo, estreptococcus, estafilococcus, pneumococcus e certos clostrídios produzem hialuronidase, enzima que promove o espalhamento dessas bactérias

nos tecidos pela quebra do ácido hialurônico. Esse é um polissacarídeo (glicosaminoglicano), que funciona como um cimento tecidual (Madigan et al. 1997). *Streptococcus* e *Staphylococcus* também produzem uma vasta série de proteases, nucleases e lipases, que servem para despolimerizar proteínas do hospedeiro, ácidos nucléicos e gorduras, respectivamente (Madigan et al. 1997).

A penetração de larvas de nematódeos metastrogilóides em seu hospedeiro intermediário molusco através da penetração direta no tecido exposto, ou por ingestão ou por uma combinação de ambos ocorre amplamente (Hobmaier & Hobmaier 1934, Cheng & Alicata 1965, Richards & Merritt 1967).

Para *A. costaricensis*, a via oral de infecção foi descrita por Morera (1973). Thiengo (1996), utilizando o modelo *S. marginata*/ *A. costaricensis* verificou, através de cortes histológicos, a ocorrência simultânea de penetração cutânea e oral. Essas duas vias de infecção foram confirmadas por Mendonça et al. (1999) em infecção experimental de *S. marginata*. Assim, os dados aqui obtidos em *O. matheroni* corroboram aqueles disponíveis na literatura.

Quanto à via migratória parasitária, foi evidenciado que as larvas, após penetrarem nos tecidos, ou ficam retidas em certos locais pela reação hemocitária e/ou são disseminadas pela circulação conforme o padrão anatômico dos vasos. Generalizando, este sistema é caracterizado por um coração, contido no pericárdio que consta de uma aurícula, que recebe o sangue da veia pulmonar, e de um ventrículo, que o impele através da aorta. Esta se divide em troncos arteriais cujas ramificações levam o sangue para as vísceras e para a região cabeça – pé (Fig. 30 e 31). Na ausência de um sistema capilar, o sangue que atinge estes locais insinua-se através dos espaços pseudovasculares do tecido conjuntivo. No seu retorno, o sangue acumula-se em três grandes espaços, o seio cefalopodal, o seio visceral e o seio subrenal, de onde é propellido através da parede pulmonar, reoxigenado e encaminhado para a veia renal e a veia pulmonar e, desta última, para o coração (Paraense 1973). Para uma melhor visualização dos trajetos disponíveis para as larvas um esquema general enfatizando as vias e o sistema circulatório encontra-se representado (Fig. 30 e 31).

As larvas oriundas da via cutânea de infecção podem permanecer no tecido fibromuscular ou invadir os seios hemolinfáticos, que se encontram presentes em grande número nesse tecido, ocasionando um aspecto esponjoso. Aquelas que foram ingeridas, após a transposição da parede do trato digestivo, caíam na hemocele, a partir da qual teriam livre acesso aos órgãos e ao sistema circulatório (Fig. 15, 16 e 17). O grande número de larvas

encontrado nos rins e na cavidade do manto reflete a importância dessas estruturas no sistema circulatório.

A intensa presença hemolinfática facultada a presença de grande número de larvas no tecido fibromuscular (Fig. 11, 12 e 13). A distribuição de larvas por todos os sistemas (reprodutor, digestivo, entre outros) (tabela I) também está relacionada à vascularização. Foi ainda verificado que as larvas, a partir do lúmen do trato digestivo, podem invadir a glândula digestiva através de seu ducto (Fig. 6 e 7), o qual se comunica com a porção posterior do estômago (Paraense 1972). Nesse caso, o parasito poderia permanecer na glândula digestiva ou a partir daí invadir a hemocele.

A via ^{EB}migratória de *A. costaricensis* em *S. marginata* foi descrita por Mendonça et al. (1999, 2003), em decorrência da importância epidemiológica da família Veronicellidae. Nesse trabalho, os autores perceberam marcante presença larvar no tecido fibromuscular, sistema circulatório e rim, com ocasional invasão dos órgãos, assim como verificado em *O. matheroni*,

É conhecida a ocorrência de reação hemocitária em moluscos infectados por helmintos (Newton 1952, Pan 1965, Harris & Cheng 1975) e diferenças na intensidade da resposta tecidual (hemocitária) entre moluscos do gênero *Biomphalaria*, resistentes e susceptíveis à infecção por *Schistosoma mansoni*, já foram demonstradas (Borges 1998).

No modelo *A. costaricensis*/*S. marginata* essas reações foram caracterizadas por Mendonça et al. (1999) e os dados obtidos no presente estudo demonstram algumas semelhanças (início com duas horas de infecção, tropismo pela face côncava da larva) e diferenças significativas entre a resposta tecidual em *O. matheroni* (mais lenta, menos intensa em número de células e maior ativação celular) quando comparada com aquela descrita para *S. marginata*. Em *O. matheroni*, apesar da intensa mobilização peri ou justalarvar, o encontro de granulomas foi eventual, enquanto que, em *S. marginata*, a reação hemocitária foi intensa durante todo o tempo observado (30 dias), formando constantemente granulomas bem configurados desde o 5º dia.

Em *O. matheroni*, a atividade hemocitária foi intensamente aumentada na presença de L2 transicionais para L3. Esse estágio larvar foi observado a partir do 10º dia (Fig. 19, 20, 21). Entre os 12º e o 15º dias, a reação hemocitária foi mais intensa. Com o decorrer da infecção e o desenvolvimento das L3, o grau de ativação dos hemócitos foi reduzido, indicando que essas células não reagem fortemente frente a esse estágio larvar ou que as larvas evadiram os agregados celulares (Fig. 12 e 14).

A agregação de hemócitos na face côncava da larva foi observada em ambas as espécies (Fig. 13, 19, 21 e 22). Provavelmente esse fato está relacionado à secreção de antígenos nesse sítio, que seriam secretados/excretados pelo poro excretor. Esse fenômeno poderá ser melhor investigado no futuro através da aplicação de anticorpos contra produtos larvários. Mesmo após o início da reação celular (duas horas), foram observadas, simultaneamente, larvas que não se encontravam cercadas por hemócitos, com outras cercadas por reação de intensidade variável (Fig. 12, 13, 14, 22). Isso foi constatado na maioria dos pontos de infecção, exceto naqueles em que se encontravam presentes as L2 transicionais. Essa irregularidade da resposta não foi notada em *S. marginata*, na qual, mesmo na presença de L3, ocorreu intensa reação celular (Mendonça et al. 1999, 2003).

A reação hemocitária não se mostrou larvicida em nenhum dos casos (*S. marginata*/*O. matheroni*), ocorrendo o crescimento das larvas até o estágio infectante (L3). Assim sendo, as diferenças observadas nesse estudo não estão relacionadas com susceptibilidade ou resistência. De fato, já tinha sido constatado que os nematódeos metastrogilóides permanecem intactos no interior da reação celular, onde se desenvolvem normalmente (Harris & Cheng 1975). É importante destacar que, em todos os estádios larvares, há a formação de um espaço (manguito ou túnel) perilarvário que impede que as células toquem diretamente os elementos parasitários. Esse espaço parece decorrer de acúmulo local, justalarval, de proteases secretadas pelas larvas.

Os resultados das colorações especiais e seletivas (histoquímicas) apresentadas na Tabela 2 (Fig. 23 a 29) indicam que os hemócitos, em agregados perilarvários, contém, no citoplasma, glicoproteínas neutras e há ausência de matriz extracelular do tipo colágenos intersticiais, fibras reticulares e proteoglicanos de alta e baixa sulfatação. Normalmente, as fibras reticulares podem corresponder a colágeno do tipo três (recoberto por glicoproteínas), glicoproteínas não colagênicas e fibras reticulares bioquimicamente não caracterizadas. Foi evidenciada neossíntese de colágeno, envolvendo externamente a reação hemocitária, indicando a produção dessas moléculas por fibroblastos do tecido adjacente. Em, invertebrados, tanto os hemócitos como os fibroblastos tem a capacidade de sintetizar colágeno (Franchini & Ottaviani 2000).

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que, apesar da inespecificidade do *A. costaricensis* em escolher seu hospedeiro intermediário, a forma como *O. matheroni* reage à infecção exibe certas peculiaridades quando comparada à descrita em *S. marginata* (Mendonça et al. 1999,2003), indicando a heterogeneidade do sistema de defesa dos

moluscos. É importante ressaltar que esses moluscos pertencem a ordens distintas de gastrópodes pulmonados (Stylommatophora, Soleolifera).

A literatura que enfatiza a relação parasito/ molusco é, em sua maior parte, devotada a trematódeos, sendo escasso o material referente a nematódeos. Estudos comparando aspectos morfológicos da reação hemocitária à infecção por *A. costaricensis*, em diferentes espécies de moluscos, estão em andamento.

AGRADECIMENTOS

Iolanda de Olinda Pedro e Andréa Natividade da Silva, técnicas do DEPAT, IOC, FIOCRUZ. Alexandra M dos Anjos, Luciana S Souza, Luzia HP Barroso do Laboratório de Histologia, DEPAT, IOC, FIOCRUZ. Sueleny Silva Ferreira Teixeira, técnica do Moluscário CPqRR, FIOCRUZ. Daniel Coscarelli, estudante do Laboratório de Malacologia – UFMG, por seu talento na confecção dos desenhos científicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker GM 2001. The Biology of Terrestrial Molluscs. CABI Publishing, Nova Iorque, EUA, 588pp.
- Bonetti VCBD, Graeff Teixeira C 1998. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L₃ in the mucus and inoculation of L₁ through the tegument of molluscs. Rev Soc Bras Med Trop 31: 289-294.
- Borges CM, Souza CP, Andrade AA 1998. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 93, supp.I:117-121.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA 1973. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. Am J Clin Pathol 59: 365-375.
- Cheng TC, Alicata JE 1965. On the modes of infection of *Achatina fulica* by the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. Malacol 2(2): 267-274
- Chiaradia LA, Milanez JM, Graeff Teixeira C, Thomé JW 2004. Lesmas: pragas da agricultura e ameaça à saúde humana. Agropec Catarin 17(2): 70-74
- Conejo ME, Morera P 1988. Influencia de la edad de los veronicelideos en la infección con *Angiostrongylus costaricensis*. Rev Biol trop 36 (2B): 519-526.
- Dolber PC & Spach MS 1993. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. J Histochem Cytochem 41: 465-469.
- Duarte Z, Morera P, Davila P, Gantier JC 1992. *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. Ann Parasitol Hum Comp 67: 94-96.
- Franchini A., Ottaviani E 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-β. Tissue e Cell 32: 312-321.
- Godoy A, Souza CP, Guimarães CT, Andrade ZA 1997. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz 92(1): 121-122.
- Graeff Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1989. *Phyllocaulis variegatus* an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 65-68.
- Graeff Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1989. *Phyllocaulis*

variegatus [5] an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 65 [68].

Graeff [7] Teixeira C, Thiengo SC, Thomé JW, Medeiros AB, Camillo [8] Moura L, Agostini AA 1993. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 487 [489].

Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G 1981. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Rev Saúde Publ 15: 436 [438].

Harris KR, Cheng TC 1975. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. Int J Parasitol 5: 521:528.

Hobmaier A, Hobmaier M 1934. The route of infestation and the site of localization of lung worms in mollusks. Science 80: 229.

Kaminsky RG, Andrews K, Mor NR 1987. *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras: Estudio preliminar. Rev Méd Hond 55: 4 [8].

Laitano AC, Genro JP, Fontoura R, Branco SSL, Maurer RL, Graeff [9] Teixeira C, Milanez JM, Chiaradia LA, Thomé JW 2001. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). Rev Soc Bras Med Trop 34(1): 95 [97].

Lee DL, 1965, The Physiology of Nematodes, University Reviews in Biology, Oliver & Boyd LTD, London, 154pp.

Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS 1992. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). Rev Inst Med trop São Paulo 34: 399 [402].

Lutz A 1921. Observações sobre o gênero *Urogonimus* e uma nova forma de *Leucochloridium* em novo hospedador. Mem Inst Oswaldo Cruz 13: 136 [140].

Madigan MT, Martinko JM, Parker J 1997. Brock Biology of microorganisms, 8th ed., Prentice Hall, New Jersey, p.986+A [11]+G [11]+I [30].

Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo [12] Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL 1999. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental

- intermediate host (*Sarasinula marginata*). Mem Inst Oswaldo Cruz 94(4): 549-556.
- Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Machado PM, Caputo LFG, Lenzi HL 2003. *Angiostrongylus costaricensis* and Experimental infection of *Sarasinula marginata* II. Elimination routes. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 893-898.
- Morera P 1973. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes, 1971). Am J Trop Med Hyg 22: 613-621.
- Morera P, Céspedes R 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop 18: 173-185, 197.
- Morera P, Ash LR 1971. Investigación del huesped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chileno Parasitol 25: 135.
- Morera P, Lazo R, Urquizo J, Laguno M 1983. First record of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes, 1971) in Ecuador. Am J Trop Med Hyg 32: 1460-1461.
- Newton WL 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Austrolorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 36:2:366
- Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am J Trop Med Hyg 14: 931-976
- Paraense WL 1972. Fauna planorbídica do Brasil. In CS Lacaz et al., Introdução à geografia médica do Brasil, Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo. p. 213-239.
- Paraense WL 1973. The molluscan intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil, p. 187-201. IN: Epidemiology and Control of schistosomiasis. N. Ansari (ed) S. Karger, Basel.
- Patterson CM 1971. Taxonomic studies of the land snail family Succineidae. Malacol Review 4: 131-202.
- Pessoa SB & Martins AV 1977. Trematódeos parasitas do sistema sanguíneo: In Pessoa Parasitologia Médica 10ª edição. Guanabara Koogan
- Rambo RP, Agostini AA, Graeff Teixeira C 1997. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil: Prevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate Host from Eighteen Endemic Foci. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 9-14.
- Richards CS, Merritt JW 1967. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. J Parasitol 53(2): 382-388
- South, A 1992. Terrestrial Slugs. Biology, ecology and control. Chapman & Hall, London,

UK, 428 pp.

Thiengo SC 1996. Mode of Infection *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 277-278.

Tillier S 1981. South American and Juan Fernandez Succineid slugs (Pulmonata). J Moll Stud 47: 125-146.

Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J 1980. Emergence of Third Stage Larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). J Parasitol 66(5): 856-857.

Wallace GD, Rosen L 1969. Technique for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. Malacol 7: 427-438.

Willcox HP, Coura JR 1989. Nova concepção para o método de Baermann-Moraes-Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. Mem Inst Oswaldo Cruz 84(4): 539-565

Tabela I: Localização das larvas de *Angiostrongylus costaricensis* durante seu desenvolvimento em *Omalonyx matheroni*

Tempo de Infeção	Localização larvar	Tecido Fibromuscular	Região Cervical	Lumen do trato digestivo	Bulbo Bucal	Glândula Salivar	Glândula Digestiva	Penis/ Vagina	Glândula de Albumine	Próstata	Ductos do trato reprodutivo	Ovariotestis	Rim	Cavidade Pericárdica	Seios Cavidade do manto	Glândula Podal	Pé
30 min	X	X	X	X	X	EO 1.000	X	X	EO 500	EO 500	X	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	X	EO 500	X
1 hora	X	X	X	X	EO 1.000	EO 1.000	X	EO 500	EO 500	EO 500	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	EO 500
2 horas	X	X	EO 1.000	X	EO 1.000	EO 1.000	X	EO 500	X	EO 500	EO 500	X	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X
4 horas	X	X	EO 1.000	X	X	X	EO 1.000	EO 500	EO 500	EO 500	EO 500	X	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X
6 horas	X	X	EO 1.000	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	EO 500	EO 500	EO 500	X	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	EO 500
8 horas	X	X	EO 1.000	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	X	X	X	EO 500	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	X	X	X	X
2 dias	X	X	X	EO 500	EO 1.000	X	EO 1.000	X	EO 500	EO 500	EO 500	X	X	X	X	X	X
5 dias	X	X	X	EO 500	X	X	EO 1.000	X	X	X	EO 500	EO 1.000	X	EO 1.000	EO 1.000	X	X
10 dias	X	X	X	EO 500	X	X	EO 1.000	EO 500	X	EO 500	EO 500	EO 1.000	X	EO 1.000	EO 1.000	X	X
15 dias	X	X	EO 1.000	EO 500	X	X	X	EO 1.000	EO 500	X	EO 500	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X
21 dias	X	X	X	EO 500	X	X	EO 1.000	X	X	EO 500	EO 500	EO 1.000	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X
25 dias	X	X	X	EO 500	X	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X	EO 500	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	EO 500
28 dias	X	X	X	EO 500	X	X	EO 1.000	X	X	X	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	X	X
30 dias	X	X	X	EO 500	X	EO 1.000	EO 1.000	X	X	EO 500	EO 500	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 1.000	EO 500	X

X : presença de larvas

EO : ausência de larvas

Figura 1: Verme adulto de *A. costaricensis* (seta) no plexo mesentérico de *Mus musculus* swiss albino.


Figura 2: L₁ de *A. costaricensis* (seta) no lúmen do intestino (asterisco) de *O. matheroni* (30 min. de infecção) (HE, barra=160 ).


Figura 3: L₁ (seta) próxima à superfície da mucosa intestinal de *O. matheroni* (30 min. de infecção) (HE, barra=40 ).


Figura 4: L₁ (seta) atravessando o epitélio intestinal de *O. matheroni*. Lúmen intestinal – asterisco (30 min. de infecção) (HE, barra=40 ).



Figura 5: L₁ (seta) no conjuntivo subepitelial do intestino (asterisco) de *O. matheroni* (30 min. de infecção) (HE, barra=40 ).

Figura 6: Ductos de comunicação da glândula digestiva de *O. matheroni* com o lúmen do trato digestivo. Glândula digestiva (asterisco fechado) e ductos (asterisco aberto). (30 min. de infecção) (HE, barra=400 ).

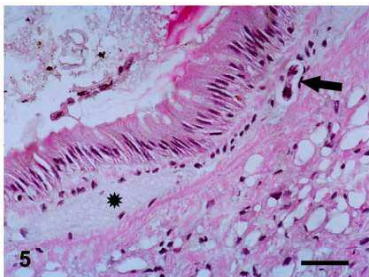
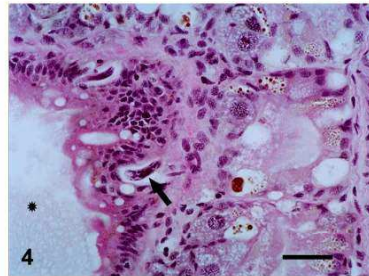
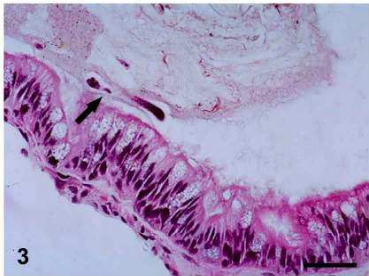
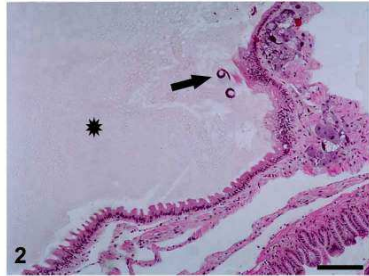
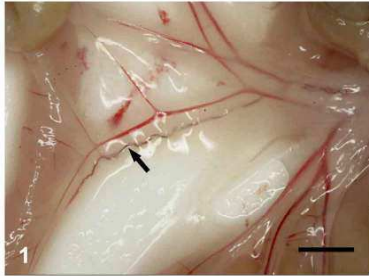



Figura 7: Presença de larva no ducto que comunica a glândula digestiva de *O. matheroni* com o lúmen do trato digestivo (seta). (30 min. de infecção) (HE, barra=112  μm).


Figura 8: Larva penetrando no tecido da glândula digestiva de *O. matheroni*. (30 min. de infecção) (HE, barra=32  μm).


Figura 9: L₁ dissociando as células epiteliais e penetrando no tegumento (seta) de *O. matheroni* (30 min. de infecção) (HE, barra=40  μm).


Figura 10: L₁ (seta) no pé (asterisco) de *O. matheroni* (30 min. de infecção) (HE, barra=40  μm).




Figura 11: Várias reações hemocitárias em torno de L₁, com aspecto pré  granulomatoso, próximas uma das outras, quase se fundindo na periferia (2 dias de infecção) (HE, barra=112  μm).

Figura 12: Tecido fibromuscular do manto de *O. matheroni* apresentando granuloma típico, com células fibroblastóides na periferia (seta), situado próximo a uma larva com fraca reação celular justalarval (cabeça de seta) (20 dias de infecção) (HE, barra=50  μm).

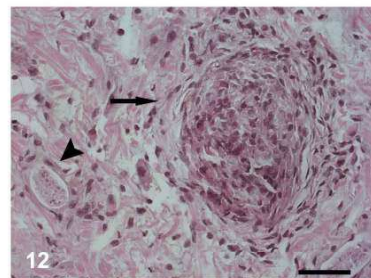
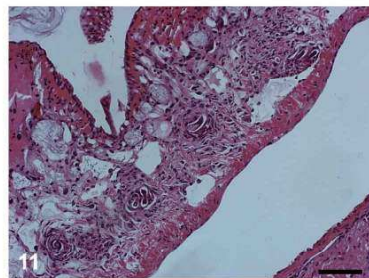
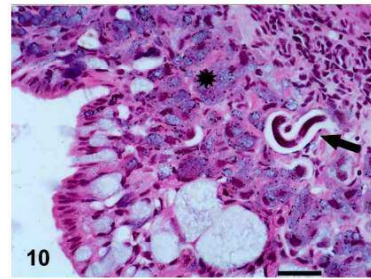
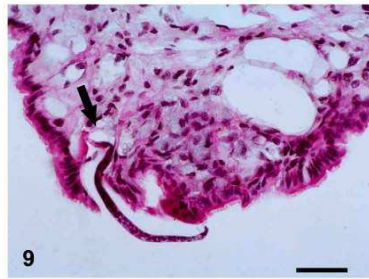
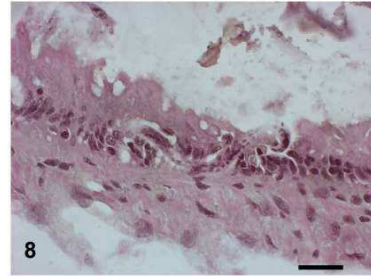
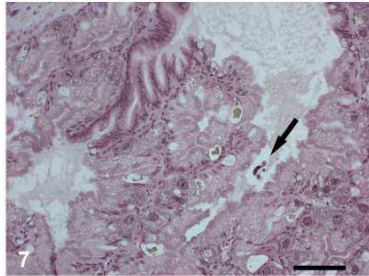



Figura 13: L3 no tecido fibromuscular de *O. matheroni* com agregado hemocitário em sua face côncava (seta) (30 dias de infecção) (HE, barra=32 m).


Figura 14: L3 retorcida (seta), localizada próxima a uma glândula mucosa da camada fibromuscular (asterisco) de *O. matheroni* (30 dias de infecção) (HE, barra=40 m).


Figura 15: Larva (seta) no interior de vaso hemolinfático do pulmão (asterisco) de *O. matheroni* (8 horas de infecção) (HE, barra=112 m).


Figura 16: Reação hemocitária retendo larva no interior de vaso hemolinfático (seta) de *O. matheroni* (15 dias de infecção) (HE, barra=225 m).



Figura 17: Detalhe de larva retida por reação hemocitária no interior de vaso hemolinfático do pulmão (seta) de *O. matheroni*. O vaso está ladeado por epitélio respiratório cúbico (15 dias de infecção) (HE, barra=32 m).

Figura 18: Início da reação hemocitária ao redor de larva (seta) situada no tecido fibromuscular de *O. matheroni* (4 horas de infecção) (HE, barra=40 m).

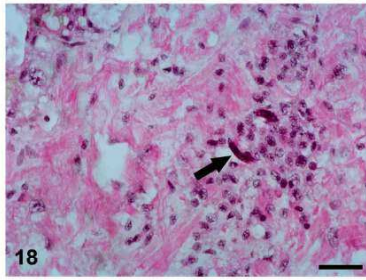
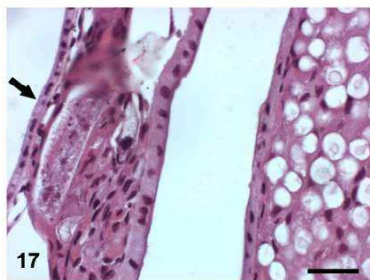
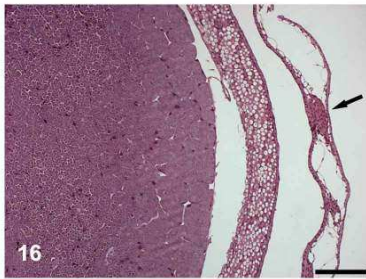
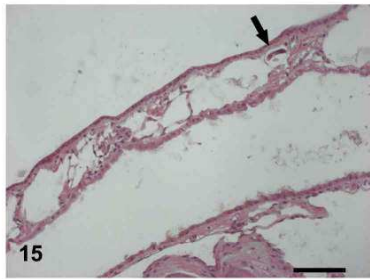
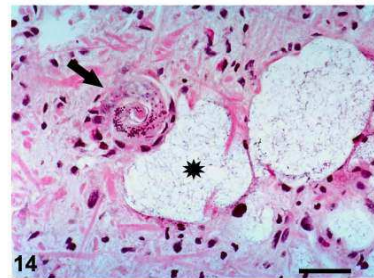
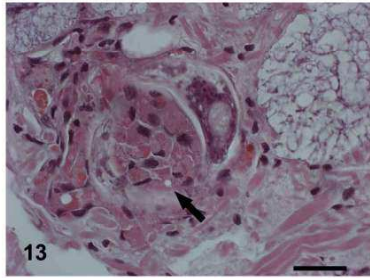



Figura 19: Tecido fibromuscular de *O. matheroni* exibindo L2 (asterisco), com hemócitos concentrados em sua face côncava (seta) (5 dias de infecção) (HE, barra=40 ).


Figura 20: Glândula salivar de *O. matheroni* contendo L2 transicional, evidenciada pela presença de vacúolos lipídicos na base (seta) de suas células epiteliais intestinais (10 dias de infecção) (HE, barra=40 ).





Figura 21: Reação pré-granulomatosa (seta) peri L2 transicional (asterisco), com hemócitos ativados mais concentrados na face côncava da larva (12 dias de infecção) (HE, barra=40 ).

Figura 22: Larvas com (seta) e sem (cabeça de seta) reação celular no tecido fibromuscular de *O. matheroni* (5 dias de infecção) (HE, barra=40 ).

Figuras 23 e 24: Reações hemocitárias perilarvares com ausência de depósito de colágenos intersticiais (30 dias de infecção) (Fig.23:Tricromática de Masson, Fig.24:Picrossirius) (barra=32 ).

Figuras 23 e 24: Reações hemocitárias perilarvares com ausência de depósito de colágenos intersticiais (30 dias de infecção) (Fig.23:Tricromática de Masson, Fig.24:Picrossirius; Fig. 25:PIFG) (barra=32 ).

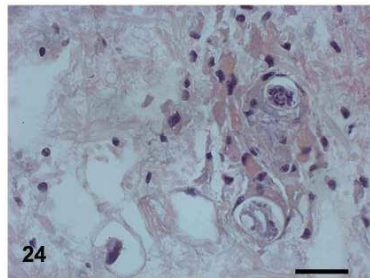
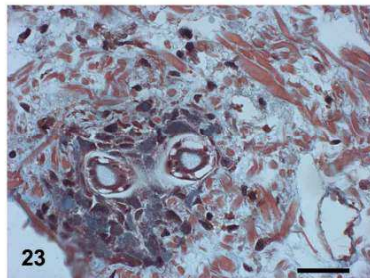
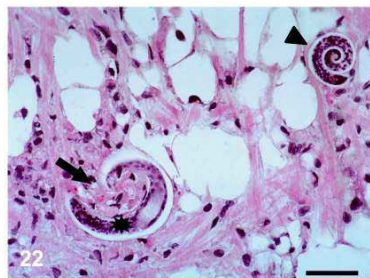
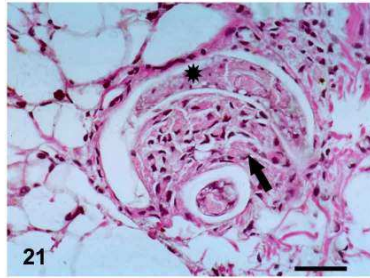
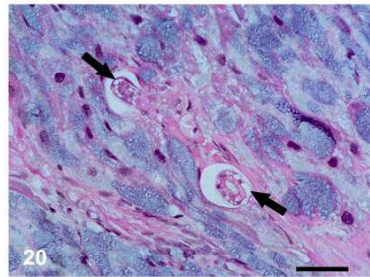
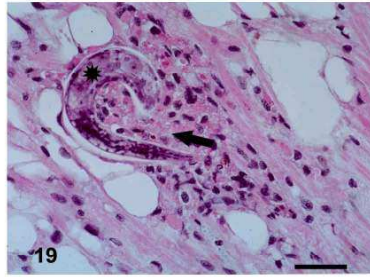



Figura 25: Reações hemocitárias perilarvares com ausência de depósito de colágenos intersticiais (30 dias de infecção) (PIFG, barra=32 m).








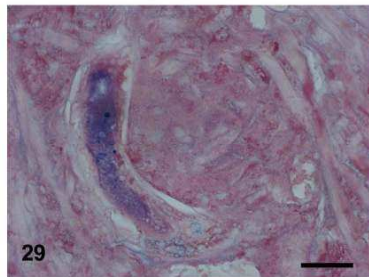
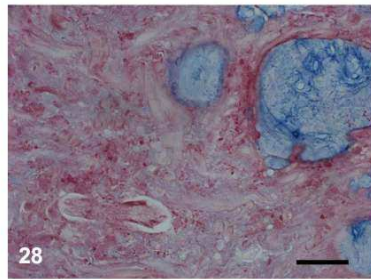
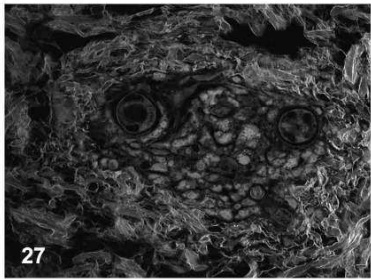
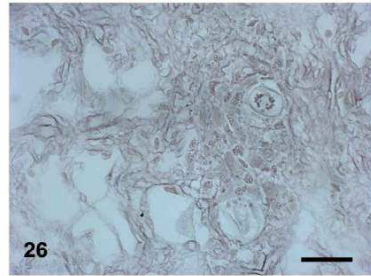
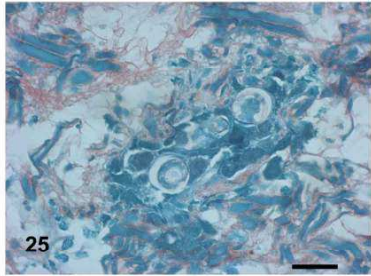
Figura 26: Reação hemocitária perilarvar destituída de fibras reticulares (30 dias de infecção) (Reticulina de Gomori, barra=32 m).

Figura 27: Reação hemocitária perilarvar demonstrando ausência de colágenos intersticiais em seu interior, circundada por neossíntese de colágeno, com fibras finas e delicadas, no tecido fibromuscular adjacente (30 dias de infecção) (PMA SR – LSCM  barra=32 m)

Figuras 28 29: Reações hemocitárias perilarvares sem evidência de depósitos de proteoglicanos de baixa e alta sulfatação (30 dias de infecção) (Fig 28: Alcian Blue pH 1,0; Fig.29: Alcian Blue pH 2,5  barra=32 m).



Figuras: 30 e 31: Esquema do sistema circulatório e migração larvar.

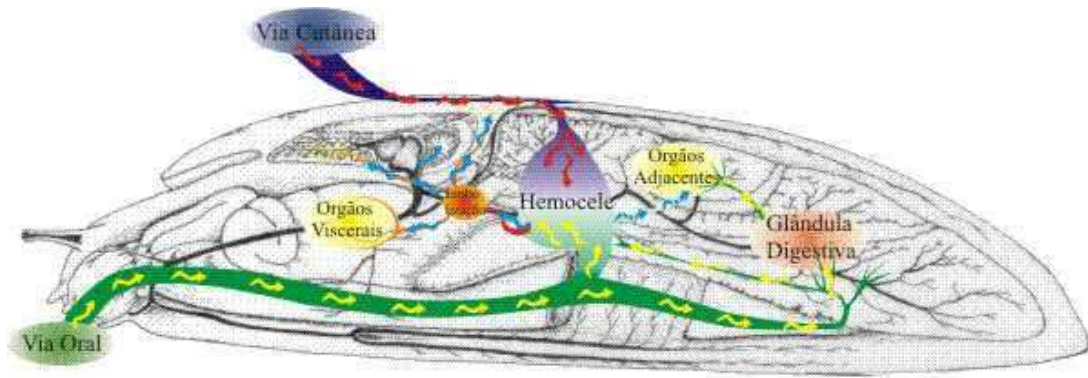


Fig 30: Ilustração da via migratória em *Omalonyx matheroni* (desenho de um Stylommatophora generalizado)

Legenda:

- Via Migratória Oral
- Via Migratória Cutânea
- ↔ Trajetos prováveis
- ↔ Trajetos comuns

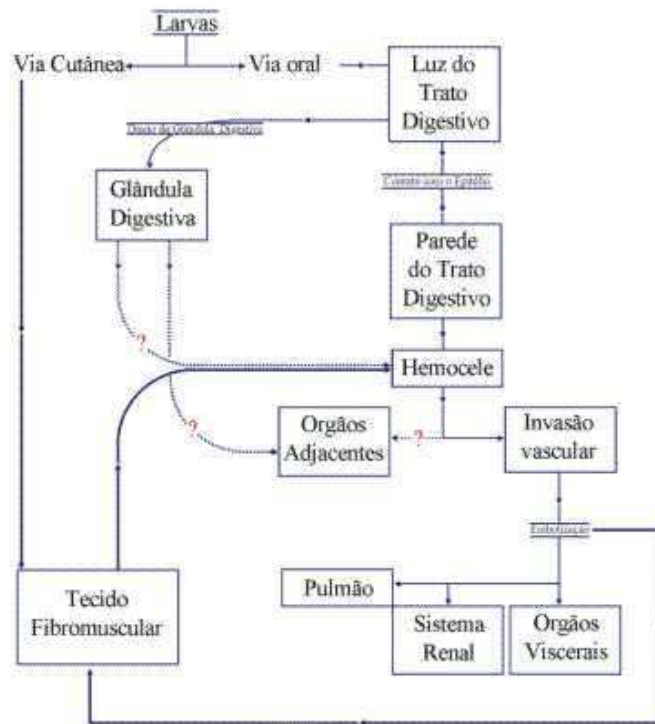


Fig 31: Esquema da via migratória em *Omalonyx matheroni*

Legenda:

- Trajeto Larval
- ...?→ Trajetos Prováveis

Ilustração: Daniel Coscarelli

ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA HEMOCITÁRIA DE
GASTRÓPODES PULMONADOS À INFECÇÃO POR
Angiostrongylus costaricensis (NEMATODA: PROTOSTRONGYLIDAE)

Lângia C Montresor^{*}, Teofânia HDA Vidigal^{*}, Cristiane LGF Mendonça^{*},

Omar S Carvalho^{*}, Ester M Mota^{**}, Karyne N de Souza^{*},

Luzia FG Caputo^{**}, Henrique L Lenzi^{***}

Laboratório de Malacologia e Sistemática Molecular, Depto de Zoologia ICB/UFMG,
^{*}Laboratório de Helminthoses Intestinais, CPqRR/Fiocruz, ^{**}Depto de Patologia, Instituto
Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Algumas espécies de moluscos pulmonados atuam como hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus costaricensis*. A interação entre esse nematóide e moluscos desse grupo foi analisada, comparando infecções experimentais de *Omalonyx matheroni*, *Biomphalaria glabrata*, *Deroceras* sp. e *Sarasinula marginata*. Foram preparados cortes histológicos de *B. glabrata* e *Deroceras* sp. com 30 minutos, 4 horas, 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de infecção com 1200 larvas (L1). Os dados foram comparados com aqueles disponíveis sobre via migratória de *A. costaricensis* em *O. matheroni* e *S. marginata*. Cortes corados em HE e Picrosirius/MA foram analisados respectivamente em microscopias de campo claro e confocal. Os resultados revelaram que a reação hemocitária de cada espécie de molusco diferiu em intensidade e em aspectos morfológicos indicativos de ativação celular. A reação hemocitária, em todos os tipos de moluscos, era mais marcante em torno de L2, principalmente em sua face côncava. *Deroceras* sp. e *O. matheroni* apresentaram evidências de neocolagênese na periferia de reações granulomatosas perilarvárias, ausentes em *S. marginata* e *B. glabrata*. Os dados comparativos indicaram a heterogeneidade morfofuncional dos hemócitos das espécies de moluscos analisadas. Para estudar o desenvolvimento larvar, 10 exemplares de cada espécie foram infectados (400L1) e digeridos após 5, 10, 15, 20 e 30 dias. A porcentagem de cada estágio larvar recuperado com 15, 20 e 30 dias demonstrou diferenças significativas (qui-quadrado) entre as espécies. Sabendo que *Deroceras* sp. é amplamente distribuída e que sua susceptibilidade ainda não tinha sido comprovada, L3 recuperadas dessa espécie foram empregadas na infecção de camundongos *Mus musculus* e, após 30 dias, constatou-se o desenvolvimento de vermes adultos, demonstrando sua potencialidade como hospedeira de *A. costaricensis*.

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis* – Planorbidae, Succineidae, Limacidae, Veronicellidae – hemócitos – hospedeiro intermediário – desenvolvimento larvar

Apoio financeiro: Fapemig, Fiocruz e Pibic/UFMG

⁺ Corresponding author. Fax: + 55 21 2573.8673. E-mail: hlenzi@ioc.fiocruz.br

^{*} Este trabalho será traduzido e submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Angiostrongylus costaricensis Morera & Céspedes 1971 é um nematódeo que parasita roedores, podendo infectar acidentalmente o ser humano, causando a angiostrongilíase abdominal (Morera & Céspedes 1971). Diversos moluscos podem atuar no ciclo como hospedeiros intermediários (Morera & Ash 1971, Graeff & Teixeira et al. 1993, Rambo et al. 1997). Essa parasitose é endêmica em algumas localidades (Morera 1985, 1988), emergente em outras, constituindo um problema de saúde pública em diversos países. No Brasil há em torno de 90 casos, sendo 81 localizados no Rio Grande do Sul (Lenzi, comunicação pessoal)

Pouco se conhece sobre a interação de *A. costaricensis* com seus hospedeiros intermediários. A maior parte da literatura que aborda a relação molusco/ parasito focaliza nas diversas helmintoses de interesse médico e veterinário, envolvendo pulmonados da ordem Basommatophora (*Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*) e trematódeos digenéticos (*Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*) (van der Knaap & Loker 1990, Yakovleva et al. 2001, Bayne et al. 2001).

Os moluscos apresentam sistema imunológico inato (pré- B linfóide), compreendendo fatores celulares e humorais. Os hemócitos (celomócitos, amebócitos) representam o principal componente celular do sistema imunológico dos moluscos (Humphries & Yoshino 2003) e reações granulomatosas e de encapsulamento foram amplamente descritas na literatura (Newton 1952, Pan 1965, Harris & Cheng 1975, Mendonça et al. 1999, 2003). Fagocitose e citotoxicidade foram apontados como os principais mecanismos de defesa na relação Basommatophora / Digenea (Sapp & Loker 2000).

Considerando que, até o momento, os hospedeiros intermediários da angiostrongilíase abdominal são gastrópodes da subclasse Pulmonata, o presente estudo visou analisar a relação entre *A. costaricensis* e moluscos desse grupo, enfocando comparativamente na resposta hemocitária e tecidual peri ou justal ar vária e na recuperação larvar em representantes de três ordens de pulmonados: Stylommatophora (Limacidae: *Deroceras* sp., Succineidae: *Omalonyx matheroni*), Soleolifera (Veronicellidae: *Sarasinula marginata*), Basommatophora (Planorbidae: *Biomphalaria glabrata*). A resposta hemocitária verificada em *Deroceras* sp. e *B. glabrata* foi comparada com a publicada na literatura para *S. marginata* (Mendonça et al. 1999) e *O. matheroni* (Montresor et al. Manuscrito em preparação).

Todos os moluscos estudados são comprovadamente hospedeiros intermediários experimentais do *A. costaricensis* (Ubelaker et al. 1980, Lima et al. 1992, Montresor et al. manus. in prep.), exceto *Deroceras* sp.. Neste trabalho foi também investigado o potencial desse gênero como hospedeiro intermediário para o referido nematóide. Ressalta-se que

família Limacidae é amplamente distribuída e diversas espécies foram introduzidas em vários países do mundo, nos quais, frequentemente, atuam como pragas agrícolas (South 1992).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas: 1) resposta tecidual de *B. glabrata* e *Deroceras* sp. foi analisada (cortes histológicos) e comparada com os dados disponíveis na literatura para *O. matheroni* e *S. marginata*; 2) desenvolvimento larvário nas diferentes espécies foi observado através da recuperação de larvas por digestão de moluscos experimentalmente infectados com L1 (protocolos descrito abaixo).

A. costaricensis oriundo de Criciúma, Rio Grande do Sul, Brasil mantido no Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em lesmas *S. marginata* originárias de localidades do Rio de Janeiro (RJ, Brasil) e roedores *Sigmodon hispidus* (Incorporation Virion Systems, Rockville Washington).

Moluscos. Foram utilizadas quatro espécies de moluscos provenientes de três localidades dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Os espécimes digeridos para recuperação larvar foram obtidos diretamente do campo (exceto *B. glabrata*), enquanto os exemplares destinados ao estudo histológico foram oriundos de criação em laboratório. As quatro espécies foram as seguintes: *O. matheroni* RPPN Feliciano Miguel Abdala, município de Caratinga, MG, Brasil (~ 0,34g). *Deroceras* sp. e *S. marginata* – Campus da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brasil (~ 0,1g e 1,69g, respectivamente). *B. glabrata* – córrego Ressaca – Belo Horizonte, MG, Brasil (~ 12mm de diâmetro de concha criação do Departamento de Malacologia – IOC – FIOCRUZ). Todos os moluscos foram mantidos em laboratório, a temperatura ambiente de $24,7 \pm 1,6$ °C, durante todo o período estudado.

Obtenção das larvas L1 Fezes de *S. hispidus*, com aproximadamente 30 dias de infecção por *A. costaricensis*, foram sedimentadas em funil pelo método de Baermann (Willcox & Coura, 1989). Após 12 horas, o material foi centrifugado por cinco minutos em tubos de Falcon a 3000 RPM. O sedimento foi ressuspenso em 4 a 10 mL de água desclorada para a quantificação das larvas. O número de larvas foi estimado a partir da contagem de três amostras de 200 da suspensão homogeneizada, em microscópio óptico de campo claro.

Resposta tecidual. Exemplares de *B. glabrata* e *Deroceras* sp., criados em laboratório, foram infectados com 1200 L1. Para a infecção de *B. glabrata* a suspensão de larvas foi

adicionada a recipientes, contendo uma fina lâmina d'água onde os espécimes foram mantidos por 24 horas. No caso de moluscos terrestres como *Deroceras* sp., o material incluindo as larvas foi colocado sobre fragmentos de alface cobertos por fezes de camundongos sadios e oferecido para os exemplares como alimento (Morera 1973).

Após 30 minutos, 4 horas, 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de infecção, um espécime de cada gênero foi fixado por 72 horas em Formalin[®] Millonig de Carson (Carson et al. 1973). Um exemplar não infectado de cada espécie constituiu o controle negativo. Após a fixação os moluscos com as conchas (externa ou interna) foram imersos em solução de EDTA 10% e mantidos por 15 dias para que as mesmas fossem foram descalcificadas. Posteriormente o material foi incluído em parafina e submetido a corte histológico seriado de 5 μ m de espessura. Um a cada seis cortes foi corado em HE, analisado e fotografado em microscópio óptico de campo claro Olympus Nikon Eclipse E800.

A presença de colágenos intersticiais na reação hemocitária e tecidos adjacentes foi verificada em lâminas de exemplares (*Deroceras* e *Biomphalaria*) com 30 dias de infecção coradas com Ácido fosfomolibdico[®] Picrossírius (PMA[®] PSR) (Dolber & Spach, 1993) e lidas em microscópio confocal (LSM – 510 Meta – Zeiss).

Os aspectos da reação hemocitária verificados em *Deroceras* sp. e *B. glabrata* foram comparados com os descritos em *S. marginata* (Mendonça et al. 1999, 2003) e *O. matheroni* (Montresor et al. manus. in prep.).

Recuperação larvar – Antes do início dos experimentos, 30 exemplares de *Deroceras* sp., *B. glabrata*, *S. marginata* e *O. matheroni*, obtidos diretamente do campo, foram digeridos, sedimentados em funil (Wallace & Rosen 1969) e observados em microscopia de campo claro. Somente moluscos de localidades sem evidência de parasitos foram empregados nos experimentos. Exemplares de cada uma das quatro espécies de moluscos foram individualmente expostos a 400 L1 de *A. costaricensis*, de acordo com o procedimento descrito acima. *S. marginata* e *O. matheroni* foram infectados através da oferta de fragmento de alface com fezes, como descrito previamente para *Deroceras* sp. Após 5, 10, 15, 20 e 30 dias de infecção, grupos de dez exemplares de cada espécie foram digeridos e sedimentados em funil (Wallace & Rosen 1969). Após 12 horas, o material foi coletado em tubos Falcon de 15 mL e centrifugado. O sedimento foi então ressuspendido em 500 μ L de água desclorada para a contagem e observação das larvas em microscópio óptico de campo claro. A identificação do estágio de desenvolvimento das larvas foi feita de acordo com Morera (1973).

Para observar variações/ semelhanças no desenvolvimento larvar foi quantificado o número de larvas de cada estágio de desenvolvimento (L2/ L3), em cada ponto de infecção (5, 10, 15, 20, 30 dias), em todas as espécies estudadas. Os resultados foram submetidos ao teste do qui-quadrado para verificação da significância dos valores obtidos e construção de um gráfico.

Potencial infectante das L3 oriundas de *Deroceras* sp. – As L3 obtidas a partir da digestão de *Deroceras* sp. foram utilizadas na infecção “per os” de *Mus musculus* swiss albinos. Cada camundongo foi infectado com 7 a 10 L3. Após 30 dias de infecção, 10 animais foram anestesiados, mortos e necropsiados para a verificação da presença de vermes adultos de *A. costaricensis* no plexo mesentérico dos roedores.

RESULTADOS

Resposta tecidual.

B. glabrata – Penetração ocorreu pelas vias cutânea e oral. Nas primeiras horas de infecção, grande número de larvas se encontrava no lúmen do trato digestivo, ou transpondo a parede gastrointestinal (Figs. 1 e 2). Com quatro horas de infecção, alguns hemócitos se localizavam os redor de larvas, configurando reação hemocitária inicial. Com dois dias, o agregado de hemócitos assumia padrão nodular, pré-granulomatoso (Figs. 3, 4). As L2 estavam acompanhadas de reação hemocitária mais intensa e com cinco, 10 e 15 dias foram observados granulomas ao seu redor (Figs. 5, 6). No entanto, no 15º dia, com o surgimento de L3, a reação celular diminui e, com 20, 25 e 30 dias, granulomas foram encontrados em menor frequência e a maior parte das larvas se encontravam envoltas por reação encapsulante, constituída por delgadas camadas tipo fibroblásticas (encapsulamento) ou achavam-se livres nos tecidos (Fig. 7, 8). Nos 20º, 25º e 30º dias apareceram L3 bem formadas, caracterizadas pela ausência de vacúolos lipídicos no epitélio intestinal e presença de alas laterais evidentes na cutícula. Granulomas ou reação hemocitária intensa em torno de L3 foram observados ocasionalmente (Fig. 9).

Mesmo nos pontos mais tardios foram encontradas L2 simultaneamente com L3 (Fig. 10), aquelas manifestas por gotículas lipídicas no epitélio intestinal e cercadas por exacerbada reação hemocitária. Em algumas áreas, principalmente em região podálica, hemócitos dispersos ou constituintes de reação granulomatosa perilarvária estavam repletos de pigmento melânico. As reações amebocitárias, mesmo quando sob a forma de granulomas, não exibiram presença de colágenos intersticiais (Figs. 11, 12).

Deroceras sp. – Após 30 minutos de infecção, foi evidenciada penetração cutânea (Fig. 13) e oral e, com quatro horas já ocorria reação hemocitária justalarval inicial (Fig. 14). Com dois dias, a reação se intensificava e assumia aspecto nodular pré-granulomatoso (Fig. 15, 16). No 5º dia, foi constatado grande número de granulomas bem organizados em torno de larvas, com hemócitos assumindo aspecto fibroblastóide na periferia (Figs. 17, 18). Aos 10 dias de infecção, os granulomas ainda se encontravam presentes, juntamente com L2. Larvas L3 foram identificadas no 15º dia, no qual ocorreu pequena redução na intensidade da resposta hemocitária, principalmente ao redor desse estágio larvar. Larvas L2 e L3 foram simultaneamente observadas no 15º, 20º e 25º dias de infecção, sendo que somente as L2 apresentavam ao seu redor reação granulomatosa (Fig. 19), com hemócitos ativados, caracterizados por citoplasma volumoso (Figs. 19, 20). Houve diminuição no número de hemócitos ao redor de L3, os quais não exibiam mais sinais morfológicos de atividade (Fig. 21). No 30º dia, L3 estavam envoltas por reação hemocitária pouco intensa (Figs. 22, 23) e/ou encontravam-se livres no tecido. Em torno de alguns granulomas perilarvários houve evidência de neossíntese de colágeno no tecido adjacente (Fig. 24).

Análise comparativa dos resultados

Os resultados acima descritos quando comparados com aqueles obtidos em *O. matheroni* (Montresor et al. manus. in prep.) e em *S. marginata* (Mendonça et al. 1999, 2003) possibilitaram verificar as seguintes semelhanças e diferenças na resposta das quatro espécies de moluscos à infecção experimental por *A. costaricensis*:

Ocorreu penetração oral e cutânea em todas as espécies em período de tempo relativamente curto (30 minutos de infecção).

Todas as espécies apresentaram resposta hemocitária às larvas. As L2 foram alvo de resposta hemocitária mais intensa do que as L1 e L3. Reação granulomatosa estava mais relacionada a L2. Com o decorrer da infecção e surgimento de L3, a resposta hemocitária diminuiu acentuadamente em todas espécies, exceto em *S. marginata*, na qual manteve-se constante por todo o período de infecção estudado.

Quanto à rapidez e intensidade da resposta hemocitária, *Deroceras* sp. e *S. marginata* mostraram rapidamente o recrutamento de grande número de hemócitos para os locais onde se encontram as larvas invasoras. Logo no quinto dia, nessas duas espécies, foi

marcante a presença de grande número de granulomas perilarvários bem desenvolvidos. Os moluscos *O. matheroni* e *B. glabrata* apresentaram respostas mais lentas e tardias.

Em *O. matheroni*, a reação hemocitária foi mais acentuada em torno de L2 em transição para L3, a qual era constituída por hemócitos volumosos, com citoplasma eosinofílico, vacuolizado, com núcleos deslocados para a periferia, sugestivos de hemócitos ativados. Esses aspectos morfológicos dos hemócitos de *O. matheroni* não foram verificados em nenhuma das outras espécies, independentemente do tempo de infecção.

Em todos os modelos foi constatado que os hemócitos tendiam a se agregarem na face côncava das larvas. Os hemócitos presentes nesse local eram, com freqüência, morfológicamente distintos dos demais, apresentando eosinofilia e vacuolização citoplasmática, rechaço periférico do núcleo, indicativos de ativação celular.

As larvas de qualquer estágio, em todas as espécies de moluscos e em todos os tempos de infecção estudados, exibiam um espaço (túnel) perilarvar que as mantinham distantes da reação hemocitária.

B. glabrata e *S. marginata* não apresentaram evidência de colágeno no interior da reação granulomatosa e nem em seu redor. No entanto, em *Deroceras* sp. e *O. matheroni* ocorreu neossíntese de uma delgada cápsula colagênica na periferia dos granulomas, constituída por fibras bem mais delgadas que as existentes normalmente no tecido adjacente. Em *Deroceras* sp., o colágeno estava incorporado aos estratos periféricos da reação granulomatosa, enquanto em *O. matheroni*, a neossíntese colagênica era externa aos granulomas, situando-se no tecido adjacente.

Os controles negativos não apresentaram alterações histológicas em nenhuma das espécies estudadas.

Desenvolvimento larvar.

O gráfico I representa a porcentagem de cada estágio larvar observado nos diferentes tempos. Existem diferenças significativas (qui-quadrado) nos dias: 15 (qui-quadrado: 112,2, gl=3, $p < 0,001$), 20 (qui-quadrado: 48,6, gl=3, $p < 0,001$) e 30 (qui-quadrado: 67,4734, gl=3, $p < 0,001$). Como aos cinco e 10 dias as L3 ainda não tinham se desenvolvido (Morera 1973), esses pontos não contribuíram para o estudo do desenvolvimento larvar.

Potencial infectante das L3 oriundas de *Deroceras* sp. – Foram encontrados vermes

adultos de *A. costaricensis* no plexo mesentérico dos 10 *M. musculus* necropsiados, após 30 dias de infecção.

DISCUSSÃO

Sabe-se que *A. costaricensis* tem a capacidade de infectar amplo espectro de hospedeiros intermediários gastrópodes da subclasse Pulmonata. Neste trabalho observou-se utilizando exemplares das ordens Basommatophora (*B. glabrata*), Stylommatophora (*Deroceras* sp. e *O. matheroni*) e Soleolifera (*S. marginata*) que em todos estes moluscos ocorreu reação hemocitária peri ou justalarvária, que exibiu alguns aspectos peculiares a depender do molusco, tendendo a circunscrever especialmente as diversas formas larvares sob a forma de encapsulação e mesmo de granulomas bem configurados.

Os resultados demonstram que *A. costaricensis* exibe comportamento ativamente invasivo, uma vez que em todas as espécies de moluscos estudadas foi possível evidenciar claramente as formas oral e cutânea de penetração aos 30 minutos de infecção.

A penetração de larvas de nematódeos metastrongilóides em moluscos através da penetração pelo tegumento ou por ingestão ou pela combinação de ambas as formas, foi descrita por vários autores (Hobmaier & Hobmaier 1934, Cheng & Alicata 1965, Richards & Merritt 1967). Em *A. costaricensis* também foram reportadas ambas as formas de infecção (Morera 1973, Thiengo 1996, Mendonça et al. 1999), aqui confirmadas. Esses dados indicam que a infecção do parasito não parece envolver interações do tipo receptor-ligante, mas decorre da produção de proteases de amplo espectro de ação por parte do nematóide, digerindo ativamente os tecidos a serem invadidos (spreading factor) (Lee 1965). De fato, uma característica observada em cortes histológicos de organismos (vertebrados e invertebrados) infectados por metastrongilóides é a presença de espaço perilarvar (Serra et al. 2003, Harris & Cheng 1975), visto aqui também em todos os modelos estudados. Esse espaço ou túnel parece decorrer da liberação de proteases pelas larvas, sugerindo que o parasito utiliza um mecanismo de digestão extracorpórea para a penetração em seus hospedeiros, atuando nas junções intercelulares ao penetrarem por epitélios do tegumento ou do trato gastrointestinal.

Quanto à reação celular, os hemócitos foram recrutados, em todos os modelos, predominantemente por L2. Esse evento pode decorrer da imobilidade desse estágio larvar, facultando acúmulo gradativo de células em seu entorno. Por outro lado, pode também ocorrer quimiotropismo dos hemócitos por produtos larvários, principalmente lipídicos existentes nas L2, já que o sistema imunológico inato utiliza amplamente antígenos com

componentes lipídicos na detecção de patógenos (Iwasaki & Medzhitov 2004, Iwanaga & Lee 2005). É conhecida a presença de receptores do tipo Toll em invertebrados (Belvin & Anderson 1996) e sua importância no sistema imunológico inato tem sido reconhecida (Takeda et al. 2003, Iwasaki & Medzhitov 2004). Com as recentes evidências de que frações lipídicas isoladas de helmintos, no caso *Schistosoma mansoni*, ativam TLR2 (Toll-like receptors tipo2) (van der Kleij et al. 2002), existe a possibilidade desses receptores estarem envolvidos na resposta de invertebrados, inclusive moluscos, a helmintos. As L2 de *A. costaricensis*, além de lipídeos, apresentam também, em sua composição, carboidratos parcialmente constituídos por N-acetil-D-glactosamina, alfa-manosil e alfa-glicosila (Mendonça et al., submetido).

Em todos os modelos estudados foi verificada afinidade dos hemócitos pela face côncava das larvas. Um grande número de células freqüentemente se encontrava presente nessa região, apresentando morfologicamente distintas daquelas que se localizavam em outras regiões das larvas. Tinham citoplasma mais eosinofílico e volumoso, com microvacuolizações e núcleos deslocados para a periferia, indicando ativação celular. O tropismo celular pela face côncava também foi observado em vertebrados (Serra et al. 2003) e provavelmente se deve à liberação de produtos larvários pelo poro excretor. De fato, uma variedade de nematódeos excreta substâncias antigênicas em seus hospedeiros através do poro excretor, geralmente mediano e ventral (Schmidt & Roberts 1981). Tendo em vista que nos modelos vertebrado e invertebrado as células se agregam na face côncava da larva, pode inferir que os mesmos produtos larvários estimulam células de organismos de táxons muito distintos, reafirmando a alta conservação de alguns elementos do sistema imunológico em invertebrados e mesmo em vertebrados. De fato, trabalhos recentes têm chamado a atenção para a manutenção de diversos mecanismos em seres filogeneticamente distantes, reforçando assim a antiguidade do surgimento do sistema imunológico inato, seu alto grau de conservação e sua importância evolutiva (Hoffmann 2004, Iwanaga & Lee 2005).

A velocidade e intensidade do recrutamento dos hemócitos, bem como seu grau de ativação não segue os mesmos padrões entre as espécies e, enquanto em *Deroceras sp.* e *S. marginata* a resposta é rápida, culminando na presença de grande número de granulomas no 5º dia, em *B. glabrata* e *O. matheroni* a resposta se dá de forma mais lenta. Em *O. matheroni*, a formação de granulomas é ocasional, sendo observado o predomínio de reações de padrão nodular (pré-granulomas). Outro aspecto distintivo observado em *O. matheroni* é a intensa ativação celular, principalmente na presença de L2 transicionais. *B. glabrata* também

demonstrou peculiaridades, tais como presença de melanina nos hemócitos e a formação de delgada cápsula celular fibroblastóide (encapsulação), não verificada nos outros modelos.

As variações no padrão reacional hemocitário entre as várias espécies de molusco, perante o mesmo tipo de infecção, indicam individualidade reacional, ou seja, as células dos moluscos não são funcionalmente homogêneas nas diferentes espécies. Essa constatação sugere que elas apresentam receptores característicos de cada espécie ou respondem de forma diferenciada aos mesmos estímulos. De fato, a heterogeneidade do sistema de defesa dos moluscos e de outros invertebrados tem sido investigada (Yakovleva et al. 2001, Iwanaga & Lee 2005) e efeitos espécie-específicos de citocinas e de outros peptídeos foram demonstrados (Ottaviani et al. 1995). Invertebrados podem discriminar, freqüentemente de modo bastante específico, entre várias substâncias estranhas. Fatores presentes no fluido corporal dos invertebrados atuam como moléculas de reconhecimento, incluindo aglutininas, componentes da cascata da profenoloxidase e, em insetos, a hemolina (tipo de cecropina) (Horton & Ratcliffe, 1996). Uma variedade de moléculas com atividade tipo citocina tem sido referida em invertebrados. Em insetos, essas incluem um fator de depleção de plasmatócitos (tipo leucócito), um ativador de leucócitos (denominado hemoquinina) e vários estimulantes da encapsulação e fagocitose (Horton & Ratcliffe, 1996; Loret & Strand, 1998).

A presença de melanina nos hemócitos de *B. glabrata* pode ser simplesmente decorrente da sua presença nos tecidos dos moluscos. Como os hemócitos têm alta atividade fagocítica, a interiorização de moléculas contidas nos tecidos, como a melanina, ocorreriam com freqüência. Tem sido demonstrado que a melanina pode desempenhar funções de defesa devido às moléculas citotóxicas que são geradas durante a melanogênese (ROI – reativos intermediários do oxigênio, semiquinonas e metídeos de quinonas). Freqüentemente, em invertebrados, a melanina é incorporada nas reações de encapsulação a bactérias e fungos (Horton & Ratcliffe, 1996; Klein & Horejsi, 1997).

Todas as espécies estudadas, exceto *S. marginata*, apresentaram redução na resposta após o 15º dia, com presença de larvas livres. Esse fato pode estar relacionado à baixa atração dos hemócitos por L3. No entanto, Harris & Cheng (1975), no modelo *Angiostrongylus cantonensis* em *B. glabrata* relacionaram este fato à mobilidade das L3, que, após sua maturação iniciam um processo de migração pelo tecido, durante o qual podem se encontrar larvas sem reação ou envoltas por encapsulação. Considerando-se que o espaço perilarvar denota a liberação de proteases pelas larvas e que a muda L2-L3 de *A. costaricensis* ocorre entre 11 e 14 dias de infecção (Morera 1973), o encontro de larvas sem reação após esse

período pode indicar que elas evadiram a cápsula onde se encontravam retidas e migraram pelo tecido. Em *S. marginata* os granulomas se mantiveram presentes em todos os tempos analisados.

Deve-se ressaltar que, em nenhum dos modelos, a reação celular foi larvicida. Sabe-se que larvas de diversas espécies de nematódeos metastrongilóides permanecem aparentemente intactas mesmo quando circundadas pela reação celular do hospedeiro – vertebrado ou invertebrado (Harris & Cheng, 1975, Mendonça et al., 1999, Serra et al. 2003). Uma vez que a reação celular não destrói a larva e ainda favorece sua liberação pelo rompimento de granulomas perilarvários durante a contração muscular (Conejo & Morera 1988, Mendonça et al. 2003), a encapsulação de *A. costaricensis* em moluscos veronicelídeos tem sido considerada um exemplo de utilização ou de exploração pelo parasito da resposta imune do hospedeiro. Esses aspectos da relação parasito-hospedeiro têm sido discutidos por Damian (1987) e Lenzi et al. (1997). A criação do espaço perilarvar por proteases parece ser um evento importante para a proteção do parasito, pois impossibilita que as células do hospedeiro toquem a superfície das larvas. Mesmo intensas degranulações de eosinófilos, em ratos, ficam barradas pelo espaço perilarvar (Serra et al. 2003).

Outro aspecto que demonstrou variações no padrão reacional entre as espécies de moluscos estudadas foi a presença de colágeno nos granulomas. Em *S. marginata* e *B. glabrata* não foi detectado colágeno, enquanto em *Deroceras* sp. e *O. matheroni* houve neossíntese colagênica periférica aos granulomas. O aspecto dessas deposições não foi o mesmo, pois em *Deroceras* sp. a neossíntese estava incorporada à estrutura dos granulomas (região periférica), enquanto que em *O. matheroni* a reação colagênica ocorreu em tecido adjacente. Isso parece indicar que, em *Derocera* sp., os hemócitos foram responsáveis pela síntese de colágeno, ao passo que em *O. matheroni*, o colágeno foi sintetizado por fibroblastos do tecido adjacente aos granulomas. De fato, hemócitos e fibroblastos são responsáveis pela deposição de matriz extracelular em invertebrados, incluindo a neossíntese de colágeno. A participação dos hemócitos na síntese de colágeno tem se mostrado expressiva e moléculas semelhantes a PDGF (platelet-derived growth factor) e TGF- β (transforming growth factor- β) participam do processo (Franchini & Ottaviani 2000, Serpentine et al. 2000).

Assim como os hemócitos podem secretar colágeno, são também responsáveis pela lise dos tecidos nas áreas em que formam agregados e/ou granulomas justa ou perilarvários, pois tem a capacidade de liberar metaloproteínases (Azumi & Yokosawa, 1996; Ziegler et al. 2002; Ote et al. 2005).

Os dados obtidos pela digestão, recuperação e análise do desenvolvimento larvar (quadrado) em moluscos das quatro espécies em questão, em diferentes tempos de infecção, reforçam os indícios de heterogeneidade reacional verificados na histologia. O padrão de desenvolvimento das larvas se mostrou peculiar a cada espécie. Em *O. matheroni*, a maior porcentagem de L3 no 15° dia demonstra a possível participação dos hemócitos no processo de maturação das larvas, tendo em vista que essa foi a espécie que apresentou maior ativação amebocitária (eosinofilia e vacuolização citoplasmática) na presença de L2 transitórias. Assim sendo, a ativação dos hemócitos por esse tipo de larva, a partir do 10° dia, pode estar relacionada ao maior desenvolvimento de L3 no 15° dia em *O. matheroni*. O desenvolvimento das L3 em *S. marginata* é retardado em relação às outras espécies, tendo em vista que esta apresentou uma proporção significativamente maior de L2 aos 20 e 30 dias. Nessa espécie, os amebócitos não estavam intensamente ativados apesar de presentes em grande número ao redor das larvas e, mesmo com 30 dias de infecção, essas se encontravam retidas por granulomas exuberantes. A hipótese acima, que aventa a possibilidade dos hemócitos interferirem na maturação larval, se baseia em sua capacidade de secretar fatores variados, como homólogos de astaquina (estimula a hematopoese em invertebrados) (Soderhall et al. 2005) e proteínas com domínios de metaloproteinase encontrados na família ADAM. Esses tipos de metaloproteinases podem clivar a matriz extracelular em tecidos em degeneração e remodelamento durante os períodos de muda em *Bombyx mori* (Insecta: Lepidoptera) (Ote et al. 2005). No molusco bivalve *Crassostrea virginica* foi identificada nos hemócitos atividade enzimática indicativa da presença de proteína semelhante a metaloproteinase (Metaloproteinase-like activity) (Ziegler et al. 2002)

As diferenças no padrão de resposta celular e no desenvolvimento larvar nesses moluscos demonstram que a resposta de cada espécie apresenta características próprias e está relacionada com o desenvolvimento do parasito. De fato, trabalhos recentes sobre o sistema de defesa de invertebrados vêm demonstrando que cada espécie apresenta padrões característicos de defesa que dependem de uma ampla variedade de fatores biológicos (Iwanaga & Lee 2005). Entretanto, estudos abrangendo moluscos da mesma espécie oriundos de diferentes localidades devem ser realizados para verificar se os resultados observados neste estudo representam padrões específicos ou se as variações intraespecíficas são tão significativas quanto as interespecíficas. Trabalhos que comparem os aspectos do parasitismo em espécimes oriundos de áreas endêmicas e de áreas onde a parasitose não está presente serão imprescindíveis para uma melhor avaliação dos fatores que influenciam a relação parasito-hospedeiro.

A caracterização dos mecanismos moleculares empregados no sistema imunológico inato dos invertebrados tem sido considerada uma etapa essencial ao esclarecimento do funcionamento deste sistema imunológico (Humphries & Yoshino 2003, Hoffmann 2004, Iwanaga & Lee 2005). No entanto, a maior parte dos dados disponíveis na literatura foram obtidos com ensaios *in vitro* ou histoquímica, não tendo sido demonstrada a estrutura molecular de receptores e mediadores envolvidos nesses processos (Humphries & Yoshino 2003).

Neste trabalho foi ainda verificado o potencial infectante das L3 recuperadas a partir de exemplares de *Deroceras* sp. experimentalmente infectados. Esse gênero de origem européia foi introduzido em diversas localidades e se encontra amplamente distribuído pelo mundo, inclusive no Brasil (South 1992, Fernandes 1982, Chiaridia et al. 2004). Está frequentemente associado ao peridomicílio e, atua como praga agrícola. Esse gênero é também vetor de *Angiostrongylus cantonensis* (Alicata 1965) e, no Brasil (Santa Catarina), foram encontrados espécimes infectados com larvas de metastrogilóides em área endêmica de angiostrongilíase abdominal (Maurer et al. 2002). A distribuição da espécie, bem como seu habitat, fazem dela um vetor com potencial importância epidemiológica.

Foi por tanto demonstrado que *A. costaricensis* se desenvolve em moluscos representantes da subclasse Pulmonata, independentemente da ordem a que pertençam. Os dados indicam que o padrão reacional do sistema imunológico dos pulmonados compartilha muitos aspectos conservados, apesar da ocorrência de certas peculiaridades entre as espécies.

Estudos visando caracterizar os aspectos moleculares do sistema imunológico dos moluscos serão essenciais para uma melhor compreensão de sua interação com os helmintos.

AGRADECIMENTOS

Dra Ligia Corrêa, Departamento de Malacologia (IOC – FICRUZ) que cedeu^{nos} gentilmente os espécimes de *B. glabrata*; Iolanda de Olinda Pedro, Andréa Natividade da Silva, Alexandra M dos Anjos, Luciana S Souza, Luzia HP Barroso do Departamento de Patologia (IOC, FIOCRUZ) e Sueleny Silva Ferreira Teixeira do Moluscário do CPqRR (FIOCRUZ) pelo apoio técnico; e Adriano Paglia, Conservation International pela ajuda na elaboração do gráfico aqui apresentado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alicata JE 1962. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. *Can J Zool* 40: 5.
- Azumi K, Yokosawa H 1996. Characterization of novel metalloproteases released from ascidian hemocytes by treatment with calcium ionophore. *Zoolog Sci* 13: 365-370.
- Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasit* 123: 159-167.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA 1973. Formalin fixation for electron microscopy: a reevaluation. *Am J Clin Pathol* 59: 365-375.
- Cheng TC & Alicata JE 1965. On the modes of infection of *Achatina fulica* by the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Malacol* 2(2): 267-274.
- Chiaradia LA, Milanez JM, Graeff-Teixeira C, Thomé JW 2004. Lesmas: pragas da agricultura e ameaça à saúde humana. *Agropecu Catarin* 17(2): 70-74.
- Conejo ME, Morera P 1988. Influencia de la edad de los veronicelideos em la infección con *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Biol trop* 36 (2B): 519-526.
- Damian RT 1987. The exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol* 73: 313-319.
- Dolber PC & Spach MS 1993. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 41: 465-469.
- Fernandes JV 1982. Contribucion al conocimiento de las babosas y sietecueros (Mollusca: Gastropoda) que causan daños a la agricultura en venezuela. *Rev Fac Agron (Maracay)* XII(3-4): 353-386.
- Franchini A., Ottaviani E 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF- β . *Tissue e Cell* 32: 312-321.
- Graeff-Teixeira C, Thiengo SC, Thomé JW, Medeiros AB, Camillo-Cobura L, Agostini AA 1993. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 487-489.
- Harris KR & Cheng TC 1975. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. *Int J Parasitol* 5: 521-528.

- Hobmaier A, Hobmaier M 1934. The route of infestation and the site of localization of lung worms in molluscs. *Science* 80: 229.
- Hoffmann A J 2004. Primitive immune systems. *Immunological Reviews* 198: 5–9
- Horton J, Ratcliffe N 1996. Evolution of immunity, 4th ed., In I Roitt, J Brostoff, D Male. *Immunology*, Mosby, London, p.15.1–5.22.
- Humphries J E & Yoshino T THY P 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates *Integr. comp. biol.* 43:305–312
- Iwanaga S, Lee BL 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Jour. Biochem. Mol. Biol.* 38(2): 128–130.
- Iwasaki A & Medzhitov R 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol.* 5 (10): 987–995.
- Klein J, Horejsi V 1997. *Immunology*, 2nd ed., Blackwell Science, London, 722 pp.
- Lee DL 1965: *The Physiology of Nematodes*. University reviews in biology. Editora: Oliver & Boyd LTD. London, 154p.
- Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo Machado M, Panasco MS, Romanha WS, Lenzi JA 1997. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(Suppl. II): 19–32.
- Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS 1992. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). *Rev Inst Med trop São Paulo* 34: 399–402.
- Loret SM, Strand MR 1998. Follow-up of protein release from *Pseudoplusia includens*: a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. *Eur J Cell Biol* 76: 146–155.
- Maurer RL, Graeff Teixeira C, Thomé JW, Chiaradia LA, Sugaya H, Yoshimura K 2002. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with *Metastrongylid* larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44 (1) 53–54.
- Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL 1999. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental

- intermediate host (*Sarasinula marginata*). Mem Inst Oswaldo Cruz 94(4): 549-556.
- Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Machado PM, Caputo LFG, Lenzi HL 2003. *Angiostrongylus costaricensis* and Experimental infection of *Sarasinula marginata* I. Elimination routes. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 893-898.
- Montresor L C, Vidigal THDA, Mendonça CL; Carvalho OS, Mota E M, Caputo LFG, Lenzi HL. Infecção experimental de *Omalonyx matheroni* (Gastropoda: Succineidae) por *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae) e estudo da via migratória parasitária. Artigo no Prelo.
- Morera P 1973. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes, 1971). Am J Trop Med Hyg 22: 613-621.
- Morera P 1985. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. Parasitol Today 1: 173-175.
- Morera P 1988. Angiostrongilíase abdominal: um problema de saúde pública? Rev Soc Bras Med Trop 21: 81-83.
- Morera P, Céspedes R 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop 18: 173-185, 197.
- Morera P, Ash LR 1971. Investigación del huesped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chileno Parasitol 25: 135.
- Newton WL 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 362:366
- Ote M, Mita K, Kawasaki H, Kobayashi M, Shimada T 2005. Characteristics of two genes encoding proteins with an ADAM-type metalloprotease domain, which are induced during the molting periods in *Bombyx mori*. Arch Insect Biochem Physiol 59: 91-98.
- Ottaviani E., Franchini A., Cassanelli S, Genedani S. 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. Biol Cell 85: 87-91.
- Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am J Trop Med Hyg 14: 931-976
- Rambo RP, Agostini AA, Graeff-Teixeira C 1997. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil: Prevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate Host from Eighteen Endemic Foci. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 9-14.

- Richards CS, Merritt JW 1967. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. *J Parasitol* 53(2): 382-388.
- Sapp KK & Loker ES. 2000. A comparative study of mechanism underlying digenean snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *Journal of Parasitol* 86: 1020-1029
- Schmidt G D & Roberts LS. 1981. Phylum Nematoda IN: Foundations of Parasitology. 2^a edition. The CV Mosby Company. London.
- Serpentini A., Ghayor C, Poncet J.M, Hebert V, Galéra P, Pujol JP., Boucaud-Camou E J, Lebel M. 2000. Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF in hemocytes from the Gastropod Mollusc, *Haliothis tuberculata*. *J.Experimental Zoology* 287: 275-284.
- Serra MF, Barreto EO, Silva JP, Azevedo V, Mota EM, Pelajo Machado M, Lucena S, Pires AI, Carvalho V, Cordeiro RS, Lenzi HL, Silva PM, Martins MA 2003. Kinetics of eosinophil and IgE mast cell changes following infection with *Angiostrongylus costaricensis* in Wistar rats. *Parasite Immunol* 25: 169-177.
- Sodehall I, Kim YA, Jiravanichpaisal P, Lee SY, Sodehall K 2005. An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. *J Immunol* 174: 6153-6160.
- South, A 1992. *Terrestrial Slugs. Biology, ecology and control*. Chapman & Hall, London, UK, xxii + 428 pp.
- Takeda K & Akira S 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 5(3), 143-153.
- Thiengo SC 1996. Mode of Infection *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 277-278.
- Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J 1980. Emergence of Third Stage Larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). *J Parasitol* 66(5): 856-857.
- van der Knaap WPW, Locker ES 1990. Immune Mechanisms in Trematode Snail Interactions. *Parasitol Today* 6(6): 175-182.
- Wallace GD & Rosen L 1969. Technique for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacol* 7: 427-438.
- Willcox HP, Coura JR 1989. Nova concepção para o método de Baermann Moraes Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(4): 539-565.

Yakovleva N. V., Samoilovich M. P, Gorbushin A. M. 2001. The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs. *J. Evolutionary Biochemistry and Physiology* 37 (4): 358-367.

Ziegler G, Paynter K, Fisher D 2002. Matrix metalloproteinase-like activity from hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131: 361-370.

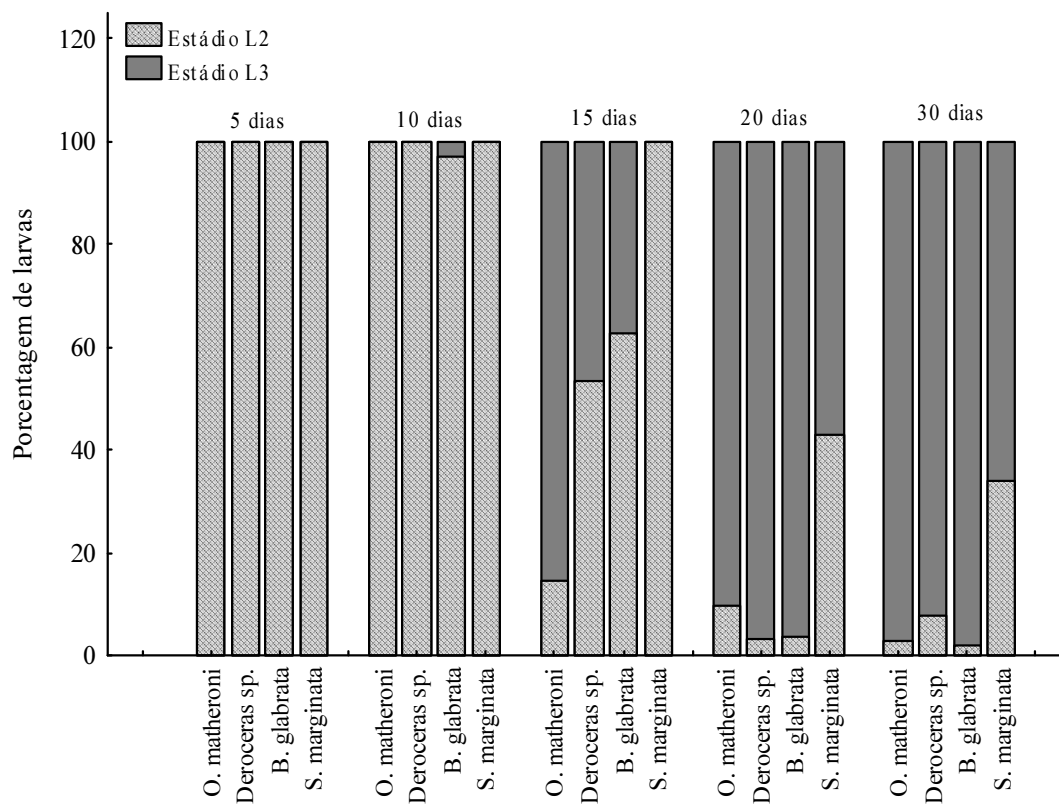


Gráfico I: Porcentagem de L2 e L3 de *A. costaricensis* encontradas com 5, 10, 15, 20 e 30 dias, em todas as espécies de moluscos estudadas (*O. matheroni*, *Deroceras sp.*, *B. glabrata*, *S. marginata*).

Figuras 1 a 12: Correspondem a exemplares de *B. glabrata*

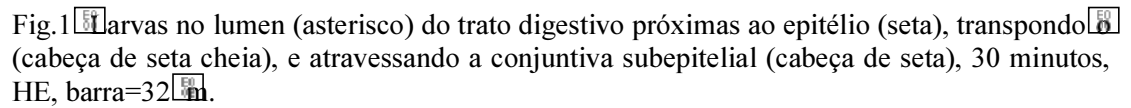

Fig.1  Larvas no lumen (asterisco) do trato digestivo próximas ao epitélio (seta), transpondo (cabeça de seta cheia), e atravessando a conjuntiva subepitelial (cabeça de seta), 30 minutos, HE, barra=32  μ m.

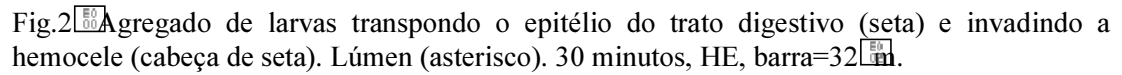

Fig.2  Agregado de larvas transpondo o epitélio do trato digestivo (seta) e invadindo a hemocele (cabeça de seta). Lúmen (asterisco). 30 minutos, HE, barra=32  μ m.

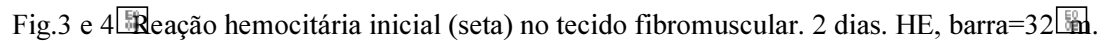

Fig.3 e 4  Reação hemocitária inicial (seta) no tecido fibromuscular. 2 dias. HE, barra=32  μ m.

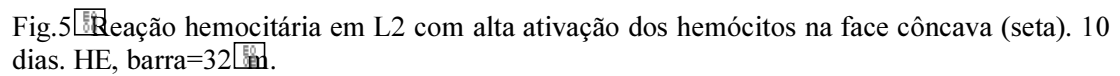

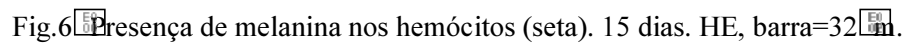

Fig.5  Reação hemocitária em L2 com alta ativação dos hemócitos na face côncava (seta). 10 dias. HE, barra=32  μ m.

Fig.6  Presença de melanina nos hemócitos (seta). 15 dias. HE, barra=32  μ m.

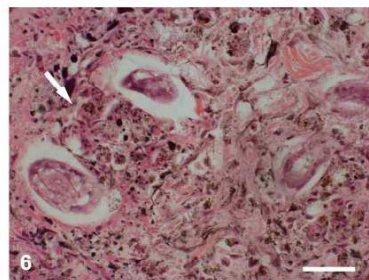
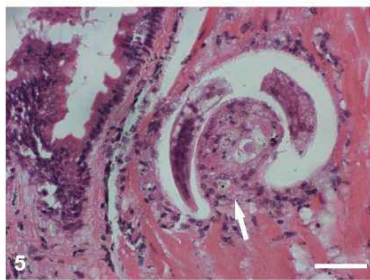
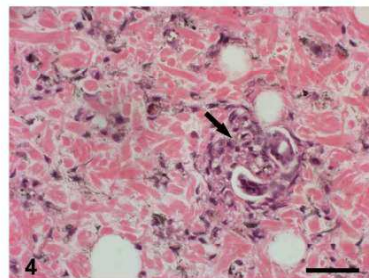
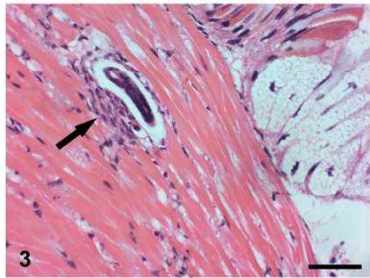
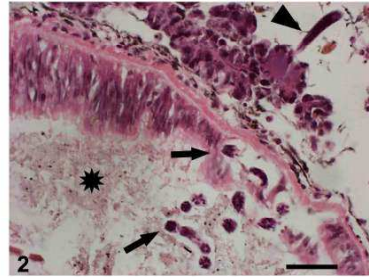
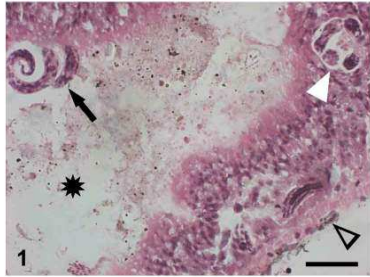


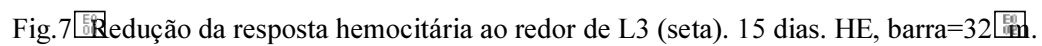
Fig.7  Redução da resposta hemocitária ao redor de L3 (seta). 15 dias. HE, barra=32 μm .

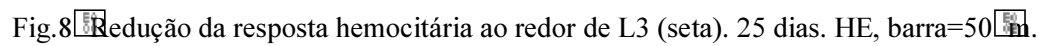
Fig.8  Redução da resposta hemocitária ao redor de L3 (seta). 25 dias. HE, barra=50 μm .

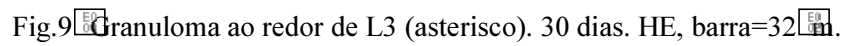
Fig.9  Granuloma ao redor de L3 (asterisco). 30 dias. HE, barra=32 μm .

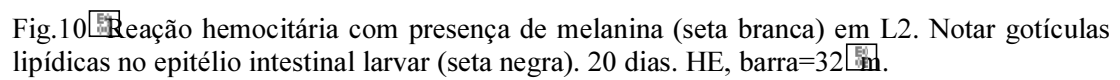
Fig.10  Reação hemocitária com presença de melanina (seta branca) em L2. Notar gotículas lipídicas no epitélio intestinal larvar (seta negra). 20 dias. HE, barra=32 μm .

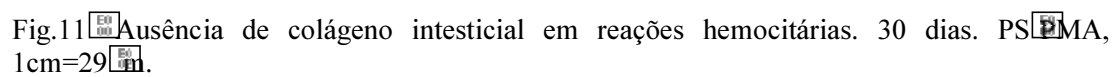
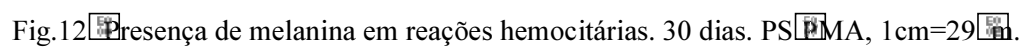
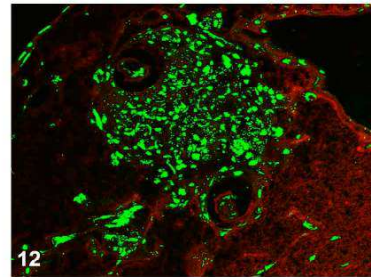
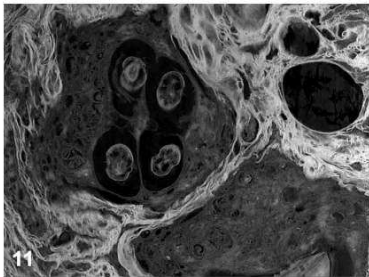
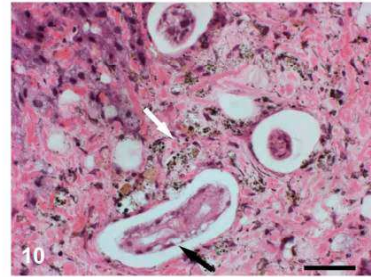
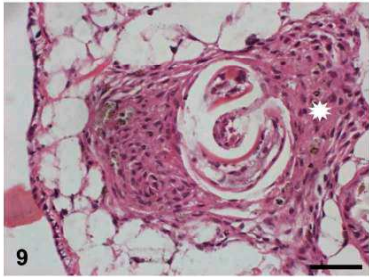
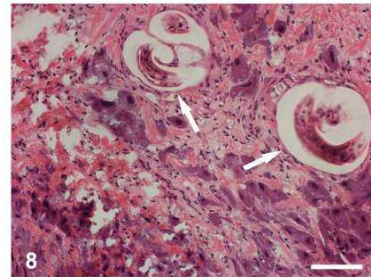
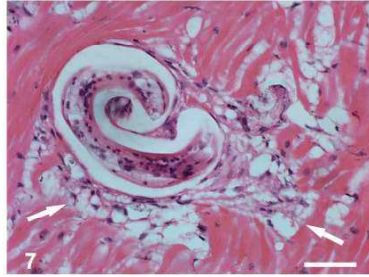
Fig.11  Ausência de colágeno intestinal em reações hemocitárias. 30 dias. PS-MA, 1cm=29 μm .

Fig.12  Presença de melanina em reações hemocitárias. 30 dias. PS-MA, 1cm=29 μm .



Figuras 13 a 24: Correspondem a exemplares de *Deroceras* sp.

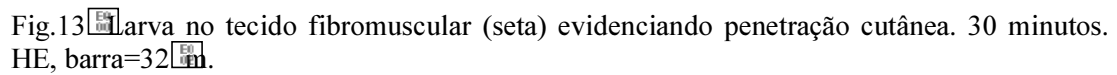
Fig.13  Larva no tecido fibromuscular (seta) evidenciando penetração cutânea. 30 minutos. HE, barra=32µm.

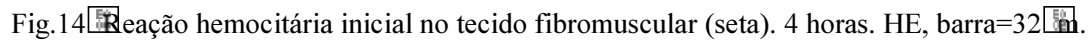
Fig.14  Reação hemocitária inicial no tecido fibromuscular (seta). 4 horas. HE, barra=32µm.

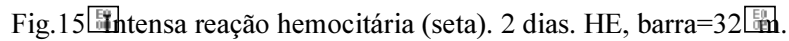
Fig.15  Intensa reação hemocitária (seta). 2 dias. HE, barra=32µm.

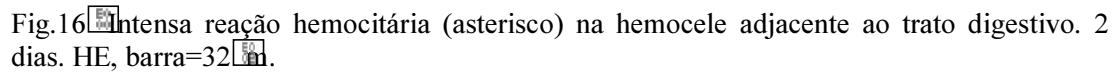
Fig.16  Intensa reação hemocitária (asterisco) na hemocele adjacente ao trato digestivo. 2 dias. HE, barra=32µm.

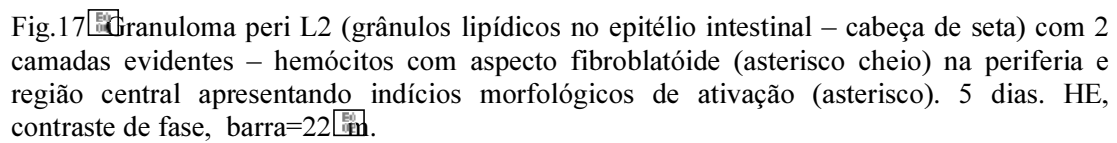
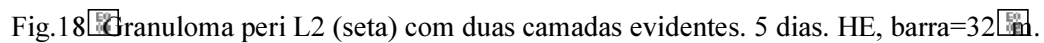
Fig.17  Granuloma peri L2 (grânulos lipídicos no epitélio intestinal – cabeça de seta) com 2 camadas evidentes – hemócitos com aspecto fibroblatóide (asterisco cheio) na periferia e região central apresentando indícios morfológicos de ativação (asterisco). 5 dias. HE, contraste de fase, barra=22µm.

Fig.18  Granuloma peri L2 (seta) com duas camadas evidentes. 5 dias. HE, barra=32µm.

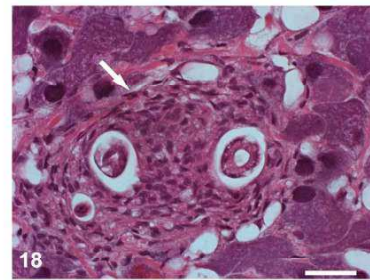
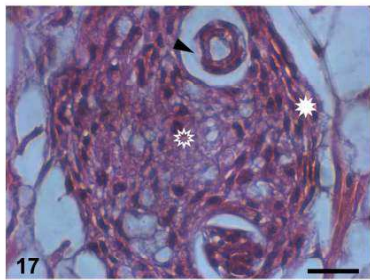
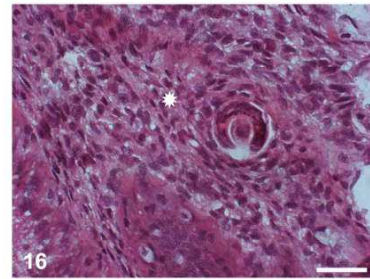
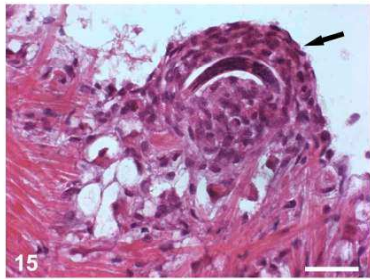
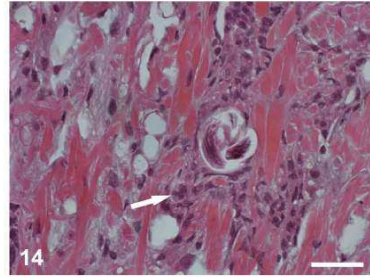
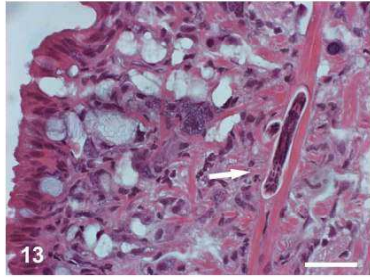


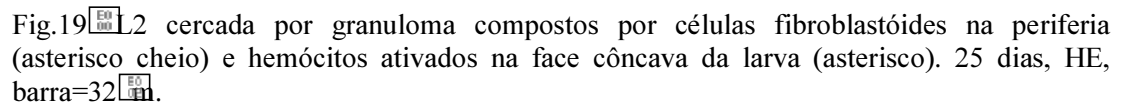
Fig.19  L2 cercada por granuloma compostos por células fibroblastóides na periferia (asterisco cheio) e hemócitos ativados na face côncava da larva (asterisco). 25 dias, HE, barra=32 μ m.

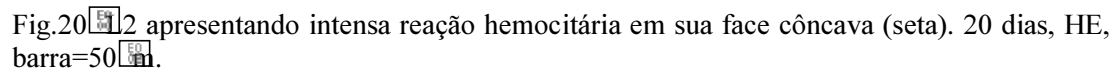
Fig.20  apresentando intensa reação hemocitária em sua face côncava (seta). 20 dias, HE, barra=50 μ m.

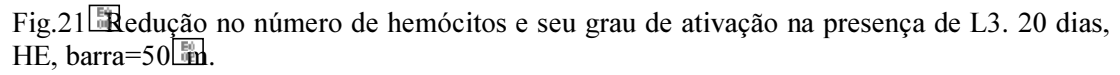
Fig.21  Redução no número de hemócitos e seu grau de ativação na presença de L3. 20 dias, HE, barra=50 μ m.

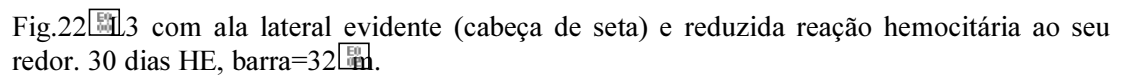
Fig.22  L3 com ala lateral evidente (cabeça de seta) e reduzida reação hemocitária ao seu redor. 30 dias HE, barra=32 μ m.



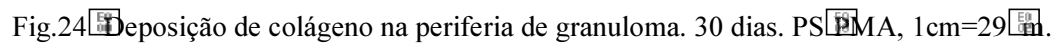

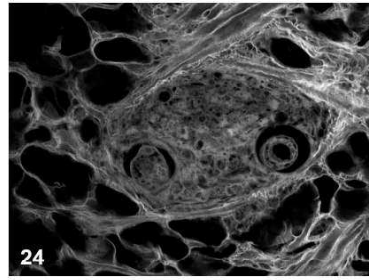
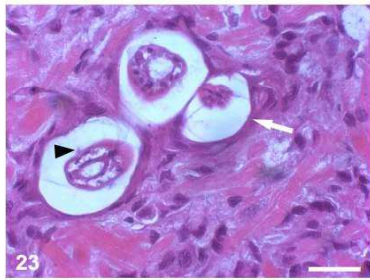
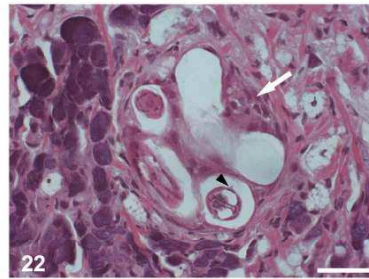
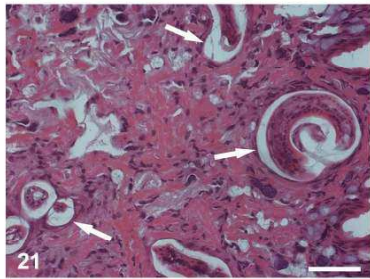
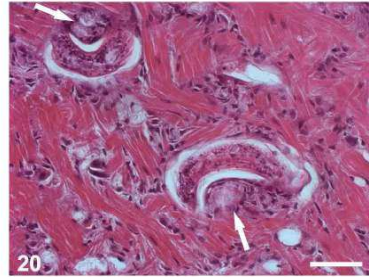
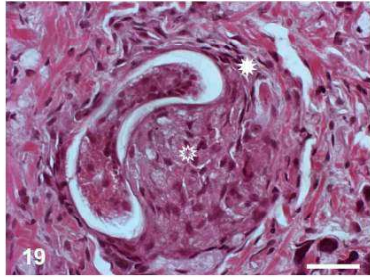
Fig.23  cabeça de seta). 20 dias. HE, barra=22 μm." data-bbox="165 336 870 370"/> Fraca reação hemocitária (seta) em L3 (alas laterais  cabeça de seta). 20 dias. HE, barra=22 μ m.

Fig.24  Deposição de colágeno na periferia de granuloma. 30 dias. PS , 1cm=29 μ m.



DISCUSSÃO

Neste estudo foi descrita a via migratória de *A. costaricensis* em *O. matheroni*, a reação hemocitária de moluscos pulmonados à infecção pelo referido nematóide, e o desenvolvimento larvar nas espécies estudadas. Dos moluscos que foram utilizados como modelo experimental, demonstrou a potencialidade de *O. matheroni* e *Deroceras* sp. atuarem como hospedeiros intermediários, desenvolvendo L3 infectantes.

Constatou-se que a via migratória de *A. costaricensis* em *O. matheroni* foi dependente dos caminhos disponibilizados pelo próprio sistema circulatório (Prancha 5). O amplo espalhamento de larvas por vários sítios do molusco resultou da distribuição da vascularização, bem como a presença de grande quantidade de larvas no tecido fibromuscular, rim e cavidade pulmonar (do manto) refletiu a alta irrigação/vascularização hemolinfática desses locais. Esse aspecto corroborou com os dados encontrados em *S. marginata* (Mendonça et al. 1999, 2003), na qual o tecido fibromuscular, o rim e o sistema circulatório também foram considerados locais de destaque na migração do parasito.

Ao comparar os resultados obtidos com *O. matheroni* aos disponíveis para *S. marginata* (Mendonça et al. 1999), observou-se que a resposta tecidual (hemocitária) apresentava características próprias a cada um dos modelos. Partiu-se, então, para um estudo comparativo mais amplo em diversas espécies de moluscos pulmonados (*O. matheroni*, *B. glabrata*, *Deroceras* sp., *S. marginata*).

Dois aspectos se mostraram comuns à resposta de todas as espécies de moluscos estudadas: 1) maior intensidade da reação na presença de L2; 2) maior atração dos hemócitos pela face côncava das larvas. Ali se encontravam em maior número e exibiam sinais morfológicos de atividade celular. Além dessas semelhanças, foram verificados aspectos particulares a cada espécie estudada. Diferenças morfológicas na reação hemocitária, expressas por maior ou menor número de células, alterações morfológicas indicativas de mais ou menos ativação celular e presença ou ausência de síntese de matriz extracelular intragranulomatosa, demonstraram heterogeneidade de respostas ao mesmo agente parasitário.

Esses resultados indicaram que, apesar de serem ativados pelos mesmos produtos de excreção/secreção larvar, os hemócitos apresentam características próprias a cada modelo experimental, apesar das respostas básicas serem bastante semelhantes entre eles. Realmente a literatura sobre o sistema imunológico dos invertebrados tem discutido a conservação de vários aspectos do seu sistema imunológico inato (Hoffmann 2004, Iwanaga & Lee 2005),

bem como a existência de heterogeneidade, demonstrada por mecanismos espécie-específicos (Ottaviani et al. 1995, Yakovleva et al. 2001). No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de se verificar se estes padrões de resposta hemocitária se mantêm na mesma espécie ou se este sofre grandes variações intra-específicas de acordo com a localidade do molusco e a cepa do parasito.

Foi detectada presença de colágeno nos agregados hemocitários apenas em *Deroceras* sp. e no tecido adjacente à reação granulomatosa em *O. matheroni*, indicando que nessas espécies houve uma tentativa maior de encapsulamento fibroso.

Evidências indiretas apontaram para a migração ativa de L3, exemplificadas pela ocorrência de larvas sem reação, após o 15º dia. A mobilidade das L3 e a aparente diminuição de secreção/excreção de produtos larvários seriam os principais fatores responsáveis pela menor frequência de reação hemocitária em seu entorno. A única espécie em que não foram observadas L3 livres foi *S. marginata*, mas nessa espécie a circulação é fechada e as L3 eram aprisionadas por freqüentes granulomas intravasculares.

Através da análise comparativa dos cortes histológicos, foi possível evidenciar, claramente, nas espécies representantes das diferentes ordens de pulmonados, a ocorrência simultânea de penetrações oral e cutânea das larvas, aos 30 minutos de infecção. Dessa forma foi demonstrando que *A. costaricensis* tem comportamento invasivo, que provavelmente está relacionado a um mecanismo de digestão proteásica, independente de ligante-receptor. Deve-se ressaltar que essa característica é comum aos nematódeos da super família *Metastrongyloidea* (Hobmaier & Hobmaier 1934, Cheng & Alicata 1965, Richards & Merritt 1967).

A presença de espaço perilarvar (demonstrando liberação de proteases) e a integridade dos parasitos no interior dos agregados hemocitários foram aspectos constatados em todas as espécies. Realmente, diversos autores verificaram que os nematódeos da super família *Metastrongyloidea* não são danificados pela reação celular do hospedeiro intermediário (Hobmaier & Hobmaier 1934, Harris & Cheng, 1975, Mendonça et al., 1999). Ao contrário, outros autores, estudando moluscos veronicelídeos, também verificaram que as larvas ficam retidas nas reações hemocitárias, sem sofrer danos e, quando os granulomas estão perto do tegumento, pela compressão do movimento muscular do molusco, podem se romper, facilitando a eliminação de larvas para o meio exterior (Conejo & Morera 1988, Mendonça et al. 2003). Existe, portanto, a possibilidade dos mecanismos de eliminação larvar serem distintos nos veronicelídeos em relação aos outros pulmonados. Na prática, moluscos íntegros

eliminam poucas larvas, ficando a maioria retida no interior do seu corpo, contribuindo para infecções orais por parte de hospedeiros que os ingerem (roedores, humanos).

A porcentagem de larvas em cada estágio encontrada em *S. marginata*, *O. matheroni*, *Deroceras* sp. e *B. glabrata* evidenciou que o desenvolvimento larvar não segue o mesmo padrão nas quatro espécies (gráfico I). As L3 se desenvolvem mais rapidamente em *O. matheroni* e, com 15 dias, essas representam a maioria das larvas recuperadas. No trabalho comparativo da infecção de *A. costaricensis* em vários moluscos, discutiu-se a possibilidade dos hemócitos contribuírem para o processo de muda das larvas através da secreção de metaloproteinasas. De fato, em cada muda, as larvas desprendem a cutícula, necessitando enzimas para que isso ocorra. Essas observações indicam que a relação parasito-molusco não se processa necessariamente numa interface “bélica”, podendo ocorrer mecanismos aleatórios de ajuda. Exemplos de exploração da resposta imune do hospedeiro pelo parasito foram descritos por Damian (1987) e Lenzi et al. (1997) e a maior parte aborda a relação mamífero-trematódeo. As evidências aqui apresentadas sugerem que esses mecanismos podem ser válidos em hospedeiros invertebrados, não estando restritos a hospedeiros vertebrados, os quais apresentam grande complexidade em seu sistema imune. Nesse sentido, resultados de Reis & Andrade (1987) mostraram que granulomas periovulares em camundongos infectados com esquistossomose servem para proteger os tecidos do hospedeiro das secreções dos miracídeos, em vez de atacá-los e matá-los, como foi sugerido em alguns estudos prévios.

Nos pontos com 20 e 30 dias de infecção foi evidenciado que o desenvolvimento das L3 é mais lento em *S. marginata* em relação às outras espécies. Mendonça (1999) havia percebido este atraso no desenvolvimento larvar, no entanto, como seus experimentos foram feitos em meses mais frios, isso foi atribuído à menor temperatura, que, sabidamente retarda a muda de estágio (Ishii 1984, Graeff & Teixeira 1991). Através deste estudo foi comprovado que o desenvolvimento larvar em *S. marginata* é mais lento do que em outras espécies estudadas, porém se desconhecem os mecanismos. Nesse caso não parece haver um favorecimento das mudas pela reação hemocitária, que costuma ser bastante intensa e constante em torno das larvas, mesmo as L3.

Adicionalmente ao estudo da relação dos moluscos com *A. costaricensis* foi ainda verificado que *O. matheroni* e *Deroceras* sp. são hospedeiros potenciais do parasita, já que as larvas obtidas dessas espécies se desenvolvem em parasitos adultos no plexo mesentérico de *Mus musculus*. Esses dados reforçam a baixa especificidade do parasita em relação ao

hospedeiro intermediário. O gênero *Omalonyx* é amplamente distribuído no continente americano e ocorrem em locais onde existem focos da parasitose. O gênero *Deroceras* é de origem européia e foi introduzido em diversos países, inclusive no Brasil (South 1992). Esses moluscos são pragas agrícolas e freqüentemente podem ser encontrados, constituindo grandes populações em ambiente rural e urbano. Deve-se ressaltar que outros gêneros da família Limacidae também foram introduzidos em diversas localidades. Esses moluscos são encontrados com freqüência em peridomicílio, bem como em hortas. Os aspectos aqui observados apontam para a possibilidade desses moluscos se converterem, na natureza, em hospedeiros intermediários de *A. costaricensis*.

O estudo da relação entre os nematódeos da super família Metastrongyloidea e os moluscos tem muito a acrescentar ao conhecimento dos mecanismos de defesa dos invertebrados.

Tendo em vista que *A. costaricensis* é um protostrongilídeo de importância médica e que a angiostrongilíase abdominal é uma parasitose emergente e bastante desconhecida no Brasil, estudos da relação nematóide-molusco são importantes para o desenvolvimento de medidas de controle da parasitose, com ênfase em seu hospedeiro intermediário.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão: 1) confirmou-se o caráter promíscuo do *A. costaricensis* em relação a hospedeiros intermediários; 2) verificou-se que a via migratória desse nematóide em hospedeiro susceptível (*O. matheroni*) depende do sistema circulatório do hospedeiro; 3) constatou-se que todos os tipos de moluscos estudados reagiram, através de hemócitos, à penetração e invasão tecidual das larvas, formando agregados nodulares, encapsulantes ou granulomatosos em torno das mesmas, sem exercerem ação larvicida; 4) demonstrou-se, pela primeira vez na literatura, que *O. matheroni* e *Deroceras* sp. têm a capacidade de atuarem com hospedeiros intermediários para *A. costaricensis*.

7 PERSPECTIVAS

Considerando a riqueza de lâminas e de blocos já confeccionados de vários moluscos pulmonados e a disponibilidade de se obter material a fresco quando necessário, pretende-se complementar os estudos com os seguintes aspectos:

1. Estudar a influência da coexistência molusco/ parasita (áreas endêmicas) no padrão de resposta hemocitária e comparar com o padrão observado para moluscos da mesma espécie oriundos de outras localidades, não endêmicas para a parasitose.
2. Caracterizar in vivo e ex vivo, imunoistoquímica e histoquimicamente, os hemócitos dos moluscos das três ordens (Basommatophora, Stylommatophora e Soleolifera), em situação normal e perante infecção por *A. costaricensis*, utilizando microscopias de campo claro, confocal e eletrônicas de transmissão e varredura.
3. Verificar, por técnicas de imunomarcção e moleculares, se nas reações hemocitárias ocorre expressão de metaloproteinases e moléculas da família ADAM.
4. Estudar o comportamento dos hemócitos em moluscos com uma, duas e três infecções, para verificar o efeito “memória”.
5. Tentar decifrar a circulação de retorno em moluscos com circulação aberta.

8 Referências Bibliográficas

- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES 1997. A family of fibrinogen – related proteins that precipitates parasite – derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc Natl Acad Sci USA 94(16): 8691–8696.
- Aderem A & Ulevitch RJ 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response Nature: vol 406.
- Alfonso TB & Jones BW 2002. gcm2 Promotes Glial Cell Differentiation and is Required with glial cells missing for Macrophage Development in Drosophila. Developmental Biology 248: 369–383.
- Alicata JE 1962. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. Can J Zool 40: 5.
- Alicata JE 1991. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. Parasitol Today 7: 151–153.
- Anderson RC 1992. Nematodes parasite of vertebrates: their development and transmission. Cab. international , 578 p.
- Araque W, Barrios EE, Rodriguez P, Delgado VS, Finol HJ 2003. Ultrastructural study of the in vitro interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(7):905–908.
- Araújo JLB 1989. Moluscos de importância econômica no Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). Rev Bras Zool 6(4): 583–592.
- Azumi K, Yokosawa H 1996. Characterization of novel metalloproteases released from ascidian hemocytes by treatment with calcium ionophore. Zoolog Sci 13: 365–370.
- Baiard JK, Neafie RC, Lanoie L & Connor DH 1987. Abdominal angiostrongylosis in an African man: case study. Amer J Trop Med Hyg 37: 353–356.
- Barker G.M 2001. Gastropods on land: Phylogeny, Diversity and Adaptive Morphology IN: The Biology of Terrestrial Molluscs, CABI Publishing, Nova Iorque, EUA, 588p.
- Barraco MA, Steil AA, Gargioni R 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tengophila*. Mem Inst Oswaldo Cruz 88(1): 73–83.
- Bayne CJ 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. BioScience 40: 723–730.

731.

Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC 1980a. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J Parasitol* 66(3): 413-419.

Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasit* 123: 159-167.

Bayne CJ, Loker ES, Yui MA, Stephens JA 1984. Immune recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Parasitol Immunol* 6: 519-528.

Beck G. 1998. Macrokines: invertebrate cytokine-like molecules? *Frontiers in Bioscience* 3: 559-569.

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

Bonetti VCBDO & Graeff Teixeira C 1998. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L₃ in the mucus and inoculation of L₁ through the tegument of molluscs. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 289-294.

Borges CM, Souza CP, Andrade AA 1998. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, supp.I:117-121.

Brusca RC, Brusca GJ 2003. *Invertebrates*. 2nd ed., Sinauer Associates, Massachusetts, Inc., Publishers, xxii + 936 pp.

Cao Asuncio'n, Ramos Martínez J I, Barcia R 2004. In vitro effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* LMK. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 215-225.

Carson FL, Martin JH, Lynn JA 1973. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 59: 365-375.

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL. First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:39-40.

Carvalho OS, Teles HMS, Mota EM, Mendonça CLGF, Lenzi HL 2003. Potentiality of

- Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(6): 743-745.
- Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, Morera P 1967. Granulomas entéricos y linfáticos com intensa eosinofilia tisular producidos por un estromgilídeo (*Strongylata*). *Acta Médica Cost* 10: 235-235.
- Cheng TC, Alicata JE 1965. On the modes of infection of *Achatina fulica* by the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Malacol* 2(2): 267-274.
- Chiaradia LA 2001. Preferência alimentar da lesma *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) por culturas anuais econômicas e de subsistência. Resumos da Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão III: 76-80.
- Chiaradia LA, Milanez JM, Graeff Teixeira C, Thomé JW 2004. Lesmas: pragas da agricultura e ameaça à saúde humana. *Agropec Catarin* 17(2): 70-74.
- Coelho PMZ 1995. Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: FS Barbosa, Tópicos em Malacologia Médica, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 208-217.
- Conejo ME & Morera P 1988. Influência de la edad de los veronicelideos en la infección con *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Biol trop* 36 (2B): 519-526.
- Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(Suppl. I):13-19.
- Cox CB 2001. The biogeographic regions reconsidered. *Journal of Biogeography* 28: 511-523.
- Damian RT 1987. The exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol* 73: 3-13.
- Demo OJ, Pessat OAN 1986. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Argentina. *Prensa Médica Argentina* 73: 732-738.
- Doenhoff MJ, Hassounah O, Murare H, Bain J, Lucas S 1986. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 80: 503-514.
- Dolber PC & Spach MS 1993. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 41: 465-469.

- Duarte Z, Morera P & Vuong PN 1991. Abdominal angiostrongyliasis in Nicaragua: a clinicopathological study on a series of 12 cases reports. *Ann Parasitol Hum Comp* 66:259-262.
- Duarte Z, Morera P, Davila P, Gantier JC 1992. *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. *Ann Parasitol Hum Comp* 67: 94-96.
- Dutra-Marke AVC, Williams C, Dickstein R, Kaufer N, Spotila JR 2001. Inferences on the phylogenetic relationships of Succineidae (Mollusca, Pulmonata) based on 18S rRNA. *Malacol* 43(1): 223-236.
- Fauza DO, Maksoud Filho JG, Ibrahim RE 1990. Abdome agudo na infância por angiostrongilíase intestinal: relato de um caso. *Rev Ass Med Brasil* 36: 150-152.
- Fernandes JV 1982. Contribucion al conocimiento de las babosas y sietecueros (Mollusca: Gastropoda) que causan daños a la agricultura en venezuela. *Rev Fac Agron (Maracay)* XII(3-4): 353-386.
- Fletcher TC, Cooper-Willis CA 1982. Cellular Defense Systems of the Mollusca. In N Cohen, MM Sigel, *The reticuloendotelial system – A comprehensive treatise, Phylogeny and Ontogeny*, Vol 3, Plenum Press, New York and London, p. 141-166.
- Franchini A., Ottaviani E 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF- β . *Tissue Cell* 32: 312-321.
- Furuta E, Yamaguchi K 2001. Haemolymph: Blood Cell Morphology and Function. In GM Barker, *The Biology of Terrestrial Molluscs*, CABI Publishing, Nova Iorque, EUA. p. 289-306.
- Godoy A, Souza CP, Guimarães CT, Andrade ZA 1997. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(1): 121-122.
- Graeff-Teixeira C 1986. Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, xxii + 131pp.
- Graeff-Teixeira C, Camilo Coura L, Lenzi HL 1989b. Suscetibilidade de *Megalobulimus* sp. à infecção por larvas de *Angiostrongylus costaricensis*. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Parasitologia*, Rio de Janeiro, p. 151.
- Graeff-Teixeira C, Pinto VM, Junior EB, Agostini AA 1994. Natural infection of *Phyllocalulus soleiformis* with larvae morphologically similar to L2 of *Angiostrongylus*

costaricensis. Mem Inst Oswaldo Cruz 89: (1) 121.

Graeff Teixeira C, Thiengo SC, Thomé JW, Medeiros AB, Camillo Cbura L, Agostini AA 1993. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 487-489.

Graeff Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1989. *Phyllocaulis variegatus* an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 65-68.

Graeff Teixeira C, Avila Pires FD, Machado RCC, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1990. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 32: 147-150.

Graeff Teixeira C, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1991a. Clinical and epidemiological studies on abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 33: 375-380.

Graeff Teixeira C, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1991b. Histopathological criteria for the diagnosis on abdominal angiostrongyliasis. Parasitol Res 77: 606-611.

Graeff Teixeira C, Camillo Cbura L, Lenzi HL 1991c. Angiostrongilíase abdominal nova parasitose no sul do Brasil. Rev AMRIGS 35: 91-98.

Grewal PS, Grewal SK, Tan L, Adams BJ 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: Types of associations and evolutionary trends. Journal of nematology 35(2):146-156

Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G 1981. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Rev Saúde Publ 15: 436-438.

Harris KR & Cheng TC 1975. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. Int J Parasitol 5: 521:528.

Heller J 2001. Life history strategies. In GM Barker, The Biology of Terrestrial Molluscs, CABI Publishing, Nova Iorque, EUA. p.413-445.

Hobmaier A, Hobmaier M 1934. The route of infestation and the site of localization of lung worms in molluscs. Science 80: 229.

Hoffmann A J 2004. Primitive immune systems. Immunological Reviews 198: 5-9.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA Jr, Ezekowitz RAB 1999. Phylogenetic perspectives

in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318.

Horton J, Ratcliffe N 1996. Evolution of immunity, 4th ed., In I Roitt, J Brostoff, D Male. *Immunology*, Mosby, London, p.15.1-15.22.

Hulbert TV, Larsen RA, Chandrasoma PT 1992. Abdominal angiostrongyliasis mimicking acute appendicitis and Meckel's diverticulum: report of a case in the United States and review. *Clin Infect Dis* 14: 836-840.

Humphries J E & Yoshino T, HTHY P 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates *Integr. comp. biol.* 43:305-312

Iwanaga S, Lee BL 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(2): 128-130.

Iwasaki A & Medzhitov R 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 5 (10): 987-995

Jeandel R, Fortier G, Pitre-Delaunay C, Jouannelle A 1988. Angiostrongylose intestinale à *Angiostrongylus costaricensis*. A propos d'un cas en Martinique. *Gastroent Clin Biol* 12: 390-393.

Jeong KH, Lie KJ, Heyneman D 1983. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol* 7(2): 217-228.

Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, Noble LR 2001. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata* – *Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitol* 123: 181-196.

Juminer B, Roudier M, Raccurt CP, Pujol HP, Gerry F, Bonnet R 1992. Presence de l'angiostrongylose abdominale en Guadeloupe. A propos de deux cas récents. *Bull Soc Path Exot* 85: 39-43.

Kaminsky RG, Andrews K, Mor NR 1987. *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Estudio preliminar. *Rev Méd Hond* 55: 4-8.

Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 33: 303-308.

Klein J, Horejsi V 1997. *Immunology*, 2nd ed., Blackwell Science, London, 722 pp.

Klimovich V. B. 2002. Actual Problems of Evolutionary Immunology. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 38: 5: 562-574. Translated from *Zhurnal*

Evolyutsionnoi Biokhimmii i Fiziologii, Vol. 38, No. 5, 2002, pp. 442-451. Original Russian Text Copyright © 2002 by Klimovich.

Kramer MH, Greer GJ, Quinonez JF, Padilha NR, Hernandez B, Arana BA, Lorenzana R, Morera P, Hightower AW, Eberhard ML, Herwaldt BL 1998. First reported out break of abdominal angiostrongyliasis. Clin Infect Dis 26: 365-372.

Laitano AC, Genro JP, Fontoura R, Branco SSL, Maurer RL, Graeff Teixeira C, Milanez JM, Chiaradia LA, Thomé JW 2001. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). Rev Soc Bras Med Trop 34(1): 95-97.

Lee DL 1965: The Physiology of Nematodes. University reviews in biology Editora: Oliver & Boyd LTD. London, 154p.

Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo Machado M, Panasco MS, Romanha WS, Lenzi JA 1997. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? Mem Inst Oswaldo Cruz 92(Suppl. II): 19-32.

Lessa CSS, Scherre PO, Vasconcelos MC, Freire LS, Santos JAA, Freire NMS 2000. Registro de *Fasciola hepatica* em eqüinos (*Equis caballus*), caprinos (*Capra hircus*) e ovinos (*Ovis aries*) no município de Itaguaí. Rev Bras Ciência Vet: 63-64.

Lewis FA, Patterson CN, Knight M, Richards CS 2001. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. Parasitol 123: 169-179.

Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS 1992a. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). Rev Inst Med trop São Paulo 34: 399-402.

Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS 1992b. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). Rev Inst Med Trop São Paulo 34: 399-402

Lima LC, Souza CP 1989. Ocorrência de *Sarasinula marginata* (Mollusca: Soleolifera) em Belo Horizonte, MG, Brasil. Rev Saúde Publ 23(4): 345-346.

Lodes MJ, Yoshino TP 1990. The effect of Schistosome excretory-secretory products on

- Biomphalaria glabrata hemocytes motility. J Invertebr Pathol 56(1): 75-83.
- Loker ES, Bayne CJ, Buckey PM, Kruse KT 1982. Ultrastructure of encapsulation of Schistosoma mansoni mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10R2 strain of Biomphalaria glabrata. J Parasitol 68: 84-94.
- Loret SM, Strand MR 1998. Follow-up of protein release from Pseudoplasia includens: a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. Eur J Cell Biol 76: 146-155.
- Loria-Cortés R & Lobo-Sanahuja JF 1980. Clinical Abdominal Angiostrongyliasis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by Angiostrongylus costaricensis. Am J Trop Med Hyg 29: 538-544.
- Lutz A 1921. Observações sobre o gênero Urogonimus e uma nova forma de Leucochloridium em novo hospedador. Mem Inst Oswaldo Cruz 13: 136-140.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J 1997. Brock Biology of microorganisms, 8th ed., Prentice Hall, New Jersey, p.986+A11+G11+I130.
- Magalhães KG, Passos LKJ, Carvalho OS 2004. Detection of Lymnaea columella infection by Fasciola hepatica through multiplex-PCR. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(4): 421-424.
- Malek EA 1980. Snail-transmitted parasitic diseases. Vol I and II. CRC Press. Florida.
- Malek EA 1981. Presence of Angiostrongylus costaricensis Morera and Cespedes, 1971 in Colombia. Amer J Trop Med Hyg 30: 81-83.
- Malek EA 1985. Snail hosts of Schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical América: A manual. Pan American Health Organization, Washington, xxii + 327 pp.
- Malek EA, Cheng TC 1974. Medical and economic malacology. Academic Press, New York
- Mas-Cobina S, Funatsu JR, Bargues MD 2001. Fasciola hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South América. Parasitol 123 Suppl: S115-117.
- Maurer RL, Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Chiaradia LA, Sugaya H, Yoshimura K 2002. Natural infection of Deroceras laeve (Mollusca: Gastropoda) with Metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. Rev Inst Med Trop São Paulo 44 (1) 53-54.
- Mendonça CLGF 1999. Angiostrongylus costaricensis no hospedeiro intermediário Sarasinula marginata (Mollusca: Soleolifera): Vias de infecção, migração e eliminação larvar. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte. IOC, Fiocruz.

- Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Machado PM, Caputo LFG, Lenzi HL 2003. *Angiostrongylus costaricensis* and Experimental infection of *Sarasinula marginata* ^{ES}II. Elimination routes. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 893^{ES}898.
- Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo^{ES}Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL 1999. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). Mem Inst Oswaldo Cruz 94(4): 549^{ES}556.
- Monge E, Arroyo R, Solano E 1978. A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes 1971). J Parasitol 64(1):34.
- Montresor L C, Vidigal THDA , Mendonça CL; Carvalho OS, Mota E M, Caputo LFGLenzi HL. Infecção experimental de *Omalonyx matheroni* (Gastropoda: Succineidae) por *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae) e estudo da via migratória parasitária. Artigo no prelo.
- Morera P 1971. Investigacion del huesped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chileno Parasitol 25: 133^{ES}134.
- Morera P 1973. Life hystory and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. Am J Trop Med Hyg 22: 613^{ES}621.
- Morera P 1985. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. Parasitol Today 1: 173^{ES}175.
- Morera P 1986. Angiostrongiliasis abdominal: Transmision y observaciones sobre su posible control. In Control y erradicacion de enfermedades infecciosas: Un Simposio Internacional ^{ES} OMS/OPS, Serie de copublicaciones de la OPS, N 1.
- Morera P 1988. Angiostrongilíase abdominal: um problema de saúde pública? Rev Soc Bras Med Trop 21: 81^{ES}83.
- Morera P, Andrews KL, Rueda A 1988. The intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. Rev Biol Trop 36(2B):575^{ES}576.
- Morera P, Ash LR 1971. Investigacion del huesped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chileno Parasitol 25: 135.
- Morera P, Céspedes R 1971a. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lunhworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop 18: 173^{ES}185.
- Morera P, Céspedes R 1971b. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana.

Acta Med Costa 14: 159-173.

Morera P, Lazo R, Urquiza J & Laguno M 1983. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 32: 1460-1461.

Mota EM, Lenzi HL 1995. Ciclo Evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis* Nova Proposta. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 707-709.

Mota EM, Lenzi HL 2001. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90(6): 707-709.

Napp A J & Ottaviani E 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates

Newton WL 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 36:366

Oliveira MP, Rezende GJR, Castro GA 1984. Contribuição à biologia do *Megalobulimus (Phaiopharus) granulatus* Rang, 1831 (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora, Strophocheilidae). *Comunicações Malacológicas* 15:1-18.

Ote M, Mita K, Kawasaki H, Kobayashi M, Shimada T 2005. Characteristics of two genes encoding proteins with an ADAM-type metalloprotease domain, which are induced during the molting periods in *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol* 59: 91-98.

Ottaviani E, Franchini A., Cassanelli S, Genedani S. 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol Cell* 85: 87-91.

Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 14: 931-976

Paraense WL 1953. Biologia dos Planorbídeos Esquistossomose *mansoni* no Brasil. In *Debates promovidos pela Sociedade de Gastroenterologia e Nutrição de São Paulo*.

Paraense WL 1955. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 53: 285-291.

Paraense WL 1972. Fauna planorbídica do Brasil. In CS Lacaz et al., *Introdução à geografia médica do Brasil*, Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo. p. 213-239.

Paraense WL 1973. The molluscan intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil, p. 187-201. IN: *Epidemiology and Control of schistosomiasis*. N. Ansari (ed) S. Karger, Basel.

Paraense WL 1976. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. *Rev Brasil Biol* 36: 535-539.

- Paraense WL 1981. Gastropoda. In SH Hurlbert, G Rodrigues, ND Santos, Aquatic biota of tropical south America, San Diego State University, California. p. 200²⁰⁷.
- Paraense WL 1986. Distribuição dos caramujos no Brasil. In FA Reis et al., Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica, Biblioteca da Academia Mineira de Medicina. p.117¹²⁸.
- Paraense WL, Alencar AJT, Corrêa LR 1983. Distribuição dos planorbídeos e prevalência da xistosomose mansoni no Estado do Espírito Santo. Mem Inst Oswaldo Cruz 78: 373³⁸⁴.
- Paraense WL, Deslandes N 1955. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 53: 87¹⁰³.
- Paredes ZZ 1972. Ileocolitis Seudotumoral Eosinofílica de origen parasitario. Del Instituto de Anatomia Patológica XI: 43⁵⁰.
- Patterson CM 1971. Taxonomic studies of the land snail family Succineidae. Malacol Review 4: 131²⁰².
- Pessoa SB & Martins AV 1977. Trematódeos parasitas do sistema sanguíneo: In Pessoa Parasitologia Médica 10^a edição. Guanabara Koogan
- Rambo RP, Agostini AA, Graeff^{Teixeira} C 1997. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil ^PPrevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate Host from Eighteen Endemic Foci. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 9¹⁴.
- Reis MG, Andrade ZA 1987. Functional significance of periovular granulomas in schistosomiasis. Braz J Med Biol Res 20: 55⁶².
- Rey L 1991. Parasitologia. 2^a ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, xxii + 731 pp.
- Richards CS, Merritt JW 1967. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. J Parasitol 53(2): 382³⁸⁸.
- Robles GR, Loria R, Lobo F, Robles A, Valle S, Cordero C 1968. Granuloma eosinofílico parasitario intestinal. Rev Med Hosp Niños 3: 67⁸⁰.
- Rodrigues R 1997. Anatomia patológica da Angiostrongilose abdominal. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, xxii
- Rodrigues Rubens, Agostini A A, Porto SM, Olivaes A J O, Branco SL, Genro J P, Laitano A C, Maures R L, Graeff^{Teixeira} C 2002. Dogs may be a reservoir host for *Angiostrongylus costaricensis*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 44(1) 55⁵⁶

- Ruppert B M.D.1996. Zoologia dos invertebrados. Roca,São Paulo.VI edição
- Salzet M 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune response. Trends Immunol 22: 285-288.
- Sanchez GA 1992. Perforación intestinal por *Angiostrongylus costaricensis*. Presentacion de dos casos. Rev Méd Panamá 17: 74-81.
- Santos CP 1985. Redescricao de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestres, *Proechimys* sp, na Venezuela (*Metastrongyloidea, Angiostrongylidae*). Mem Inst Osw Cruz 80: 81-83.
- Sapp KK & Loker ES. 2000. A comparative study of mechanism underlying digenean snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. Journal of Parasitol 86: 1020-1029.
- Sauerbrey M 1977. A precipitin test for the diagnosis of human abdominal angiostrongyliasis. Amer J Trop Med Hyg 26:1156-1158.
- Schmidt G D & Roberts LS. 1981. Phylum Nematoda IN: Foundations of Parasitology. 2^a edition. The CV Mosby Company. London.
- Serpentini A., Ghayor C, Poncet J.M, Hebert V, Galéra P, Pujol JP,. Boucaud-Camou E J, Lebel M. 2000. Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF in hemocytes from the Gastropod Mollusc, *Haliothis tuberculata*. J.Experimental Zoology 287: 275-284.
- Serra MF, Barreto EO, Silva JP, Azevedo V, Mota EM, Pelajo Machado M, Lucena S, Pires AI, Carvalho V, Cordeirao RS, Lenzi HL, Silva PM, Martins MA 2003. Kinetics of eosinophil and IgE mast cell changes following infection with *Angiostrongylus costaricensis* in Wistar rats. Parasite Immunol 25: 169-177.
- Sierra E, Morera P 1972. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). Acta Médica Cost 15: 95-99.
- Sly DL, Toft JD, Gardiner CH 1982. London WT. Spontaneous occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* marmosets (*Saguinus mystax*). Lab Anim Sci 32: 286-288.
- Sminia T, Borghart-Reinders E, van de Linde AW 1974. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. An electron microscopic and autoradiographic study. Cell Tissue Res 153(3):307-316.
- Sodehall I, Kim YA, Jiravanichpaisal P, Lee SY, Sodehall K 2005. An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. J Immunol 174: 6153-6160.

- Sorensen RE, Minchella DJ 2001. Snail trematoda life history interactions: past trends and future directions. *Parasitol* 123:313.
- South A 1965. Biology and ecology of *Agriolimax reticulatus* (Müll.) and other slugs: spatial distribution. *Journal of Animal Ecology* 34: 403-417
- South, A 1992. *Terrestrial Slugs. Biology, ecology and control*. Chapman & Hall, London, UK, xxii + 428 pp.
- Souza C P, Lima LC 1997. *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. Centros Colaboradores OMS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, xxii + 79 pp.
- Stephenson JW 1968. A review of the biology and ecology of slugs of agricultural importance. *Proceedings of the Malacological Society* 38: 169-178.
- Takeda K & Akira S 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 5(3), 143-153.
- Tesh RB, Ackerman LJ, Dietz WH, Williams JA 1973. *Angiostrongylus costaricensis* in Panamá. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. *Amer J Trop Med Hyg* 22: 348-356.
- Thiengo SC 1996. Mode of Infection *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 277-278.
- Thiengo SC, Amato SB, Aventino A, Araújo JLB 1993. Estudo sobre os hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Rev Bras Parasitol Vet* 2(supl 1): 64.
- Thomé JW 1975a. Estado atual da sistemática dos Veronicelídeos americanos. *Arquivos do Museu Nacional* 55: 155-165.
- Thomé JW 1975b. Os gêneros da família Veronicellidae nas Américas (Mollusca: Gastropoda). *Iheringia*: 48: 3-56.
- Thomé JW 1993. Estado atual da sistemática dos Veronicellidae (Mollusca: Gastropoda) americanos como comentários sobre sua importância econômica, ambiental e na saúde. *Biociências* 1: 61-73.
- Thomé JW, Lopes VLR 1973. Aulas práticas de Zoologia, I. Dissecção de um molusco gastrópode desprovido de concha. *Iheringia*: 3: 34-43.

- Tiller S 1981. South American and Juan Fernandez Succineid slugs (Pulmonata). *J Moll Stud* 47: 125-146.
- Troppmair H 1987. Paleogeografia e dinâmica espacial. In: *Biogeografia e meio ambiente*, Embrapa. p. 174-182.
- Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J 1980. Emergence of Third Stage Larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). *J Parasitol* 66(5): 856-857.
- van der Knaap WPW, Locker ES 1990. Immune Mechanisms in Trematode-Snail Interactions. *Parasitol Today* 6(6): 175-182.
- Velasquez JZ, Baquedano WR, Perez AR, Flores MB 1974. *Angiostrongylosis costaricensis*. Primeiros casos mexicanos. *Rev Invest Clin* 26:389-394.
- Wade CM, Mordan PB, Clarke B 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proceeding of the Royal Society of London* 268: 413-422.
- Wallace GD & Rosen L 1969. Technique for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacol* 7: 427-438.
- Webster JP, Davies CM 2001. Coevolution and compatibility in the snail-Schistosome system. *Parasitol* 123: 41-56.
- Willcox HP, Coura JR 1989. Nova concepção para o método de Baermann-Moraes-Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(4): 539-565.
- World Health Organization (WHO) 1993. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. Technical Report Series Geneva, Switzerland, 830: 86.
- World Health Organization (WHO) 1998. Report de la Consultation informelle de L'OMS sur la lutte contre la schistosomiases.
- Yakovleva N. V., Samoilovich M. P, Gorbushin A. M. 2001. The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs. *J. Evolutionary Biochemistry and Physiology* 37 (4): 358-367.
- Ziegler G, Paynter K, Fisher D 2002. Matrix metalloproteinase-like activity from hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131: 361-370.
- Ziliotto Ajr, Kunzle JE, Rus Fernandes LA, Prates-Campos C, Britto-Costa R 1975.

Angiostrongilíase: apresentação de um provável caso. Rev Inst Med Trop São Paulo 17: 312-318.