

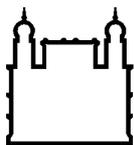
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO
NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
PARASITOLÓGICOS DE *Rattus norvegicus* (WISTAR) INFECTADO
POR *Angiostrongylus cantonensis*

BRUNNA VIANNA BRAGA

Rio de Janeiro
Junho de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BRUNNA VIANNA BRAGA

Efeitos da exposição ao herbicida à base de Glifosato nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) infectado por *Angiostrongylus cantonensis*

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

Orientador (es): Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Prof. Dr. Juberlan Silva Garcia

RIO DE JANEIRO
Junho de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE
MANGUINHOS / ICICT / FIOCRUZ – RJ

Vianna Braga, Brunna.

Efeitos da exposição ao herbicida à base de glifosato nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) infectado por *Angiostrongylus cantonensis* / Brunna Vianna Braga. - Rio de janeiro, 2020.

156 f.; il.

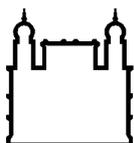
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Dr. Arnaldo Maldonado Júnior.

Co-orientador: Dr. Juberlan Silva Garcia.

Bibliografia: f. 137-156

1. Glifosato. 2. *Angiostrongylus cantonensis* . 3. *Rattus norvegicus* . 4. Bioquímica sanguínea. 5. Hematologia. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: BRUNNA VIANNA BRAGA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NOS
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E PARASITOLÓGICOS DE
Rattus norvegicus (WISTAR) INFECTADO POR *Angiostrongylus cantonensis*

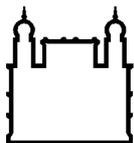
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Prof. Dr. Juberlan Silva Garcia

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Silvana Carvalho Thiengo – Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Octavio Augusto França Presgrave (Instituto Nacional de Controle
de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)
Prof. Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Raquel de Oliveira Simões (Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro)

Rio de Janeiro, 16 de junho de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

Dedico esta dissertação às minhas tias-avós Thereza Barbosa Vianna (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Barbosa Vianna por possibilitarem a minha caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer à minha irmã, Aléxia Vianna Braga, por ser um modelo de inspiração e por sempre me incentivar a estudar para eu realizar os meus sonhos.

Eu agradeço também aos meus pais, Walter Braga e Eliana Vianna, por me apoiarem e me permitirem seguir esse longo caminho que é a vida acadêmica, servindo como apoios e tendo paciência nos momentos mais complicados.

Ao meu namorado e melhor companheiro, Marcelo Rodrigues, eu tenho imensa gratidão por estar sempre presente em minhas conquistas, torcendo e me acompanhando, durante as minhas apresentações e, principalmente, por cuidar de mim e me ajudar nas situações mais difíceis.

Igualmente, eu agradeço aos meus melhores amigos, Rafael Tavares e Louise Dias que, mesmo à distância, estiveram presentes para alegrarem os meus dias e por me darem apoio emocional em momentos árduos da minha vida pessoal e profissional.

Eu agradeço aos meus orientadores, Dr. Arnaldo Maldonado Júnior e Dr. Juberlan Silva Garcia, ambos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR – IOC/FIOCRUZ-RJ), pela dedicação e paciência, além da disposição e entusiasmo para o desenvolvimento dessa dissertação. Gratidão também por terem compartilhado a imensa carga de conhecimento sobre diversas áreas da biologia, não só me auxiliando na construção desse trabalho, assim como no meu desenvolvimento como profissional.

À minha amiga Karina Varella, um agradecimento especial por sempre me ajudar durante as disciplinas, conversar e ouvir sobre meus conflitos internos e por estar a todo momento disponível, quando eu precisei.

À minha amiga Daniela Vinhas, por ter sido sempre uma pessoa compreensiva, apta a me ouvir e a me auxiliar, não somente durante os meus experimentos, mas também quando eu precisei de apoio emocional. Empatia lhe define, Dani.

Eu agradeço ao meu amigo Thiago Cardoso por ajudar com as análises estatísticas dos meus dados, sempre tendo muita paciência e procurando a melhor forma de me explicar os conceitos sobre esse assunto.

A todos os meus amigos e colegas do LABPMR por serem como uma segunda família, me compreendendo, apoiando, auxiliando e dividindo conhecimentos comigo, de uma forma leve e divertida.

À toda equipe do biotério do Pavilhão Lauro Travassos (FIOCRUZ) por estarem sempre disponíveis durante os experimentos e, em especial, ao técnico Roberto Barbosa, por me acompanhar, durante os finais de semana, para a realização da exposição dos roedores ao herbicida Roundup®.

Ao colaborador Msc. Cleber Hooper, do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB – FIOCRUZ), por ser um profissional dedicado e por ter auxiliado com as análises hematológicas e bioquímicas, além de ser sempre prestativo e estar disponível para sanar minhas dúvidas.

Ao colaborador Dr. Jairo Pinheiro, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por disponibilizar os reagentes e a infraestrutura necessários à dosagem da concentração de glicogênio hepático dos roedores.

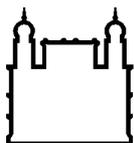
Eu agradeço, ainda, aos estagiários, Lucas Castro e Jonathan da Silva, pela imensa ajuda e disponibilidade durante o processamento e dosagem da concentração de glicogênio hepático, na UFRRJ.

À Dra. Tainá Monte por ter sido a primeira a me dar a oportunidade em trabalhar na área de parasitologia, como Iniciação Científica, e por compartilhar, diversas vezes, seu conhecimento comigo, me auxiliando na construção de relatórios e artigos.

Aos os membros da banca da defesa: Dra. Silvana Thiengo, Dr. Octavio Presgrave, Dr. Jairo Pinheiro, Dra. Raquel Simões e Dra. Clélia Almeida, pela disponibilidade e contribuição a escrita da minha dissertação.

E, finalmente, eu agradeço pelo apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e por todo suporte oferecido pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, durante esses dois anos de Mestrado.

Um único sonho é mais poderoso do que mil realidades.
- J. R. R. Tolkien



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

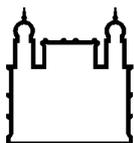
Efeitos da exposição ao herbicida à base de Glifosato nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) infectado por *Angiostrongylus cantonensis*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Brunna Vianna Braga

Rattus norvegicus, o hospedeiro definitivo natural do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*, apresenta-se amplamente distribuído por todo o território brasileiro, incluindo regiões agrícolas, onde ele pode ser exposto a diferentes pesticidas, incluindo à formulação comercial Roundup®. A partir dessa informação, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição oral ao herbicida Roundup® sobre *R. norvegicus* (Wistar) infectado, experimentalmente, por *A. cantonensis*, a fim de observar possíveis alterações sobre parâmetros fisiológicos do roedor, assim como, sobre aspectos parasitológicos da infecção. Para as análises, os animais constituíram cinco grupos: Controle limpo [CL], controles de infecção (aguda e crônica) [CIA e CIC], controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio [CEHC e CEHT], grupo exposto ao herbicida e depois infectado por *A. cantonensis* [GEI] e grupo infectado, primeiramente, por *A. cantonensis* e depois exposto ao herbicida [GIE]. A infecção dos roedores foi realizada, via oral, com 50 larvas L₃ por roedor. O herbicida Roundup® foi diluído, em água destilada, à concentração de 500 mg/kg do animal, sendo administrado, oralmente, durante 15 dias consecutivos. Foram avaliados parâmetros hematológicos e bioquímicos. Além disso, foram verificadas a carga parasitária de helmintos adultos e o período pré-patente dos grupos CIC, GIE e GEI, quantificando também o número de larvas L₁ eliminadas nas fezes dos roedores. A infecção crônica promoveu alterações hematológicas e bioquímicas, configurando um quadro de anemia microcítica, intensa reação inflamatória, dano tecidual hepático, colestase, esplenomegalia e alterações no metabolismo de carboidratos. A exposição ao herbicida Roundup® não promoveu alterações nos parâmetros eritrocitários, assim como no número de plaquetas. Em contrapartida, esses grupos (CEHC e CEHT) demonstraram neutropenia e linfocitopenia, indicando imunodepressão. A exposição ao Roundup® gerou também aumento na atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e bilirrubina total, sugerindo dano tecidual hepático, além de alterar as concentrações de glicogênio hepático e promover hiperglicemia. Os efeitos da infecção por *A. cantonensis*, bem como os da exposição ao herbicida Roundup® foram antagônicos, em relação aos parâmetros leucocitários, havendo intensa reação inflamatória e imunodepressão, respectivamente. Porém, ambos promoveram efeitos sinérgicos em relação ao metabolismo de carboidratos. A associação da infecção com a exposição ao herbicida promoveu alterações bioquímicas nos testes de função hepática, além de provocar hepatomegalia. Também foi observado que a exposição ao herbicida anteriormente à infecção (grupo GEI) resultou em monocitose, possivelmente, causada por dano tecidual. A exposição ao herbicida e a infecção não promoveram alterações na função renal dos roedores de nenhum dos grupos experimentais. A exposição prévia ao agrotóxico influenciou na carga parasitária do grupo GEI, possivelmente, por sua capacidade imunodepressora. Além disso, tal grupo eliminou uma quantidade maior de larvas L₁, explicado pelo aumento do número de fêmeas recuperadas, em relação aos grupos CIC e GIE. Em síntese, o herbicida Roundup® pode influenciar nos efeitos da infecção pelo nematódeo *A. cantonensis*, em *Rattus norvegicus* (Wistar), dependendo do parâmetro analisado, assim como na carga parasitária e na eliminação de larvas L₁.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Effects of exposure to a glyphosate-based herbicide in haematological, biochemical and parasitological parameters of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Angiostrongylus cantonensis*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Brunna Vianna Braga

Rattus norvegicus, the *Angiostrongylus cantonensis* nematode natural definitive host, is widely distributed throughout Brazil, including agricultural regions, where it can be exposed to a diversity of pesticides, as the commercial glyphosate formulation Roundup®. From that information, the purpose of this work was to evaluate the effects of this herbicide, by oral exposure, in *R. norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *A. cantonensis*, in order to observe possible changes in rodent's physiological parameters, as well as in parasitological aspects of the infection. For the analysis, five distinct groups were created: Clean control [CL], infection controls (acute and chronic phases) [CIA and CIC], controls exposed to the herbicide (continuous and late effects) [CEHC and CEHT], group infected with *A. cantonensis* and then exposed to the herbicide [GIE] and group primarily exposed to herbicide and then infected with *A. cantonensis* [GEI]. For the experimental infection, 50 larvae L₃ per rodent were used. The herbicide Roundup® were diluted in distilled water, at the 500 mg/kg body weight concentration and the animals were treated, orally, for a period of 15 days. Haematological and biochemical parameters were analyzed. In addition, the parasite load and the prepatent period of the groups CIC, GIE and GEI were evaluated, as well as, the number of L₁ larvae eliminated in the rodent's feces. The chronic infection promoted haematological and biochemical alterations, resulting in microcytic anemia, intense inflammatory response, damage in the hepatic tissue, cholestasis, splenomegaly and changes in the carbohydrate metabolism. The exposure to the herbicide Roundup® did not cause changes in the erythrocyte parameters or in the platelet's numbers. However, the CEHC and CEHT groups presented neutropenia and lymphocytopenia, suggesting immunodepression. The exposure to Roundup® elevated the aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities and the total bilirubin serum levels, indicating hepatic tissue damage. In addition, it promoted changes in the hepatic glycogen concentrations and in the blood glucose. The infection and exposure effects were antagonistic, in the leucocitary parameters, occurring intense inflammatory reaction and immunodepression, respectively. However, both provoked synergistic effects in the carbohydrate metabolism. The association between the infection and the exposure to the herbicide caused biochemical changes in the hepatic function tests and hepatomegaly. The previous exposure to the herbicide (GEI group) resulted in monocytosis, possibly caused by the tissue damage observed in this group. The exposure to pesticide, as well as the infection, did not interfere in the renal function of none of the experimental groups. The previous exposure to the herbicide had influence in the GEI group's parasite load, possibly because of its immunodepressive capacity. Besides that, this group eliminated a greater number of L₁ larvae, elucidated by the increase of the number of recovered female helminths, in comparison with the CIC and GIE groups. In summary, the Roundup® herbicide can influence in the *A. cantonensis*-infection effects, as well as, in the parasite load and in the L₁ larvae elimination.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Utilização de agrotóxicos no Brasil	22
1.1.1 O herbicida glifosato	23
1.1.2 Via de absorção e modo de ação	24
1.1.3 Toxicidade de herbicidas à base de glifosato em roedores	26
1.1.4 Efeitos do glifosato em helmintos	27
1.2 Características gerais dos nematoides	28
1.2.1 Morfologia	28
1.3 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	32
1.3.1 Ciclo Biológico	32
1.3.2 Angiostrongilíase cerebral (AC)	35
1.3.3 Efeitos da infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em roedores.....	39
1.4 Aplicação da bioquímica clínica na detecção de alterações hepáticas e renais	42
1.4.1 Teste de função hepática.....	42
1.4.2 Albumina como marcador de análises bioquímicas	44
1.4.3 Teste de função renal	44
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Herbicida utilizado e tratamento dos roedores	48
4.2 Grupos experimentais	48
4.3 Helminto utilizado e manutenção experimental de seu ciclo biológico	50

4.4	Recuperação de larvas L ₃ e infecção dos roedores	51
4.5	Eutanásia dos roedores	52
4.6	Pesagem dos órgãos	52
4.7	Análises hematológicas e bioquímicas	52
4.8	Avaliação da carga parasitária	54
4.9	Avaliação coproparasitológica de <i>Rattus norvegicus</i> infectado por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	54
4.10	Análises estatísticas	54
4.11	Aspectos éticos	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Efeitos da infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em <i>Rattus norvegicus</i>	56
5.1.1	Pesagem dos órgãos	56
5.1.2	Análises hematológicas	56
5.1.3	Análises bioquímicas	58
5.2	Efeitos da exposição ao herbicida Roundup®.....	60
5.2.1	Pesagem dos órgãos	60
5.2.2	Análises hematológicas	61
5.2.3	Análises bioquímicas	63
5.3	Diferenças estatísticas entre os grupos Controles Infectados (CIA e CIC) e Controles expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT).....	66
5.3.1	Pesagem dos órgãos	66
5.3.2	Análises hematológicas	68
5.3.3	Análises bioquímicas	72
5.4	Efeitos da associação da exposição ao herbicida Roundup® com a infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	76
5.4.1	Pesagem dos órgãos	76
5.4.2	Análises hematológicas	78
5.4.3	Análises bioquímicas	82
5.5	Avaliação da carga parasitária	86
5.6	Análise coproparasitológica.....	86
6	DISCUSSÃO	89

6.1	Efeitos da infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	89
6.1.1	Pesagem dos órgãos e análises hematológicas.....	89
6.1.2	Análises bioquímicas.....	94
6.2	Efeitos da exposição ao herbicida Roundup® em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	101
6.2.1	Massa corporal.....	101
6.2.2	Análises hematológicas.....	101
6.2.3	Análises bioquímicas.....	105
6.3	Efeitos da associação da exposição ao herbicida Roundup® com a infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	112
6.3.1	Pesagem dos órgãos.....	113
6.3.2	Análises hematológicas.....	116
6.3.3	Análises bioquímicas.....	124
6.4	Avaliação da carga parasitária	133
6.5	Análise coproparasitológica	134
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
8	CONCLUSÕES	136
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição anual, em toneladas, do ingrediente ativo Glifosato, comercializada no Brasil, entre os anos de 2009 e 2017	23
Figura 2: Representação da estrutura do Glifosato (Fórmula molecular – C ₃ H ₈ NO ₅ P)	24
Figura 3: Representação da via bioquímica indicando o sítio aonde ocorre a inibição da EPSP sintase pela ação de herbicidas à base de glifosato	25
Figura 4: Esquemática da cutícula de nematoides (<i>Ascaris</i>)	29
Figura 5: Organização geral dos nematoides, utilizando a morfologia de <i>Rhabditis</i> sp., como exemplo	31
Figura 6: Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	34
Figura 7: Locais, no mundo, nos quais foi observada a presença do nematódeo <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	35
Figura 8: Estados brasileiros em que foi registrada a presença de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em hospedeiros intermediários e definitivos (●) e/ou de casos de Meningite eosinofílica no Brasil (▲)	37
Figura 9: Delineamento experimental.....	50
Figura 10: Aparelho de Baermann e Moraes com amostras de fezes, de <i>Rattus norvegicus</i> infectados, para obtenção de larvas L ₁	51
Figura 11: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores para função hepática dos grupos: Controle limpo (CL), Controle de infecção aguda (CIA) e Controle de infecção crônica (CIC)	59
Figura 12: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores para função hepática dos grupos: Controle limpo (CL) e Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e de efeito tardio (CEHT)	64
Figura 13: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores hepáticos dos grupos: Controle limpo (CL), Controle de infecção aguda (CIA), Controle de infecção crônica (CIC) e Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e de efeito tardio (CEHT)	73
Figura 14: Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores hepáticos dos grupos: Controle limpo (CL), Controles de infecção aguda (CIA), Controle de infecção crônica (CIC), Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e	

de efeito tardio (CEHT), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida (GIE) e grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado (GEI).....	83
Figura 15: Gráfico de barras demonstrando a média de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> machos, fêmeas e do total de helmintos adultos, recuperados de artérias pulmonares e coração dos roedores dos grupos controle de infecção crônica (CIC), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida Roundup® (GIE) e grupo exposto ao herbicida Roundup® e, depois, infectado (GEI)	86
Figura 16: Média e desvio padrão do número de larvas L ₁ <i>Angiostrongylus cantonensis</i> eliminadas por roedores <i>Rattus norvegicus</i> de cada grupo (controle de infecção crônica – CIC; grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida – GIE; grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado – GEI), entre o 38º ao 50º dia p.i.	87
Figura 17: Média e desvio padrão da quantidade de larvas L1 eliminadas por cada helminto fêmea recuperada dos grupos controle de infecção crônica (CIC), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida (GIE) e grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado (GEI).....	88
Figura 18: A reação imunológica, contra antígenos liberados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , promoveu hiperplasia esplênica, resultando em esplenomegalia nos roedores do grupo Controle de infecção crônica (CIC)	89
Figura 19: Causas da trombocitopenia observada em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> – (1): Dano tecidual, gerando trombocitopenia de consumo e extravasamento de elementos sanguíneos, incluindo as plaquetas; (2): Esplenomegalia, ampliando a capacidade do baço de sequestrar as plaquetas.....	92
Figura 20: A liberação de ovos por helmintos adultos fêmeas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e a eclosão de larvas L ₁ , nos capitulares pulmonares, estimularam uma resposta do tipo Th2, em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados, havendo liberação de interleucinas IL-5 e IL-4, que estão relacionadas à indução de eosinófilos e linfócitos B, respectivamente, ocasionando em uma eosinofilia reacional e linfocitose	93
Figura 21: <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar), infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , apresentaram neutrofilia. Esse efeito pode ter sido uma reação aos ovos e às larvas do parasito, uma vez que os neutrófilos são responsáveis, entre outras funções, pela eliminação de larvas helmínticas, além de danos ao parasito adulto, através da liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases	94

Figura 22: Produtos excretados/secretados por fases larvais e/ou adultas de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> aumentaram a permeabilidade da membrana de hepatócitos, gerando maior atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados pelo parasito.....	96
Figura 23: O aumento da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina, observado em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , pode ter sido causado por um comprometimento do fluxo biliar (colestase), solubilizando-a no plasma sanguíneo.....	97
Figura 24: O aumento dos níveis séricos da bilirrubina total (BT), observado em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , pode ter sido ocasionado por uma alteração na capacidade metabólica hepática, uma vez que, em condições fisiológicas normais, tal pigmento é metabolizado pelo fígado e excretado, posteriormente, pelo trato gastrointestinal. Quando ocorre disfunção desse órgão, há o acúmulo da BT, no sangue, elevando seus níveis séricos.....	98
Figura 25: A hipoglicemia observada em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados, cronicamente, por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , pode ser resultado: da presença de helmintos adultos, captando a glicose no sangue, como substrato energético; de uma menor capacidade do fígado de promover a gliconeogênese, devido a alterações hepáticas, também verificadas nesses animais.....	99
Figura 26: <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) infectados cronicamente por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> apresentaram aumento nos níveis séricos de proteínas totais, causado pelo aumento de gamaglobulinas (imunoglobulinas), no plasma sanguíneo, como uma reação à infecção.....	100
Figura 27: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) apresentaram diminuição do seu peso corporal que pode estar relacionado à redução da alimentação, ou seja, uma perda de apetite, sendo esse, um sinal clínico recorrente durante intoxicações por pesticidas.....	101
Figura 28: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) apresentaram neutropenia que pode estar associada a alterações na medula óssea.....	103
Figura 29: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) apresentaram linfocitopenia que pode estar associada a uma peroxidação de membrana plasmática, resultando em apoptose inicial e necrose de linfócitos.	

Outra causa possível seria o efeito de metais pesados e do surfactante Polioxietileno amina (POEA), presentes na formulação comercial Roundup®, que têm sido apontados como agentes que promovem a quebra de fitas de DNA desse tipo celular 104

Figura 30: A atividade enzimática sérica da fosfatase alcalina apresentou-se diminuída, nos roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) 106

Figura 31: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) apresentaram hiperbilirrubinemia, sendo resultado de uma possível: (1) disfunção hepática; (2) inativação da conjugação da bilirrubina; (3) efeito hepatotóxico que o surfactante Polioxietileno amina (POEA) pode promover e; (4) indução, pelo herbicida Roundup®, da enzima heme oxidase, resultando em maior degradação do grupamento Heme e, conseqüentemente, elevando os níveis séricos da bilirrubina..... 108

Figura 32: Os roedores somente expostos ao herbicida Roundup® (grupos CEHC e CEHT) apresentaram hiperalbuminemia, podendo ser um indicativo de comprometimento hepático, uma vez que esses animais também apresentaram alterações nas enzimas AST, ALT e FA, que corrobora tal hipótese. Outra possibilidade é de que esse aumento tenha sido uma resposta ao estresse oxidativo que a exposição ao herbicida Roundup® promove, visto que a albumina tem função antioxidante. Nos animais do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) foi observado, também, aumento dos níveis séricos das proteínas totais, sendo explicada pela elevação da albumina, no plasma sanguíneo, cuja concentração corresponde a mais de 50% das proteínas totais, no sangue..... 110

Figura 33: O herbicida Roundup® alterou o metabolismo de carboidratos de *Rattus norvegicus* (Wistar) – logo após o final da exposição, foi observado, nos roedores (grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo – CEHC), diminuição da concentração de glicogênio hepático, que pode ter decorrido de uma glicogenólise em função ao estresse promovido pelo herbicida. Tal processo resultou em uma hiperglicemia tardia, observada no grupo com semanas após a exposição (Controle exposto ao herbicida de efeito tardio – CEHT). Para conter esse aumento da glicemia, o organismo dos animais estimulou, de forma fisiológica, o processo de glicogênese, numa tentativa de alcançar a homeostase 111

Figura 34: Nenhum dos roedores dos grupos controle de infecções aguda e crônica (CIA e CIC, respectivamente) e controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio (CEHC e CEHT, nessa ordem) apresentaram alteração na massa do fígado. Entretanto, no grupo associado (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE), foi observada hepatomegalia, podendo ser elucidada pelo aumento da concentração de glicogênio hepático, promovido pela infecção por *Angiostrongylus cantonensis*, além de uma possível esteatose hepática não alcoólica causada pela exposição ao pesticida. Tal alteração demonstra que quando associados, esses dois agentes provocam aumento da massa do fígado..... 115

Figura 35: Somente a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* promoveu alterações eritrocitárias em *Rattus norvegicus* (Wistar), indicando que a concentração de 500 mg/kg do animal do herbicida Roundup® não afeta tais parâmetros hematológicos. Portanto, tal alteração, também observada nos grupos associados (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI) está relacionada à infecção 117

Figura 36: Somente a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* promoveu trombocitopenia em *Rattus norvegicus* (Wistar), indicando que a concentração de 500 mg/kg do animal do herbicida Roundup® não afeta o número de plaquetas. Portanto, tal alteração, também observada nos grupos associados (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI) está relacionada à infecção, uma vez que os resultados obtidos nas análises desses roedores, são semelhantes aos do controle de infecção crônica (CIC) 118

Figura 37: A infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* (grupo CIC) e o efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) promoveram alterações antagônicas no número de neutrófilos de *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo neutrofilia e neutropenia, respectivamente. Quando é observado o grupo onde há a associação desses dois agentes (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE), observa-se que a exposição ao pesticida interfere no efeito da infecção, diminuindo o número de neutrófilos. Quando a ordem dos agentes é inversa (Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI), ocorre o contrário: a infecção compensa a redução do número desses granulócitos, promovida pela exposição 120

Figura 38: O efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* (grupos CIA e CIC) promoveram alterações antagônicas no número total de linfócitos de *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo linfocitopenia e linfocitose, respectivamente. Quando são observados os grupos onde há a associação desses dois agentes (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI), observa-se também linfocitose, porém, menos evidente que a detectada no grupo controle de infecção crônica (CIC), indicando que a exposição influenciou no efeito promovido pela infecção..... 122

Figura 39: Nenhum dos roedores dos grupos controles infectados (CIA e CIC) e controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio (CEHC e CEHT) apresentaram alterações no número de monócitos, no sangue..... 124

Figura 40: O efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) e a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* (grupo CIC) promoveram alterações antagônicas em *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo diminuição e aumento, respectivamente, da atividade sérica da fosfatase alcalina (FA)..... 127

Figura 41: A infecção por *Angiostrongylus cantonensis*, assim como a exposição ao herbicida Roundup® promovem efeitos similares sobre os níveis séricos de bilirrubina total em *Rattus norvegicus* (Wistar). Porém, quando há a associação desses dois agentes (grupos GIE e GEI), os efeitos não se somam, ou seja, não são sinérgicos, ainda que o grupo GIE tenha demonstrado um aumento mais evidente que os demais grupos experimentais..... 128

Figura 42: No presente trabalho, foi observado que o herbicida Roundup® promoveu hiperalbuminemia em *Rattus norvegicus* (Wistar) analisados semanas após a exposição (grupo CEHT). Por outro lado, a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* (grupos CIA e CIC) resultou em efeitos semelhantes aos observados nos animais do grupo controle limpo (CL). Nos grupos associados (GIE e GEI), houve um leve aumento nos níveis séricos dessa proteína, porém, não de forma significativa, indicando que a infecção pode ter influenciado no efeito da exposição ao herbicida..... 130

Figura 43: Ambas a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* e a exposição ao herbicida Roundup® promoveram alterações no metabolismo de carboidratos de *Rattus norvegicus* (Wistar). Porém, os efeitos foram antagônicos: no primeiro caso, a infecção aguda promove um aumento da concentração de glicogênio hepático que,

ao alcançar à fase crônica, sofre um declínio; no segundo caso, por sua vez, logo ao final da exposição, a concentração de glicogênio hepático diminui e, após algumas semanas, ele tende a elevar-se 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, em gramas (g), de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente)	56
Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eritrocitários, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente).	57
Tabela 3: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Controles de Infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente)	58
Tabela 4: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Controles de Infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente)	60
Tabela 5: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)	61
Tabela 6: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)	61
Tabela 7: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle	

limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)62

Tabela 8: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)65

Tabela 9: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)67

Tabela 10: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)69

Tabela 11: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)71

Tabela 12: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de

Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente)75

Tabela 13: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, em gramas (g), de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI)77

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI)79

Tabela 15: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções Aguda e Crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI)81

Tabela 16: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle

limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções Aguda e Crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI)85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos aromáticos
AC	Angiostrongilíase cerebral
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância simples
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BT	Bilirrubina total
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz
CDE	Contagem de eritrócitos
CEHC	Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo
CEH	Controles expostos ao herbicida
CEHT	Controle exposto ao herbicida de efeito tardio
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CIA	Controle de infecção aguda
CIC	Controle de infecção crônica
Cis	Controles infectados
CL	Controle limpo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético tripotássico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPSP sintase	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ex.	Exemplo
FA	Fosfatase alcalina
GIE	Grupo infectado e, depois, exposto
GEI	Grupo exposto e, depois, infectado
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hct	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IOC/FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
L ₁	Primeiro estágio larval de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
L ₂	Segundo estágio larval de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
L ₃	Terceiro estágio larval de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
L ₄	Quarto estágio larval de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
L ₅	Helminto jovem adulto de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
n	Número
ME	Meningite eosinofílica
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
OGMs	Organismos geneticamente modificados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	<i>Phosphoenol piruvate</i>
p.i	pós-infecção
POEA	Polioxietileno amina
Rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
S3P	<i>Shikimate-3-phosphate</i>
TGO	Transaminase glutâmico pirúvica
TGP	Transaminase glutâmico-oxalacética
T _H 2	<i>T-helper 2</i>
VCM	Volume corpuscular médio
Vs.	<i>Versus</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Utilização de agrotóxicos no Brasil

Agrotóxicos podem ser definidos como:

“produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, proteção de florestas – nativas ou implantadas, e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (Brasil, 1989, p. 1).

Essas substâncias atuam como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 1989). Apesar de sua aplicação atual, inicialmente, elas foram criadas como armas químicas, no contexto das grandes guerras mundiais e, somente há pouco mais de meio século, vêm sendo utilizadas em setores agrícolas (Londres, 2011).

No Brasil, a introdução desses produtos ocorreu na década de 1960, quando foi implementado um modelo de produção, baseado na denominada “Revolução Verde”, ou seja, um conjunto de práticas e inovações tecnológicas, direcionado, principalmente, ao uso de agrotóxicos e fertilizantes, com a argumentação de que a adoção dessas práticas modernizaria a agricultura brasileira (Delgado, 2004; Andrades e Ganimi, 2007; Dias et al., 2018).

Entretanto, apenas tardiamente, em 1989, foi criada e implementada a Lei nº 7.802/89, denominada Lei dos Agrotóxicos, compreendendo uma série de regras e diretrizes obrigatórias, visando regular a obtenção e uso de tais produtos (Brasil, 1989; Dias et al., 2018). Apesar de critérios rigorosos, o Brasil constitui um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, tendo ocupado o primeiro lugar, em uma classificação elaborada em 2008 (ANVISA, 2012). Atualmente, verifica-se um incremento no número de ingredientes ativos, autorizados para utilização na agricultura, que conta com cerca de 500 produtos para comercialização (Dias et al., 2018), incluindo o herbicida mais utilizado no país, o glifosato (sob a formulação comercial Roundup®) que, em 2017, alcançou a quantidade de 173.150,75 toneladas comercializadas (SEI/ANVISA, 2018) (Figura 1).

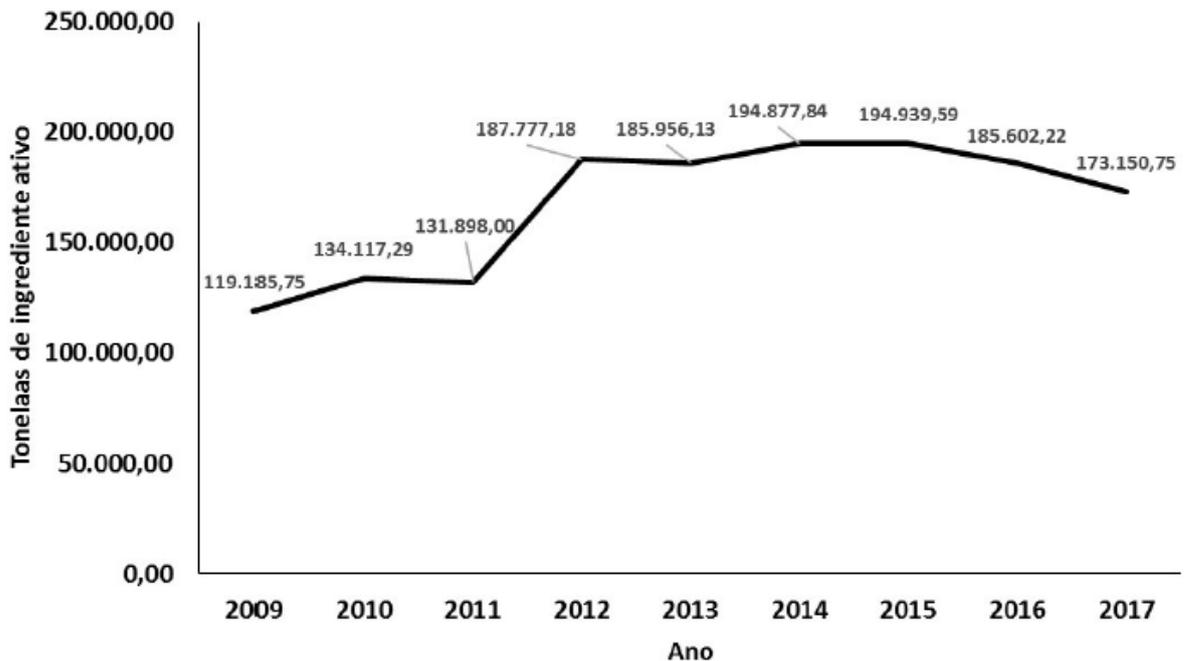


Figura 1: Distribuição anual, em toneladas, do ingrediente ativo Glifosato, comercializada no Brasil, entre os anos de 2009 e 2017 (SEI/ANVISA, 2018).

1.1.1 O herbicida glifosato

O glifosato ($C_3H_8NO_5P$) (Figura 2) é um organofosfato, nomeado, pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), como N-(fosfometil)glicina (Sergi, 2019). Esse composto, pertencente ao grupo químico das glicinas, foi, inicialmente, sintetizado para atuar como quelante industrial, detergente, redutor de pH etc. (Franz et al., 1997; Gruys e Sikorski, 1999; Oliveira Júnior et al., 2011). Somente em 1971, o pesquisador químico, John Franz, pertencente à empresa multinacional *Monsanto Company*, descobriu a sua capacidade herbicida, criando-se a marca Roundup® (Galli e Montezuma, 2005; Baer e Marcel, 2014). Desde então, os herbicidas à base de glifosato são distribuídos, sob diversas formulações comerciais, sendo considerados os pesticidas mais vendidos mundialmente (Baer e Marcel, 2014; Mesnage, 2015).

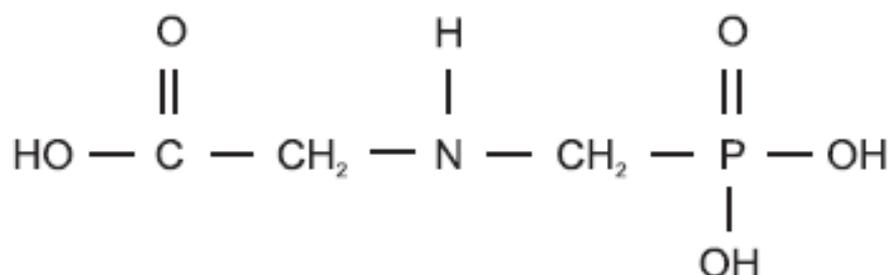


Figura 2: Representação da estrutura do Glifosato (Fórmula molecular – C₃H₈NO₅P) (Yamada e Castro, 2007).

O princípio ativo atua de forma sistêmica, não-seletiva e pós-emergente, sendo altamente eficiente em eliminar diferentes tipos de ervas daninhas (anuais, perenes, mono e dicotiledôneas) (Amarante Junior et al., 2002). Tem sido utilizado em culturas agrícolas, em práticas de silvicultura e horticultura, em coleções hídricas – para o controle de plantas aquáticas invasoras, e em ambientes domésticos e de lazer (Edge et al., 2014; Tarouco et al., 2017).

Apesar de existirem diversas formulações comerciais do glifosato, disponíveis no mercado agropecuário, a principal e mais utilizada, mundialmente, é a Roundup® (*Monsanto-Bayer Company*), que apresenta formulação à base de sal de isopropilamina. Além do princípio ativo, ele é disponibilizado, comercialmente, misturado a aditivos e surfactantes, como por exemplo, o polioxietileno amina (POEA), cuja função é auxiliar o glifosato a penetrar nas folhagens das plantas-alvo, aumentando a eficácia do produto (Sergi, 2019).

Alguns estudos sugerem que essas substâncias “inertes” podem ser a causa majoritária de alta toxicidade dessas formulações (Langiano e Martinez, 2008; Lanctôt et al., 2014; Navarro-Martín et al., 2014), uma vez que o glifosato sozinho é considerado pouco tóxico, agindo sobre uma via metabólica presente somente em plantas, bactérias, fungos e alguns protistas, e ausente em animais (Giesy et al., 2000; Kruse et al., 2000; Maeda e Dudareva, 2012; Tarouco et al., 2017).

1.1.2 Via de absorção e modo de ação

O glifosato possui alto grau de adsorção às partículas do solo, o que resulta em sua inativação, quando em contato com esse substrato (Oliveira Júnior et al., 2011; Helander et al., 2012). Por esse motivo, como todo herbicida pós-emergente, o glifosato só pode ser aplicado sobre partes da planta-alvo que estão acima do

solo. A via de entrada desse herbicida ocorre pelas folhas do vegetal, através da cutícula, por onde ele penetra rapidamente e, depois, é absorvido de forma mais lenta. Através do floema, o glifosato é distribuído pelos meristemas apicais, raízes e rizomas, configurando sua característica sistêmica (Yamada e Castro, 2007; Helander et al., 2012).

O seu mecanismo de ação acontece a partir da inibição, por competição, da atividade da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) (EC 2.5.1.19), que atua na sexta etapa da via metabólica do ácido chiquímico. Ela tem a função de catalisar a reação que condensa dois compostos: o fosfoenolpiruvato (PEP, do inglês: *phosphoenol piruvate*) e o chiquimato-3-fosfato (S3P, do inglês: *shikimate-3-phosphate*), formando o fosfato orgânico e o enolpiruvilchiquimato-3-fosfato. Esse último serve como substrato para formação do corismato, precursor universal de aminoácidos aromáticos (AA) essenciais. Quando a planta é exposta ao glifosato, ele se liga ao complexo enzima EPSPs-S3P, impedindo o prosseguimento da formação de alguns aminoácidos (Oliveira Júnior et al., 2011) (Figura 3).

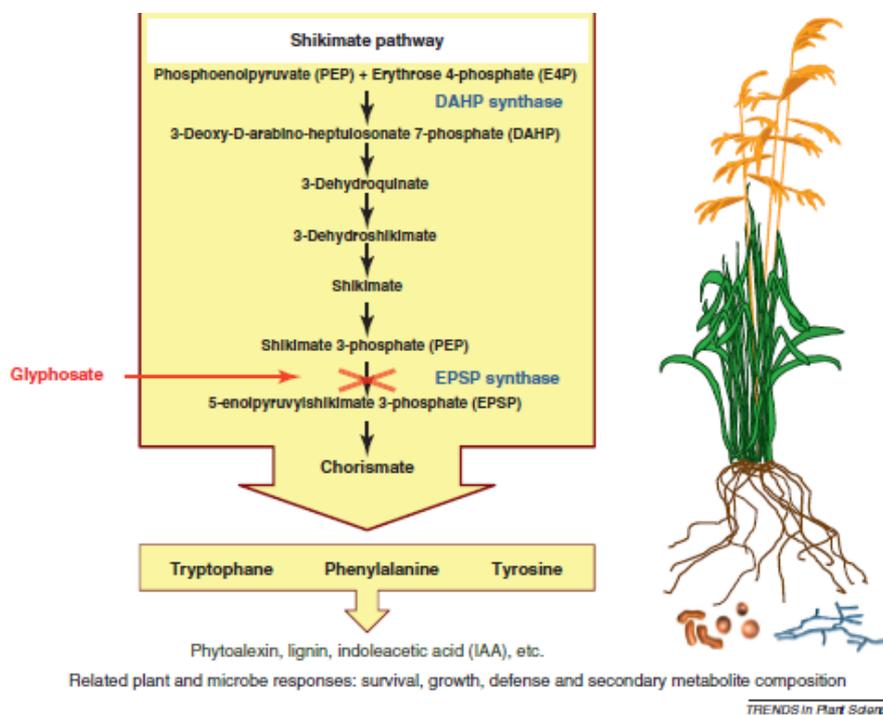


Figura 3: Representação da via bioquímica indicando o sítio onde ocorre a inibição da EPSP sintase pela ação de herbicidas à base de glifosato (Helander et al., 2012).

Os três aminoácidos aromáticos essenciais, sintetizados na via do ácido chiquímico, são: fenilalanina, tirosina e triptofano. Eles atuam como precursores de diversos metabólitos secundários, como lignina, alcaloides, hormônios vegetais, componentes da parede celular, entre outros. Além disso, eles são utilizados como subunidades para a síntese de proteínas e, portanto, são fundamentais para o funcionamento desses organismos (Kruse et al., 2000; Maeda e Dudareva, 2012). Quando a planta-alvo é exposta ao glifosato, o seu metabolismo entra em colapso, levando-a à morte, dentro de semanas ou até dias (Franz et al., 1997; Monquero et al., 2004; Oliveira Júnior et al., 2011).

1.1.3 Toxicidade de herbicidas à base de glifosato em roedores

O glifosato é considerado, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de menor toxicidade quando comparado a outros herbicidas (OMS, 1994), apesar de ter sido demonstrado, através de estudos, com modelos experimentais, que tanto o ingrediente ativo glifosato, quanto suas formulações comerciais, que contêm associados aditivos e surfactantes, podem trazer prejuízos à saúde animal (ATSDR, 2019). Estudos toxicológicos, em que foi administrado apenas o glifosato a ratos e camundongos, demonstraram efeitos deletérios aos sistemas hematológico, bioquímico e histopatológico, acometendo, principalmente, os rins e o fígado desses animais (Jasper et al., 2012; Séralini et al., 2014; Dedeke et al., 2018).

Os rins têm sido considerados alvos preferenciais dos efeitos tóxicos do glifosato, o que decorre da sua principal forma de excreção através da urina, corroborado pelo maior acúmulo dessa substância nesse órgão, quando confrontado com os demais tecidos do corpo (Acquavella et al., 2004; Mesnage et al., 2012; GTFA, 2014). Esse achado foi confirmado por Dedeke et al. (2018), que detectou dano renal severo em ratos albinos, expostos a diferentes concentrações do Roundup® (3,6, 50,4 e 248,4 mg/kg). Os autores verificaram aumento da concentração dos metabólitos ureia e creatinina, na urina, acompanhado de lesão renal. Esses fatos foram, anteriormente, demonstrados em um ensaio envolvendo ratos Sprague-Dawley, no qual ficou evidenciado que, mesmo expostos a doses abaixo da recomendada pelo fabricante, o glifosato foi capaz de provocar alterações morfológicas e bioquímicas nos rins e no fígado desses animais (Mesnage et al., 2015).

Desta forma, desde a década de 1980, tem sido confirmado o potencial do glifosato em atuar sobre células animais, causando alterações hepáticas, particularmente, alterando a fosforilação oxidativa (Olorunsogo et al., 1979) e causando danos irreversíveis em células do fígado, evidenciados a partir da observação do aumento na atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1) e alanina aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2) e da formação de fibras reticulares (Benedetti et al., 2004).

Segundo Williams et al. (2000), concentrações do glifosato abaixo de 1.000 mg/kg são consideradas níveis sem efeitos adversos observáveis (NOAEL, do inglês – *No observed adverse effect level*) em ratos. Porém, Jasper et al. (2012), avaliando o efeito da administração oral do Roundup®, nas concentrações 50 e 500 mg/kg do animal, ou seja, abaixo de 1.000 mg/kg, em camundongos, constataram anemia macrocítica, com alterações em parâmetros hematológicos (número de eritrócitos, hemoglobina e volume corpuscular médio), e redução da massa corporal em ambas as dosagens.

1.1.4 Efeitos do glifosato em helmintos

Agrotóxicos podem agir como estressantes ambientais, promovendo o desequilíbrio de habitats e, conseqüentemente, comprometendo não só a macrofauna ali presente, assim como, de forma direta, os parasitos que eles albergam (Solomon et al., 1996; Lafferty e Kuris, 1999; Monte et al., 2016). Apesar de poucos estudos terem avaliado a toxicidade do glifosato, e de suas formulações comerciais, incluindo a Roundup®, sobre esses organismos, normalmente, os trabalhos restringem-se a três objetivos principais: (1) elucidar a influência dessa substância sobre a biologia desses organismos; (2) avaliar a sua toxicidade em relação aos seus hospedeiros (Monte et al., 2018; 2019) e; (3) utilizar nematoides de vida livre como bioindicadores para contaminação ambiental (Sochová et al., 2006).

Rohr et al. (2008) e Raffel et al. (2009) empregaram, em seus estudos, diferentes fases do ciclo biológico do trematódeo *Echinostoma trivolvis* Cort, 1914, como modelos experimentais, expondo-as a concentrações de quatro pesticidas distintos, incluindo o glifosato, a fim de avaliar a influência dessas substâncias na infecção de anfíbios. Monte et al. (2016; 2018), utilizando outra espécie desse mesmo gênero, *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967, detectaram mortalidade de miracídios e cercárias, após a exposição a diferentes dosagens abaixo da

concentração letal do herbicida Roundup®, além de alterações morfológicas e ultraestruturais nos helmintos adultos.

O nematódeo, de vida livre *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1899, também vem sendo amplamente utilizado em estudos sobre a toxicidade do glifosato. Quando expostos a distintas concentrações da formulação comercial Roundup®, os espécimes apresentam neurodegeneração (Negga et al., 2011), alterações na reprodução, na locomoção, além de estresse oxidativo (García-Espiñeira, 2018; Jacques et al., 2019). Tais estudos são fundamentais para evidenciar os efeitos tóxicos que esse herbicida produz sobre seres distintos de seus organismos-alvo.

1.2 Características gerais dos nematoides

Os nematoides constituem um grupo amplo de espécies que possuem hábitos e características peculiares. Eles estão presentes em ambientes terrestres e aquáticos (água doce e marinho), incluindo aqueles cujas condições são extremas, como por exemplo: águas termais, regiões polares, rochosas e montanhosas, locais ácidos e com hipóxia, entre outros. Algumas espécies podem ser: predadoras, entomopatogênicas, de vida livre – em sua maioria, ou parasitos de plantas e animais, aos quais podem provocar diversas patologias (Monte, 2014; Shan e Mahamood, 2017).

Dependendo da espécie, o ciclo biológico pode apresentar-se de forma monoxênica, havendo a participação de somente um hospedeiro, ou heteroxênica, no qual dois ou mais hospedeiros são necessários para completá-lo. Para alcançar a fase adulta, ou seja, o estágio maduro sexualmente, o parasito deve, anteriormente, passar por quatro fases de desenvolvimento: L₁, L₂, L₃ e L₄ (Monte, 2014; Shan e Mahamood, 2017). Porém, alguns autores consideram como estágio L₅, o helminto adulto jovem ou imaturo.

1.2.1 Morfologia

Os nematoides, geralmente, possuem corpo cilíndrico e filiforme, entretanto, em raras exceções, pode apresentar-se na forma de pera, limão ou de saco. Seu formato é alongado e transparente ou opaco, não segmentado e com simetria

bilateral, tendo tamanho variando entre 82 μm (helmintos microscópicos) até 8 metros (Shan e Mahamood, 2017).

Externamente, o corpo dos nematoides apresenta uma cutícula composta, majoritariamente, de proteínas associadas a carboidratos e lipídeos. Essa superfície é revestida por uma epicutícula constituída pelos seguintes estratos: córtex (interno e externo), mediano ou matriz (subdividido em camadas fibrilar e homogênea) e fibroso. Entre suas funções, destacam-se: trocas gasosas, proteção corporal e o auxílio aos músculos durante a locomoção (Smyth, 1994; Rey, 2008; Shan e Mahamood, 2017) (Figura 4).

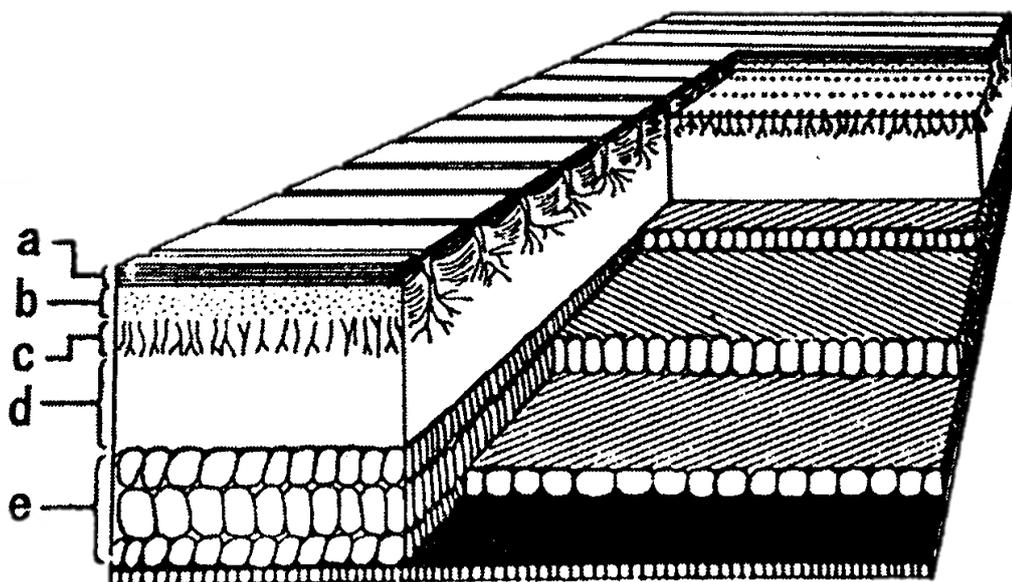


Figura 4: Esquemática da cutícula de nematoides (*Ascaris*): a – Camada cortical externa; b – camada cortical interna; c – camada fibrilar da matriz; d – camada homogênea da matriz; e – camadas fibrosas (Adaptado de Rey, 2008).

Logo abaixo da cutícula, pode-se observar uma membrana basal e, subsequentemente, uma camada fina, denominada hipoderme (epiderme), cuja função é a produção de substâncias que irão constituir a cutícula. Além disso, ela possui quatro prolongamentos, voltados para a região interna do corpo do helminto, chamados de cordões longitudinais – mediano-dorsal, mediano-ventral e dois laterais (constituem os canais excretores). Adjacente à hipoderme, há músculos formados por estriações transversais e/ou longitudinais, que garantem a movimentação do helminto e, também, auxiliam no funcionamento de alguns sistemas, como por exemplo: o digestivo – na dilatação do esôfago e do ânus; o

sistema reprodutor, tais como musculatura copuladora, espicular, dentre outros (Rey, 2008; Shan e Mahamood, 2017).

Na extremidade anterior, pode-se observar a região cefálica contendo lábios, papilas sensoriais e anfídeos (órgãos quimiorreceptores e sensoriais), sendo nessa região onde se inicia o sistema digestivo, constituído por: boca (estoma), cavidade bucal, esôfagos glandular e muscular e intestino. Esses dois últimos estão conectados através de uma estrutura denominada cárdia, cuja função é impedir que o alimento seja regurgitado do intestino para o esôfago. Posteriormente ao intestino, encontra-se o reto que, no macho, desemboca em uma câmara, denominada cloaca, e nas fêmeas, no ânus. Por apresentarem sistemas digestivo e reprodutivo associados, os machos utilizam a cloaca tanto para a eliminação de resíduos provenientes de sua digestão, quanto como saída do espículo (órgão copulador). Em contrapartida, nas fêmeas, tais sistemas apresentam-se separadamente e o ânus desempenha o papel de expelir materiais não aproveitados durante a digestão (Smyth, 1994; Rey, 2008; Monte, 2014; Shan e Mahamood, 2017) (Figura 5).

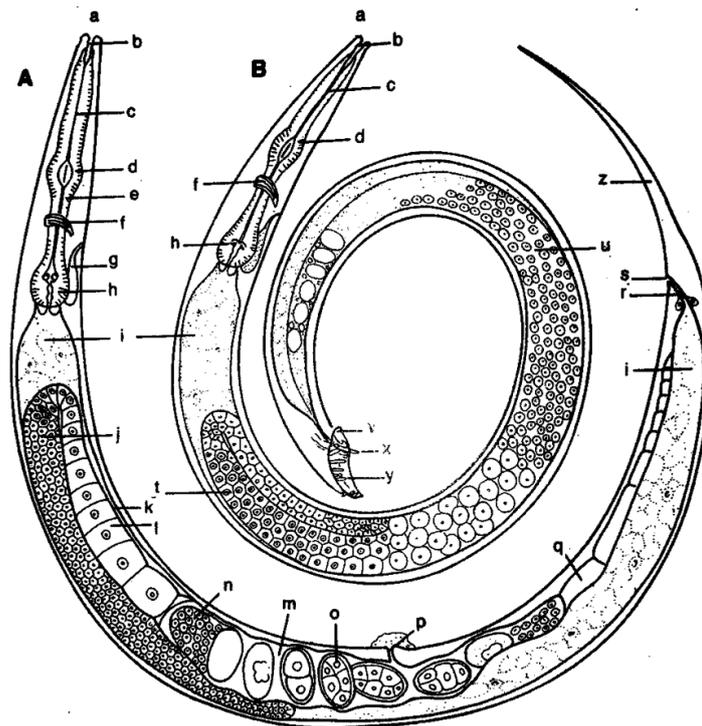


Figura 5: Organização geral dos nematoides, utilizando a morfologia de *Rhabditis* sp., como exemplo. (A) Fêmea e (B) macho: a – lábio; b – boca; c – canal do esôfago; d – dilatação esofágica (bulbo médio); e – esôfago muscular; f – anel nervoso; g – glândula e poro excretor; h – bulbo posterior com mecanismo valvular; i – intestino; j – ovário superior; k – oviduto, contendo óvulos (l); m – útero, contendo (n) espermatóides; o – ovos; p – vagina e abertura vulvar; q – oviduto e ovário posteriores; r – reto e glândulas retais; s – abertura anal; t – testículo com espermatócitos; u – vaso deferente, com espermatóides; v – asas caudais; x – espículo; y – papilas sensoriais; z – cauda. (Rey, 2008).

Os nematoides podem ser dioicos (sexos separados) ou monoicos (hermafroditas), havendo dimorfismo sexual, como o fato de as fêmeas serem maiores que os machos. O sistema reprodutor feminino pode apresentar um, dois, três ou mais ovários (denominados: monodelfo, didelfo e polidelfo, respectivamente); oviduto; útero além da vagina, ovijectores e vulva. O sistema reprodutor masculino é composto por um ou dois testículos ligados a um canal deferente, vesícula seminal, canal ejaculador e câmara cloacal, além de estruturas acessórias, como por exemplo, espículo, gubernáculo e télamon, que podem ou não ter função durante a cópula (Travassos, 1950; Rey, 2008; Shan e Mahamood, 2017).

Entre a parede corporal e os órgãos internos, há uma cavidade, denominada pseudoceloma, que funciona como um sistema hidrostático, movido por fluidos,

auxiliando na locomoção do parasito (Rey, 2008; Monte, 2014) e promovendo a circulação de nutrientes e oxigênio que serão absorvidos por outros órgãos (Rey, 2008).

1.3 *Angiostrongylus cantonensis*

Angiostrongylus cantonensis Chen, 1935 é um nematódeo pertencente à família Angiostrongylidae e foi originalmente descrito em Guangzhou (Cantão), na China, parasitando artérias pulmonares e o ventrículo direito do coração de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758, sendo popularmente conhecido como o “verme pulmonar de ratos” (Chen, 1935; Wang et al., 2008; 2012; OuYang et al., 2012; Moreira et al., 2013; Monte et al., 2014).

Esse nematoide é endêmico no sul e sudeste asiático e nas ilhas do Pacífico (Lima et al., 2009; Monte et al., 2014), porém, atualmente, ele pode ser encontrado na América do Norte, nas ilhas do Caribe, em alguns países da África, na Austrália e na América do Sul, incluindo o Brasil (Wang et al., 2012). Tal distribuição se deve à introdução, através de navios e aeronaves, de hospedeiros intermediários e definitivos infectados por *A. cantonensis* (Wang et al., 2008), além da presença de hospedeiros naturais aptos a manterem o seu ciclo biológico, nesses locais (Monte et al., 2014).

1.3.1 Ciclo Biológico

Angiostrongylus cantonensis possui ciclo evolutivo heteroxeno, necessitando de dois hospedeiros para completá-lo: um intermediário, representado por moluscos gastrópodes (caramujos aquáticos ou terrestres e lesmas), de diversas espécies (Thiengo et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Morassutti et al., 2014; Lu et al., 2018), e um hospedeiro definitivo, representado por roedores, principalmente, das espécies *R. norvegicus* e *R. rattus* (Wang et al., 2008; 2012; Cowie, 2013; Morassutti et al., 2014).

O hospedeiro definitivo se infecta, por ingestão de larvas de terceiro estágio (L₃) que, poucas horas após a deglutição, penetram na parede do intestino, alcançam o sistema porta hepático, passam pelo fígado e pela veia cava inferior, caindo na circulação pulmonar, até chegarem ao ventrículo direito cardíaco. A partir

desse local, essas larvas migram para os capilares pulmonares, até o lado esquerdo do coração, atingindo a circulação arterial e, assim são, passivamente, dispersadas para as diversas partes do corpo do roedor (Martins et al., 2015; Spratt, 2015).

Por possuírem neurotropismo (Eamsobhana, 2014; Monte et al., 2014), as larvas L₃, uma vez que alcançam o Sistema Nervoso Central (SNC), permanecem, temporariamente, no cérebro, onde crescem e sofrem uma muda, desenvolvendo-se em larvas de quarto estágio (L₄). Depois disso, essas larvas migram para o espaço subaracnoideo, onde passam, mais uma vez, por uma nova muda, tornando-se larvas L₅ (helminto jovem adulto).

Após deixarem o cérebro, os helmintos alcançam as artérias pulmonares, onde maturam sexualmente, copulam, e as fêmeas iniciam a oviposição. Os ovos são carregados, pela corrente sanguínea, até os capilares pulmonares e, após seis dias, rompem-se, liberando larvas de primeiro estágio (L₁). Essas migram até os alvéolos, sobem a árvore bronquial para alcançarem a faringe e, então, serem deglutidas. Ao atingir o trato gastrointestinal, as larvas L₁ são eliminadas, para o ambiente externo, juntos às fezes do hospedeiro definitivo (Kum, 1983; Wang et al., 2008; Spratt, 2015).

O hospedeiro intermediário, no caso, um molusco, pode infectar-se com larvas L₁, por três vias distintas: ingerindo as fezes do roedor, contendo as larvas; pela penetração de larvas em seu tegumento; ou a partir da entrada delas pelo poro respiratório (Carvalho et al., 2012; Thiengo et al., 2013). Dentro do molusco, as larvas L₁ sofrem duas mudas, desenvolvem-se em L₂ (larvas de segundo estágio) e, depois, em L₃ (forma infectante para o hospedeiro definitivo). Essa última pode ser transmitida para hospedeiros paratênicos, ou seja, hospedeiros de transporte, como: planárias terrestres, caranguejos, camarões, sapos, rãs e lagartos, nos quais elas permanecem quiescentes, não sofrendo desenvolvimento dentro desses animais (Wallace e Rosen, 1966; 1967; Slom e Johnson, 2003; Shan, 2011; Moreira et al., 2013; Martins et al., 2015). O roedor que se alimentar de hospedeiros intermediários ou paratênicos, infectados com larvas L₃, se infectará, dando continuidade ao ciclo de *A. cantonensis* (Wang et al., 2008; Oliveira et al., 2015) (Figura 6).

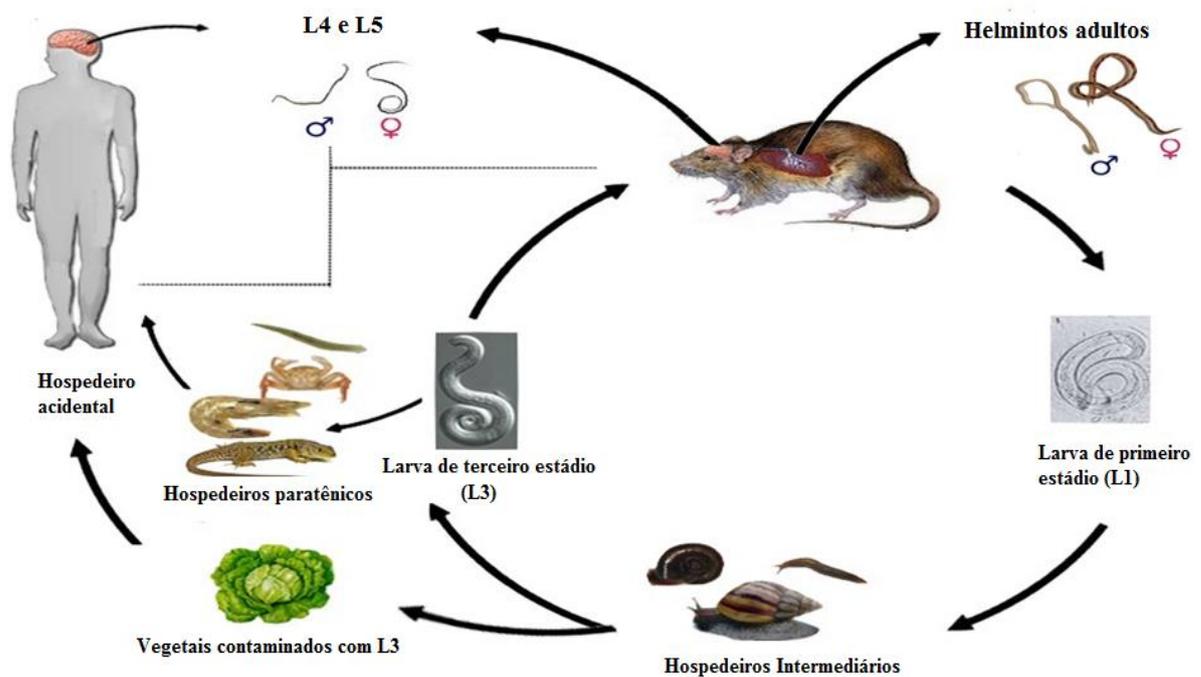


Figura 6: Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis* (Esquema baseado no ciclo do CDC e adaptado por Garcia, 2014).

O homem é considerado um hospedeiro acidental, pois não faz parte do ciclo evolutivo natural de *A. cantonensis*. A infecção ocorre: através da ingestão de hospedeiros intermediários ou paratênicos, crus ou malcozidos, parasitados com larvas L₃; e pela alimentação ou contato com vegetais mal higienizados que contenham muco de moluscos, no qual foram liberadas as larvas infectantes (Wang et al., 1991; Slom et al., 2002; Tsai et al., 2004; Wang et al., 2012).

Após serem ingeridas pelo homem, as larvas L₃ percorrem o mesmo caminho que fariam nos roedores (Wang et al., 2008; Martins et al., 2015), até alcançarem o SNC. Nesse local, sofrem mudanças de estágio larvar até desenvolverem-se no quinto estágio larval (L₅). Porém, devido à intensa reação inflamatória que provocam, grande parte dessas larvas acabam morrendo e, somente em raros casos, elas migram para as artérias pulmonares (Orihel e Ash, 1995; Prociw, 1999; 2000; Sawanyawisuth e Chotmongkol, 2013; Martins et al., 2015). Essa reação inflamatória que ocorre nas meninges, com aporte de células do sistema imunológico, particularmente granulócitos eosinófilos, é denominada meningite (ou meningoencefalite) eosinofílica, que é o principal quadro clínico decorrente dessa zoonose (Wang et al., 2012; Li et al., 2014; Liu et al., 2017a).

1.3.2 Angiostrongilíase cerebral (AC)

A angiostrongilíase cerebral tem *A. cantonensis* como principal agente etiológico e que, por acometer o sistema nervoso central da pessoa infectada, esse nematoide é considerado o maior causador de meningite eosinofílica (ME) no Sudeste Asiático, no Pacífico e nas Ilhas do Caribe (Wang et al., 2012; Martins et al., 2015). A doença foi, primeiramente, reportada, em 1945 (Taiwan) (Beaver e Rosen, 1964) e, desde então, já foram relatados surtos em diversas regiões da Ásia, onde é considerada um problema de saúde pública (Alicata, 1991; Carvalho et al., 2012; Wang et al., 2012).

Atualmente, *A. cantonensis* encontra-se distribuído por diferentes áreas do globo: Estados Unidos, Ilhas do Caribe, alguns países da África, Austrália e América do Sul, incluindo o Brasil (Kliks e Palumbo, 1992; Wang et al., 2012; Morassutti et al., 2014; CDC, 2019a) (Figura 7).



Figura 7: Locais, no mundo, nos quais foi observada a presença do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*: Estados Unidos, Ilhas do Caribe, Brasil, países da África, Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico e Austrália (CDC, 2019b).

1.3.2.1 Angiostrongilíase cerebral no Brasil

Existe o consenso de que o primeiro caso confirmado de meningite eosinofílica, no país, foi reportado em 2006, onde um paciente HIV-positivo (do inglês, *human immunodeficiency vírus*) foi diagnosticado com infecção por *A. cantonensis*, através do teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Morassutti et al., 2014). Até o presente, já foram notificados mais de trinta casos da doença, nas regiões brasileiras nordeste, sudeste e sul

(Caldeira et al., 2007; Garcia et al., 2008; Lima et al., 2009; Thiengo et al., 2010; Espírito-Santo et al., 2013; Cognato et al., 2013).

A extensa gama de espécies de hospedeiros intermediários e a abundância de hospedeiros definitivos, presentes em todo o território brasileiro, contribui para a manutenção do ciclo biológico desse parasito, facilitando sua endemicidade no país (Maldonado Júnior et al., 2010). Diversos estudos têm identificado espécies hospedeiras, como *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 e *Pomacea lineata* Spix, 1827, além dos roedores *R. norvegicus* e *R. rattus*, naturalmente infectados por *A. cantonensis*. Por esse motivo, tal nematoide, em decorrência da sua abundância e ampla distribuição geográfica, levanta a questão de representar um problema de saúde pública no país (Caldeira et al., 2007; Maldonado Júnior et al., 2010; Simões et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Cognato et al., 2013; Thiengo et al., 2013; Morassutti et al., 2014) (Figura 8).



Figura 8: Estados brasileiros (cor cinza) em que foi registrada a presença de *Angiostrongylus cantonensis* em hospedeiros intermediários e definitivos (●) e/ou de casos de Meningite eosinofílica no Brasil (▲): AM – Amazonas; PA – Pará; CE – Ceará; PE – Pernambuco; BA – Bahia; ES – Espírito Santo; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; PR – Paraná; SC – Santa Catarina; RS – Rio Grande do Sul. Nos demais estados (cor branca), até o momento do estudo, não foi identificado hospedeiros infectados ou casos de meningite eosinofílica causada por *A. cantonensis*: MA – Maranhão; PI – Piauí; RN – Rio Grande do Norte; PB – Paraíba; RS – Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; SE – Sergipe; AL – Alagoas; SE – Sergipe; MG – Minas Gerais (Morassutti et al., 2014).

1.3.2.2 Sintomas, diagnóstico, tratamento e prevenção

O principal sintoma da angiostrongilíase cerebral é uma inflamação das meninges decorrente do recrutamento de eosinófilos para o sítio onde o nematódeo encontra-se localizado. Manifestações inespecíficas como: cefaleia, rigidez do pescoço, febre, parestesia, náuseas e vômitos também podem ser observados (Wang et al., 2012). Há, ainda, casos em que o paciente é assintomático –

normalmente na fase aguda da doença, e, após algumas semanas, o indivíduo pode ser capaz de curar-se espontaneamente (Morassutti et al., 2014). Porém, em quadros mais graves – quando há a ingestão de um elevado número de larvas do nematódeo ou o diagnóstico da doença é tardio, pode ocorrer a elevação da pressão intracraniana, resultando em perda de consciência, coma, e, se não tratada, adequadamente, o paciente pode evoluir ao óbito (Wang et al., 2012). Outra manifestação clínica promovida pela infecção por *A. cantonensis* é a angiostrongilíase ocular (Sinawat et al., 2008; Shan, 2011), decorrente da migração das larvas presentes no SNC para os olhos, levando à inflamação do nervo óptico (neurite ocular), lesões permanentes, assim como, perda de visão (Diao et al., 2011; Feng et al., 2013; Morassutti et al., 2014).

Para o diagnóstico da meningite eosinofílica, o exame padrão, quando possível, é a punção lombar do líquido cefalorraquidiano (LCR), no qual verifica-se a ocorrência de pleocitose eosinofílica (número de eosinófilos maior que 10% em relação à contagem total liquorica de leucócitos) (Ramirez-Avila et al., 2009; Sawanyawisuth et al., 2009; Morassutti et al., 2014).

Em casos em que exista a suspeita de meningite eosinofílica, como sintoma da angiostrongilíase cerebral, é de extrema importância a avaliação do histórico clínico do paciente: viagens ou permanência em área endêmica; ingestão de hospedeiros intermediários e paratênicos crus ou malcozidos, ou, ainda de verduras mal higienizadas, que possam estar contaminadas com o muco de moluscos hospedeiros intermediários infectados. Além disso, atualmente, os testes imunológicos: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase chain reaction*) detectam a presença de antígenos de *A. cantonensis* no sangue periférico e no LCR do paciente. Porém, em casos em que há pouca quantidade de amostra, a sensibilidade e especificidade desses testes acabam não sendo confiáveis (Tsai et al., 2001; Wang et al., 2008; Shan, 2011). Em certas situações, verifica-se a presença de larvas, no LCR, porém, tal método se mostra pouco eficaz, já que sua sensibilidade depende da quantidade de amostra disponível para o diagnóstico, podendo resultar em um falso negativo (Wang et al., 2012; Barratt et al., 2016).

Até o momento, não existe tratamento específico para a ME causa por *A. cantonensis*. Geralmente, são administrados corticosteroides para controlar a reação

inflamatória (Chotmongkol et al., 2000; Wang et al., 2012; Morassutti et al., 2014). Em alguns casos, observou-se eficácia na utilização de anti-helmínticos durante o tratamento da ME (Jitpimolmard et al., 2007). Porém, pelo fato desses fármacos promoverem a morte dos parasitos, pode levar ao agravamento da reação inflamatória, agravando o quadro clínico do paciente (Prociv et al., 2000). Chotmongkol et al. (2004) demonstraram que a associação do esteroide Prednisolona com o Albendazol também se mostrou eficaz na diminuição da duração da cefaleia, mas não de forma significativa em relação a pacientes tratados somente com o esteroide (Chotmongkol et al., 2009; Morassutti et al., 2014). A punção lombar do LCR é outro método eficiente para aliviar a cefaleia, uma vez que ele reduz a pressão intracraniana, a qual se eleva por causa da inflamação. Além disso, é recomendado o tratamento de suporte, sendo o paciente mantido hidratado e sob a administração de analgésicos para redução da febre e da dor (Morassutti et al., 2014).

Para prevenir-se contra a infecção por *A. cantonensis*, é sugerido que a população local e pessoas que viajem para áreas endêmicas tenham conhecimento acerca do parasito, sobre as formas de infecção e sobre os sintomas da ME (Wang et al., 2012; Cowie, 2013; Martins et al., 2015).

1.3.3 Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em roedores

Como o próprio conceito remete, o parasitismo representa uma interação ecológica desarmônica, na qual o parasito obtém os recursos para sobrevivência em detrimento do hospedeiro, situação na qual o hospedeiro terá o comprometimento de sua capacidade de sobrevivência e reprodução, podendo ver-se agravado em decorrência da intensidade da infecção e, portanto, vir à óbito (Rey, 2002).

Em relação ao nematoide *A. cantonensis*, tem sido demonstrado que ele também pode provocar efeitos danosos à integridade física de seu hospedeiro definitivo, causando sintomas clínicos como ataxia, tremores e paralisia, muitas vezes decorrentes de alterações fisiológicas (Garcia et al., 2014a; b; Mengying et al., 2017).

1.3.3.1 Alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas

Garcia et al. (2014b), analisando os efeitos da infecção por *A. cantonensis* em *R. norvegicus* (Wistar), demonstraram a ocorrência de alterações em parâmetros hematológicos como o hematócrito (Hct), a contagem de eritrócitos (CDE), a hemoglobina (HGB) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), ao longo de diferentes semanas pós-infecção, indicando um quadro de anemia degenerativa. Além disso, os animais infectados apresentaram alterações significativas na quantidade de plaquetas (trombocitopenia) e no número total de leucócitos e de suas subpopulações (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos), sugerindo intenso processo inflamatório.

A migração de larvas de *A. cantonensis*, pelos órgãos do roedor, também causa danos teciduais, sendo sugeridos por meio de alterações em alguns parâmetros bioquímicos e identificados por técnicas histopatológicas. Garcia et al. (2014a) demonstraram que em diferentes fases da infecção, as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) apresentaram aumento significativo, em ratos Wistar experimentalmente infectados, sugerindo dano hepático e colestase, que foram confirmados a partir de análises histopatológicas do fígado.

A presença dos helmintos adultos, nas artérias pulmonares, também gera dano tecidual, tanto à nível macroscópico – edema, fibrose e necrose, quanto à nível histopatológico, apresentando áreas de infiltrado inflamatório crônico linfocitário (Hévila, 2018).

Por ser um parasito neurotrópico, *A. cantonensis* causa diversas alterações, aos órgãos pertencentes ao complexo do SNC. Mengying et al. (2017), realizaram a histopatologia do cérebro de camundongos BALB/c infectados e observaram que a infecção provocou danos teciduais, com o agrupamento de células inflamatórias, promovendo o espessamento das meninges. Além disso, esses autores sugeriram que tais lesões poderiam causar deficiência do estado cognitivo dos roedores, comprometendo seu aprendizado.

Segundo Garcia et al. (2014a), a infecção por *A. cantonensis*, em *R. norvegicus* (Wistar), promove mudanças no metabolismo glicídico, como o aumento da concentração de glicogênio hepático e hipoglicemia. Nesse mesmo estudo, também foi observado um ganho de massa do fígado, durante a fase crônica da

infecção (4ª e 6ª semanas) que, segundo os autores, pode ter sido consequência do acúmulo de glicogênio nesse órgão.

1.3.3.2 Alterações imunológicas

Como em outras infecções helmínticas, a principal resposta imunológica produzida no curso do parasitismo por *A. cantonensis*, nos hospedeiros vertebrados, é a do tipo T-*helper* 2 (T_H2). Essa reação induz a proliferação de diversos tipos celulares, incluindo os eosinófilos, que aumentam em quantidade, no LCR, culminando na principal manifestação clínica da angiostrongilíase cerebral, a meningite eosinofílica (Mesquita Júnior et al., 2010; Gosnell e Kramer, 2013). Alguns estudos já demonstraram que essas células têm envolvimento importante na morte de larvas de *A. cantonensis*, presentes no SNC, o que resulta no processo inflamatório característico da infecção (Yoshimura et al., 1988; Chih-Cheng et al., 2007; Wen-Yuan et al., 2013; Gosnell e Kramer, 2013).

A eosinofilia evidente, observada no LCR e no sangue periférico de hospedeiros infectados por *A. cantonensis*, resulta de uma reação dependente de linfócitos T_H2 (Sugaya e Yoshimura, 1988). Isso se deve ao fato de que essas células produzem a interleucina-5 (IL-5), que está diretamente relacionada à ativação e expansão dos eosinófilos (Sugaya et al., 1997a; Aoki et al., 1998; Gosnell e Kramer, 2013). Além disso, já foi demonstrado que os linfócitos T_H2 aumentam, significativamente, em camundongos infectados por *A. cantonensis*, tendo papel na estimulação de linfócitos B produtoras de anticorpos que contribuem na eliminação dos helmintos e, conseqüentemente, promovem a diminuição da carga parasitária, nesses animais (Lee et al., 1996).

Também tem sido demonstrado o papel de linfócitos T CD8+ (citotóxicos), na imunidade protetora de camundongos infectados por *A. cantonensis*. Aoki et al. (1998) observaram que camundongos BALB/c, que tiveram essas células bloqueadas por anticorpos anti-CD8+, apresentaram um menor número de eosinófilos observada no LCR e, portanto, uma diminuição da pleocitose. Além disso, esse bloqueio resultou num aumento da carga parasitária, desses animais, após 30 dias de infecção. Através desses resultados, eles concluíram que os linfócitos T CD8+ podem desempenhar proteção imunológica na fase mais avançada da infecção.

1.4 Aplicação da bioquímica clínica na detecção de alterações hepáticas e renais

A bioquímica clínica, também conhecida como patologia clínica ou química clínica, é a ciência utilizada na medicina laboratorial, cujo objetivo é auxiliar no diagnóstico e detecção de patologias, através da análise de variados exames. Geralmente, as amostras utilizadas são a urina e o sangue, devido a sua fácil obtenção. Nelas, são mensurados os níveis de diversos componentes que possam sugerir alguma alteração patológica ou disfunção de um determinado órgão (Gaw et al., 2015).

1.4.1 Teste de função hepática

O fígado desempenha funções variadas que são essenciais ao funcionamento do organismo: armazena vitaminas e componentes energéticos, como por exemplo a glicose – sob a forma do polissacarídeo glicogênio; possui capacidade sintetizadora, produzindo sais biliares, colesterol e proteínas (Ex: hormônios e fatores de coagulação); participa das vias metabólicas de carboidratos, de proteínas e de lipídeos; faz a excreção, junto aos rins, de produtos derivados do metabolismo e de substâncias tóxicas; e possui, também, enzimas que promovem a desaminação de aminoácidos, denominadas aminotransferases (Schinoni, 2006; Crook, 2012).

Por possuírem função fisiológica central, alguns componentes produzidos no fígado, são aplicados, na bioquímica clínica, como marcadores para os “testes de função hepática”. Seus níveis são determinados no plasma sanguíneo e são sugestivos no diagnóstico de algumas hepatopatias (Crook, 2012; Gaw et al., 2015; Das et al., 2018).

1.4.1.1 Marcadores para dano hepatocelular e colestase

A alanina aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2) – também denominada transaminase glutâmico pirúvica (TGP), e a aspartato aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1.), conhecida como transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) são enzimas utilizadas como marcadores de lesão dos hepatócitos, uma vez que, em condições normais, elas encontram-se, predominantemente, no interior dessas células. O nível aumentado de AST e ALT, no plasma, indicam dano de membranas mitocondrial

e/ou citoplasmática, respectivamente, e sugere hepatite, hepatotoxicidade e isquemia (Crook, 2012; Telega, 2018a). A AST pode, ainda, ser encontrada em outros órgãos do organismo, particularmente nos músculos esquelético e cardíaco, servindo como um indicador para miosite e infarto do miocárdio (Crook, 2012; Gaw et al., 2015).

A fosfatase alcalina (FA) (EC 3.1.3.1), uma enzima presente na camada externa de membranas celulares, é utilizada, entre outras atribuições, como marcador para a identificação de hepatopatias e obstrução do fluxo biliar no fígado (colestase). Ela também pode ser encontrada em outros órgãos como nos ossos (nos osteoblastos), no intestino, nos rins e na placenta, e sua função está relacionada à remoção de grupamentos fosfatos de diferentes moléculas (Kaneko, 1989; Jorge et al., 2014). No fígado, essa enzima é sintetizada nos canalículos biliares – estruturas localizadas entre os hepatócitos e que permitem a passagem de bile até os ductos biliares. Quando esse fluido permanece bloqueado, nesses canais, ocorre o acúmulo da FA e, através das junções comunicantes das células, ela é liberada para o sangue, elevando seus níveis no plasma (Crook, 2012).

1.4.1.2 Avaliação de capacidade excretora e metabólica do fígado

A dosagem dos níveis séricos de bilirrubina tem sido preconizada como: indicador da capacidade hepática em transportar ânions orgânicos e na metabolização de drogas (Thapa e Walia, 2007; Crook, 2012). Durante a degradação de eritrócitos senescentes, ocorre a liberação de hemoglobina que é dividida em globina e grupo heme. Esse grupo prostético, quando separado do ferro (Fe^{+}) que carrega, é convertido em bilirrubina (Corless et al., 1983). Tal pigmento, uma vez ligado à albumina, é chamado de bilirrubina não conjugada ou indireta (forma menos solúvel em água) que, dessa forma, é carregada até o fígado. Nesse órgão, ela é convertida em bilirrubina conjugada ou direta (molécula polar), para sua posterior excreção. Em exames laboratoriais, essas formas podem ser dosadas, separadamente, ou em conjunto (bilirrubina total – BT), podendo indicar, em casos de hiperbilirrubinemia, doença parenquimatosa hepática e obstrução das vias biliares. Já, quando seus níveis se apresentam baixos no plasma, indicam efeitos tóxicos de determinadas drogas (Thapa e Walia, 2007).

1.4.2 Albumina como marcador de análises bioquímicas

A albumina é uma proteína sintetizada, exclusivamente, no fígado e constitui mais de 50% das proteínas totais presentes no plasma sanguíneo (Santos et al., 2004; Telega, 2018b). Ela promove a manutenção da pressão osmótica (também conhecida como pressão coloidosmótica) e do volume sanguíneo; realiza o transporte de substâncias circulantes presentes no sangue (bilirrubina, ácidos graxos, íons de metal, colesterol, componentes farmacológicos, entre outros) e possui atividade antioxidante, uma vez que essa proteína se liga a espécies reativas de oxigênio e a radicais peroxinitritos (ONOO-) (Anraku et al., 2001; Evans, 2002; Santos et al., 2004).

Na bioquímica clínica, a dosagem de albumina sérica auxilia na detecção de alterações relacionadas ao fígado como o comprometimento da capacidade de síntese proteica e da função hepática, hepatopatias crônicas (Ex: cirrose) e ascite. Além disso, na ausência de doenças relacionadas a tal órgão, a hipoalbuminemia pode sugerir problemas renais (síndrome nefrótica ou nefrose), gastrointestinais (Enteropatia perdedora de proteínas) ou parasitoses (Rowlands, 1980; Gonzalez et al., 2000; Thapa e Walia, 2007; Brock et al., 2016; Telega, 2018b).

1.4.3 Teste de função renal

Os rins são órgãos com função necessária à manutenção da homeostase do organismo. Eles podem atuar como: (1) reguladores – promovendo o equilíbrio ácido-básico e eletrolítico, além de controlar a osmolaridade e o volume de líquidos corporais; (2) órgãos endócrinos – produzindo e secretando uma série de hormônios determinantes para o funcionamento de diferentes tecidos; e (3) órgãos excretores – removendo, do sangue, substâncias externas ao organismo (Ex: fármacos e pesticidas), ou metabólitos (ureia) (Sodré et al., 2007; Berne e Levy, 2009; Guyton e Hall, 2011).

A perda de função ou patologias renais resulta em desequilíbrio da concentração de metabólitos, no plasma sanguíneo (Ettinger e Feldman, 1997; Borges et al., 2008). Entre eles, existem substâncias nitrogenadas não-proteicas, como a ureia, a creatinina e o ácido úrico, que são utilizadas como biomarcadores, em testes de função renal, com a finalidade de se detectar e diagnosticar alteração do funcionamento fisiológico (Sodré et al., 2007).

A ureia é um metabólito produzido a partir de amônia, oriunda do catabolismo de proteínas presentes em tecidos e em alimentos (Abensur, 2011). Sintetizada, exclusivamente no fígado, a ureia é posteriormente transportada até os rins, a partir do sistema vascular, difundindo-se, de forma passiva, para os compartimentos líquidos do corpo (Sodré et al., 2007; Borges et al., 2008). Ao chegar aos rins, é filtrada nos glomérulos e parte é reabsorvida nos túbulos renais, enquanto o restante é excretado na urina (Borges et al., 2008; Gowda et al., 2009).

Na bioquímica clínica, a ureia é amplamente utilizada para avaliação da capacidade funcional dos rins, e quando seus níveis séricos estão alterados, são indicativos de insuficiência renal sintomática (Motta, 2009; Ramos e Marini, 2014). Porém, ainda que importante, esse biomarcador possui limitações, já que sua concentração pode variar, dependendo de diversos fatores não renais (Ex: sangramento gastrointestinal, ingestão excessiva de proteínas, desidratação e inanição profunda, entre outros) (Abensur, 2011). Por essa razão, sua medição é realizada em conjunto com a creatinina, pois, essa última, permanece praticamente constante, não possuindo interferência de fatores externos aos rins (exceto em ingestão excessiva de carne) e, portanto, permitindo a correção dos valores observados para a ureia (Willard et al., 1993; Gonzalez et al., 2000; Pöpl et al., 2004).

A creatinina é um produto metabólico gerado a partir da degradação da creatina e da fosfocreatina, presentes nos músculos (Gonzalez et al., 2000; Abensur, 2011). A creatina, em seu estado livre, é transformada, de forma espontânea e irreversível, em creatinina e, essa, por sua vez, é, então, filtrada nos glomérulos renais e excretada, através da urina (Fernandes e Larsson, 2000; Sodré et al., 2007; Borges et al., 2008). Quando os seus níveis séricos se elevam, indicam redução na excreção renal e alteração na taxa de filtração glomerular (Jacobs, 1996; Ramos e Marini, 2014) e, uma vez diminuídos, sugerem glomerulonefrite, necrose tubular aguda e desidratação (Larsson et al., 1997; Bush, 2004; Gowda et al., 2009).

Além da ureia e da creatinina, o ácido úrico também é utilizado para detectar disfunções renais. Esse metabólito é um produto da degradação de purinas (adenina e guanina) no fígado e, geralmente, sua excreção é feita pelos rins. Portanto, quando seus níveis se encontram aumentados, sugerem redução da taxa de filtração glomerular (Basten, 2011; Marion et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O uso de agrotóxicos tem se mostrado um fator preocupante para a saúde pública, já que podem contaminar o solo, a água e os alimentos, levando a consequências negativas em relação à saúde humana, dos animais e ao ambiente.

No Brasil, o herbicida glifosato é o componente químico mais utilizado, sob a formulação comercial Roundup®, diante da alegação de apresentar características de amplo espectro de ação sobre ervas daninhas, tolerância por culturas vegetais geneticamente modificadas (OGM) e por apresentarem baixa toxicidade à saúde humana e animal. Entretanto, herbicidas à base de glifosato vêm sendo alvo de estudos, e se mostrando prejudicial à saúde desses organismos não-alvo.

Postulamos que a exposição à formulação comercial à base de Glifosato, a Roundup®, possa influenciar a relação entre um helminto parasito e seu hospedeiro, uma vez que seus efeitos resultam em: (1) mudanças hematológicas, bioquímicas e imunológicas, no hospedeiro definitivo, tornando-o susceptível à infecção e, conseqüentemente, agravando os impactos que o parasito exerce sobre tal hospedeiro; e (2) alterações em parâmetros parasitológicos do helminto, ou seja, infectividade, fertilidade, entre outros, podendo interferir em sua dinâmica de transmissão.

Para testar essa hipótese, optamos por mensurar as variáveis, indicativas de alterações fisiológicas e parasitológicas, utilizando o modelo *A. cantonensis*/*R. norvegicus*. Esse roedor tem sido amplamente utilizado como modelo experimental na avaliação da toxicidade por agrotóxicos. Já o nematódeo *A. cantonensis* é um dos principais agentes etiológicos da ME, zoonose registrada no Brasil em meados da década de 2000, e atualmente considerada emergente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição ao herbicida Roundup® sobre a hematologia e bioquímica sanguínea, além de parâmetros parasitários do hospedeiro definitivo, *R. norvegicus*, infectado por *A. cantonensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar alterações hematológicas em *R. norvegicus*, em decorrência da administração do herbicida em concomitância ou não de infecção por *A. cantonensis*;
- Avaliar os efeitos do herbicida e/ou da infecção com *A. cantonensis* sobre os perfis bioquímicos hepático e renal, de *R. norvegicus*, através de marcadores bioquímicos (ALT, AST, FA, albumina, ureia, ácido úrico, bilirrubina total, proteínas totais e creatinina);
- Determinar o efeito da administração do herbicida sobre o período pré-patente do nematódeo; número total de helmintos adultos e o padrão de eliminação de larvas L₁, por meio de análise coproparasitológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Herbicida utilizado e tratamento dos roedores

O herbicida utilizado, para os ensaios, contém glifosato ($C_3H_8NO_5P$), como ingrediente ativo, de formulação comercial Roundup® (480g/L sal de Isopropilamina de N(fosfometil) glicina; 360 g/L equivalente ácido N(fosfometil) glicina (Monsanto Company, St Louis MO, USA).

A concentração do herbicida, selecionada para os experimentos, foi a de 500 mg/kg do animal que, apesar de ser considerada uma concentração que não apresenta efeitos adversos observáveis em ratos (Williams et al., 2000), já promoveu alterações hematológicas e redução de massa corporal em *R. norvegicus* (Jasper et al., 2012). Para alcançar essa concentração, o Roundup® foi diluído em água destilada e a sua administração foi realizada, diariamente, dentro de um período de 15 dias, através de gavagem (Jasper et al., 2012).

4.2 Grupos experimentais

Foram constituídos cinco grupos contendo entre 10 e 20 fêmeas de *R. norvegicus* (Wistar), como descritos abaixo (Figura 9). Todos os animais utilizados nos ensaios foram alimentados com ração Nuvilab CR-1, apropriada para roedores, e água filtrada *ad libitum*. Os ratos Wistar foram mantidos no infectório do Pavilhão Lauro Travassos (IOC/FIOCRUZ), entre os meses de agosto e outubro de 2018 e de 2019, sob condições apropriadas de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (12/12h claro/escuro) (Garcia et al., 2012) (CEUA/L-004/2019).

- **Controle limpo [CL] (n = 10):** grupo de animais que receberam somente água desclorada, durante todo o experimento, até a sua eutanásia.
- **Controles de infecção [CIs] (n = 20):** formados por animais infectados, experimentalmente, com 50 larvas L₃ de *A. cantonensis* por roedor. Após 15 dias de infecção, 10 animais foram eutanasiados, correspondendo ao subgrupo controle de infecção aguda (CIA). Ao 50º dia p.i, o restante dos

animais foi submetido à eutanásia, formando o subgrupo controle de infecção crônica (CIC). Esses subgrupos foram constituídos com o objetivo de atuarem como controles do efeito da exposição ao herbicida Roundup® sobre a infecção por *A. cantonensis*.

- **Controles expostos ao herbicida [CEH] (n = 20):** compostos por ratos oralmente expostos somente ao herbicida Roundup®, por 15 dias consecutivos. Dez animais foram eutanasiados no dia seguinte ao último dia da exposição (16º dia), com o objetivo de verificar o efeito contínuo que o herbicida pode provocar e, portanto, constituindo, o subgrupo controle exposto ao herbicida de efeito contínuo (CEHC). Passados 50 dias após o final da administração do herbicida, foi realizada a eutanásia do restante dos animais, formando o subgrupo controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT), cuja finalidade foi observar se os efeitos da exposição perduravam semanas após a sua administração.
- **Grupo infectado e depois exposto [GIE] (n = 10):** composto por animais que foram, primeiramente, infectados, via oral, com 50 larvas L₃ de *A. cantonensis* por roedor e, a partir do 16º dia p.i, foram expostos, oralmente, ao herbicida Roundup®, por 15 dias consecutivos. A eutanásia desses animais foi realizada no 50º dia p.i. Esse grupo foi selecionado para investigar se a exposição poderia influenciar, de modo sinérgico ou antagônico, o curso da infecção.
- **Grupo exposto e, depois, infectado [GEI] (n = 10):** constitui o grupo de animais que foram primeiramente expostos, via oral, ao herbicida Roundup®, por 15 dias consecutivos. No dia seguinte ao último dia de exposição, esses roedores foram infectados, oralmente, por larvas 50 L₃ de *A. cantonensis* por roedor. Esse grupo foi criado com o objetivo de avaliar se a exposição prévia ao herbicida teria algum efeito que pudesse alterar a dinâmica de infecção de *A. cantonensis*. A eutanásia desses animais foi realizada no 50º dia p.i.

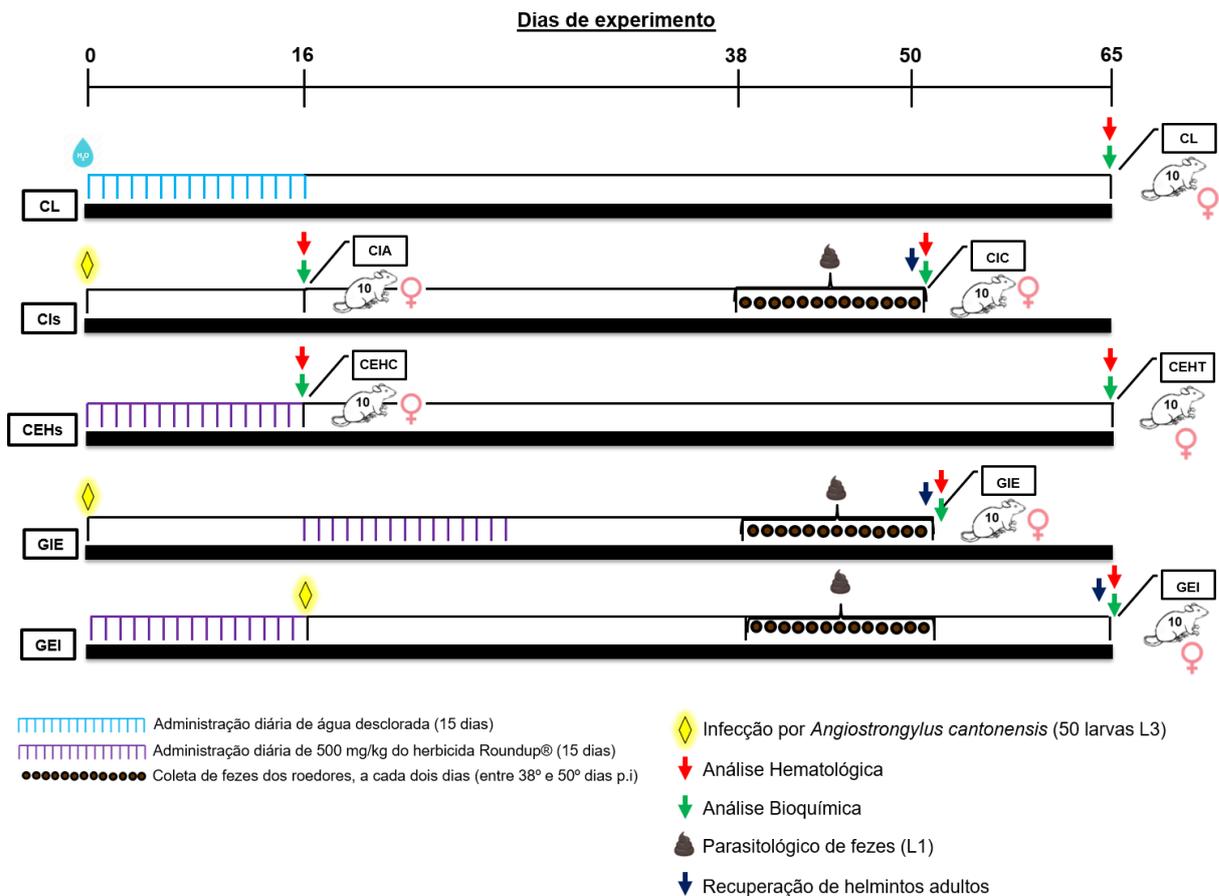


Figura 9: Delineamento experimental: [CL]: Controle limpo; [CI] – Controles de infecção; [CIA] – Controle de infecção aguda; [CIC] – Controle de infecção crônica; [CEH] – Controles expostos ao Herbicida; [CEHC] – Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo; [CEHT] – Controle exposto ao herbicida de efeito tardio; [GIE] – Grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida; [GEI] – Grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado; L₃ = Terceiro estágio larval de *Angiostrongylus cantonensis*; p.i. = pós-infecção. (Esquema elaborado pela autora, 2020).

4.3 Helminto utilizado e manutenção experimental de seu ciclo biológico

A linhagem de *A. cantonensis* utilizada no presente trabalho, foi isolada de moluscos *A. fulica* capturados no município São Gonçalo, no estado do Rio de Janeiro (22°49'37"S43°03'14"W), em 2011. Desde então, o ciclo biológico desse nematoide vem sendo mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (IOC/FIOCRUZ), utilizando-se espécimes de *R. norvegicus* (Wistar), como hospedeiros definitivos e de moluscos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), como hospedeiros intermediários (Garcia et al., 2014b) (CEUA/L-004/2019).

4.4 Recuperação de larvas L₃ e infecção dos roedores

Para a obtenção de larvas L₃ de *A. cantonensis*, exemplares de *B. glabrata*, previamente infectados com, aproximadamente, 1.200 larvas L₁, tiveram suas conchas removidas e suas partes moles maceradas. As amostras foram submetidas à técnica de sedimentação de Baermann e Moraes (Hendrix e Robinson, 2012), sendo deixadas em repouso, *overnight* (Figura 10), para a liberação das larvas L₃ do tecido do molusco. No dia seguinte, elas foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos, e em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram homogeneizadas em vórtex. A quantificação das larvas L₃ foi realizada utilizando-se um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi sv6) (Garcia et al., 2014b).

Cada espécime de *R. norvegicus*, dos grupos CIA, CIC, GIE e GEI, foi inoculado, experimentalmente, com 50 larvas L₃ de *A. cantonensis*, via orogástrica. O número de larvas L₃ utilizado na infecção foi escolhido seguindo o critério de ser uma quantidade não letal aos animais (Liu et al., 2017a).



Figura 10: Aparelho de Baermann e Moraes com amostras de fezes, de *Rattus norvegicus* infectados, para obtenção de larvas L₁ (Acervo pessoal, 2019).

4.5 Eutanásia dos roedores

Os animais, de todos os grupos, foram eutanasiados por superdosagem de anestésico. Nesse processo, cada animal foi imobilizado e, utilizando-se agulhas de tamanho 13 x 0,38 mm, acopladas a seringas de 1 ml, foram injetados os pré-anestésicos Cloridrato de Ketamina 200 mg/kg associado a 10 mg/kg de Cloridrato de Xilazina e o anestésico Pentobarbital sódico 250 mg/kg, de forma intramuscular, na região externa do músculo quadríceps femoral. Este procedimento foi realizado no infectório do Pavilhão Lauro Travassos – FIOCRUZ (CEUA/L-004/2019).

4.6 Pesagem dos órgãos

Para saber a concentração correta dos anestésicos, os animais, de cada grupo, foram pesados (massa corporal) e, após a eutanásia, foi realizada a necropsia, para retirada e pesagem do fígado, baço e rins. Os pulmões e o coração, dos animais com infecção crônica (grupos CIC, GIE e GEI) também foram recolhidos, para posterior obtenção de helmintos adultos presentes nas artérias pulmonares e no ventrículo direito cardíaco.

4.7 Análises hematológicas e bioquímicas

O sangue total, de cada um dos animais, foi coletado através de punção cardíaca, logo após a eutanásia. Para o armazenamento das amostras hematológicas, foram utilizados microtubos (500 µl, tampa roxa; VACUPLAST®) contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA K₃), jateado em suas paredes, para preservar a morfologia das células. Para as análises bioquímicas, o sangue foi acondicionado em microtubos (500 µl, tampa amarela; VACUPLAST®) contendo ativador de coágulo e gel separador, para acelerar o processo de coagulação sanguínea, proporcionando um maior volume amostral, para a posterior avaliação.

Para as análises hematológicas, as amostras foram avaliadas no analisador automatizado hematológico Poch 100 – iV DIFF (Sysmex, Kobe, Japão), de uso veterinário, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ).

Foram realizadas a: contagem de eritrócitos (CDE) ($10^6/\text{mm}^3$); dosagem da hemoglobina (HGB) (g/dL); avaliação do hematócrito (Hct) (%) e do índice hematimétrico (Volume Corpuscular Médio (VCM) (fm^3); dosagem de hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL)), além da contagem de plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e do número total de leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$). As diferentes subpopulações leucocitárias do sangue foram identificadas através da análise em extensão sanguínea em lâminas (duas por roedor). Para o preparo das lâminas, foi utilizado o kit comercial Panótico Rápido (Laborclin®), que consiste em duas etapas: (1) fixação do material com o composto triarilmetano e (2) coloração com dois corantes distintos: um ácido contendo xanteno (cora hemoglobina, evidenciando as hemácias) e um básico contendo tiazina (cora núcleo/DNA das células). As lâminas foram submersas, mantendo um movimento vertical contínuo de cima para baixo, por 5 segundos, em cada uma das três soluções. Após esse processo, as lâminas foram lavadas com água deionizada e, posteriormente à secagem, foram lidas sob microscópio óptico Nikon® Eclipse (Modelo E4537).

O enfoque das análises bioquímicas foi avaliar se a infecção, a exposição ao herbicida Roundup® e/ou a associação desses dois agentes poderiam afetar os rins e/ou o fígado dos roedores. Para isso, o sangue coletado foi analisado no equipamento de bioquímica seca chamado Vitros 250 (Ortho clinical – Johnson e Jonhson), do ICTB (FIOCRUZ). Ao que diz respeito aos rins, foram medidas as concentrações séricas de ureia *BUN* (*Blood urea nitrogen*), ácido úrico e creatinina. Já para o fígado, foram avaliados: biomarcadores de função hepática – enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA); os níveis séricos de bilirrubina total (BT) e das proteínas totais, incluindo a albumina; e a glicemia. A concentração de glicogênio hepático (mg de glicose/g de tecido) também foi dosada e, para isso, foi retirado 1 g de tecido, do lóbulo maior do fígado, de cada roedor. A extração foi realizada de acordo com Pinheiro e Gomes (1994), sendo determinada pela técnica de Sumner (1924) (Pinheiro e Amato, 1994), utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5 DNS), no Laboratório de Biofísica, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ.

4.8 Avaliação da carga parasitária

Helminthos adultos foram recuperados através da necropsia das artérias pulmonares e do coração dos animais, dos grupos CIC, GIE e GEI. Os parasitos foram lavados em solução Locke a 0,9%, para a retirada de resíduo tecidual, proveniente dos roedores e quantificados, diferenciando-os entre machos e fêmeas.

4.9 Avaliação coproparasitológica de *Rattus norvegicus* infectado por *Angiostrongylus cantonensis*

Para definir o período pré-patente da infecção, os animais dos grupos de infecção crônica (CIC, GIE e GEI) tiveram suas fezes coletadas (1 g por animal), a cada dois dias, pela manhã, individualmente, entre os períodos de 38^o e 50^o dias pós-infecção. As amostras foram submetidas, separadamente, ao método de sedimentação de Baermann e Moraes, que se baseia no termo-hidrotropismo positivo das larvas L₁, utilizando água desclorada previamente aquecida a 40^o C (Hendrix e Robinson, 2012). As larvas L₁ recuperadas, presentes em cada amostra, foram quantificadas (Larvas L₁ por 1g de fezes), utilizando um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV6) (Garcia et al., 2014b).

4.10 Análises estatísticas

Para investigar as significâncias das diferenças entre os grupos, foram utilizados: a análise de variância simples (*One-way analysis of variance* – ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a normalidade dos dados. Já os testes Tukey-Kramer e Dunn's *post hoc* foram aplicados para a comparação entre as médias dos grupos estudados. O *software* utilizado para essas análises foi o Past 3.25 (Hammer et al., 2001) e os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos (Garcia et al., 2011).

Para a avaliação da carga parasitária de larvas L₁, foram analisados: o número total de larvas liberadas por cada roedor, de cada grupo e, também, a quantidade de larvas L₁ produzidas por cada fêmea, de cada espécime dos grupos selecionados. O objetivo dessas análises foi verificar se o herbicida pode ou não

influenciar na fertilidade das fêmeas e, conseqüentemente, interferir no ciclo de *A. cantonensis*.

Em relação à quantidade de helmintos adultos, foi verificada diferença significativa, entre os grupos, no que diz respeito ao total de machos e de fêmeas recuperados nos roedores.

4.11 Aspectos éticos

Todos os procedimentos, que envolveram o uso de animais de laboratório, estavam de acordo com a licença de nº L-004/2019, concedida pela Comissão de Ética do Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC) – FIOCRUZ.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Rattus norvegicus*

5.1.1 Pesagem dos órgãos

A massa de todos os órgãos analisados foi maior para o grupo CIC, porém apenas a massa do baço demonstrou aumento significativo, quando comparado aos dos animais dos grupos CL ($p=0,0002$) e CIA ($p=0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, em gramas (g), de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente).

Massa (g)	Grupos experimentais		
	CL	CIA	CIC
Fígado	10 ± 1 ^a	9 ± 1 ^a	11 ± 2 ^a
Baço	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	2 ± 0 ^b ↑
Rins	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a
Corporal	265 ± 27 ^a	242 ± 18 ^a	253 ± 16 ^a

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, significam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

A seta ↑ indica aumento, estatisticamente significativo, do valor do grupo CIC, em comparação ao do grupo CL.

5.1.2 Análises hematológicas

Como pode ser observado na Tabela 2, o grupo CIC apresentou declínio na contagem de eritrócitos (CDE) ($p=0,03$), quando comparado ao grupo CIA e na concentração da hemoglobina (HGB) ($p=0,01$), quando comparado aos grupos CL e CIA. Ocorreu a diminuição significativa no hematócrito (Hct) ($p=0,01$) e no volume corpuscular médio (VCM) ($p=0,01$), do grupo CIC em relação ao grupo CL. A infecção crônica (CIC) também promoveu trombocitopenia nos roedores, quando comparados aos dos grupos CL ($p=0,0001$) e CIA ($p=0,0001$). Não foram

observadas alterações significativas, entre os grupos, na hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente).

Parâmetros	Grupos experimentais		
	CL	CIA	CIC
CDE ($10^6/\text{mm}^3$)	8 ± 1^a	8 ± 0^a	$8 \pm 0^b \downarrow$
HGB (g/dL)	16 ± 1^a	16 ± 1^a	$14 \pm 1^b \downarrow$
Hct (%)	47 ± 4^a	$46 \pm 4^{a,b}$	$43 \pm 1^b \downarrow$
VCM (fm^3)	58 ± 1^a	$57 \pm 2^{a,b}$	$56 \pm 1^b \downarrow$
HCM (pg)	19 ± 0^a	19 ± 1^a	19 ± 1^a
CHCM (g/dL)	33 ± 0^a	34 ± 0^a	33 ± 1^a
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	864 ± 55^a	923 ± 55^a	$590 \pm 69^b \downarrow$

CDE = contagem de eritrócitos; HGB = hemoglobina; Hct = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

^{a,b} Letras distintas, na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A seta \downarrow indica diminuição, estatisticamente significativa, dos valores dos grupos CIA e CIC, em comparação aos do grupo CL.

Quando comparada aos grupos CL e CIA, a infecção crônica (CIC) promoveu leucocitose ($p=0,001$, para ambos), eosinofilia ($p=0,001$ e $p=0,04$, respectivamente), neutrofilia (segmentados – S) ($p=0,02$ e $p=0,0004$, respectivamente) e linfocitose ($p=0,02$, para ambos). Não foram observadas alterações significativas no número de basófilos, neutrófilos (bastonetes – B) e de monócitos, em nenhum dos grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente).

Parâmetros (10 ³ /mm ³)	Grupos experimentais		
	CL	CIA	CIC
Leucócitos	5 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	9 ± 3 ^b ↑
Basófilos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Eosinófilos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	1 ± 2 ^b ↑
Neutrófilos (B)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Neutrófilos (S)	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	2 ± 1 ^b ↑
Linfócitos	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	6 ± 2 ^b ↑
Monócitos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Neutrófilos (B) = Bastonetes; Neutrófilos (S) = Segmentados.

^{a,b} Letras distintas, na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A seta ↑ indica aumento, estatisticamente significativo, dos valores do grupo CIC, em comparação aos do grupo CL.

5.1.3 Análises bioquímicas

Nas figuras 11A e 11B pode ser observado o aumento na atividade das enzimas AST e FA, no plasma sanguíneo dos animais infectados cronicamente por *A. cantonensis* (grupo CIC), quando comparados aos dos grupos CL ($p=0,0001$ e $p=0,01$, respectivamente) e CIA ($p=0,0001$ e $p=0,004$). Houve, também, aumento na atividade da enzima ALT, nos animais infectados (grupos CIA e CIC), em relação aos do grupo CL ($p=0,01$ e $p=0,0001$, respectivamente), além de diferença significativa entre as infecções aguda (CIA) e crônica (CIC) ($p=0,0001$), quando comparados entre si (Figura 11C). A concentração da bilirrubina total elevou-se, no plasma sanguíneo de roedores dos grupos CIA e CIC, quando comparados àqueles do grupo CL ($p=0,01$) (Figura 11D).

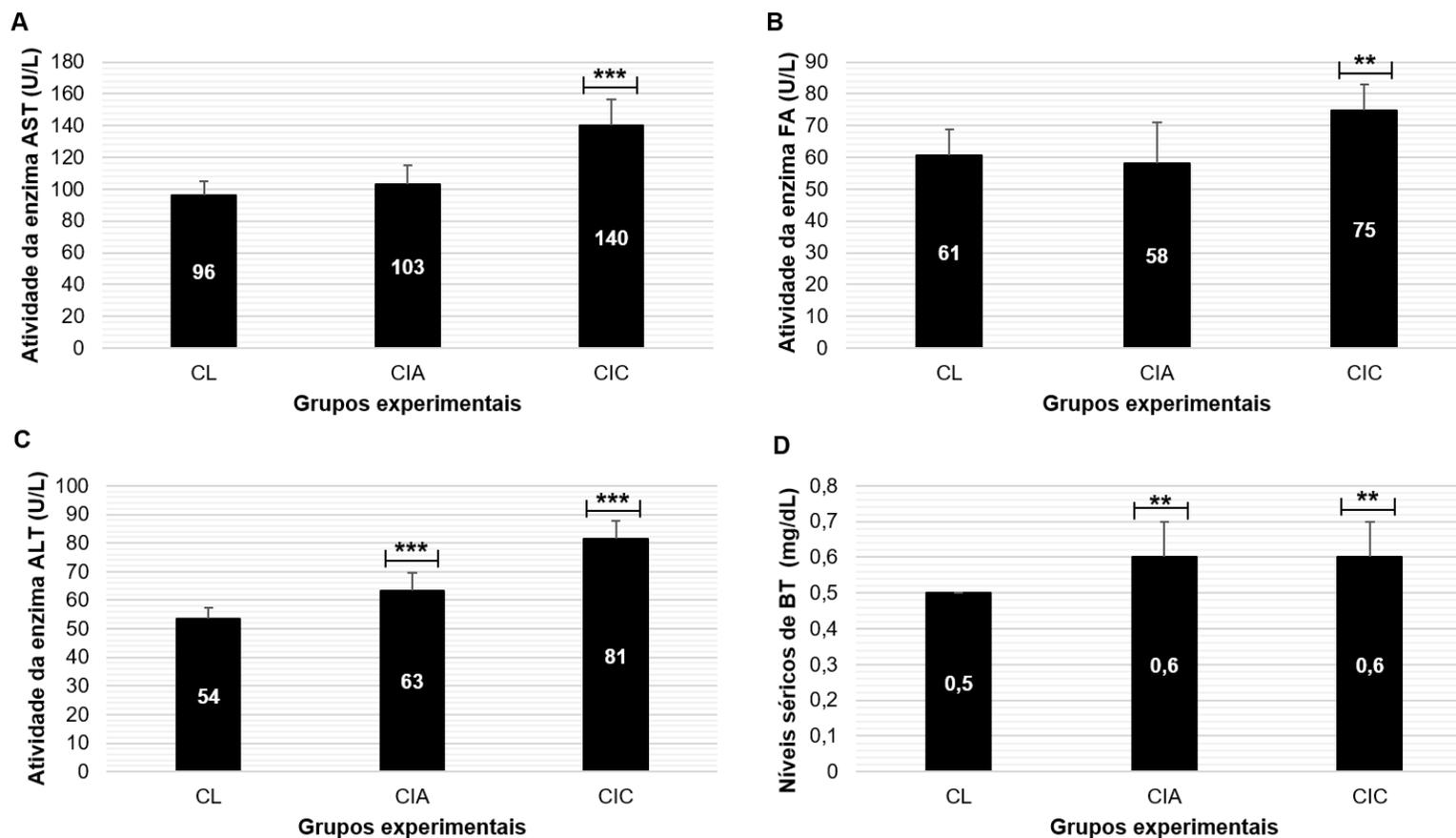


Figura 11: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores para função hepática: A – aspartato aminotransferase (AST); B – fosfatase alcalina (FA); C – alanina aminotransferase (ALT); D – bilirrubina Total (BT). Grupos: Controle limpo (CL), Controle de infecção aguda (CIA) e Controle de infecção crônica (CIC). Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante); ** ($p=0,001$ a $0,01$ – Muito significativa); *** ($p<0,001$ – Extremamente significativa).

O metabolismo de carboidratos foi influenciado pela infecção por *A. cantonensis*, tendo sido constatada hipoglicemia no grupo CIC, em relação aos grupos CL ($p=0,03$) e CIA ($p=0,02$) e aumento do conteúdo de glicogênio hepático no grupo CIA, quando comparado aos grupos CL ($p=0,01$) e CIC ($p=0,001$). Foi observada também elevação dos níveis séricos das proteínas totais, nos roedores com infecção crônica (CIC), em comparação aos dos grupos CL ($p=0,0001$) e CIA ($p=0,002$) (Tabela 4).

Os parâmetros referentes aos testes de função renal – ureia, ácido úrico e creatinina, não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos grupos avaliados, assim como ocorreu com a dosagem de albumina sérica (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente).

Parâmetros (Bioquímica)	Grupos experimentais		
	CL	CIA	CIC
Glicose (mg/dL)	264 ± 25 ^a	268 ± 41 ^a	222 ± 29 ^b ↓
Glico. H. (mg/g de tecido)	4 ± 1 ^a	6 ± 1 ^b ↑	3 ± 1 ^a
Proteínas totais (g/dL)	6 ± 1 ^a	7 ± 1 ^a	8 ± 1 ^b ↑
Albumina (g/dL)	4 ± 0 ^a	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a
Ureia <i>BUN</i> (mg/dL)	43 ± 4 ^a	40 ± 4 ^a	44 ± 6 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	3 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a	4 ± 2 ^a
Creatinina (mg/dL)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Ureia *BUN* = *Blood Urea Nitrogen*; Glico. H = Glicogênio Hepático.

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIA e/ou CIC, em comparação aos do grupo CL.

5.2 Efeitos da exposição ao herbicida Roundup®

5.2.1 Pesagem dos órgãos

Houve diminuição da massa corporal dos animais expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT), quando comparados aos do controle limpo (CL)

($p=0,04$, para ambos). As massas do fígado, dos rins e do baço não apresentaram diferença significativa, em nenhum dos grupos analisados (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Massa (g)	Grupos experimentais		
	CL	CEHC	CEHT
Fígado	10 ± 1 ^a	11 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a
Baço	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a
Rins	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a
Corporal	265 ± 27 ^a	241 ± 22 ^b ↓	266 ± 21 ^b ↓

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

A seta ↓ indica diminuição, estatisticamente significativa, dos valores dos grupos CEHC e CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.2.2 Análises hematológicas

Os parâmetros do eritrograma e o número de plaquetas não apresentaram diferença significativa entre grupos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros	Grupos experimentais		
	CL	CEHC	CEHT
CDE (10⁶/mm³)	8 ± 1 ^a	8 ± 0 ^a	8 ± 1 ^a
HGB (g/dL)	16 ± 1 ^a	15 ± 3 ^a	15 ± 1 ^a
Hct (%)	47 ± 4 ^a	46 ± 3 ^a	46 ± 1 ^a
VCM (fm³)	58 ± 1 ^a	57 ± 2 ^a	57 ± 1 ^a

Parâmetros	Grupos experimentais		
	CL	CEHC	CEHT
HCM (pg)	19 ± 0 ^a	19 ± 1 ^a	19 ± 1 ^a
CHCM (g/dL)	33 ± 0 ^a	34 ± 1 ^a	34 ± 0 ^a
Plaquetas (10³/mm³)	864 ± 55 ^a	1021 ± 208 ^a	878 ± 43 ^a

CDE = contagem de eritrócitos; HGB = hemoglobina; Hct = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

^a Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

No leucograma, pôde ser observada neutropenia (S) no grupo CEHC, em relação ao CL ($p=0,02$) e linfocitopenia nos animais do grupo CEHT, quando comparados aos dos grupos CL ($p=0,002$) e CEHC ($p=0,01$). A contagem total de leucócitos e suas subpopulações celulares: eosinófilos, basófilos, neutrófilos (B) e monócitos, não apresentaram diferença significativa em nenhum desses grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros (10 ³ /mm ³)	Grupos experimentais		
	CL	CEHC	CEHT
Leucócitos	5 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	4 ± 2 ^a
Basófilos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Eosinófilos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Neutrófilos (B)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Neutrófilos (S)	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^b ↓	1 ± 0 ^{a,b}
Linfócitos	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	2 ± 1 ^b ↓
Monócitos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Neutrófilos (B) = Bastonetes; Neutrófilos (S) = Segmentados.

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A seta ↓ indica diminuição, estatisticamente significativa, dos valores dos grupos CEHC e CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.2.3 Análises bioquímicas

Foi verificado que a atividade da fosfatase alcalina (FA) diminuiu no grupo CEHT, em relação aos grupos CL ($p=0,03$) e CEHC ($p=0,003$) (Figura 12B). Além disso, a exposição ao herbicida Roundup® provocou aumento na atividade das enzimas AST ($p=0,0004$ e $p=0,0001$, respectivamente) e ALT ($p=0,0004$, em ambos) e da concentração de bilirrubina total (BT) ($p=0,02$ e $p=0,001$, respectivamente), no plasma sanguíneo de roedores dos grupos CEHC e CEHT, quando comparados aos do grupo CL (Figura 12A, 12C e 12D, na devida ordem).

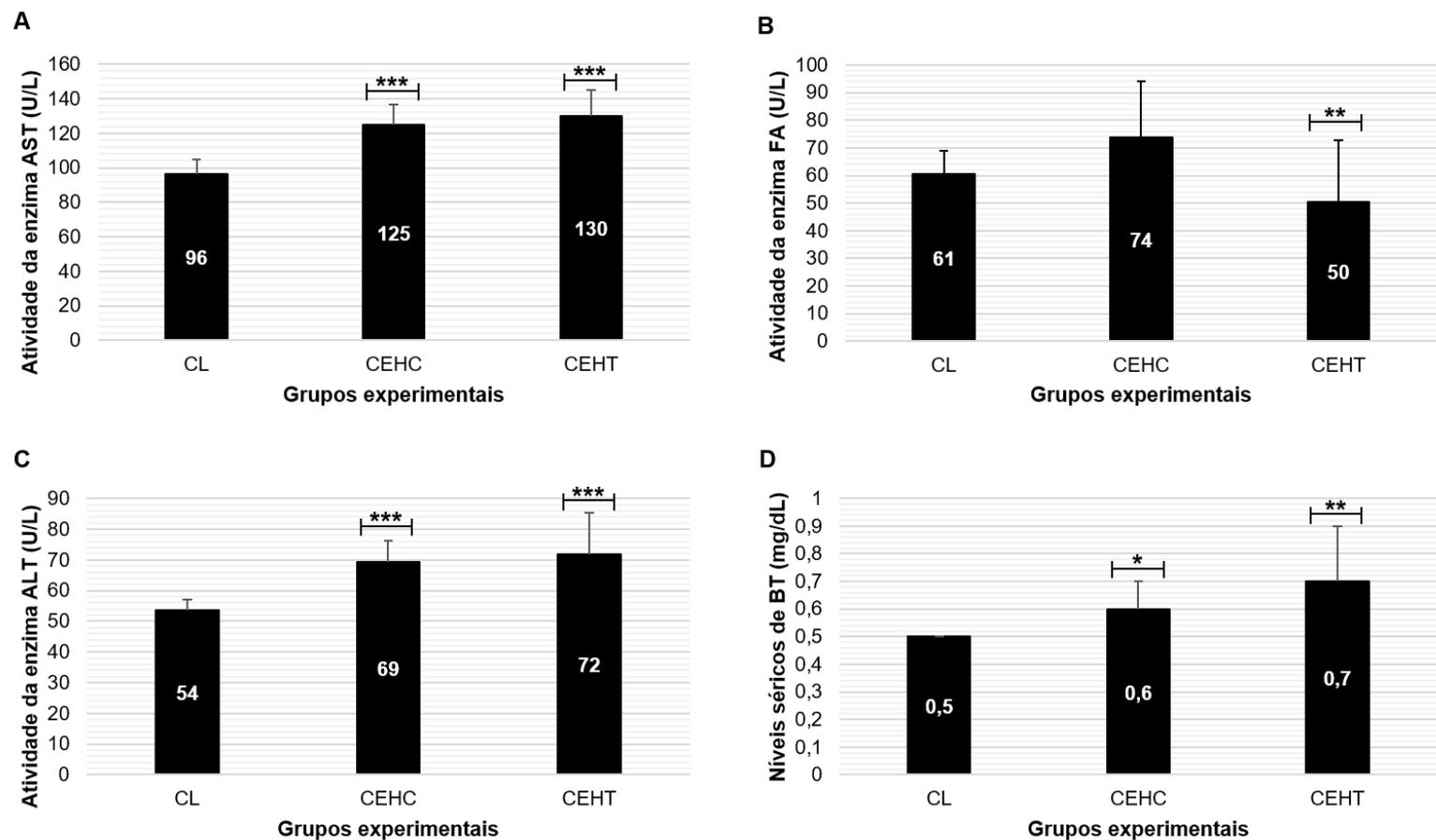


Figura 12: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores para função hepática: A – Aspartato aminotransferase (AST); B – Fosfatase alcalina (FA); C – Alanina aminotransferase (ALT); D – Bilirrubina Total (BT). Grupos: Controle limpo (CL) e Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e de efeito tardio (CEHT). Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante); ** ($p=0,001$ a $0,01$ – Muito significativa); *** ($p<0,001$ – Extremamente significativa).

Nas análises relacionadas ao metabolismo de carboidratos, os animais do grupo CEHT apresentaram hiperglicemia, quando comparado aos do grupo CEHC, além de aumento nos níveis de glicogênio hepático, em comparação aos dos animais dos grupos CL ($p=0,01$) e CEHC ($p=0,0001$). Em contrapartida, nos roedores do grupo CEHC, foi observada diminuição dos níveis de glicogênio hepático, em relação aos do grupo CL ($p=0,01$) (Tabela 8).

Foi observada hiperalbuminemia nos animais expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT), quando comparados àqueles do grupo CL ($p=0,03$). Os testes para avaliação de função renal não demonstraram diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados (ureia, creatinina e ácido úrico). Os níveis séricos de proteínas totais elevaram-se no grupo CEHT, em relação ao controle limpo ($p=0,02$) (Tabela 8).

Tabela 8: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL) e daqueles somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros (Bioquímicos)	Grupos experimentais		
	CL	CEHC	CEHT
Glicose (mg/dL)	264 ± 25 ^{a,b}	251 ± 23 ^a	287 ± 31 ^b
Glico. H. (mg/g de tecido)	4 ± 1 ^a	2 ± 1 ^b ↓	6 ± 1 ^c ↑
Proteínas totais (g/dL)	6 ± 1 ^a	7 ± 1 ^{a,b}	8 ± 1 ^b ↑
Albumina (g/dL)	4 ± 0 ^a	4 ± 1 ^b ↑	4 ± 1 ^b ↑
Ureia <i>BUN</i> (mg/dL)	43 ± 4 ^a	40 ± 8 ^a	43 ± 5 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	3 ± 2 ^a	4 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a
Creatinina (mg/dL)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Ureia *BUN* = *Blood Urea Nitrogen*; Glico. H. = Glicogênio Hepático.

^{a,b,c} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CEHC e/ou CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.3 Diferenças estatísticas entre os grupos Controles Infectados (CIA e CIC) e Controles expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT)

Essa análise teve como objetivo detectar diferenças significativas presentes em parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos, comparando os grupos CIA e CIC vs. CEHC e CEHT, visando avaliar se a exposição ao herbicida Roundup® teria efeitos sinérgicos ou antagônicos à infecção nos parâmetros observados.

5.3.1 Pesagem dos órgãos

Os animais do grupo CIC apresentaram aumento da massa do baço, quando comparados aos dos grupos CEHC ($p=0,0001$) e CEHT ($p=0,001$). As massas do fígado, dos rins e corporal não sofreram alteração em nenhum dos grupos, nessa análise (Tabela 9).

Tabela 9: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Massa (g)	Grupos experimentais				
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT
Fígado	10 ± 1 ^a	9 ± 1 ^a	11 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a
Baço	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	2 ± 0 ^b ↑	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a
Rins	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a
Corporal	265 ± 27 ^a	242 ± 18 ^{a,b}	253 ± 16 ^{a,b}	241 ± 22 ^b ↓	266 ± 21 ^b ↓

O grupo controle limpo (CL), apesar de não fazer parte dessa análise estatística, foi adicionado à Tabela 9, para servir como base para os resultados dos demais grupos controles.

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais avaliados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIC, CEHC e CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.3.2 Análises hematológicas

A infecção crônica (CIC) promoveu diminuição do hematócrito (Hct), em comparação ao grupo CEHC ($p=0,04$). Os demais parâmetros avaliados (CDE, HGB, HCM, VCM e CHCM) não variaram, de forma significativa, entre os grupos avaliados. Os animais do grupo CIC também apresentaram trombocitopenia, quando comparados aos dos grupos CEHC ($p=0,01$) e CEHT ($p=0,03$) (Tabela 10).

Tabela 10: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT
CDE ($10^6/\text{mm}^3$)	8 ± 1 ^a	8 ± 0 ^a	8 ± 0 ^b ↓	8 ± 0 ^{a,b}	8 ± 1 ^{a,b}
HGB (g/dL)	16 ± 1 ^a	16 ± 1 ^a	14 ± 1 ^b ↓	15 ± 3 ^{a,b}	15 ± 1 ^{a,b}
Hct (%)	47 ± 4 ^a	46 ± 4 ^a	43 ± 1 ^b ↓	46 ± 3 ^a	46 ± 1 ^{a,b}
VCM (fm^3)	58 ± 1 ^a	57 ± 2 ^{a,b}	56 ± 1 ^b ↓	57 ± 2 ^{a,b}	57 ± 1 ^{a,b}
HCM (pg)	19 ± 0 ^a	19 ± 1 ^a	19 ± 1 ^a	19 ± 1 ^a	19 ± 1 ^a
CHCM (g/dL)	33 ± 0 ^a	34 ± 0 ^a	33 ± 1 ^a	34 ± 1 ^a	34 ± 0 ^a
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	864 ± 55 ^a	923 ± 55 ^{a,b}	590 ± 69 ^b ↓	1051 ± 142 ^a	878 ± 43 ^a

CDE = contagem de eritrócitos; HGB = hemoglobina; Hct = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. O grupo controle limpo (CL), apesar de não fazer parte dessa análise estatística, foi adicionado à Tabela 10, para servir como base para os resultados dos demais grupos controles.

^{a,b} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A seta ↓ indica diminuição, estatisticamente significativa, dos valores do grupo CIC, em comparação aos do grupo CL.

A infecção crônica promoveu leucocitose nos roedores do grupo CIC, em comparação aos dos grupos CEHC ($p=0,0001$) e CEHT ($p=0,0001$). Foi também observada eosinofilia, no grupo CIA, quando comparado ao grupo CEHC ($p=0,04$) e no grupo CIC, em relação aos grupos CEHC ($p=0,0001$) e CEHT ($p=0,02$). Houve diferença significativa entre o grupo CIC e os grupos CEHC ($p=0,0001$) e CEHT ($p=0,04$), ao que diz respeito ao número de neutrófilos (S). O grupo CEHT apresentou linfocitopenia quando comparado aos controles infectados (CIA: $p=0,001$; CIC: $p=0,0001$), havendo efeitos antagônicos, em relação ao CL. O número de monócitos, basófilos e neutrófilos (B) não apresentaram alterações em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 11).

Tabela 11: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros (10 ³ /mm ³)	Grupos experimentais				
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT
Leucócitos	5 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	9 ± 3 ^b ↑	5 ± 1 ^a	4 ± 2 ^a
Basófilos	0 ± 0 ^a				
Eosinófilos	0 ± 0 ^{a,c}	0 ± 0 ^a	1 ± 1 ^b ↑	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^{a,b,c}
Neutrófilos (B)	0 ± 0 ^a				
Neutrófilos (S)	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^{a,c}	2 ± 1 ^b ↑	1 ± 0 ^c ↓	1 ± 0 ^{a,c}
Linfócitos	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	6 ± 2 ^b ↑	4 ± 1 ^{a,b}	2 ± 1 ^c ↓
Monócitos	0 ± 0 ^a				

Neutrófilos (B) = Bastonetes; Neutrófilos (S) = Segmentados. O grupo controle limpo (CL), apesar de não fazer parte dessa análise estatística, foi adicionado à Tabela 11, para servir como base para os resultados dos demais grupos controles.

^{a,b,c} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIC, CEHC e CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.3.3 Análises bioquímicas

Os animais expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT) apresentaram aumento na atividade sérica da enzima AST, em comparação ao controle de infecção aguda (CIA) ($p=0,01$ e $p=0,001$, respectivamente), cujo resultado foi semelhante ao do controle limpo (CL) (Figura 13A). Em relação à atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (FA), foi observada diferença significativa entre os grupos CEHT e CIC ($p=0,001$), havendo um efeito antagônico, quando comparados ao CL (Figura 13B). Ao que diz respeito à atividade sérica da enzima ALT, ainda que os grupos CIC, CEHC e CEHT tenham apresentado aumento significativo em relação ao CL, foi observado que, nessa análise, o controle de infecção crônica (CIC) demonstrou uma maior atividade dessa aminotransferase, de forma significativa, quando comparado aos grupos CEHC ($p=0,03$) e CEHT ($p=0,02$) (Figura 13C). Não foi detectada diferença significativa nos níveis séricos de bilirrubina total, entre os grupos avaliados, porém, quando comparados ao controle limpo (CL), esse parâmetro demonstrou-se aumentado nos grupos CIC, CEHC e CEHT, indicando que os efeitos da infecção por *A. cantonensis* e da exposição ao herbicida Roundup® são semelhantes (Figura 13D).

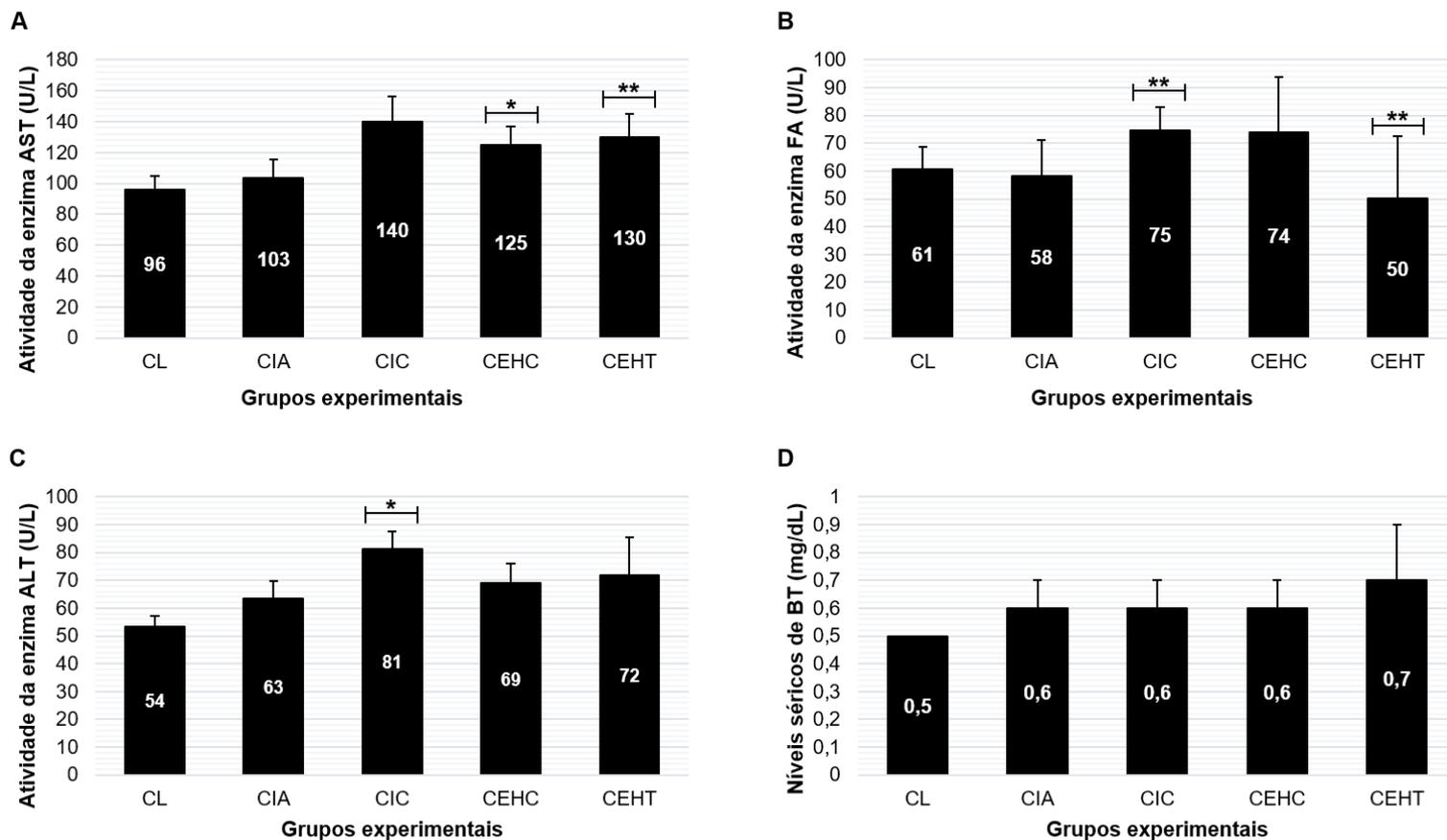


Figura 13: Valores médios e desvio padrão, dos biomarcadores hepáticos: A – Aspartato aminotransferase (AST); B – Fosfatase Alcalina (FA); C – Alanina aminotransferase (ALT); D – Bilirrubina Total (BT). Grupos: Controle limpo (CL), Controle de infecção aguda (CIA), Controle de infecção crônica (CIC) e Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e de efeito tardio (CEHT). Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante); ** ($p=0,001$ a $0,01$ – Muito significativa); *** ($p<0,001$ – Extremamente significativa).

A concentração de glicogênio hepático apresentou diferenças significativas entre os pares CIA vs. CEHC ($p=0,0001$) e CEHT vs. CIC ($p=0,01$), demonstrando que: no primeiro par houve um efeito antagônico, ocorrendo o aumento dos níveis de glicogênio, no fígado dos animais do grupo CIA e diminuição nos do grupo CEHC, em relação ao CL; e no segundo par, houve somente aumento evidente da concentração de glicogênio hepático, no grupo CEHT. Além disso, foi observada hipoglicemia nos animais infectados cronicamente (CIC), quando comparados aos do grupo CEHT, cujo resultado se assemelha com o encontrado no grupo CL. Os níveis séricos de ureia, creatinina e ácido úrico, proteínas totais e albumina não se alteraram significativamente entre os grupos analisados (Tabela 12).

Tabela 12: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); e somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente).

Parâmetros (Bioquímica)	Grupos experimentais				
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT
Glicose (mg/dL)	264 ± 25 ^{a,c}	268 ± 41 ^{a,c}	222 ± 29 ^{b,c} ↓	251 ± 23 ^c	287 ± 3 ^a
Glico. H. (mg/g de tecido)	4 ± 1 ^{a,b}	6 ± 1 ^b ↑	3 ± 1 ^c	2 ± 1 ^c ↓	6 ± 1 ^d ↑
Proteínas totais (g/dL)	6 ± 1 ^a	7 ± 1 ^{a,c}	8 ± 1 ^{b,c} ↑	7 ± 1 ^{a,b,c}	8 ± 1 ^c ↑
Albumina (g/dL)	4 ± 0 ^a	4 ± 1 ^{a,b}	4 ± 1 ^{a,b}	4 ± 1 ^b ↑	4 ± 1 ^b ↑
Ureia BUN (mg/dL)	43 ± 4 ^a	40 ± 4 ^a	44 ± 6 ^a	40 ± 8 ^a	43 ± 5 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	3 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a	4 ± 2 ^a	4 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a
Creatinina (mg/dL)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Ureia *BUN* = *Blood Urea Nitrogen*; Glico. H. = Glicogênio Hepático. O grupo controle limpo (CL), apesar de não fazer parte dessa análise estatística, foi adicionado à Tabela 12, para servir como base para os resultados dos demais grupos controles.

^{a,b,c,d} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIA, CIC, CEHC e CEHT, em comparação aos do grupo CL.

5.4 Efeitos da associação da exposição ao herbicida Roundup® com a infecção por *Angiostrongylus cantonensis*

5.4.1 Pesagem dos órgãos

Com exceção da massa dos rins, as demais pesagens realizadas para essa análise, demonstraram diferenças significativas. Os animais do grupo GIE apresentaram aumento na massa corporal, quando comparados aos dos grupos CIA ($p=0,04$) e CEHC ($p=0,03$). Além disso, estes animais (grupo GIE) também apresentaram aumento na massa do fígado, em relação aos dos grupos CL ($p=0,002$) e CIA ($p=0,001$). Foi verificado que a massa do baço elevou-se nos grupos GIE e GEI, quando comparados aos grupos CL ($p=0,0001$, para ambos), CIA ($p=0,0002$ e $p=0,0001$), CEHC ($p=0,0001$, em ambos) e CEHT ($p=0,0002$ e $p=0,0001$), sendo esses resultados, semelhantes aos encontrados nos animais do grupo CIC (Tabela 13).

Tabela 13: Valores médios e desvio padrão da massa corporal e dos órgãos, em gramas (g), de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI).

Massa (g)	Grupos experimentais						
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT	GIE	GEI
Fígado	10 ± 1 ^a	9 ± 1 ^a	11 ± 2 ^{a,b}	11 ± 2 ^{a,b}	11 ± 2 ^{a,b}	12 ± 1 ^b ↑	11 ± 2 ^{a,b}
Baço	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	2 ± 0 ^b ↑	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a	2 ± 0 ^b ↑	2 ± 1 ^b ↑
Rins	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a	2 ± 0 ^a
Corporal	265 ± 27 ^{a,c}	242 ± 18 ^{a,b}	253 ± 16 ^{a,b,c}	241 ± 22 ^b ↓	266 ± 21 ^{b,c} ↓	271 ± 20 ^c	251 ± 19 ^{a,b,c}

^{a,b,c} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIC, CEHC, CEHT, GIE e GEI, em comparação aos do grupo CL.

5.4.2 Análises hematológicas

Os animais do grupo GEI apresentaram diminuição na contagem de eritrócitos (CDE), quando comparados aos do grupo CIA ($p=0,01$). Ao que diz respeito à concentração da hemoglobina (HGB), os roedores dos grupos GIE e GEI apresentaram-na diminuída, em relação àqueles dos grupos CL ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente), CIA ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente) e CEHT ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente). Além disso, foi observado declínio desse parâmetro no grupo GEI, quando comparado ao grupo CEHC ($p=0,03$). Verificou-se, ainda, que a porcentagem do hematócrito (Hct) diminuiu no grupo GEI, em relação aos grupos CL ($p=0,01$), CIA ($p=0,02$) e CEHT ($p=0,02$) e no grupo GIE, quando comparado ao grupo controle limpo ($p=0,02$). O volume corpuscular médio (VCM) dos animais dos grupos GIE e GEI diminuiu, em comparação aos do grupo CL ($p=0,01$ e $p=0,004$, respectivamente). Foi observado também declínio da hemoglobina corpuscular média (HCM) nos grupos GIE e GEI, em relação aos grupos CL ($p=0,002$ e $p=0,02$, respectivamente), CIA ($p=0,004$ e $p=0,03$, respectivamente) e CEHC ($p=0,003$ e $p=0,03$, respectivamente). Além disso, verificou-se que houve declínio em tal parâmetro, no grupo GIE, quando comparado ao grupo CEHT ($p=0,01$). A concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) diminuiu no grupo GIE, em relação ao grupo CEHC ($p=0,03$) (Tabela 14).

Os grupos GIE e GEI apresentaram trombocitopenia, em comparação aos grupos CIA ($p=0,002$ e $p=0,0001$, respectivamente), CEHC ($p=0,0001$, para ambos), CEHT ($p=0,03$ e $p=0,0001$, respectivamente) e, somente no GEI, em relação ao CL ($p=0,0003$) (Tabela 14).

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão de parâmetros eritrocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de infecções aguda e crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI).

Parâmetros	Grupos experimentais						
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT	GIE	GEI
CDE ($10^6/\text{mm}^3$)	$8 \pm 1^{a,c}$	8 ± 0^a	$8 \pm 0^{b,c} \downarrow$	$8 \pm 0^{a,b,c}$	$8 \pm 1^{a,b,c}$	$8 \pm 0^{a,b,c}$	8 ± 0^c
HGB (g/dL)	16 ± 1^a	16 ± 1^a	$14 \pm 1^{b,c,d} \downarrow$	$15 \pm 3^{a,b,c}$	$15 \pm 1^{a,b}$	$14 \pm 1^{c,d} \downarrow$	$14 \pm 1^d \downarrow$
Hct (%)	47 ± 4^a	$46 \pm 4^{a,d}$	$43 \pm 1^{b,c,d} \downarrow$	$46 \pm 3^{a,c,d}$	$46 \pm 1^{a,b,d}$	$43 \pm 1^{c,d} \downarrow$	$43 \pm 2^d \downarrow$
VCM (fm^3)	58 ± 1^a	$57 \pm 2^{a,b}$	$56 \pm 1^b \downarrow$	$57 \pm 2^{a,b}$	$57 \pm 1^{a,b}$	$56 \pm 1^b \downarrow$	$56 \pm 2^b \downarrow$
HCM (pgL)	19 ± 0^a	19 ± 1^a	$19 \pm 1^{a,b,c}$	19 ± 1^a	19 ± 1^a	$19 \pm 0^{b,c} \downarrow$	$19 \pm 1^c \downarrow$
CHCM (g/dL)	$33 \pm 0^{a,b}$	$34 \pm 0^{a,b}$	$33 \pm 1^{a,b}$	34 ± 1^a	$34 \pm 0^{a,b}$	33 ± 0^b	$33 \pm 1^{a,b}$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$864 \pm 55^{a,c}$	$923 \pm 55^{a,b}$	$590 \pm 69^{b,c,d} \downarrow$	1051 ± 142^a	878 ± 43^a	$699 \pm 61^{c,d}$	$543 \pm 35^d \downarrow$

CDE = contagem de eritrócitos; HGB = hemoglobina; Hct = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

^{a,b,c,d} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A seta \downarrow indica diminuição, estatisticamente significativa, dos valores dos grupos CIC, GIE e GEI, em comparação aos do grupo CL.

Com exceção do número de basófilos e de neutrófilos (B), os demais parâmetros leucocitários alteraram-se nos grupos GIE e GEI. Neles, foi observada leucocitose, quando comparados aos grupos CEHC ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) e CEHT ($p=0,001$, para ambos). Além disso, os animais dos grupos GIE e GEI também apresentaram eosinofilia, quando comparados aos dos grupos CL ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) e CEHC ($p=0,004$, para ambos), com resultado assemelhando-se ao do grupo CIC. Foi observada linfocitose significativa, nos grupos GIE e GEI, em relação ao grupo CEHT ($p=0,001$ e $p=0,002$, respectivamente). O grupo GEI também apresentou neutropenia (S), em comparação ao grupo CEHC ($p=0,04$), além de monocitose, em relação aos grupos CIA ($p=0,04$), CEHC ($p=0,002$) e CEHT ($p=0,004$) (Tabela 15).

Tabela 15: Valores médios e desvio padrão de parâmetros leucocitários, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções Aguda e Crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI).

Parâmetros (10 ³ /mm ³)	Grupos experimentais						
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT	GIE	GEI
Leucócitos	5 ± 2 ^{a,c}	5 ± 1 ^{a,c}	9 ± 3 ^{b,c} ↑	5 ± 1 ^a	4 ± 2 ^a	8 ± 3 ^c	8 ± 3 ^c
Basófilos	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Eosinófilos	0 ± 0 ^{a,c}	0 ± 0 ^{a,d}	1 ± 1 ^{b,d} ↑	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^{a,b,c,d}	1 ± 1 ^d ↑	0 ± 1 ^d ↑
Neutrófilos (B)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Neutrófilos (S)	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^{a,c}	2 ± 1 ^b ↑	1 ± 0 ^c ↓	1 ± 0 ^{a,c}	1 ± 1 ^{a,b,c}	1 ± 1 ^{a,b}
Linfócitos	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	6 ± 2 ^b ↑	4 ± 1 ^{a,b}	2 ± 1 ^c ↓	5 ± 2 ^{a,b}	5 ± 1 ^{a,b}
Monócitos	0 ± 0 ^{a,b}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^{a,b}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^{a,b}	1 ± 1 ^b

Neutrófilos (B) = Bastonetes; Neutrófilos (S) = Segmentados.

^{a,b,c,d} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIC, CEHC, CEHT, GIE e GEI, em comparação aos do grupo CL.

5.4.3 Análises bioquímicas

Os grupos GIE e GEI apresentaram aumento na atividade sérica da enzima AST, em relação aos grupos CL ($p=0,0001$ e $p=0,002$, respectivamente) e CIA ($p=0,0001$ e $p=0,01$, respectivamente) (Figura 14A). A enzima fosfatase alcalina (FA) teve sua atividade, no plasma sanguíneo, diminuída no grupo GIE, em comparação ao grupo CIC ($p=0,02$). Tal declínio também pode ser observado no grupo GEI, em relação aos grupos CL ($p=0,03$), CIC ($p=0,0002$) e CEHC ($p=0,002$) (Figura 14B), demonstrando que a exposição ao herbicida Roundup® pode promover um efeito antagônico ao da infecção crônica por *A. cantonensis*. A atividade sérica da enzima ALT aumentou nos roedores do grupo GIE, quando comparado aos grupos CL ($p=0,0001$) e CIA ($p=0,04$), e nos animais do grupo GEI, em comparação ao grupo CL ($p=0,01$). Porém, quando comparado ao grupo CIC, o grupo GEI demonstrou diminuição na atividade dessa enzima (ALT) ($p=0,004$) (Figura 14C). Foi verificado, ainda, que os níveis séricos de bilirrubina total se elevaram no grupo GIE, em relação aos grupos CL ($p=0,003$) (Figura 14D).

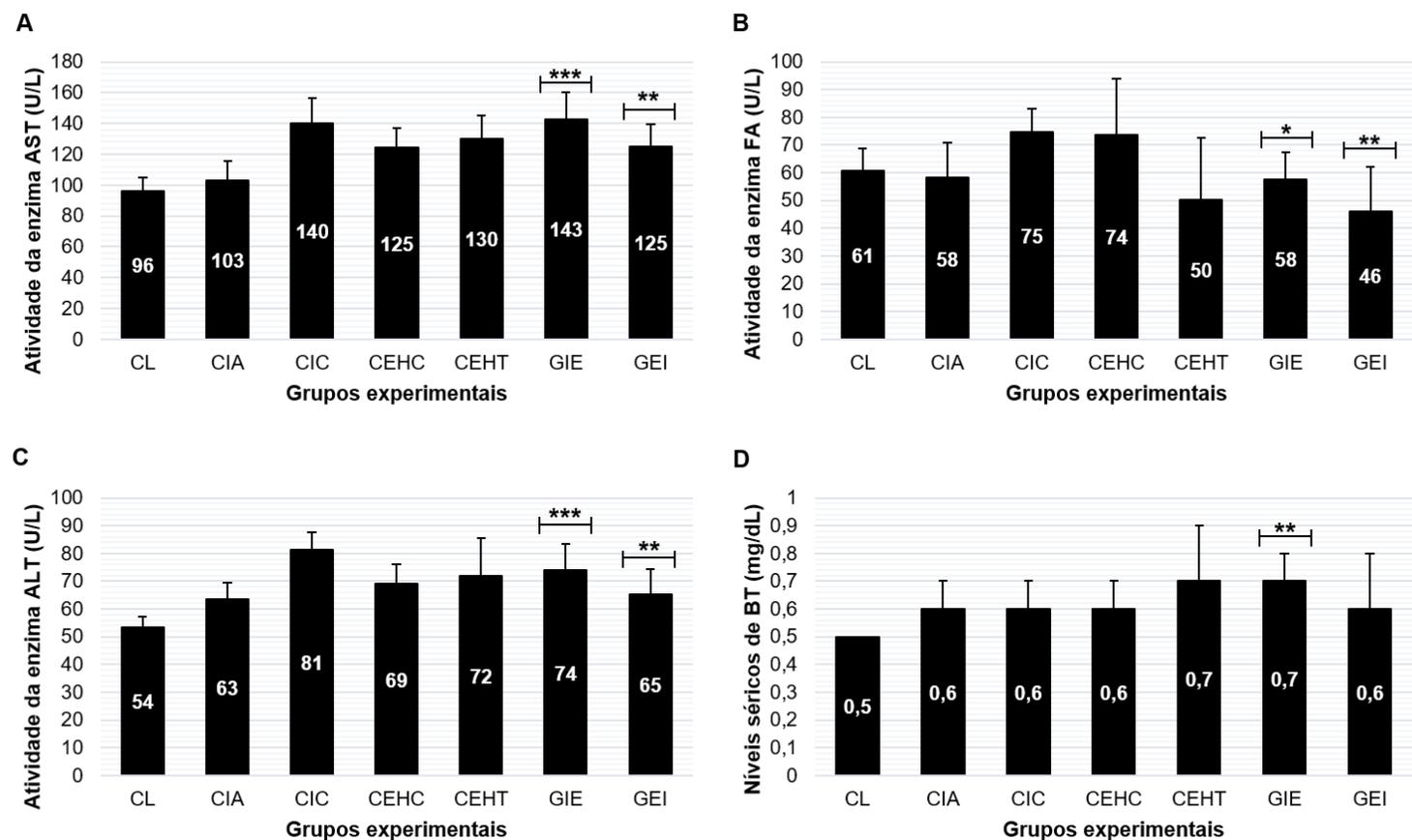


Figura 14: Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores hepáticos: A – Aspartato aminotransferase (AST); B – Fosfatase alcalina (FA); C – Alanina aminotransferase (ALT); D – Bilirrubina Total (BT). Grupos: Controle limpo (CL), Controles de infecção aguda (CIA), Controle de infecção crônica (CIC), Controles expostos ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) e de efeito tardio (CEHT), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida (GIE) e grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado (GEI). Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante); ** ($p=0,001$ a $0,01$ – Muito significativa); *** ($p<0,001$ – Extremamente significativa).

Foram verificadas alterações no metabolismo de carboidratos, havendo: hipoglicemia nos animais dos grupos GIE e GEI, quando comparados aos dos grupos CL ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente), CIA ($p=0,01$ e $p=0,002$) e CEHT ($p=0,0001$, para ambos). Além disso, houve declínio da concentração de glicogênio hepático no grupo GEI, em relação aos grupos CL ($p=0,02$), CIA ($p=0,0001$), CEHT ($p=0,0001$) e GIE ($p=0,01$). Os níveis séricos de proteínas totais elevaram-se no grupo GIE, em relação aos grupos CL ($p=0,001$), CIA ($p=0,02$) e CEHC ($p=0,01$), e no grupo GEI, quando comparado ao grupo CL ($p=0,02$) (Tabela 16).

Nenhum dos grupos experimentais apresentou variação estatisticamente significativa nos parâmetros referentes aos testes de função renal (ureia, creatinina e ácido úrico) e na albumina (Tabela 16).

Tabela 16: Valores médios e desvio padrão de parâmetros bioquímicos, de roedores *Rattus norvegicus* (Wistar) não infectados e não expostos ao herbicida (Controle limpo – CL); somente infectados, experimentalmente, por *Angiostrongylus cantonensis* (Controles de Infecções Aguda e Crônica – CIA e CIC, respectivamente); somente expostos, oralmente, à concentração de 500 mg/kg do animal de Roundup® (Controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio – CEHC e CEHT, respectivamente); primeiramente infectados por *A. cantonensis* e depois expostos ao Roundup® (Grupo infectado e depois exposto – GIE); e inicialmente, expostos ao herbicida Roundup® e depois infectados por *A. cantonensis* (Grupo exposto e depois infectado – GEI).

Parâmetros (Bioquímica)	Grupos experimentais						
	CL	CIA	CIC	CEHC	CEHT	GIE	GEI
Glicose (mg/dL)	264 ± 25 ^{a,c}	268 ± 41 ^{a,c}	222 ± 29 ^{b,c,d} ↓	251 ± 23 ^{c,d}	287 ± 31 ^a	220 ± 28 ^d ↓	212 ± 23 ^d ↓
Glico. H. (mg/g de tecido)	4 ± 1 ^{a,b,e}	6 ± 1 ^{b,e} ↑	3 ± 1 ^{c,e}	2 ± 0,9 ^{c,e} ↓	6 ± 1 ^{d,e} ↑	4 ± 2 ^e	2 ± 1 ^c ↓
Proteínas Totais (g/dL)	6 ± 1 ^a	7 ± 1 ^{a,c,e}	8 ± 1 ^{b,c,e} ↑	7 ± 1 ^{a,b,c,e}	8 ± 1 ^{c,d,e} ↑	8 ± 0 ^{d,e} ↑	8 ± 1 ^e ↑
Albumina (g/dL)	4 ± 0 ^a	4 ± 1 ^{a,b}	4 ± 0,5 ^{a,b}	4 ± 1 ^b ↑	4 ± 1 ^b ↑	4 ± 0 ^{a,b}	4 ± 0 ^{a,b}
Ureia <i>BUN</i> (mg/dL)	43 ± 4 ^a	40 ± 4 ^a	44 ± 5,8 ^a	39,6 ± 8 ^a	43 ± 5 ^a	47 ± 5 ^a	41 ± 3 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	3 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a	4 ± 1,9 ^a	3,8 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a	2 ± 1 ^a	2 ± 1 ^a
Creatinina (mg/dL)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Ureia *BUN* = *Blood Urea Nitrogen*; Glico. H. = Glicogênio Hepático.

^{a,b,c,d,e} Letras distintas, presentes na mesma linha, representam valores com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As setas ↑ e ↓ indicam aumento e diminuição, estatisticamente significativos, dos valores dos grupos CIA, CIC, CEHC, CEHT, GIE e GEI, em comparação aos do grupo CL.

5.5 Avaliação da carga parasitária

A taxa total de helmintos adultos recuperados a partir das artérias pulmonares e do coração dos roedores dos grupos CIC, GIE e GEI, foi de 45%, 45% e 61%, respectivamente. A quantidade de machos oscilou, discretamente, entre os grupos, porém, não de forma significativa. Foi observado aumento no número de fêmeas recuperadas nos animais do grupo GEI, em relação aos dos grupos CIC ($p=0,04$) e GIE ($p=0,01$). Por conta disso, o número total de helmintos recuperados das artérias pulmonares e do coração dos roedores do grupo GEI também foi elevado, quando comparado aos dos grupos CIC ($p=0,03$) e GIE ($p=0,02$) (Figura 15).

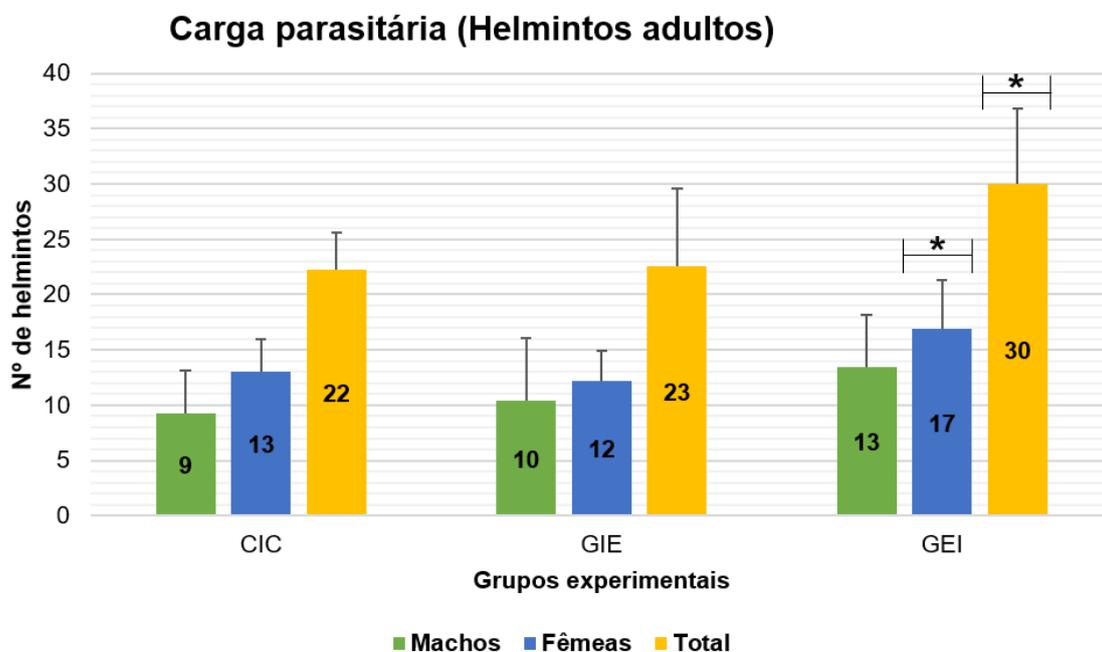


Figura 15: Gráfico de barras demonstrando a média de *Angiostrongylus cantonensis* machos (verde), fêmeas (azul claro) e do total de helmintos adultos (amarelo), recuperados de artérias pulmonares e coração dos roedores dos grupos controle de infecção crônica (CIC), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida Roundup® (GIE) e grupo exposto ao herbicida Roundup® e, depois, infectado (GEI). Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante).

5.6 Análise coproparasitológica

O grupo GEI apresentou período pré-patente no 40º dia p.i, enquanto os grupos CIC e GIE iniciaram sua eliminação de larvas L₁ no 42º dia p.i. Tal grupo

(GEI) apresentou aumento da quantidade total de larvas L₁ eliminadas nas fezes dos roedores, quando comparado aos grupos CIC ($p=0,01$) e GIE ($p=0,03$) (Figura 16).

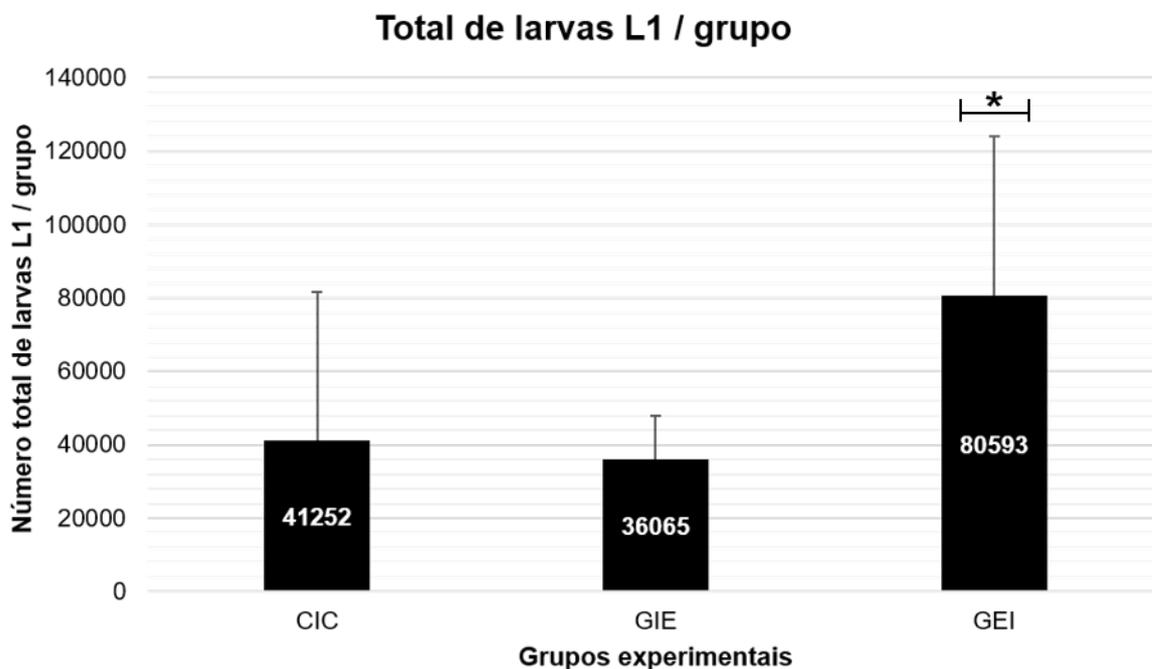


Figura 16: Média e desvio padrão do número de larvas L₁ *Angiostrongylus cantonensis* eliminadas por roedores *Rattus norvegicus* de cada grupo (controle de infecção crônica – CIC; grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida – GIE; grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado – GEI), entre o 38^o ao 50^o dia p.i. Significância entre os grupos: * ($p=0,01$ a $0,04$ – Significante).

Nenhum dos grupos (CIC, GIE e GEI) demonstrou diferença significativa na razão entre a quantidade de larvas L₁ eliminadas nas fezes, por cada helminto fêmea recuperada. (Figura 17).

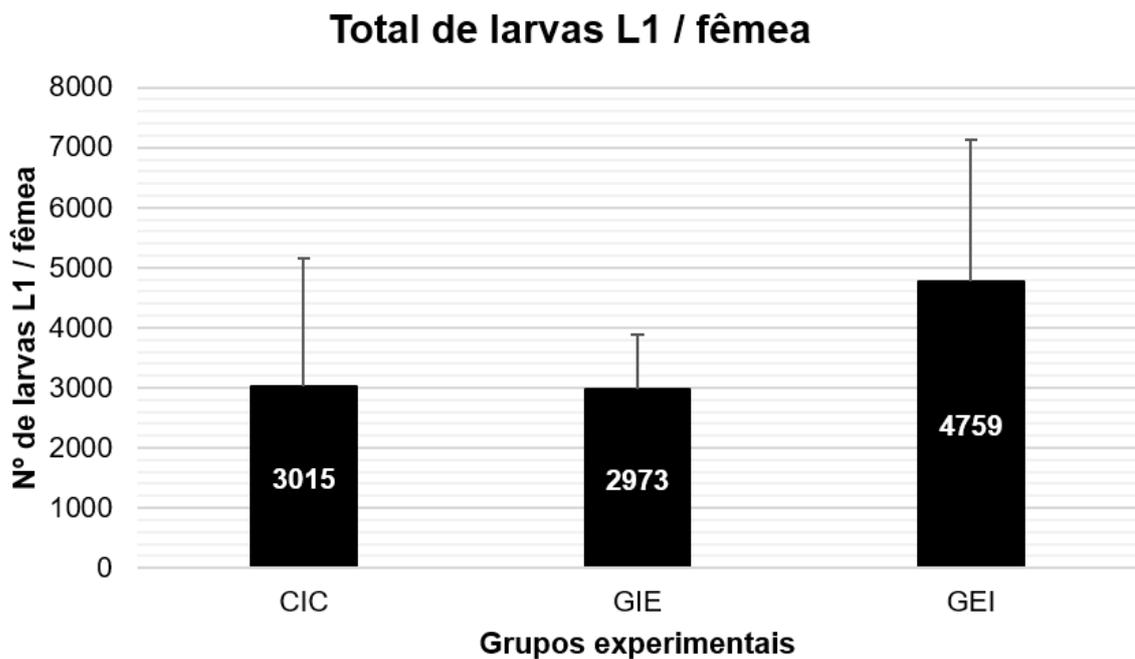


Figura 17: Média e desvio padrão da quantidade de larvas L1 eliminadas por cada helminto fêmea recuperada dos grupos controle de infecção crônica (CIC), grupo infectado e, depois, exposto ao herbicida (GIE) e grupo exposto ao herbicida e, depois, infectado (GEI). Significância: $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Rattus norvegicus* (Wistar)

6.1.1 Pesagem dos órgãos e análises hematológicas

A infecção crônica promoveu esplenomegalia nos roedores do grupo CIC que pode estar associada a uma hiperplasia esplênica, resultado da reação imunológica à antígenos (Chapman et al., 2020) liberados por helmintos adultos de *A. cantonensis*. O baço desempenha, entre outras funções importantes, um papel imunológico através da eliminação de microrganismos e de antígenos presentes no sangue, além da produção de anticorpos e ativação de células das respostas imunes inata e adaptativa (Stevens et al., 2000; Mebius e Kraal, 2005). Na literatura, existem poucos estudos que demonstrem resultados em relação à massa do baço de hospedeiros definitivos infectados por *A. cantonensis*, sendo contraditórios entre si (Aghazadeh et al., 2015; Jarvi et al., 2015; Liu et al., 2017b). Portanto, para confirmar tal hipótese sobre a sugerida hiperplasia esplênica, é necessária a realização de trabalhos mais aprofundados sobre o assunto, através de análises histopatológicas do baço.

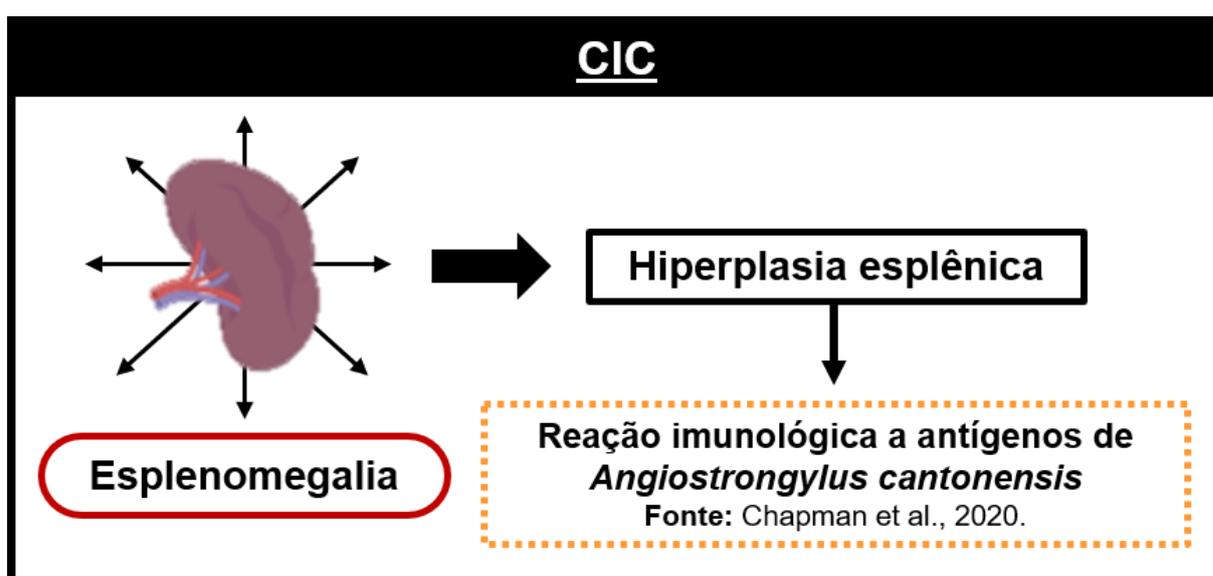


Figura 18: A reação imunológica, contra antígenos liberados por *Angiostrongylus cantonensis*, promoveu hiperplasia esplênica, resultando em esplenomegalia nos roedores do grupo Controle de infecção crônica (CIC) (BioRender, 2020).

6.1.1.1 Eritrograma

A infecção crônica (grupo CIC), causada por *A. cantonensis*, promoveu a diminuição da: contagem de eritrócitos (CDE), dosagem do hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina (HGB) e do volume corpuscular médio (VCM), sugerindo uma anemia microcítica causada por helminto hematófago. Esses resultados foram também observados por Garcia et al. (2014a), em ratos Wistar infectados experimentalmente por *A. cantonensis*, com 42 dias transcorridos da infecção inicial. Eles também observaram que com o passar do tempo (56^o p.i), houve alteração na concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), evoluindo para um quadro de anemia classificada como regenerativa. A anemia regenerativa induz a produção e liberação acelerada de eritrócitos (reticulócitos), fenômenos que decorrem da perda acentuada dessas células, que pode ser causada por diversos agentes, entre eles, a infecção por helmintos (Brito et al., 2003; Garcia-Navarro, 2005). Alguns trabalhos sugerem que esses parasitos podem levar a um quadro anêmico resultante da hematofagia e/ou da locomoção de suas fases larvais e adulta pelos órgãos, causando hemorragias nessas regiões. Em ambos os casos, há a perda de eritrócitos, levando à diminuição da biodisponibilidade de ferro presente nessas células. A deficiência desse mineral leva à redução de novas hemoglobinas e declínio de sua concentração nos eritrócitos (HGB) (Garcia-Navarro, 2005). Valero et al. (2008; 2017) demonstraram que a infecção crônica pelo trematódeo hepático *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) promoveu anemia, devido à redução da quantidade de eritrócitos (CDE), da concentração da hemoglobina (HGB) e do hematócrito (Hct). Da mesma forma, estudos envolvendo a infecção experimental com trematódeos *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Lambertucci et al., 2005; Vitorino et al., 2012) e *E. paraensei* (Garcia et al., 2012), em *R. norvegicus*, e pelo nematódeo *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1803 (Rahman e Collins, 1990), em cabras, corroboraram a ocorrência de anemia na infecção crônica por *A. cantonensis* em *R. norvegicus* (Wistar) observada no presente trabalho.

Os animais do grupo CIA não apresentaram alterações nos parâmetros eritrocitários, em relação aos grupos CIC e CL, sendo um indicativo de que os efeitos da infecção por *A. cantonensis* se tornam mais evidentes somente após o estabelecimento da fase crônica. Tais resultados são corroborados por Garcia et al.

(2014a) que observaram alterações no eritrograma de ratos Wistar somente a partir da 3ª semana pós-infecção por *A. cantonensis*. A hipótese de que essas alterações estejam associadas ao hábito hematofágico do helminto adulto é coerente com esses resultados, uma vez que com duas semanas de infecção – espaço de tempo para a fase aguda do grupo CIA, as larvas encontram-se, ainda, no SNC, não tendo desenvolvido a fase adulta e migrado aos pulmões.

6.1.1.2 Contagem de plaquetas

Verificou-se também na infecção crônica (CIC) um quadro de trombocitopenia, igualmente observada por Garcia et al. (2014a). O declínio plaquetário na infecção por *A. cantonensis* pode estar relacionado às hemorragias produzidas pela migração da fase adulta do helminto, através do coração e dos pulmões dos roedores, gerando uma demanda acentuada, dessas células, nos locais lesionados e, conseqüentemente, levando a um declínio quantitativo das plaquetas, no sangue, caracterizando uma trombocitopenia de consumo (Garcia-Navarro, 2005; Martins et al., 2015; Spratt, 2015). Schnyder et al. (2010), avaliando cães, experimentalmente, infectados por *Angiostrongylus vasorum* Baillet, 1866, também sugeriram que a trombocitopenia observada, poderia ser causada pelo extravasamento de elementos sanguíneos, incluindo os trombócitos, do meio intra para o meio extravascular, através de lesões mecânicas produzida pelo parasito. Outro fator que poderia levar à diminuição dos níveis de plaquetas no sangue, seria a esplenomegalia observada nesses animais, uma vez que esse órgão atua como sequestrante de plaquetas, havendo uma relação inversa entre a variação do nível sérico dessas células e da massa do baço (Martins et al., 2010).

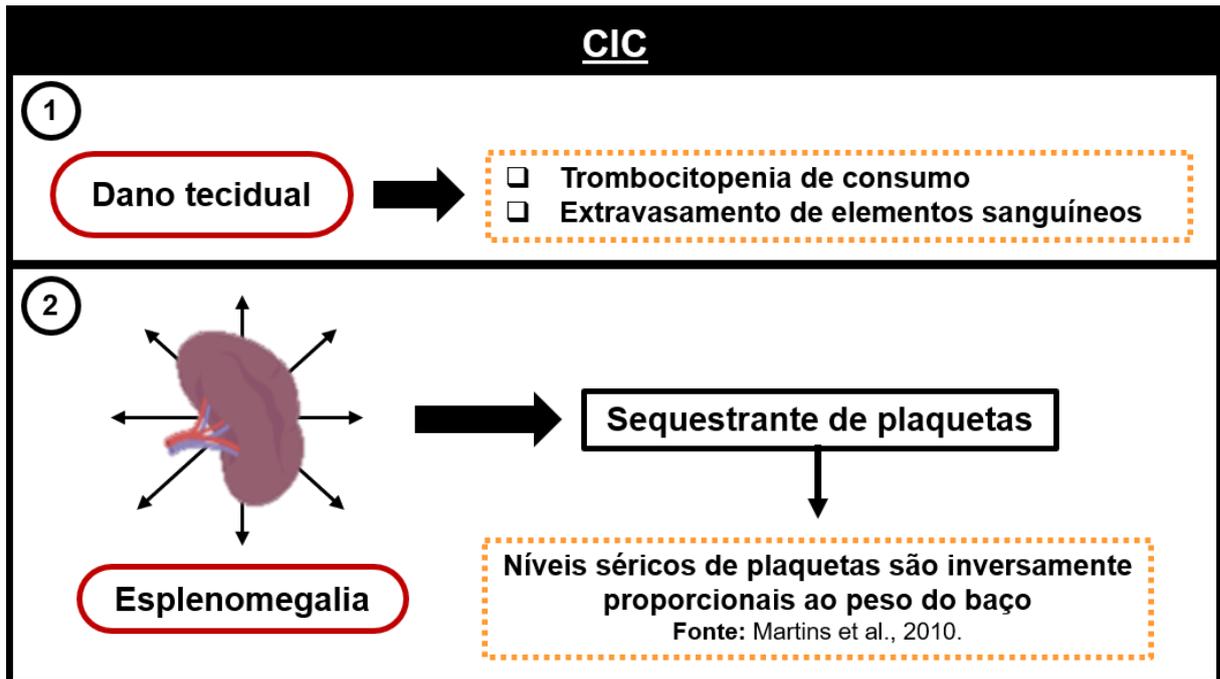


Figura 19: Causas da trombocitopenia observada em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados por *Angiostrongylus cantonensis* – (1): Dano tecidual, gerando trombocitopenia de consumo e extravasamento de elementos sanguíneos, incluindo as plaquetas; (2): Esplenomegalia, ampliando a capacidade do baço de sequestrar as plaquetas (BioRender, 2020).

6.1.1.3 Leucograma

Foi observada eosinofilia reacional durante a infecção crônica por *A. cantonensis*. Os eosinófilos são granulócitos que podem ser encontrados no sangue, porém, residem predominantemente em órgãos do trato gastrointestinal, na pele e no tecido pulmonar (Chauffaile, 2010; Kovalszki e Weller, 2016). Essas células desempenham diversas funções, incluindo o combate a infecções helmínticas, as quais estimulam a produção das interleucinas IL-4 e IL-5, por linfócitos T auxiliares. Os eosinófilos são ativados pela IL-5, ligando-se ao parasito e secretando componentes chamados de grânulos, como a peroxidase eosinofílica, proteínas catiônicas, neurotoxina derivada do eosinófilo e proteína eosinofílica básica maior, sendo essa última a responsável por causar dano ao parasito (Mendes et al., 2000; Chauffaile, 2010). Garcia et al. (2014a) também observaram eosinofilia no sangue de ratos Wistar infectados por esse nematódeo, no transcorrer das diferentes semanas após a infecção. Segundo os autores, essa alteração, que foi observada principalmente na fase crônica (42 dias p.i), pode estar associada à liberação de ovos, pelas fêmeas do helminto, além da eclosão de larvas L₁ nos capilares

pulmonares (Sasaki et al., 1993; Rosenberg et al., 2013). Outro dado importante sobre a função essencial dos eosinófilos, nos animais infectados por *A. cantonensis*, é a sua capacidade de estimular linfócitos T (Sugaya e Yoshimura 1988; Yoshimura et al. 1988; Perez et al. 1989; Yoshimura et al. 1994). A infecção por *A. cantonensis* é mediada pela resposta do tipo Th2, na qual há a liberação da Interleucina 5 (IL-5), que promove a diferenciação e liberação dos eosinófilos, corroborando a eosinofilia observada no presente trabalho. Além disso, a resposta Th2, promove a liberação da Interleucina 4 (IL-4), a partir do 30º dia p.i. A IL-4 induz os linfócitos B a produzirem a imunoglobulina E (IgE), o que explicaria o aumento de linfócitos detectados nos roedores do grupo de infecção crônica (CIC) (Sugaya et al., 1997b). Tal linfocitose também pode ser observada em ratos Wistar infectados por *A. cantonensis* (Garcia et al., 2014a) e em cães infectados por *A. vasorum* (Dracz, 2012), corroborando os resultados dessa dissertação.

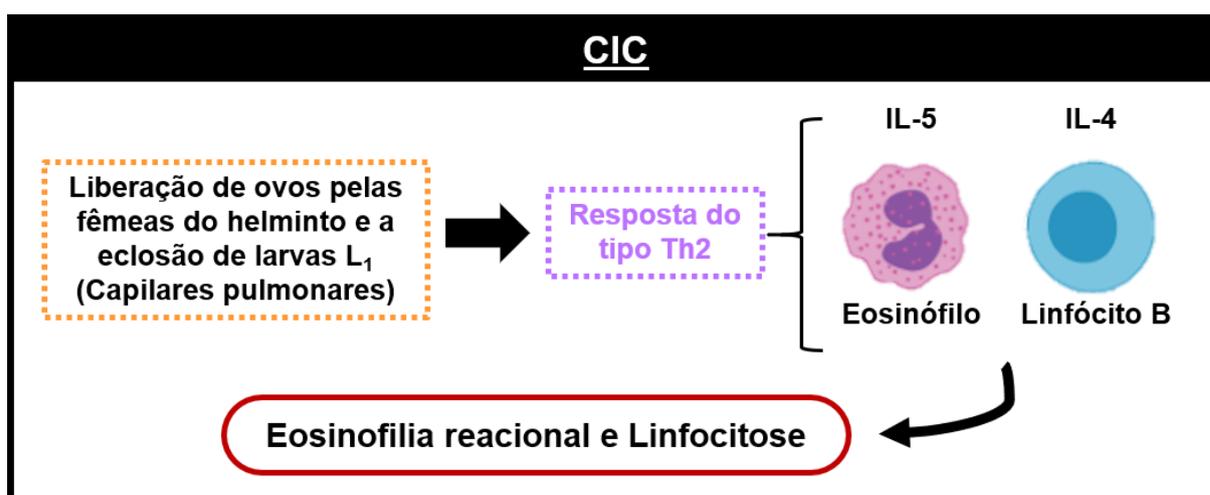


Figura 20: A liberação de ovos por helmintos adultos fêmeas de *Angiostrongylus cantonensis* e a eclosão de larvas L₁, nos capilares pulmonares, estimularam uma resposta do tipo Th2, em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados, havendo liberação de interleucinas IL-5 e IL-4, que estão relacionadas à indução de eosinófilos e linfócitos B, respectivamente, ocasionando em uma eosinofilia reacional e linfocitose (BioRender, 2020).

Foi verificado que os roedores com 50 dias p.i apresentaram neutrofilia. Durante um processo inflamatório, os neutrófilos são as primeiras células a alcançarem o sítio de inflamação, devido a sua característica quimiotática, que faz com que essas células sejam atraídas por produtos de secreção/excreção liberados pelo parasito (Garcia-Navarro, 2005). Apesar de ter uma importância maior no

combate a infecções bacterianas, os neutrófilos também são ativados e recrutados ao sítio onde o parasito e seus ovos ou larvas estão alojados (Morimoto et al., 2004; Anthony et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado a atuação dos neutrófilos na eliminação de larvas de *Strongyloides stercoralis* Bavay 1876, juntamente com os eosinófilos (Galioto et al., 2006). Além disso, uma vez alcançando o local de infecção, os neutrófilos, interagindo com outros tipos celulares, promovem danos aos helmintos através da liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases (Anthony, 2007). Em um estudo de 2012, Dracz observou neutrofilia em cães coinfectados por *A. vasorum* e *Ancylostoma caninum* Ercolani (1859), sugerindo que essa associação possa ter desencadeado a liberação do estoque de neutrófilos (S), pela medula óssea, a fim de conter, inicialmente, o processo infeccioso. Resultados semelhantes foram observados também em *R. norvegicus* (Wistar) infectados, experimentalmente, por *A. cantonensis* (Garcia et al., 2014a) e em cães com angiostrongilíase canina (Migaud et al., 1992; Bourdeaux, 1993; Dracz, 2012), concordando com os dados observados no presente trabalho.



Figura 21: *Rattus norvegicus* (Wistar), infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, apresentaram neutrofilia. Esse efeito pode ter sido uma reação aos ovos e às larvas do parasito, uma vez que os neutrófilos são responsáveis, entre outras funções, pela eliminação de larvas helmínticas, além de danos ao parasito adulto, através da liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases (BioRender, 2020).

6.1.2 Análises bioquímicas

6.1.2.1 Testes de função hepática

A infecção por *A. cantonensis* promoveu aumento nas atividades séricas das enzimas: AST, durante a fase crônica, e ALT nas fases aguda e crônica, indicando

dano tecidual. Essas enzimas estão presentes em diversos órgãos, incluindo o fígado, onde estão disponíveis em maior quantidade. Por serem componentes predominantemente intracelulares, seus níveis encontram-se baixos, no plasma sanguíneo (Kaplan, 1987). Entretanto, quando há dano tecidual intra ou extra-hepático, pode ocorrer o extravasamento dessas enzimas, elevando sua atividade no sangue. Os resultados observados, no presente trabalho, estão de acordo com aqueles encontrados por Garcia et al. (2014a; b), que detectaram aumento da atividade da AST e da ALT em diferentes semanas após infecção por *A. cantonensis*. Além disso, outros helmintos também promovem alterações semelhantes como demonstrado em modelos experimentais como *Mus musculus* (Swiss) e *R. norvegicus* (Wistar), infectados, respectivamente, pelos trematódeos *S. mansoni* e *E. paraensei* (Couto et al., 2008; Garcia et al., 2011). Esses autores sugerem que tais alterações possam ser causadas por produtos excretados/secretados pelas fases larvais e adulta do helminto, aumentando a permeabilidade da membrana dos hepatócitos e estimulando, assim, a liberação dessas enzimas para o espaço extracelular e sangue (Rej, 1971; Kaplan, 1987; Burtis et al., 2005).

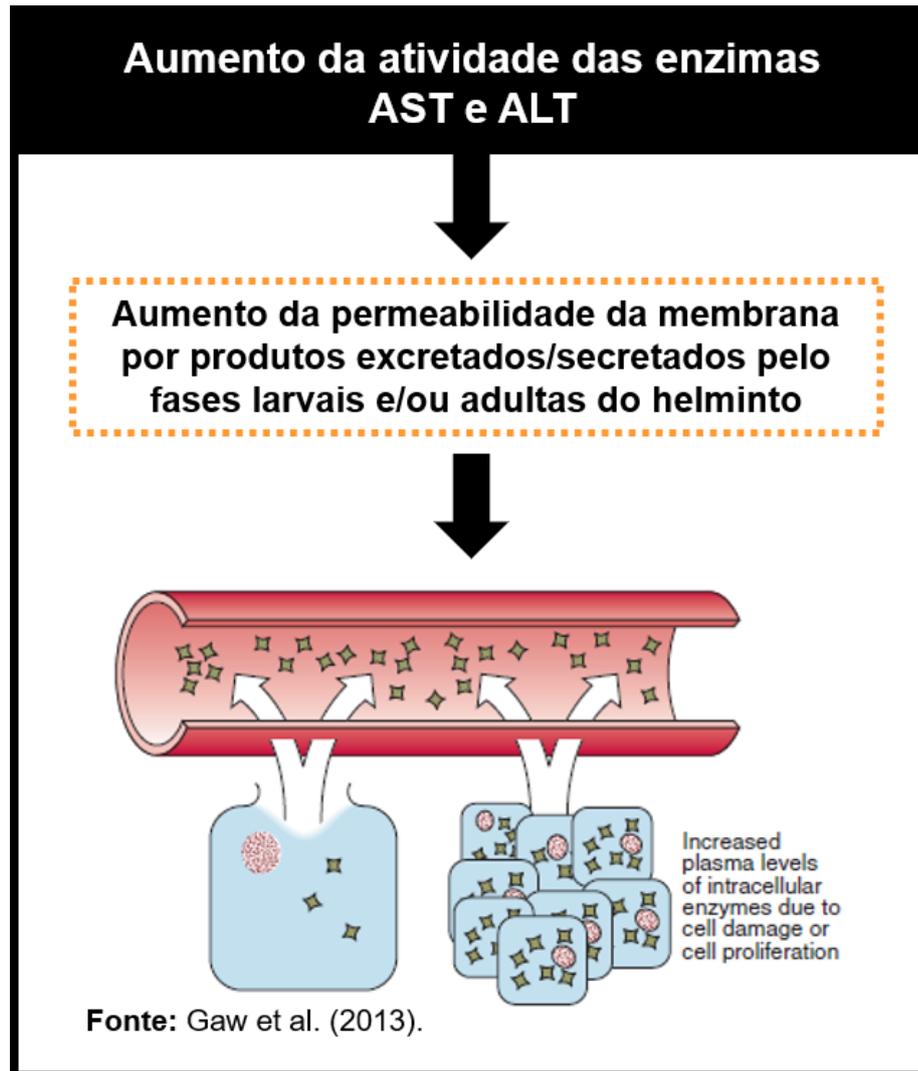


Figura 22: Produtos excretados/secretados por fases larvais e/ou adultas de *Angiostrongylus cantonensis* aumentaram a permeabilidade da membrana de hepatócitos, gerando maior atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados pelo parasito.

A atividade da enzima fosfatase alcalina (FA), no plasma sanguíneo, mostrou-se alterada devido à infecção crônica por *A. cantonensis*, apontando uma possível colestase extra ou intra-hepática, ainda que esta enzima também esteja presente em outros tecidos, como: ossos, rins, intestino e placenta (Kaneko, 1989; Jorge et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados em *R. norvegicus* infectados, experimentalmente, por *A. cantonensis*, entre a 1ª e 4ª semanas pós-infecção (Garcia et al., 2014b) e em camundongos (Swiss) infectados por *S. mansoni* (Couto et al., 2008). Segundo os autores, a FA está presente na membrana de diversos tipos celulares, incluindo os hepatócitos, sendo solubilizada quando ocorre

comprometimento do fluxo biliar no fígado, resultando na sua liberação para o plasma sanguíneo e aumentando sua atividade no sangue (Crook, 2012).

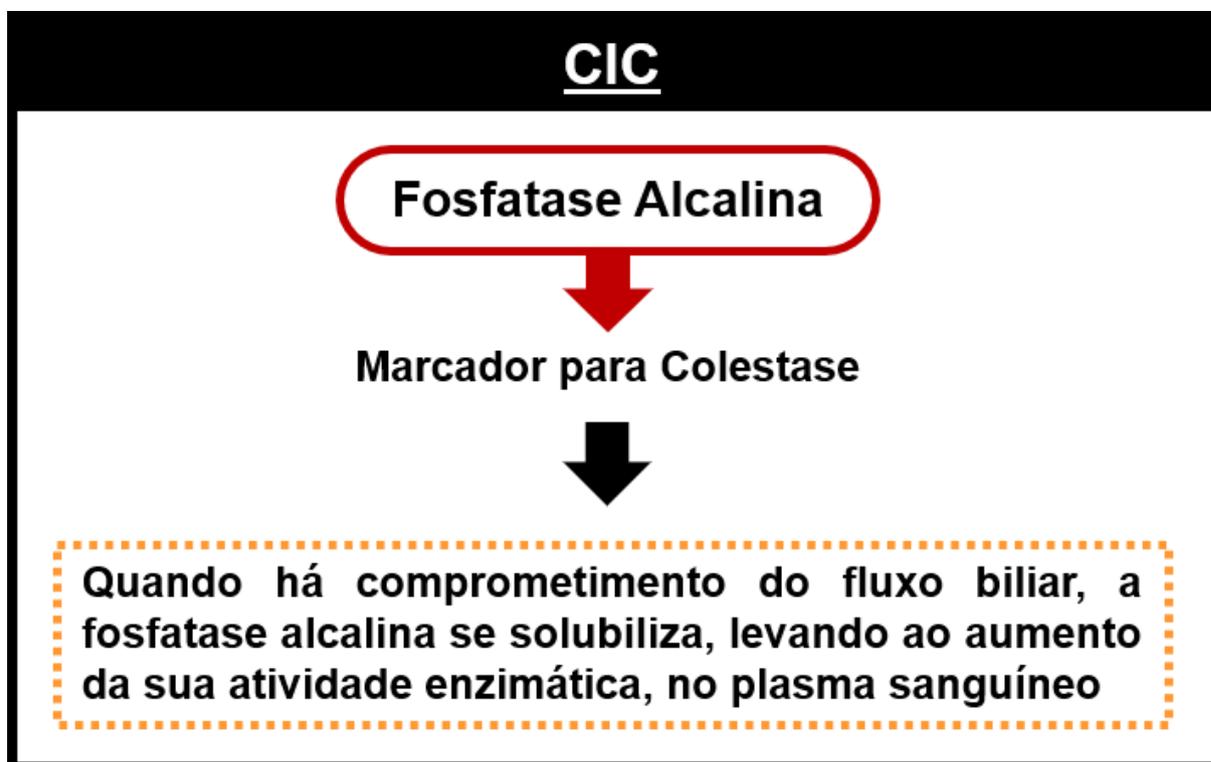


Figura 23: O aumento da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina, observado em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, pode ter sido causado por um comprometimento do fluxo biliar (colestase), solubilizando-a no plasma sanguíneo.

A infecção por *A. cantonensis* promoveu o aumento do nível sérico de bilirrubina total (BT), nos roedores dos grupos CIA e CIC, sugerindo uma possível alteração na capacidade metabólica do fígado. A bilirrubina é um produto proveniente da degradação de eritrócitos senescentes, sendo carregada pela albumina sérica até o fígado, onde é metabolizada e, posteriormente, excretada pelo trato gastrointestinal, evitando-se, dessa forma, que se acumule no sangue (Thapa e Walia, 2007; Newsome et al., 2018). Quando a capacidade metabólica hepática se encontra comprometida, ocorre uma elevação dos níveis de bilirrubina total, no plasma sanguíneo (Trauner et al., 1998; Garcia et al., 2014b). Dados sobre o efeito da infecção por *A. cantonensis* nos níveis séricos de bilirrubina total são escassos, logo, os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para o melhor entendimento acerca disso.

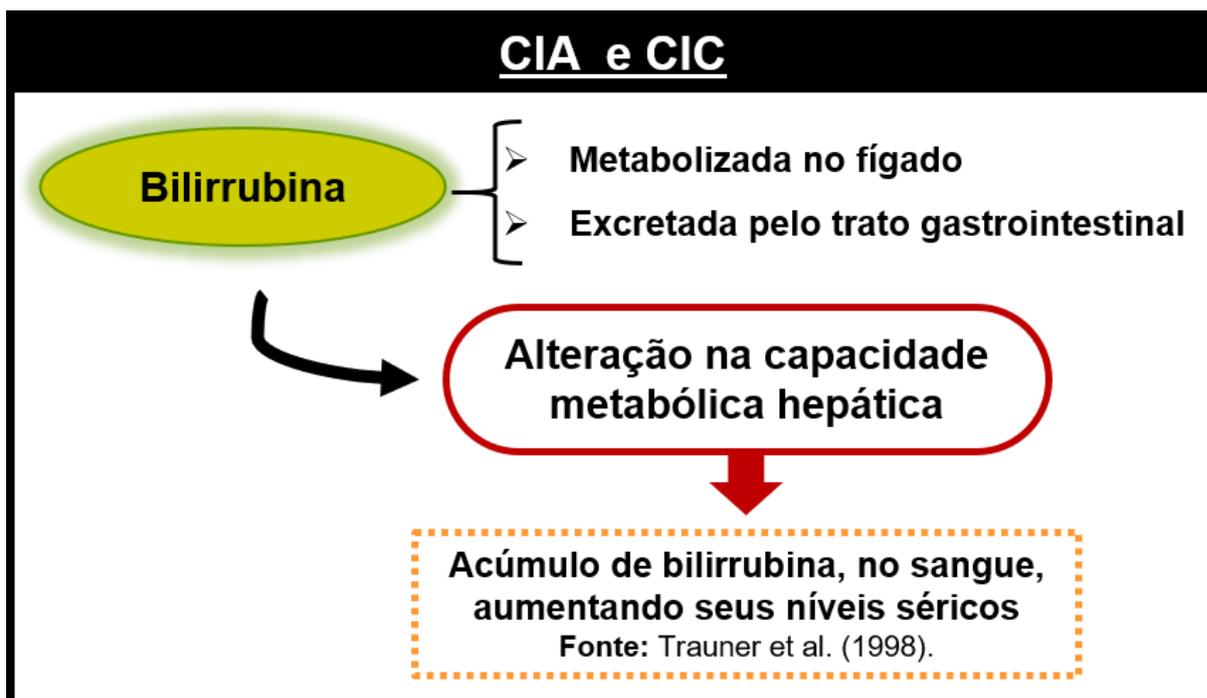


Figura 24: O aumento dos níveis séricos da bilirrubina total (BT), observado em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, pode ter sido ocasionado por uma alteração na capacidade metabólica hepática, uma vez que, em condições fisiológicas normais, tal pigmento é metabolizado pelo fígado e excretado, posteriormente, pelo trato gastrointestinal. Quando ocorre disfunção desse órgão, há o acúmulo da BT, no sangue, elevando seus níveis séricos.

6.1.2.2 Metabolismo de carboidratos

A infecção aguda (CIA) promoveu o aumento da concentração de glicogênio hepático, assemelhando-se ao resultado observado por Garcia et al. (2014b), em ratos Wistar após duas semanas de infecção por *A. cantonensis*. Os autores sugeriram que tal alteração estaria associada a infiltrados inflamatórios detectados em análises histopatológicas do fígado. Moxon e Anderson (1979) observaram grânulos de glicogênio no citoplasma de leucócitos, sugerindo que durante uma infecção, essas células fazem uso de uma maior demanda energética, principalmente aquelas que possuem função fagocítica.

Garcia et al. (2014b) também detectaram hipoglicemia em roedores, no curso das diferentes semanas de infecção, equiparando-se aos resultados encontrados nos animais do grupo CIC. Esse declínio glicêmico pode estar relacionado à demanda energética que o parasito faz uso, para realizar seus processos metabólicos, captando glicose do hospedeiro definitivo. Tem sido, ainda, proposto que a hipoglicemia observada em camundongos (Swiss) infectados por *S. mansoni*

se deve às alterações hepáticas e sua decorrente indução na capacidade de promover a gliconeogênese no fígado, processo no qual há a conversão de precursores não glicídicos (lactato, glicerol e aminoácidos) em glicose (Alleyne e Scullard, 1969; Gobatto, 1993; Couto et al., 2008).

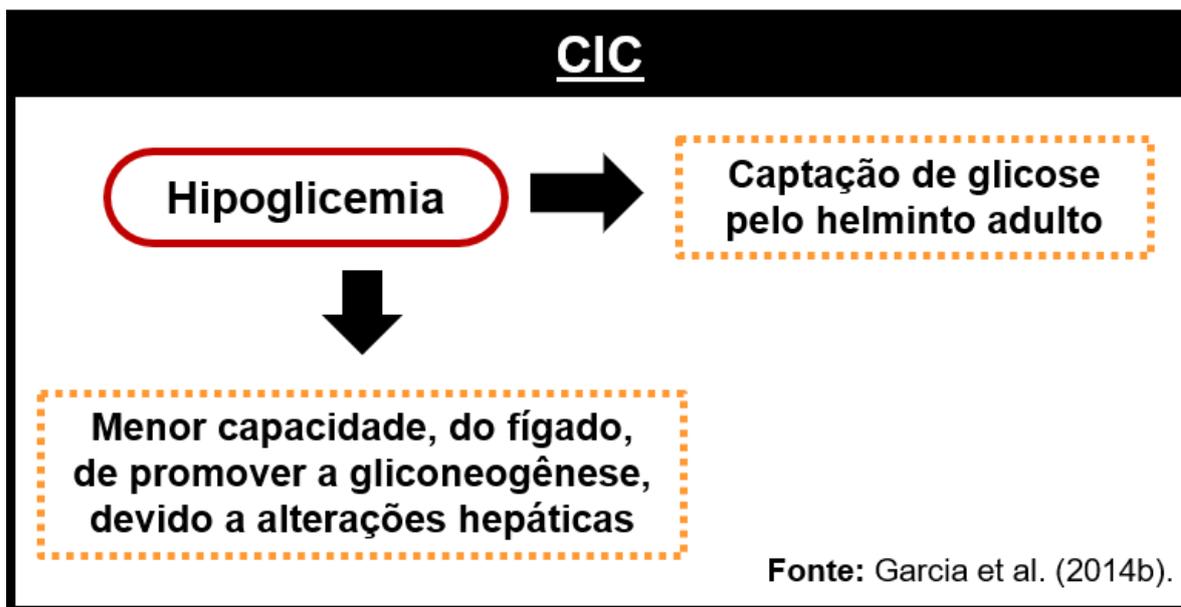


Figura 25: A hipoglicemia observada em *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados, cronicamente, por *Angiostrongylus cantonensis*, pode ser resultado: da presença de helmintos adultos, captando a glicose no sangue, como substrato energético; de uma menor capacidade do fígado de promover a gliconeogênese, devido a alterações hepáticas, também verificadas nesses animais.

6.1.2.3 Proteínas totais

Os níveis de proteínas totais, no plasma sanguíneo dos roedores, apresentaram-se elevados durante a infecção crônica (CIC), por *A. cantonensis*, quando comparada à infecção aguda (CIA) e ao controle limpo (CL). Tem sido relatado que o aumento das proteínas totais séricas esteja associado à elevação concomitante da concentração de albumina, no plasma sanguíneo, uma vez que esse componente representa mais de 50% das proteínas totais presentes no sangue (Santos et al., 2004; Telega, 2018b). Contudo, em nossas análises, os níveis de albumina permaneceram inalterados, não apresentando relação causal com o aumento das proteínas totais. Resultados similares a esses foram observados em animais infectados por nematódeos ou trematódeo sanguíneos, como: em *R. norvegicus* com 8 semanas (56 dias) de infecção por *A. cantonensis* (Garcia et al., 2014b); em cães com angiostrongilíase causada por *A. vasorum* (Cury et al., 2005) e

em camundongos infectados por *S. mansoni* (Couto et al., 2008). Em todos esses trabalhos, os autores sugerem que o aumento dos níveis séricos das proteínas totais decorreu da resposta imunológica contra as respectivas infecções, uma vez que, também foi detectada, em suas análises, a elevação de gamaglobulinas, componentes que englobam, entre outros tipos de proteínas, as imunoglobulinas (anticorpos) que estão diretamente relacionadas a processos inflamatórios (Scott et al., 2005; Silva et al., 2009).

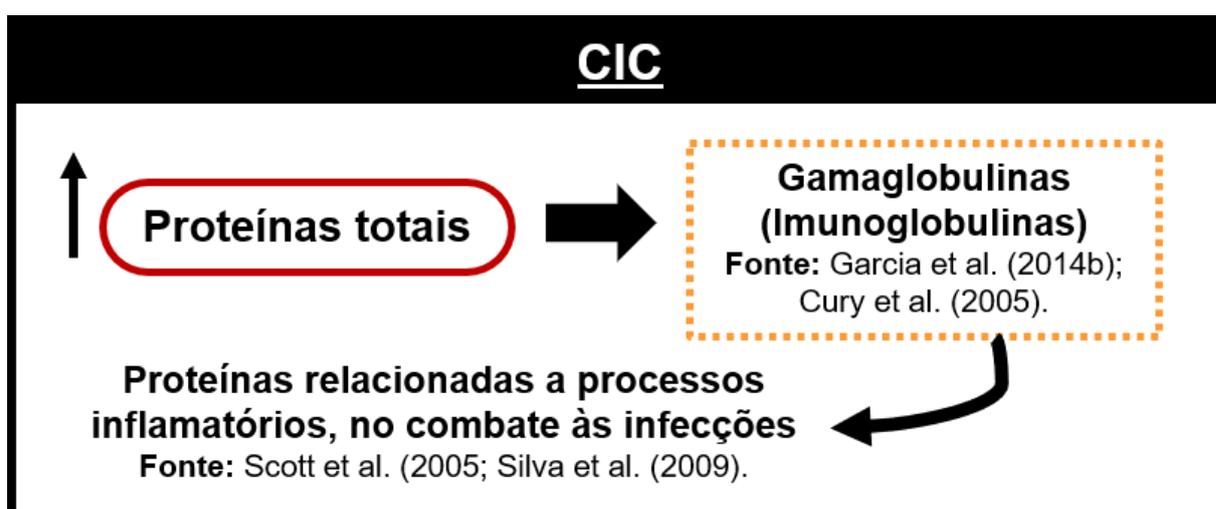


Figura 26: *Rattus norvegicus* (Wistar) infectados cronicamente por *Angiostrongylus cantonensis* apresentaram aumento nos níveis séricos de proteínas totais, causado pelo aumento de gamaglobulinas (imunoglobulinas), no plasma sanguíneo, como uma reação à infecção.

6.1.2.4 Função renal

Os animais infectados por *A. cantonensis* (grupos CIA e CIC) não apresentaram alterações nos níveis séricos de ureia, creatinina e ácido úrico em relação ao grupo controle limpo (CL). São escassos os trabalhos, com roedores, que demonstrem o efeito da infecção por esse nematódeo, sobre tais parâmetros. Cury et al. (2005) também não observaram diferenças significativas nos níveis séricos de ureia e creatinina de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum*, sugerindo que a infecção não tenha promovido alteração na função renal, uma vez que a creatinina é o principal marcador para função glomerular.

6.2 Efeitos da exposição ao herbicida Roundup® em *Rattus norvegicus* (Wistar)

6.2.1 Massa corporal

Os animais expostos diariamente, por quinze dias consecutivos, ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT) apresentaram perda de massa corporal quando comparados ao controle limpo (CL). Jasper et al. (2012) também observaram perda significativa de massa corporal de camundongos (Swiss) expostos, diariamente, por 15 dias, às concentrações 50 e 500 mg/kg do animal, da formulação comercial Roundup Original®. Segundo os autores, tal alteração estaria associada à anemia também detectada nesses animais. Porém, os presentes resultados não demonstraram diferenças significativas no eritrograma dos roedores expostos ao herbicida. Portanto, postulamos que a diminuição da massa corporal dos roedores dos grupos CEHC e CEHT esteja associada a uma possível redução da alimentação, um dos sinais clínicos recorrentes durante intoxicações por pesticidas (OPAS/OMS, 1996; Carneiro, 2015), e que já foi observada por Çağlar e Kolankaya (2008) em ratos Wistar expostos às concentrações de 56 mg/kg e 560 mg/kg de Roundup®.

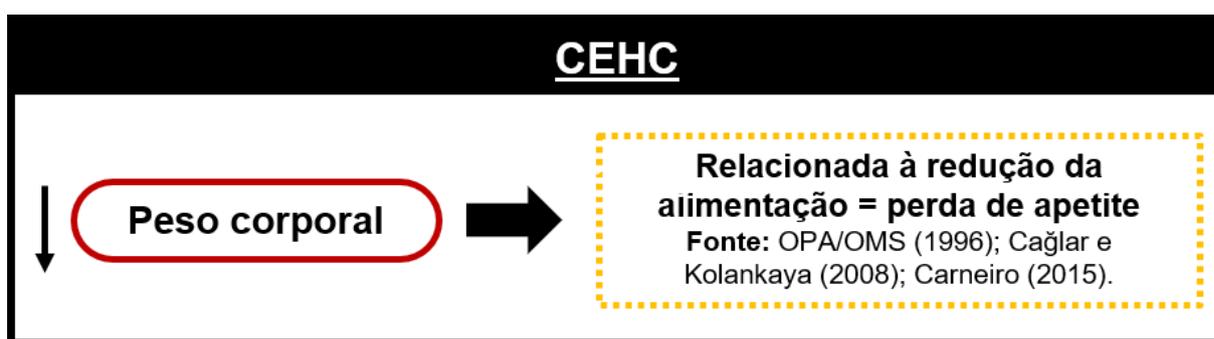


Figura 27: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) apresentaram diminuição do seu peso corporal que pode estar relacionado à redução da alimentação, ou seja, uma perda de apetite, sendo esse, um sinal clínico recorrente durante intoxicações por pesticidas.

6.2.2 Análises hematológicas

6.2.2.1 Eritrograma

Como descrito, anteriormente, não foram observadas alterações no eritrograma dos animais dos grupos CEHC e CEHT. Diferentemente, Jasper et al. (2012) observaram alterações nos parâmetros eritrocitários de camundongos (Swiss) expostos a 50 e 500 mg/kg do animal de Roundup Original®. Sugerimos que as discrepâncias constatadas sejam resultado das diferentes concentrações de glifosato empregadas nos testes. As discrepâncias os resultados desta dissertação e os observados por Jasper et al. (2012) podem ser explicados pelo fato de que a formulação comercial (Roundup®), utilizada no presente trabalho, contém uma concentração de 36% de glifosato, enquanto que esses autores utilizaram um produto com concentração de 41%, podendo, com isso, ter gerado efeito tóxico mais evidente. Segundo os autores, o Roundup Original® pode estimular estresse oxidativo, diminuindo a quantidade do antioxidante glutathione – cuja função é neutralizar esses radicais livres – e, por conta disso, promover o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, uma maior lipoperoxidação – processo no qual ocorre a oxidação dos ácidos graxos presentes em membranas celulares, resultando na sua desestruturação, desequilíbrio metabólico e de permeabilidade, além de morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Contardo-jara et al., 2009; Lushchak et al., 2009; Guilherme et al., 2010; Puértolas et al., 2010; Ortiz-Ordoñez et al., 2011). A partir dessa informação, foi proposto que as alterações eritrocitárias tenham sido causadas por esse aumento de EROs, levando à lipoperoxidação dos eritrócitos e, conseqüentemente, à lise dessas células, visto que as hemácias são sensíveis a mudanças no balanço antioxidante/pro-oxidante.

6.2.2.2 Contagem de plaquetas

No presente trabalho, não foram observadas alterações significativas na quantidade de plaquetas no sangue dos animais expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT). A função desses componentes sanguíneos é a de promover a formação de um tampão plaquetário capaz de impedir o vazamento do sangue, durante uma lesão vascular (Hoffbrand, 2013) e, portanto, sendo responsáveis, junto a outros componentes, por fazer a manutenção do processo hemostático. Efeitos do herbicida glifosato já foram demonstrados por Neiva et al. (2010) que expuseram plaquetas humanas, *in vitro*, à concentração de 500 µg/ml desse ingrediente ativo e

que, em seguida, incubaram-nas em agentes agregadores (Adenosina difosfato, epinefrina e colágeno), para verificar se o glifosato poderia influenciar nesse processo. De fato, foi observado que ele inibiu significativamente a ação agregadora desses três agentes, demonstrando que tal princípio ativo influencia no metabolismo plaquetário, tendo efeito inibitório da hemóstase primária. Ainda que exista tal informação, estudos mais aprofundados, utilizando diferentes concentrações da formulação comercial Roundup® são necessárias, para avaliar sua toxicidade em relação a esses componentes sanguíneos.

6.2.2.3 Leucograma

A exposição ao herbicida Roundup® promoveu neutropenia (segmentados), no grupo CEHC. Os neutrófilos são células pertencentes ao sistema fagocítico e são produzidos pela medula óssea – um tecido líquido-gelatinoso localizado, principalmente, no interior dos ossos axiais e longos (Travlos, 2006; Ribeiro et al., 2011). Em 2009, Prasad et al. detectaram alterações na medula óssea de camundongos (Swiss) expostos às concentrações de 25 e 50 mg/kg do herbicida Roundup®, o que poderia justificar a neutropenia observada em nossos experimentos, como resultado da exposição.

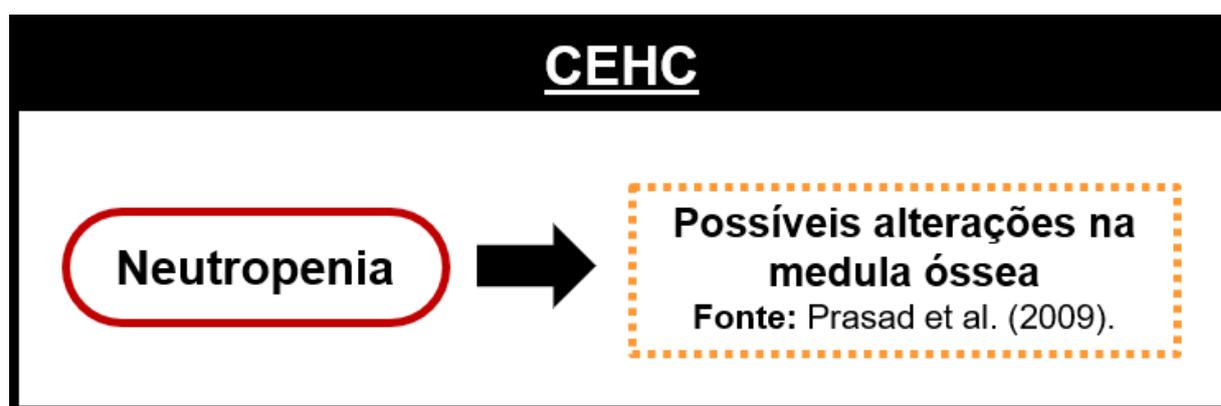


Figura 28: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo (CEHC) apresentaram neutropenia que pode estar associada a alterações na medula óssea.

A linfocitopenia se mostrou presente nos animais do grupo CEHT, sugerindo uma imunodepressão como efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup®. Poucos estudos têm como foco observar a toxicidade desse pesticida sobre tais tipos celulares, porém, já foi demonstrado por Mladinic et al. (2009) que a exposição,

in vitro, de linfócitos humanos à concentração de 580 µg/ml do ingrediente ativo glifosato puro, promoveu o aumento da peroxidação da membrana plasmática dessas células, assim como, apoptose inicial e necrose. Além disso, Defarge et al. (2018), avaliando a toxicidade de diferentes formulações comerciais do glifosato, incluindo duas da marca Roundup® (Roundup GT+ e Roundup WeatherMax®), demonstraram que tais produtos continham diversos metais pesados, incluindo o arsênico, cujos metabólitos podem induzir a quebra de fitas simples de DNA, em linfócitos humanos, *in vitro*. Por conta disso, os resultados, do presente trabalho, podem ser um indicativo de que outras substâncias presentes na formulação comercial Roundup®, além do ingrediente ativo glifosato – tais como o surfactante polioxietileno amina (POEA) e metais pesados residuais, possam ter um papel tóxico sobre células imunológicas, como os linfócitos, ainda que necessite de estudos mais aprofundados avaliando o efeito de cada uma delas, sobre tais células.

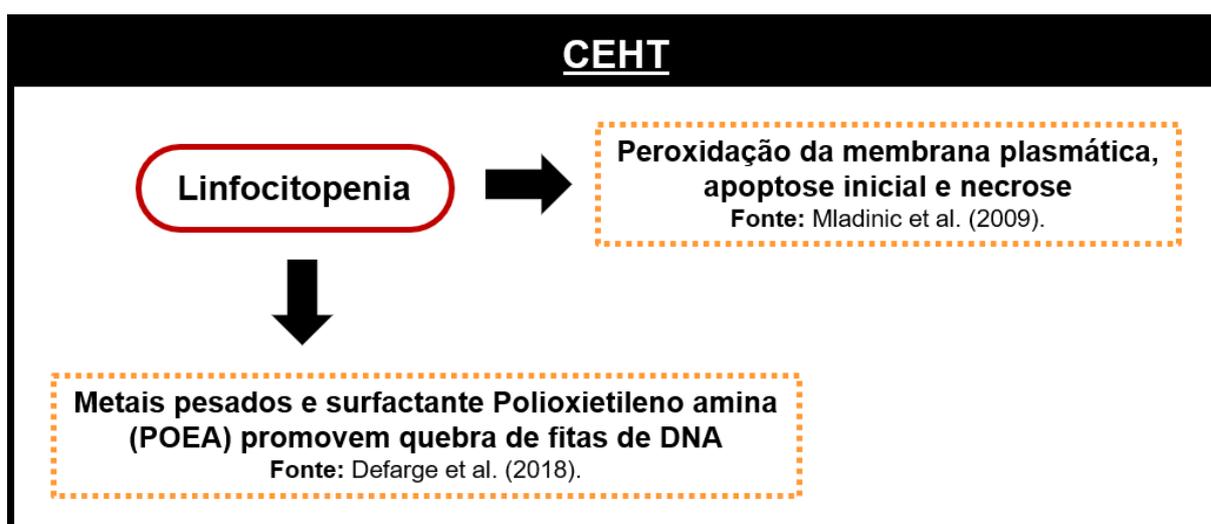


Figura 29: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) apresentaram linfocitopenia que pode estar associada a uma peroxidação de membrana plasmática, resultando em apoptose inicial e necrose de linfócitos. Outra causa possível seria o efeito de metais pesados e do surfactante Polioxietileno amina (POEA), presentes na formulação comercial Roundup®, que têm sido apontados como agentes que promovem a quebra de fitas de DNA desse tipo celular.

6.2.3 Análises bioquímicas

6.2.3.1 Testes de função hepática

Verificamos o declínio da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (FA) no grupo CEHT, podendo ser um indicativo de anemia severa, desnutrição e deficiência de magnésio (Sharma et al., 2014). Porém, os roedores desse grupo não demonstraram alterações no eritrograma, logo, a anemia não seria a causa desse declínio. A possibilidade de desnutrição não é descartada, podendo ser uma causada pela perda de apetite dos animais desse grupo, uma característica comum apresentada por animais intoxicados por pesticidas (OPAS/OMS, 1996; Carneiro, 2015), sendo corroborado pela redução da massa corporal observada durante os ensaios. Ainda é necessário considerar que esse declínio possa estar relacionado também à isoenzima da FA, presente nos osteoblastos (ossos), uma vez que o ingrediente ativo glifosato se acumula, entre outros tecidos, no ósseo (Brewster et al., 1991). A função dessa isoenzima, nos ossos, é a de incorporar moléculas de cálcio (Ca) a eles (De Araujo, 2014). Portanto, para testar tal hipótese, futuramente, análises histopatológicas desse tecido conjuntivo poderiam ser realizadas, em modelos experimentais expostos ao herbicida Roundup®, de modo a detectar desmineralização óssea, comprovando ou não se essa diminuição da FA é de caráter ósseo.

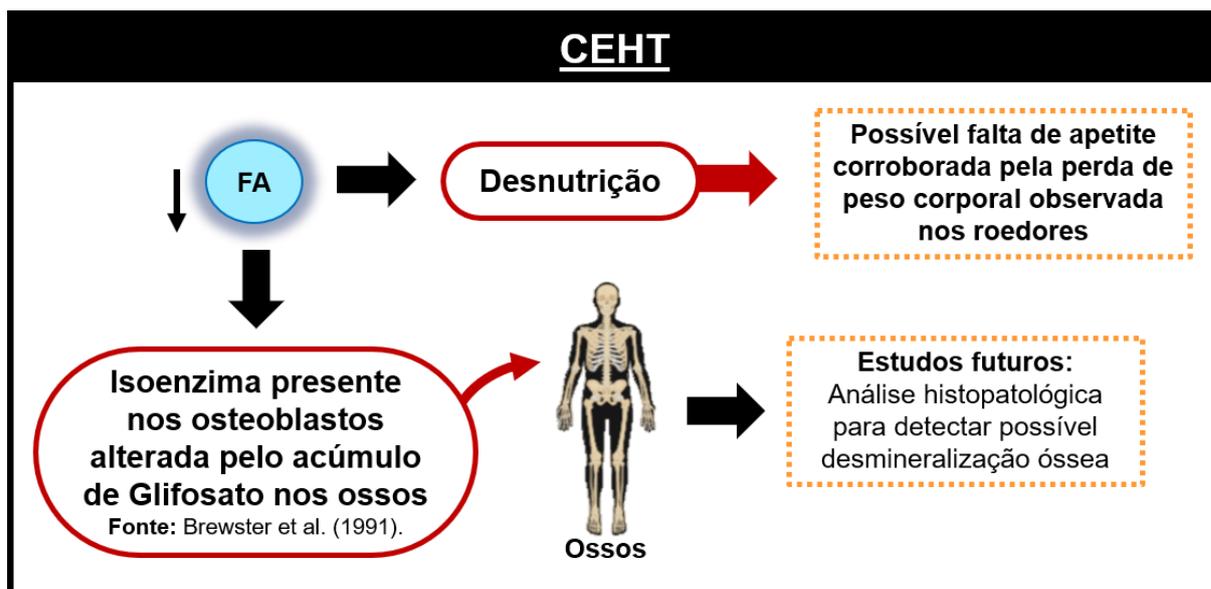


Figura 30: A atividade enzimática sérica da fosfatase alcalina apresentou-se diminuída, nos roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT). São sugeridas as possíveis causas dessa alteração: desnutrição, corroborada pela perda de peso corporal desses animais, sendo consequência de uma possível perda de apetite – sinal clínico comum em casos de intoxicações por pesticidas e; o acúmulo de Glifosato no tecido ósseo, comprometendo a atividade da isoenzima de fosfatase alcalina presente nos ossos. Mas, para essa última hipótese ser comprovada, seria necessária a realização de análises histopatológicas do tecido ósseo, para a detecção de desmineralização dos ossos, uma vez que a fosfatase alcalina tem, entre outras funções, a fixação do cálcio,

Ambos os grupos expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT) apresentaram aumento na atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sugerindo dano tecidual. Apesar de ambas aminotransferases não serem exclusivas de hepatócitos, elas encontram-se em maior quantidade no interior dessas células. Durante uma inflamação ou infecção, a sua membrana citoplasmática pode sofrer distúrbio, havendo o extravasamento dessas enzimas para a corrente sanguínea, resultando em seu aumento e, portanto, indicando tal lesão hepatocelular (Crook, 2012). Resultados semelhantes a esses foram observados em outros estudos, utilizando como modelo experimental ratos (Wistar) e camundongos (Swiss) expostos às concentrações de 4.87, 48.7, 50, 487 e 500 mg/kg de diferentes formulações comerciais à base de glifosato (Benedetti et al., 2004; Jasper et al., 2012) e, segundo os autores, essas alterações foram causadas pelo aumento da lipoperoxidação promovida pelo herbicida (Cavuçoğlu et al. 2011; Jasper et al., 2012). O fígado possui alta atividade antioxidante que o protege de suas reações oxidativas durante a biotransformação de xenobióticos. Porém, Jasper

et al. (2012) propõem que a alta capacidade do herbicida Roundup Original® em estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ultrapassa tal ação protetora que o fígado possui e, assim, promove o aumento da lipoperoxidação. Essa hipótese foi, também, sugerida por Gehin et al. (2006) que demonstrou que o ingrediente ativo glifosato e a formulação comercial Roundup® são capazes de alterar o *status* oxidativo de linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT).

Os grupos CEHC e CEHT apresentaram aumento dos níveis séricos de bilirrubina total, indicando alteração da função hepática. Dados referentes ao efeito do herbicida Roundup®, sobre esse parâmetro, são limitados. Porém, um estudo recente (Owagboriaye et al. 2017) demonstrou aumento dos níveis séricos de bilirrubina total em ratos expostos, oralmente, às concentrações de 50,4 mg/kg e 284,4 mg/kg do herbicida Roundup Original®, quando comparados a um grupo de ratos expostos a somente o princípio ativo, nas mesmas concentrações, sugerindo disfunção hepática. Segundo os autores, a formulação comercial Roundup® pode ter induzido a enzima heme oxigenase, cuja função é promover a degradação do grupo prostético heme. Como já é conhecido, a molécula heme, uma vez dissociada de seu íon de Ferro (Fe⁺), é convertida em bilirrubina total. Portanto, a indução dessa enzima, pelo Roundup®, poderia acarretar o aumento dos níveis de bilirrubina total no sangue. Há também a possibilidade de inativação da conjugação da bilirrubina, no fígado, devido ao efeito tóxico desse herbicida, corroborando o aumento dos níveis séricos dessa substância (Ibrahim et al., 2012). Além disso, Benedetti et al. (2004) demonstraram que a formulação comercial Glyphosate-Biocarb®, cujas concentrações de glifosato e do surfactante POEA correspondem às do produto utilizado no presente trabalho, pode promover hepatotoxicidade em ratos Wistar, podendo, assim, comprometer o metabolismo da bilirrubina.

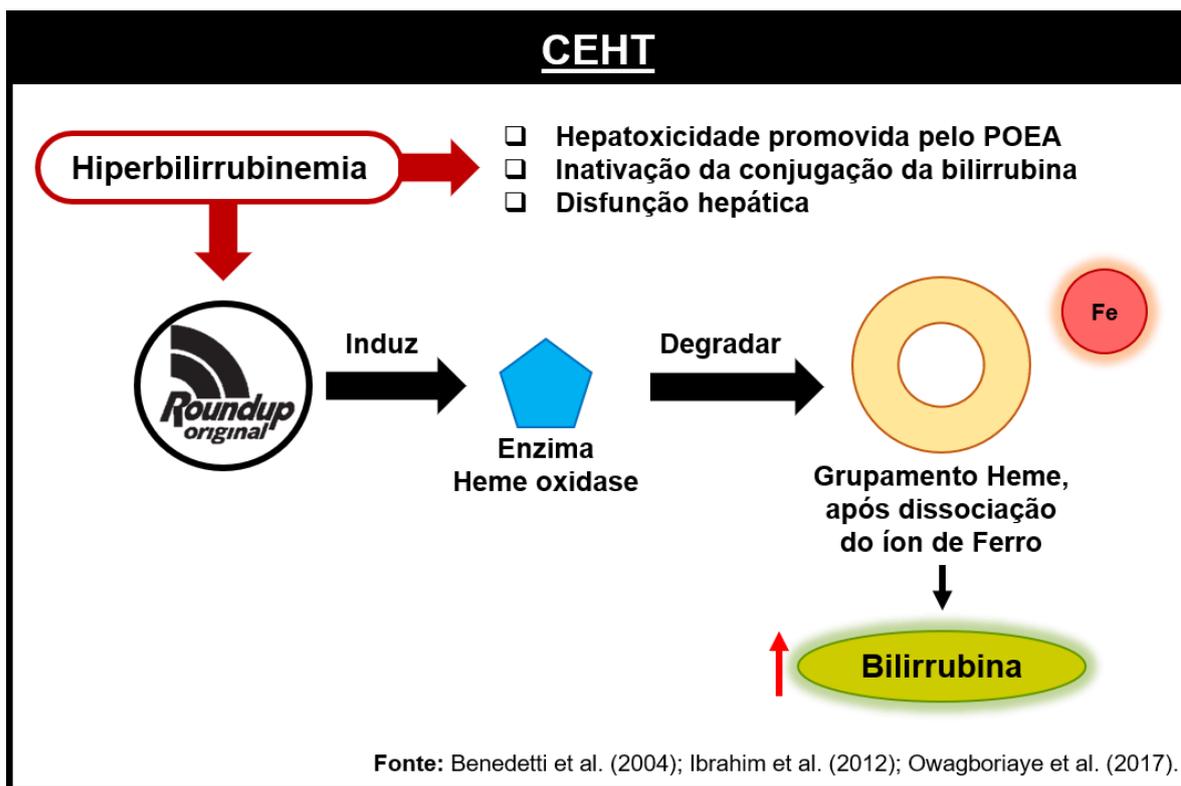


Figura 31: Os roedores do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) apresentaram hiperbilirrubinemia, sendo resultado de uma possível: (1) disfunção hepática; (2) inativação da conjugação da bilirrubina; (3) efeito hepatotóxico que o surfactante Polioxietileno amina (POEA) pode promover e; (4) indução, pelo herbicida Roundup®, da enzima heme oxidase, resultando em maior degradação do grupamento Heme e, conseqüentemente, elevando os níveis séricos da bilirrubina.

6.2.3.2 Proteínas totais e albumina

Os níveis séricos de proteínas totais elevaram-se nos ratos Wistar do grupo CEHT, podendo ser consequência do aumento dos níveis de albumina, no plasma sanguíneo, também observada nesses animais. Além disso, foi observado aumento da concentração dessa proteína no grupo CEHC, demonstrando que a exposição dos roedores ao herbicida Roundup® pode alterar os níveis séricos de albumina. Essa alteração pode ser um indicativo de comprometimento hepático, sendo corroborado pelo extravasamento das enzimas hepáticas (AST, ALT e FA), também observado no presente trabalho. O efeito do glifosato e de suas formulações comerciais, sobre tais parâmetros, é controverso, havendo diferentes resultados, dependendo da concentração utilizada ou se o princípio ativo está sendo aplicado de forma pura ou associado a um surfactante (POEA, por exemplo). El-Shenawy (2009) não observou diferenças significativas nos níveis de proteínas totais e de albumina

em ratos machos Wistar tratados com a concentração subletal de 269,9 mg/kg do herbicida Roundup®. Em contrapartida, Tizhe et al. (2014) observaram aumento significativo da albumina em ratos expostos a concentração de 3,750 mg/kg do princípio ativo glifosato, porém, essa alteração não foi o suficiente para elevar os níveis séricos das proteínas totais, as quais não apresentaram diferença significativa entre o grupo exposto ao herbicida e o controle. Essa hiperalbuminemia, segundo os autores, poderia ser um indicativo de dano renal, uma vez que eles também observaram alterações em biomarcadores para função renal (ureia e creatinina). Apesar de esses resultados serem semelhantes aos observados em nossos ensaios, não houve diferenças significativas em tais biomarcadores renais, nos roedores dos grupos CEHC e CEHT e, por isso, postulamos a hipótese de que o aumento da concentração da albumina no sangue, observado em nossos ensaios, seria em decorrência de sua função antioxidante (Falcão e Japiassú, 2011), como uma resposta ao estresse oxidativo promovido pelo herbicida Roundup®, visto que já foi demonstrado, em trabalhos anteriores, sua capacidade em promover a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gehin et al., 2006; Cavuşoğlu et al., 2011).

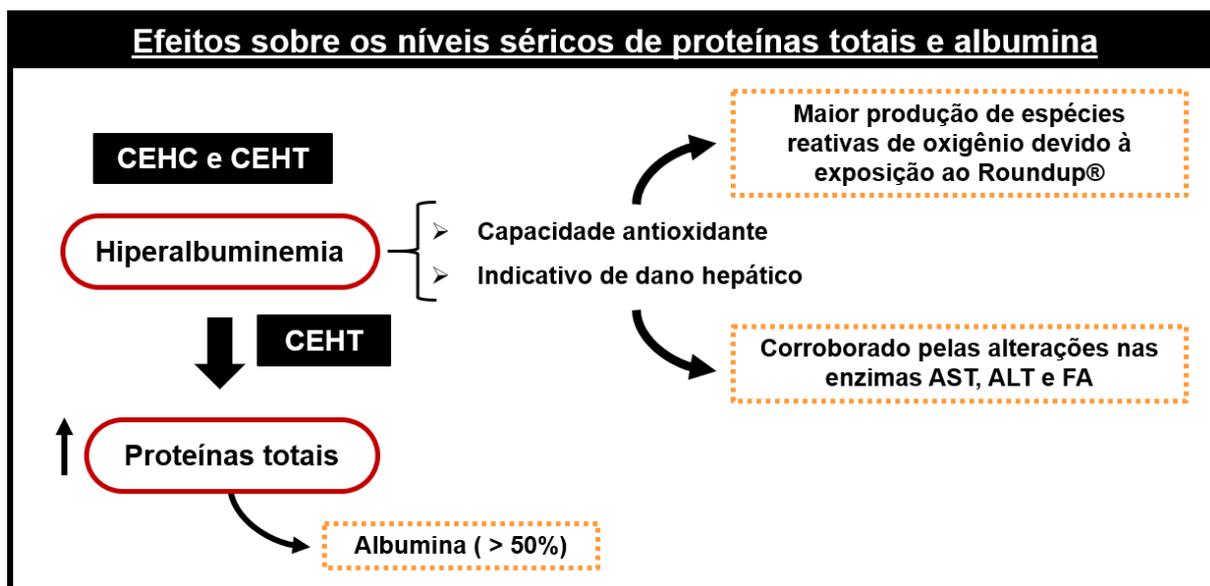


Figura 32: Os roedores somente expostos ao herbicida Roundup® (grupos CEHC e CEHT) apresentaram hiperalbuminemia, podendo ser um indicativo de comprometimento hepático, uma vez que esses animais também apresentaram alterações nas enzimas AST, ALT e FA, que corrobora tal hipótese. Outra possibilidade é de que esse aumento tenha sido uma resposta ao estresse oxidativo que a exposição ao herbicida Roundup® promove, visto que a albumina tem função antioxidante. Nos animais do grupo Controle exposto ao herbicida de efeito tardio (CEHT) foi observado, também, aumento dos níveis séricos das proteínas totais, sendo explicada pela elevação da albumina, no plasma sanguíneo, cuja concentração corresponde a mais de 50% das proteínas totais, no sangue.

6.2.3.3 Metabolismo de carboidratos

Como pode ser observado nos resultados, a exposição ao herbicida Roundup® promoveu alterações no metabolismo de carboidratos, havendo, inicialmente, diminuição da concentração de glicogênio hepático (grupo CEHC), sem alteração significativa dos níveis de glicemia e, posteriormente, aumento de tal reserva hepática (grupo CEHT), acompanhado de hiperglicemia. Salbego et al. (2010) observaram diminuição da concentração de glicogênio hepático em peixes *Leporinus obtusidens* Valenciennes 1837, expostos, experimentalmente, às concentrações de 0,1 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ do herbicida Roundup®. Esses autores sugeriram que tenha ocorrido a degradação do glicogênio hepático em função do estresse promovido pela exposição ao pesticida. Tal hipótese poderia explicar nossos dados, demonstrando que o processo de glicogenólise sucedeu-se gradualmente, resultando em hiperglicemia no estágio mais tardio da exposição (CEHT) (Owagboriaye et al., 2019). Além disso, o aumento da concentração do glicogênio no fígado dos roedores do grupo CEHT pode ter decorrido da

manutenção do organismo em manter a homeostase, havendo indução fisiológica do processo de gliconeogênese para suprir a diminuição dessa reserva energética, ocorrida imediatamente após o término da exposição. Para comprovar tais sugestões, é proposto que, futuramente, sejam realizados experimentos nos quais haja a avaliação dos efeitos da exposição do herbicida Roundup® por um período de tempo maior que o determinado no presente trabalho, na tentativa de elucidar se o metabolismo de carboidratos continuaria sendo afetado ou se o organismo alcançaria, de fato, uma homeostase, superando os efeitos tóxicos do pesticida.

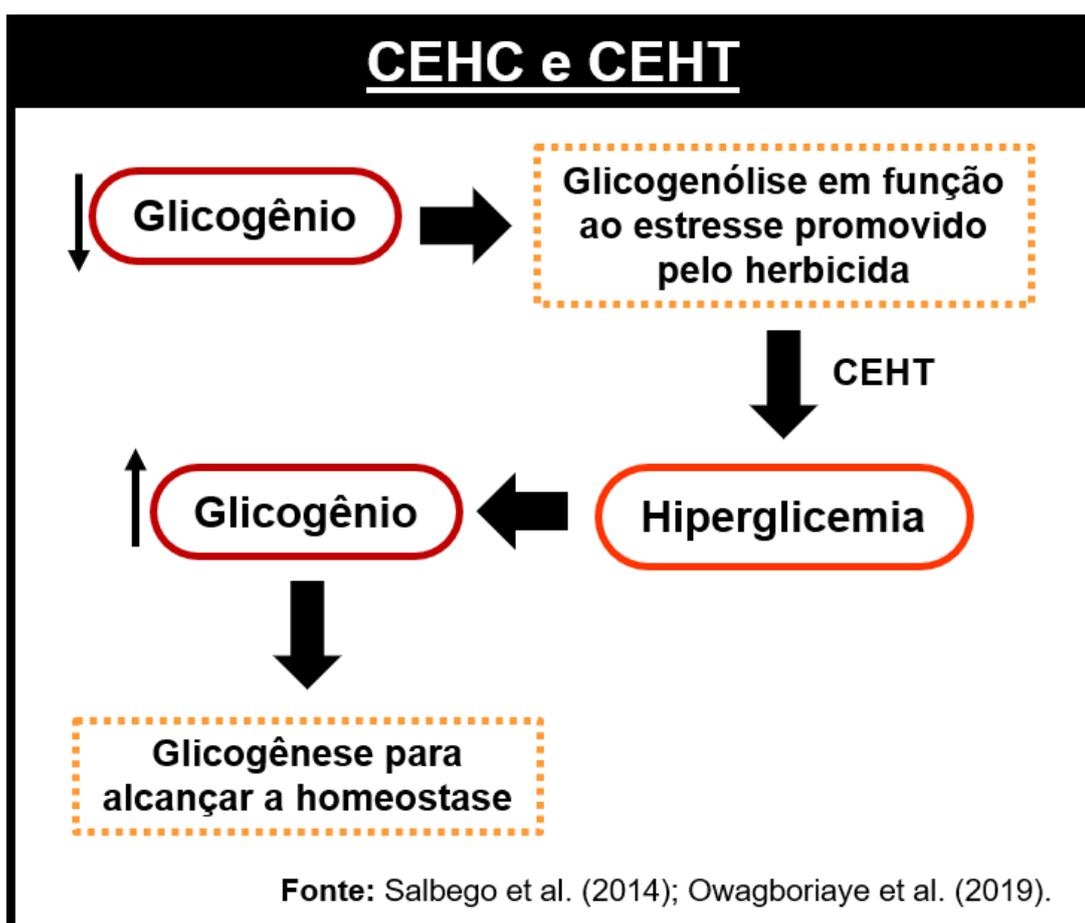


Figura 33: O herbicida Roundup® alterou o metabolismo de carboidratos de *Rattus norvegicus* (Wistar) – logo após o final da exposição, foi observado, nos roedores (grupo Controle exposto ao herbicida de efeito contínuo – CEHC), diminuição da concentração de glicogênio hepático, que pode ter decorrido de uma glicogenólise em função ao estresse promovido pelo herbicida. Tal processo resultou em uma hiperglicemia tardia, observada no grupo com semanas após a exposição (Controle exposto ao herbicida de efeito tardio – CEHT). Para conter esse aumento da glicemia, o organismo dos animais estimulou, de forma fisiológica, o processo de glicogênese, numa tentativa de alcançar a homeostase.

6.2.3.4 Função renal

Os níveis séricos dos metabólitos ureia, creatinina e ácido úrico não se apresentaram alterados nos roedores expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT). Os resultados encontrados na literatura, sobre tais parâmetros, são controversos. Cağlar e Kolankaya (2008), expondo ratos Wistar às concentrações de 56 mg/kg e 560 mg/kg da formulação comercial Roundup®, não observaram diferenças significativas nos níveis de creatinina, no plasma sanguíneo. Em contrapartida, El-Shenawy (2009) detectou uma diminuição dos níveis séricos de creatinina e aumento das concentrações de ureia e ácido úrico em ratos Wistar tratados de forma intraperitoneal com o herbicida Roundup®, na concentração de 269,9 mg/kg. Essa discordância em relação aos nossos resultados pode ser explicada pelo fato de que a formulação comercial utilizada por essa autora apresenta porcentagens de concentrações de glifosato e do surfactante POEA maiores (48% e 52%, respectivamente) que a utilizada em nossos experimentos, podendo promover um efeito tóxico mais acentuado. Segundo a autora, os níveis elevados de ureia estariam relacionados ao aumento do catabolismo proteico e da desaminação de aminoácidos durante a gliconeogênese. Além disso, a elevação dos níveis do ácido úrico, no plasma sanguíneo, pode estar ligada ao efeito antioxidante que esse metabólito possui (Niето et al., 2000), sendo uma resposta ao aumento do estresse oxidativo promovido pelo herbicida Roundup®.

6.3 Efeitos da associação da exposição ao herbicida Roundup® com a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em *Rattus norvegicus* (Wistar)

Para demonstrar se os efeitos da exposição ao herbicida Roundup® são sinérgicos ou antagônicos a aqueles promovidos pela infecção por *A. cantonensis*, foram realizadas análises estatísticas que pudessem detectar possíveis diferenças significativas entre os grupos CIA, CIC, CEHC e CEHT. Posteriormente, foram avaliados os efeitos, nos roedores, promovidos pela associação da infecção por *A. cantonensis* com a exposição ao herbicida Roundup® (grupos GIE e GEI).

6.3.1 Pesagem dos órgãos

Em relação à massa corporal, nenhum dos grupos controles (CIA, CIC, CEHC e CEHT) apresentaram diferença significativa, quando comparados entre si. Porém, o grupo GIE demonstrou maior massa corporal que os grupos CIA e CEHC, não havendo, necessariamente, um ganho de massa pelos roedores, uma vez que o resultado desse grupo (GIE) se assemelha ao do grupo CL. Essa diferença observada pode explicada pelo fato de que os roedores de ambos os grupos CIA e CEHC apresentaram declínio na sua massa corporal, ampliando tal discrepância. Como abordado, anteriormente, animais expostos a agrotóxicos podem perder massa corporal por falta de apetite, um sintoma comum durante intoxicação por essas substâncias (OPAS/OMS, 1996; Çağlar e Kolankaya, 2008; Jasper et al., 2012; Carneiro, 2015).

Entre os grupos controles, somente o baço sofreu alteração na sua massa, havendo aumento no grupo CIC, em relação aos grupos CEHC e CEHT, os quais assemelham-se ao resultado do grupo CL. Essa diferença estatisticamente significativa indica, portanto, que apenas a infecção crônica por *A. cantonensis* promove alteração, em relação à massa desse órgão. Como explicado, anteriormente, o aumento do baço pode ser observado em infecções helmínticas, uma vez que ele desempenha um papel importante na eliminação de organismos e antígenos estranhos (Stevens et al., 2000; Mebius e Kraal, 2005) e, no caso de ratos infectados por *A. cantonensis*, esse aumento pode decorrer de uma resposta do hospedeiro aos antígenos liberados pelos helmintos adultos, culminando em uma hiperplasia esplênica (Chapman et al., 2020). Em relação ao herbicida, o estudo de Wang et al. (2019) demonstrou que a concentração 1000 mg/L do princípio ativo glifosato pode levar a uma esplenomegalia em camundongos C57Bl/6, após um período longo de exposição (72 semanas). Esse dado indica que o baço pode ser afetado pelo herbicida, porém, somente em situações em que haja uma concentração maior que a utilizada no presente trabalho, assim como por um período de exposição prolongado. Os grupos nos quais houve a associação da infecção com a exposição ao agrotóxico (GIE e GEI) também apresentaram aumento do baço, quando comparados aos grupos CL, CIA, CEHC e CEHT, demonstrando resultados parecidos com o grupo CIC, sugerindo, portanto, que essa alteração tenha sido provocada pela infecção crônica.

Ao que diz respeito à massa do fígado, não houve diferença significativa entre os grupos controles CIA, CIC, CEHC e CEHT, sendo o esperado, uma vez que nenhum desses grupos apresentou, em relação ao CL, alteração nesse parâmetro. Porém, foi observado que a massa do fígado, dos animais do grupo GIE, aumentou, quando comparado aos dos grupos CL e CIA, indicando que a associação da infecção à exposição ao herbicida Roundup® induz o aumento desse órgão. Estudos já demonstraram que roedores expostos a herbicidas à base de glifosato apresentam variações na massa do fígado, de acordo com a concentração administrada e a espécie utilizada como modelo experimental (Milić et al., 2018), podendo haver diminuição, aumento (NTP, 1992) ou permanecer semelhante ao grupo controle (Cağlar e Kolankaya, 2008; El-Shenawy, 2009). Segundo Milić et al. (2018), o aumento observado pode estar relacionado a uma esteatose hepática não alcoólica (Samsel e Senef, 2013; Mesnage et al. 2017). Outro dado importante é que Garcia et al. (2014b) também observaram fígado com massa aumentada nos roedores infectados por *A. cantonensis*, durante a 8ª semana p.i., sugerindo que a alta concentração de glicogênio, detectada por histopatologia, nesses animais, poderia ser a causa para a hepatomegalia constatada. Portanto, preconizamos que, ainda que separadamente, a infecção por *A. cantonensis* e a exposição ao herbicida Roundup® tenham promovido o aumento da massa do fígado, quando associados, ambos podem promover tal alteração.

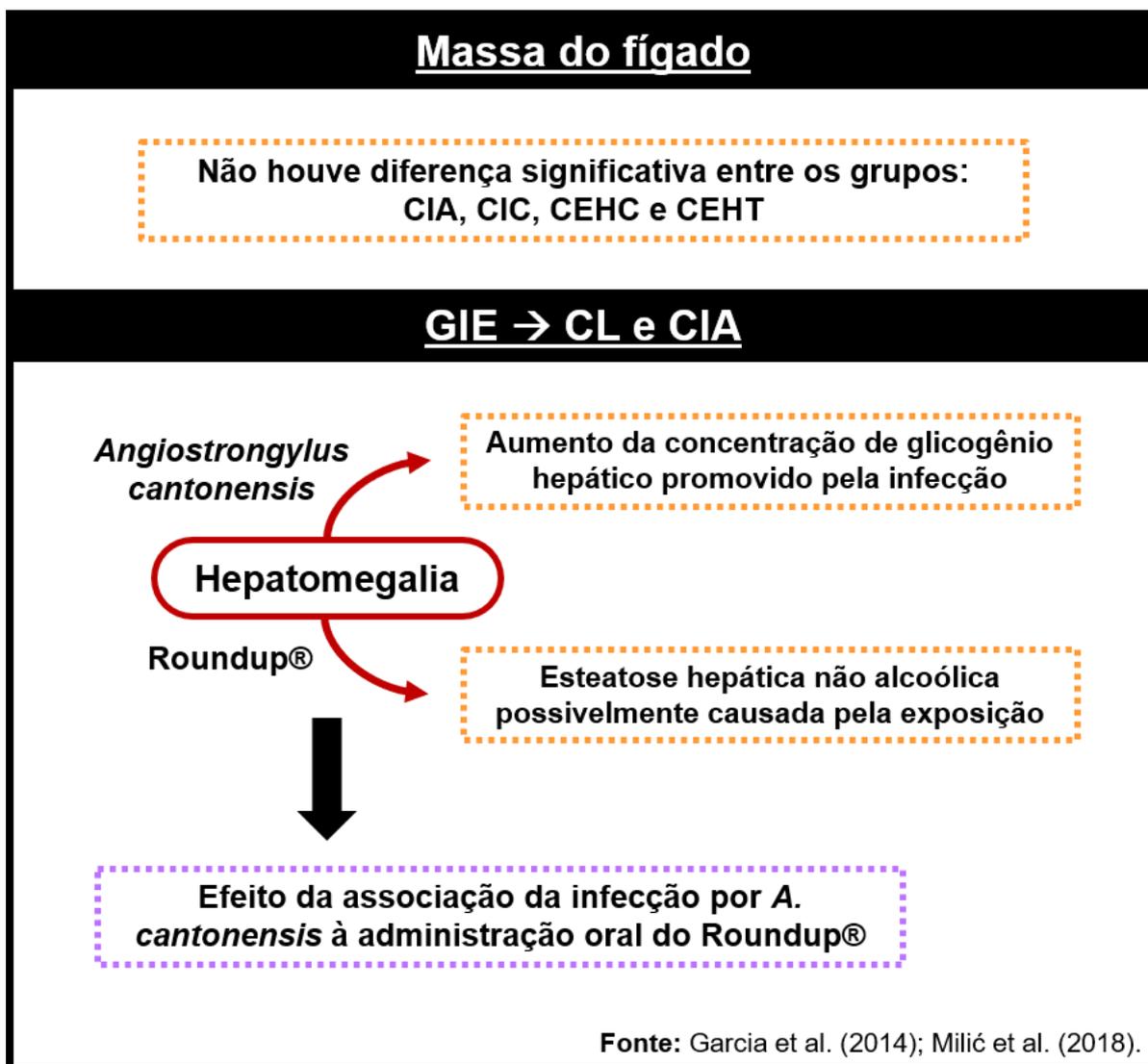


Figura 34: Nenhum dos roedores dos grupos controle de infecções aguda e crônica (CIA e CIC, respectivamente) e controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio (CEHC e CEHT, nessa ordem) apresentaram alteração na massa do fígado. Entretanto, no grupo associado (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE), foi observada hepatomegalia, podendo ser elucidada pelo aumento da concentração de glicogênio hepático, promovido pela infecção por *Angiostrongylus cantonensis*, além de uma possível esteatose hepática não alcoólica causada pela exposição ao pesticida. Tal alteração demonstra que quando associados, esses dois agentes provocam aumento da massa do fígado.

Em relação à massa dos rins, os controles CIA, CIC, CEHC e CEHT não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si, assim como ocorreu com os grupos GIE e GEI, em relação aos demais grupos experimentais.

6.3.2 Análises hematológicas

6.3.2.1 Eritrograma

Não foram observadas alterações evidentes nos grupos CIA, CEHC e CEHT, em relação ao eritrograma. Em contrapartida, a infecção crônica (CIC) promoveu a diminuição de diversos parâmetros eritrocitários, quando comparado aos grupos CEHC e CEHT, os quais demonstraram-se equivalentes aos resultados observados nos animais do controle limpo (CL). A partir de tais informações, podemos sugerir que a exposição ao herbicida Roundup® não apresenta efeitos sinérgicos e tampouco antagônicos àqueles promovidos pela infecção e, portanto, a princípio, o pesticida não teria influência na infecção, no que se refere aos parâmetros eritrocitários, durante uma associação desses dois fatores (Infecção por *A. cantonensis* – exposição à concentração de 500 mg/kg de herbicida Roundup®). De fato, os animais dos grupos em que houve tal associação (GIE e GEI) apresentaram alterações no eritrograma semelhantes aos da infecção crônica, indicando que, nas condições abordadas no presente trabalho, a exposição ao herbicida Roundup® não potencializa e nem reduz os efeitos da infecção por *A. cantonensis*, no que diz respeito a esses parâmetros hematológicos.

Até o momento, não há trabalhos que apresentem uma abordagem semelhante à do presente estudo, onde é verificada a influência que a exposição ao herbicida Roundup® possui sobre hospedeiros definitivos de helmintos. Por isso, para se obter mais informações acerca dos possíveis efeitos dessa associação, sugere-se a realização de ensaios em que sejam testadas diferentes concentrações de formulações comerciais do glifosato, em roedores infectados por *A. cantonensis*, uma vez que já existem trabalhos que demonstraram a diminuição de parâmetros eritrocitários de variados modelos experimentais, após a exposição a herbicidas à base de glifosato (Jasper et al., 2012; Owagboriaye et al., 2019), podendo haver efeitos sinérgicos a aqueles promovidos pela infecção.

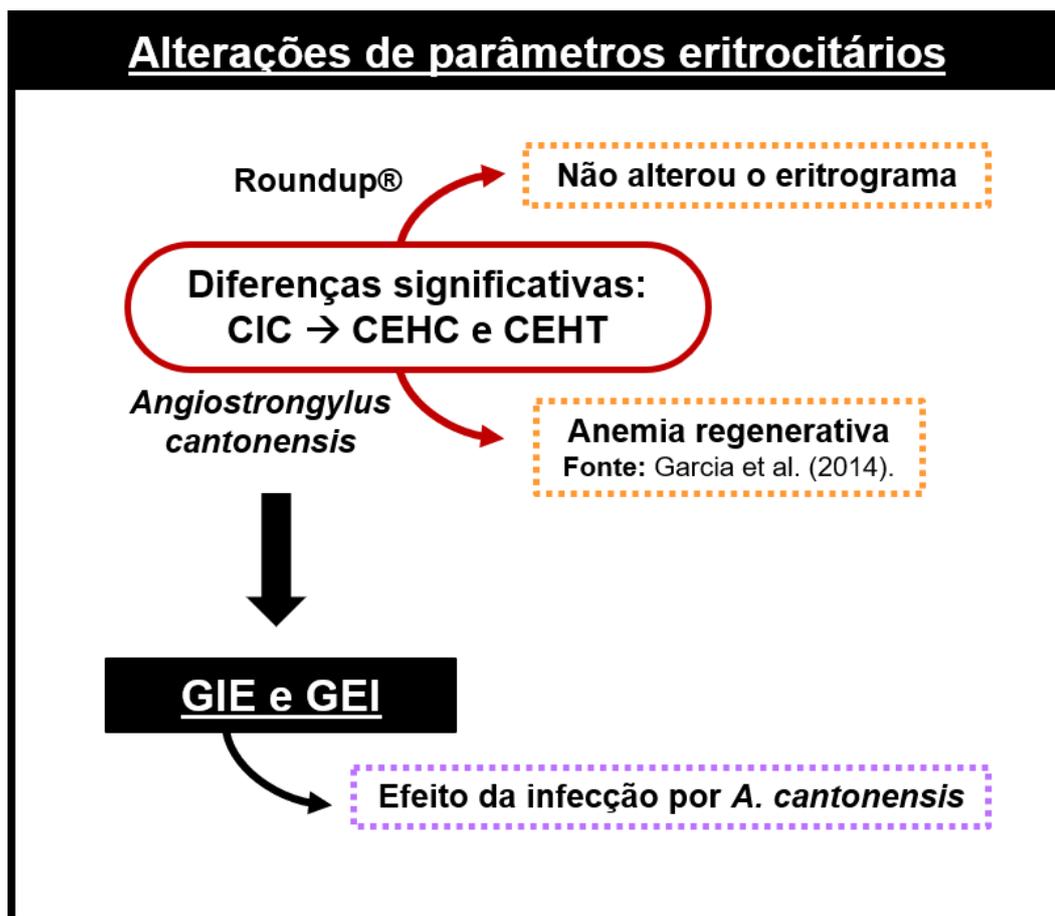


Figura 35: Somente a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* promoveu alterações eritrocitárias em *Rattus norvegicus* (Wistar), indicando que a concentração de 500 mg/kg do animal do herbicida Roundup® não afeta tais parâmetros hematológicos. Portanto, tal alteração, também observada nos grupos associados (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI) está relacionada à infecção.

6.3.2.2 Contagem de plaquetas

Como no eritrograma, os grupos nos quais houve a associação entre a infecção por *A. cantonensis* e a exposição ao herbicida Roundup® (GIE e GEI) demonstraram efeitos semelhantes aos do grupo CIC, parecendo não haver interferência pelo herbicida. De fato, nas análises nas quais houve a comparação estatística entre os controles infectados (CIA e CIC) e os controles expostos ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT), o número de plaquetas, contabilizado no grupo CIC, foi menor em relação aos grupos CEHC e CEHT, que apresentaram resultados semelhantes aos dos animais do grupo controle limpo (CL), indicando que a alteração plaquetária, observada nos grupos GIE e GEI, seja um efeito exclusivo da infecção por *A. cantonensis*. Na literatura, são escassos os trabalhos

que demonstrem os efeitos de formulações comerciais à base de glifosato sobre as plaquetas de roedores e não há informações sobre seus efeitos associados a infecções helmínticas em roedores. Portanto, apesar de os dados, obtidos no presente trabalho, indicarem que a exposição ao herbicida Roundup® não exerce influência na infecção por *A. cantonensis*, em relação à quantidade de plaquetas, sugere-se que sejam realizados ensaios posteriores em que haja a testagem de diferentes concentrações dessa formulação comercial para elucidar se, de fato, o herbicida não possui efeitos sobre a infecção ou se tal efeito seria concentração-dependente.

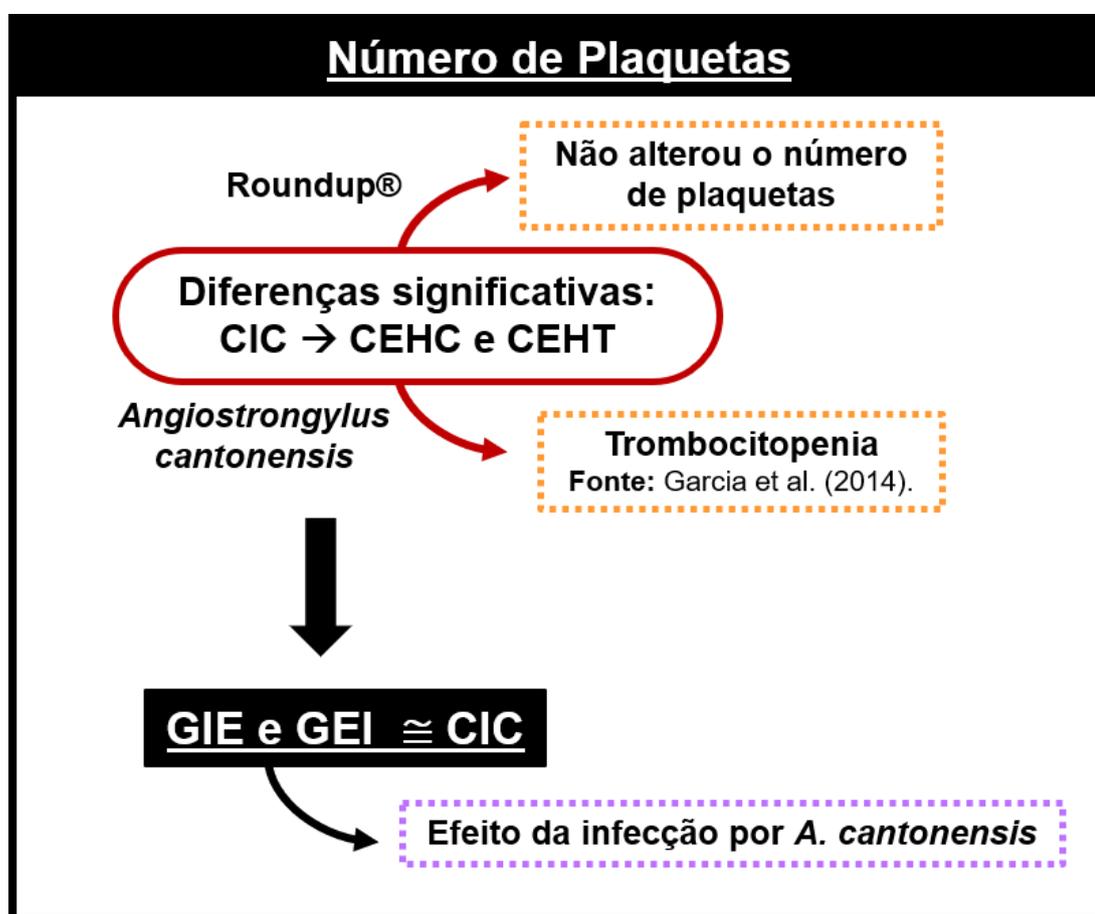


Figura 36: Somente a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* promoveu trombocitopenia em *Rattus norvegicus* (Wistar), indicando que a concentração de 500 mg/kg do animal do herbicida Roundup® não afeta o número de plaquetas. Portanto, tal alteração, também observada nos grupos associados (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI) está relacionada à infecção, uma vez que os resultados obtidos nas análises desses roedores, são semelhantes aos do controle de infecção crônica (CIC).

6.3.2.3 Leucograma

O número total de leucócitos foi influenciado somente pela infecção crônica (grupo CIC), não sendo detectados efeitos pertinentes à exposição ao herbicida Roundup® (grupos CEHC e CEHT). Porém, ainda que só tenham demonstrado diferença significativa em relação aos grupos CEHC e CEHT, os grupos GIE e GEI apresentaram um leve declínio nesse parâmetro, ainda que não significativo, quando comparado ao CIC. Existem diferentes estudos que demonstram os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre o número total de leucócitos, ainda que com resultados controversos. Jasper et al. (2012) não observaram diferença significativa nesse parâmetro, em camundongos (Swiss) expostos à concentração de 500 mg/kg de Roundup Original®. Em contrapartida, Latorre et al. (2013) observaram diminuição do número total de leucócitos em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris* Daudin, 1802) expostos a diferentes concentrações do herbicida Roundup®, durante 60 dias consecutivos, indicando que uma exposição prolongada pode promover efeitos mais evidentes nessas células. A partir dessa informação, é sugerida a hipótese de que esse sutil declínio na quantidade total de leucócitos dos animais dos grupos GIE e GEI, poderia ser melhor evidenciado em ensaios posteriores, nos quais a exposição ao herbicida ao Roundup® seria realizada por um período de tempo maior que o de 15 dias, podendo, talvez, influenciar na infecção por *A. cantonensis*, imunodeprimindo o seu hospedeiro definitivo.

O número de neutrófilos (S) também diminuiu no grupo GIE e aumentou no grupo GEI, em relação aos grupos CIC e CEHC, respectivamente. Os controles CIC e CEHT, quando comparados, demonstraram efeitos antagônicos, havendo aumento e declínio da quantidade desses granulócitos, respectivamente, quando ambos são comparados ao grupo CL. Como essas condições estão presentes no grupo GIE, pode-se sugerir que a diminuição do número de neutrófilos (S) observada nesse grupo foi influenciada pela exposição ao herbicida Roundup®, indicando que esse produto interfere na infecção por *A. cantonensis*. Além disso, fica evidente que se a infecção for posterior à exposição ao herbicida Roundup®, ela promove aumento da quantidade de neutrófilos (S), compensando a redução causada pela exposição.

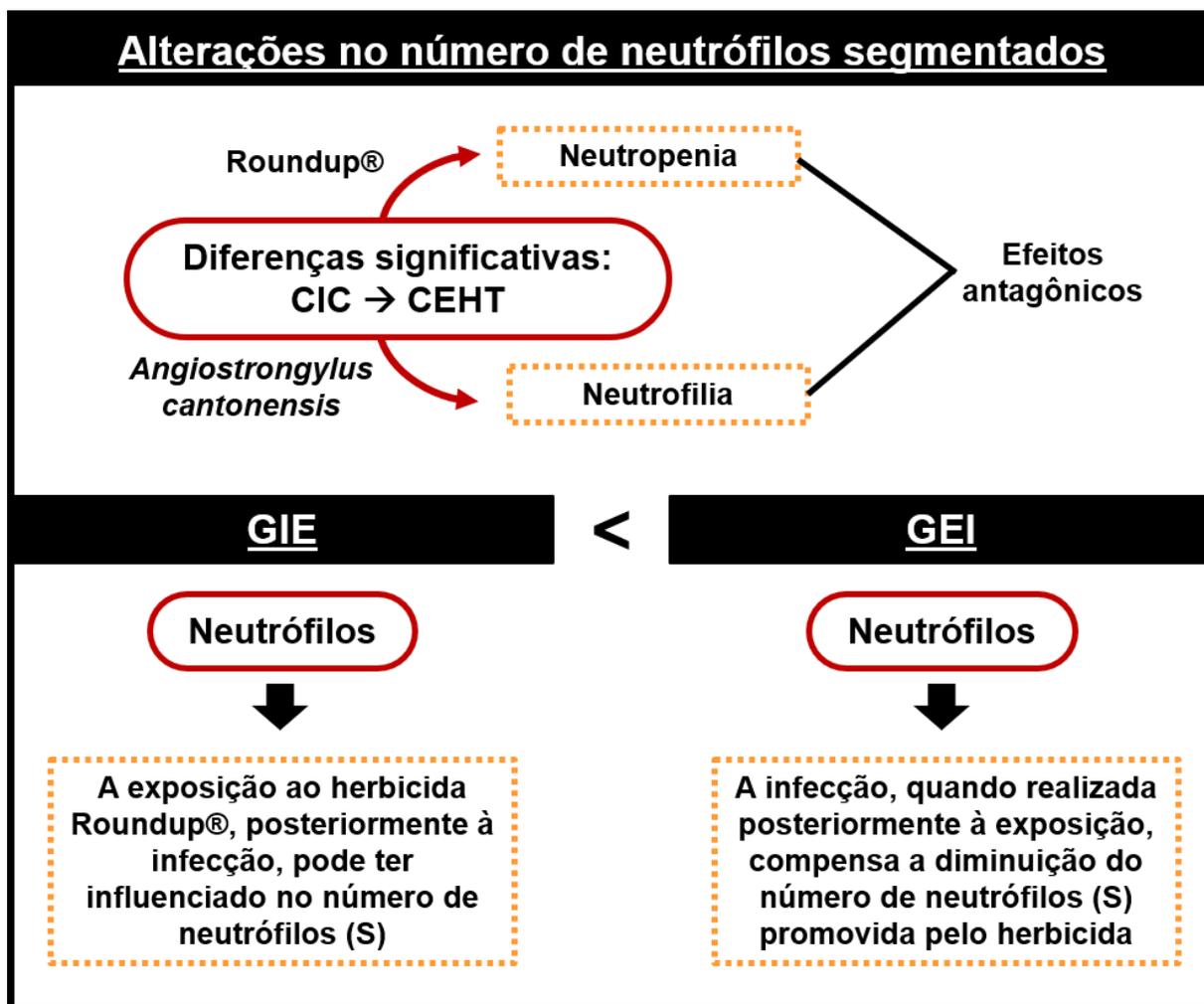


Figura 37: A infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* (grupo CIC) e o efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) promoveram alterações antagônicas no número de neutrófilos de *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo neutrofilia e neutropenia, respectivamente. Quando é observado o grupo onde há a associação desses dois agentes (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE), observa-se que a exposição ao pesticida interfere no efeito da infecção, diminuindo o número de neutrófilos. Quando a ordem dos agentes é inversa (Grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI), ocorre o contrário: a infecção compensa a redução do número desses granulócitos, promovida pela exposição.

Os animais dos grupos GIE e GEI também apresentaram, no plasma sanguíneo, aumento do número de eosinófilos, assemelhando-se ao resultado obtido do grupo CIC. Nas análises já discutidas anteriormente, os animais expostos ao herbicida Roundup® não demonstraram alteração nesse parâmetro, indicando que o efeito observado nos grupos associados (GIE e GEI) está relacionado à infecção crônica. Já foi demonstrado que os eosinófilos são células importantes no combate à infecção por *A. cantonensis* (Wen-Yuan et al., 2013), havendo aumento

expressivo de seu número, no sangue, durante diferentes semanas pós-infecção (Garcia et al., 2014a). De fato, são componentes da resposta imune inata que atuam, juntamente com anticorpos imunoglobulinas E (IgE), no combate a infecções helmínticas. Porém, os eosinófilos também são conhecidos por atuarem em reações alérgicas a diferentes agentes estranhos ao organismo (Abbas, 2014). Baseando-se nessa informação, Kumar et al. (2014) investigaram os efeitos da exposição ao princípio ativo glifosato, nas vias aéreas de camundongos C57BL/6 e observaram aumento da quantidade de eosinófilos nos pulmões desses animais, através de técnicas histopatológicas. Além disso, esses autores também observaram uma maior expressão da interleucina 33 (IL-33), a qual já foi demonstrada estar envolvida com a ativação de eosinófilos *in vitro* (Kondo et al., 2008) e com a indução de respostas inflamatórias alérgicas. Logo, ainda que no presente trabalho não haja indicativo de interferência do herbicida Roundup®, sobre os eosinófilos dos roedores infectados por *A. cantonensis*, sugerimos que em outras condições experimentais e distintas formas de exposição, esse agrotóxico poderia interferir na contagem total dessas células, influenciando na resposta eosinofílica já observada durante a infecção por tal nematódeo.

Foi observado um efeito antagônico sobre o número de linfócitos, entre o grupo CEHT e os grupos infectados (CIA e CIC), havendo diminuição e aumento, respectivamente, da quantidade dessas células, no sangue dos roedores. No caso da associação desses agentes (exposição mais infecção e vice-versa – grupos GIE e GEI), o número de linfócitos também se elevou, porém com pouco menos células que quando observado no grupo CIC, sugerindo que a exposição ao herbicida possa influenciar nesse parâmetro de forma a deprimir o efeito provocado pela infecção crônica. Anteriormente, Kwiatkowska et al. (2016) demonstraram que o glifosato induz, *in vitro*, estresse oxidativo em linfócitos humanos, através da diminuição de seus níveis de adenosina trifosfato (ATP), o que pode resultar em morte celular por necrose e, portanto, diminuir a quantidade desses leucócitos (Nicotera et al., 1998). Associando tal informação aos resultados obtidos no presente trabalho, é sugerida a realização de ensaios nos quais haja um período de exposição prolongado ao herbicida Roundup®, a fim de verificar se, no decorrer do tempo, a diminuição do número de linfócitos se mostraria mais evidente, ou alcançaria seu platô.

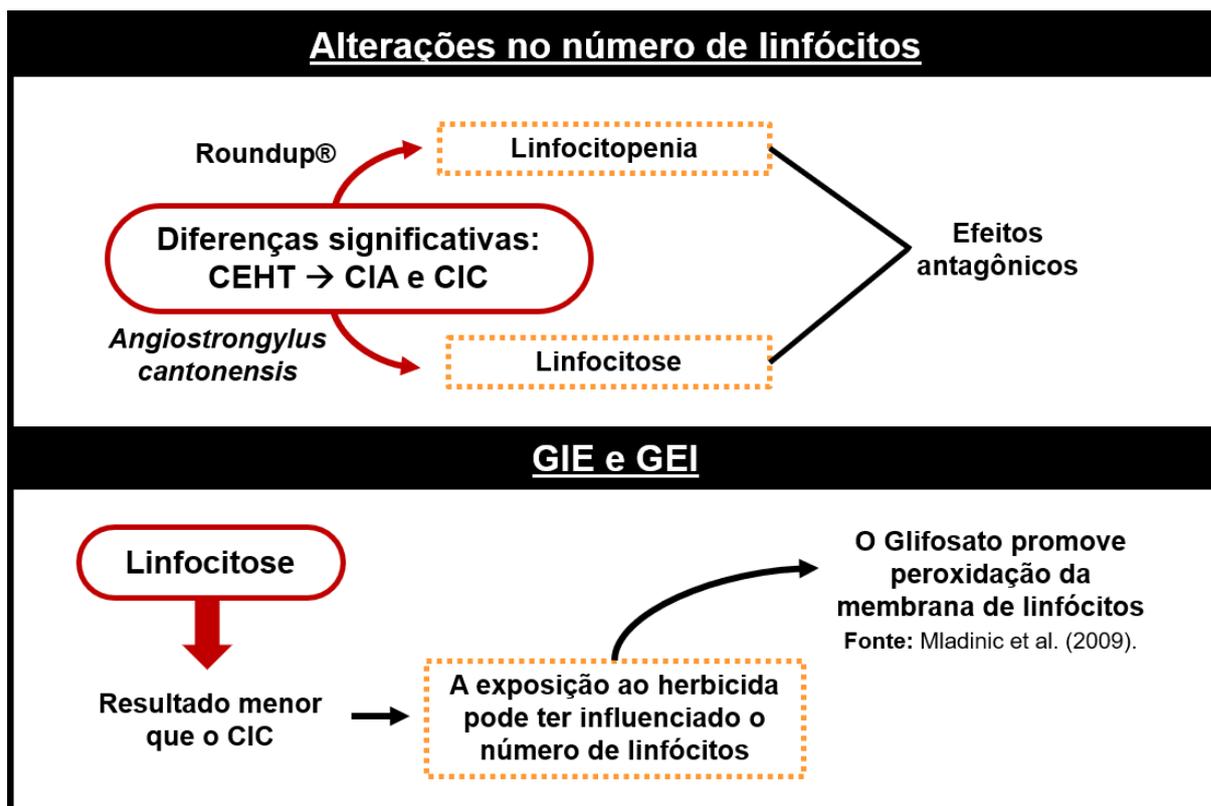


Figura 38: O efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* (grupos CIA e CIC) promoveram alterações antagônicas no número total de linfócitos de *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo linfocitopenia e linfocitose, respectivamente. Quando são observados os grupos onde há a associação desses dois agentes (Grupo primeiramente infectado e depois exposto – GIE e grupo primeiramente exposto e depois infectado – GEI), observa-se também linfocitose, porém, menos evidente que a detectada no grupo controle de infecção crônica (CIC), indicando que a exposição influenciou no efeito promovido pela infecção. Tal resultado pode ser elucidado pelo fato de que o Glifosato provoca peroxidação da membrana de linfócitos, levando à apoptose inicial e necrose dessas células e, portanto, à diminuição de sua quantidade, no plasma sanguíneo.

Os grupos controles infectados (CIA e CIC) e expostos somente ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT), avaliados no presente estudo, não apresentaram diferença significativa no número de monócitos, em relação ao controle limpo, assim como quando comparados entre si. Garcia et al. (2014a) não detectaram alterações evidentes no número de monócitos de ratos Wistar infectados por *A. cantonensis*, corroborando nossos resultados. Além disso, Jasper et al. (2012) não detectaram alterações na quantidade desses leucócitos, em camundongos (Swiss) expostos às concentrações de 50 mg/kg e de 500 mg/kg do herbicida Roundup®. Tais informações sugerem que tanto a infecção por *A. cantonensis*, quanto a exposição ao herbicida não influenciam nessas células imunológicas, ao que diz respeito a sua

quantidade no sangue. Porém, o resultado observado no grupo GEI demonstra aumento do número de monócitos, em relação aos grupos CIA, CEHC e CEHT, sugerindo que apesar de sozinhos não promoverem efeitos evidentes, a infecção e a exposição podem, de forma sinérgica, provocar tal alteração em relação a essas células. Os monócitos são células pertencentes ao sistema fagocitário mononuclear, residentes do sangue, mas que, uma vez migrando para tecidos extravasculares, durante um processo inflamatório, diferenciam-se em macrófagos, células dendríticas e osteoclastos (Gordon e Taylor, 2005). Entre as variadas funções que os monócitos desempenham, tanto em sua forma sanguínea, quanto na forma tecidual, estão a ingestão e destruição, juntamente aos neutrófilos, de microrganismos presentes no sangue e nos demais tecidos (Abbas, 2014), além de remodelação e reparo tecidual, em casos em que há dano promovido por um parasito (Gordon e Taylor, 2005). A partir dessa última informação, é sugerido, então, que o aumento na quantidade de monócitos, observado no grupo GEI, foi uma resposta ao provável dano tecidual promovido pela exposição ao herbicida somada à infecção por *A. cantonensis*, uma vez que as alterações bioquímicas detectadas, nos roedores desse grupo, indicam tal lesão. Porém, para confirmar essa hipótese, é necessária a avaliação histopatológica dos órgãos relacionados a esses parâmetros, onde possa ser detectado aumento de populações de macrófagos nesses tecidos. Além disso, já foi demonstrado que alguns helmintos hematófagos, como *S. mansoni*, excretam, durante a digestão do sangue, a hemozoína, que é fagocitada por macrófagos, entre outras células (Shu-hua e Ju, 2017). Portanto, sabendo que helmintos adultos de *A. cantonensis* também são hematófagos, preconizamos que tal hábito alimentar poderia ter promovido o aumento da quantidade de monócitos observada no grupo GEI, uma vez que esse grupo apresentou um número maior no total de helmintos recuperados através da necropsia dos roedores (dado discutido mais adiante), explicando o fato de os grupos CIC e GIE não apresentarem alterações na quantidade de monócitos, ainda que também sejam uma fase crônica da infecção por *A. cantonensis*.

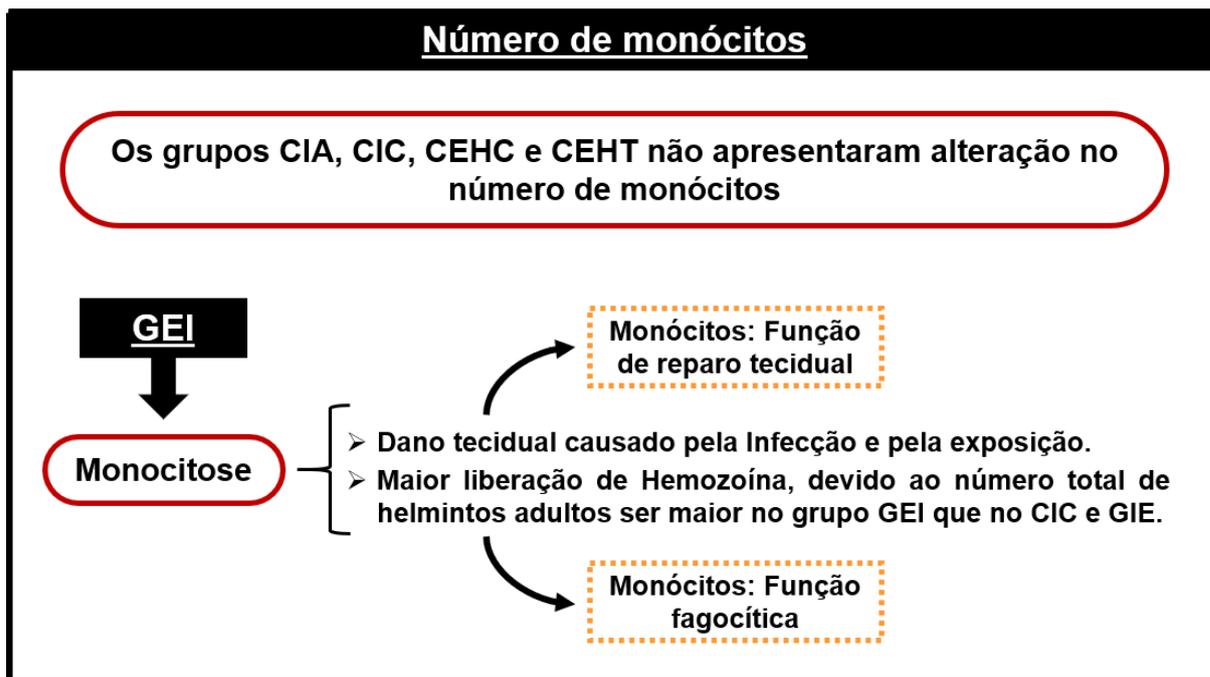


Figura 39: Nenhum dos roedores dos grupos controles infectados (CIA e CIC) e controles expostos ao herbicida de efeitos contínuo e tardio (CEHC e CEHT) apresentaram alterações no número de monócitos, no sangue. Contudo, no grupo primeiramente exposto e depois infectado (GEI) pode ser observada monocitose, indicando que a associação desses agentes promove alteração nesse parâmetro. Como os monócitos possuem funções de reparo tecidual e de fagocitose, tal aumento pode ter decorrido de uma resposta ao dano tecidual que tanto a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* quanto a exposição ao herbicida Roundup® promovem, somado à maior liberação de hemozoína, uma vez que foi recuperado um número maior de helmintos adultos nas artérias pulmonares e no coração dos animais do grupo GEI.

6.3.3 Análises bioquímicas

6.3.3.1 Função hepática

As análises estatísticas comparando os grupos controles (CIA, CIC, CEHC E CEHT), entre si, demonstraram que a exposição ao herbicida Roundup® (CEHC e CEHT) promoveu aumento da atividade sérica da enzima AST, em relação ao grupo CIA, cujo resultado é semelhante ao do controle limpo (CL). Tais grupos (CEHC e CEHT) não demonstraram diferença significativa, quando comparados ao grupo CIC, indicando que o efeito sobre essa enzima é similar, em ambos os casos, o que poderia acarretar em resultados semelhantes, em situações em que esses agentes estejam associados, que é o caso dos grupos GIE e GEI. Esses grupos demonstraram alterações estatisticamente significativas somente em comparação aos controles limpo e o de infecção aguda (CL e CIA), com efeitos similares aos

observados nos grupos CIC, CEHC e CEHT. Portanto, há a hipótese de que não houve uma interferência significativa da infecção por *A. cantonensis* sobre a exposição ao herbicida ou vice-versa. Porém, o fato de o grupo GIE ter apresentado um aumento mais evidente, ainda que não significativo, da atividade sérica da AST, quando comparado ao grupo GEI, demonstra que a exposição ao herbicida anteriormente à infecção pode estimular um maior comprometimento tecidual. Outra explicação para tal diferença sutil entre esses grupos, é de que os animais o grupo GEI, como já foi abordado, anteriormente, apresentaram alteração no número de monócitos que são células cuja função, entre outras, é a remodelagem e reparo de tecidos danificados por agentes estranhos (Gordon e Taylor, 2005), o que pode ter auxiliado na recuperação desses tecidos, contendo o extravasamento dessa enzima para o sangue.

Ainda que os grupos CIA, CEHC e CEHT tenham demonstrado aumento significativo na atividade sérica da enzima ALT, quando comparados ao grupo CL, os animais do grupo CIC apresentaram um aumento mais evidente, quando comparado aos grupos CEHC e CEHT, indicando que a infecção crônica pode provocar dano tecidual superior àquele causado por somente a exposição ao herbicida Roundup®. Porém, o agrotóxico parece exercer um efeito antagônico, em relação à infecção, nos animais que foram previamente expostos a ele e depois infectados por *A. cantonensis* (GEI), sendo observada uma diminuição da atividade sérica dessa enzima, quando comparado aos do grupo CIC. Na literatura, existem trabalhos em que são demonstradas alterações em biomarcadores de função hepática, incluindo a enzima ALT, em roedores expostos a diferentes concentrações de herbicidas à base de glifosato (Benedetti et al., 2004; Jasper et al., 2012). Segundo os autores, esses resultados indicam lesões hepatocelulares, uma vez que essa enzima, assim como a AST, encontra-se em abundância no interior dos hepatócitos. Sabendo-se que o número de monócitos elevou-se nesse grupo e que uma das funções dessas células é o reparo tecidual, preconizamos a hipótese de que a ação delas tenha mitigado o efeito da exposição ao herbicida antes mesmo da infecção por *A. cantonensis* se estabelecer, havendo um menor extravasamento da enzima ALT para a corrente sanguínea. O grupo GIE, por sua vez, também apresentou elevação dos níveis séricos da enzima ALT, em relação aos grupos CL e CIA, apresentando efeitos semelhantes aos grupos CIC e CEHT. Isso é um

indicativo de que a exposição ao herbicida posteriormente à infecção não promove um efeito evidente, como ocorre no grupo GIE.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) possui isoenzimas presentes no citoplasma e nas mitocôndrias das células que, geralmente, quando sua atividade está alterada, no plasma sanguíneo ou na urina, indica dano tecidual e renal, respectivamente. Quando utilizada como biomarcador, em análises clínicas, a AST pode revelar dano hepático, principalmente, quando acompanhado pelo aumento da atividade sérica, no plasma sanguíneo, da enzima alanina aminotransferase (ALT), que é encontrada majoritariamente no fígado e nos rins (Pinto, 2010). A elevação da atividade dessas aminotransferases, observada nos grupos GIE e GEI, pode indicar dano hepático. Lesões no fígado foram observadas em ratos Wistar infectados por *A. cantonensis* (Garcia et al., 2014b), a partir de alterações dos níveis séricos dessas enzimas, sendo corroboradas por análises histopatológicas. Além disso, na literatura, também existem trabalhos que demonstrem que a exposição ao herbicida Roundup® aumenta a atividade dessas enzimas, no plasma sanguíneo de roedores (Jasper et al., 2012) e que, segundo os autores, tal alteração pode ter sido causada pela lipoperoxidação promovida pela produção de espécies reativas de oxigênio, gerada pelo herbicida (Cavuçoğlu et al., 2011). Logo, tais informações reforçam a hipótese de que os animais dos grupos GIE e GEI tenham desenvolvido lesões hepáticas decorrentes da infecção e da exposição, ainda que haja a necessidade de ser realizada análise histopatológica desse órgão para comprovar tal sugestão.

Estatisticamente, o grupo CEHT promoveu diminuição da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (FA), enquanto o grupo CIC, promoveu o aumento dela, quando ambos são comparados ao controle limpo (CL). Tais alterações, evidentemente, reproduziram diferenças estatísticas entre esses grupos (CEHT vs. CIC), indicando um efeito antagônico. De fato, quando há a associação da exposição ao herbicida com a infecção por *A. cantonensis* (grupos GIE e GEI), ocorre diminuição da atividade dessa aminotransferase, no plasma sanguíneo dos animais, em relação ao grupo CIC, sugerindo que a exposição reduziu o efeito da infecção. Há trabalhos que demonstram o efeito inibitório do glifosato e de componentes organofosforados, sobre a enzima fosfatase alcalina, prejudicando atividades metabólicas celulares às quais ela está relacionada (Bulusu et al., 1987; Yousef et al., 1998; El-Demerdash et al., 2001). Segundo Gill et al. (1990) tal inibição seria resultado do comprometimento da produção dessa enzima, devido a um dano

estrutural do maquinário celular o qual desempenha tal função. Essa toxicidade do glifosato sobre a FA pode explicar o efeito antagônico observado em nossos resultados entre os grupos CEHT e CIC.



Figura 40: O efeito tardio da exposição ao herbicida Roundup® (grupo CEHT) e a infecção crônica por *Angiostrongylus cantonensis* (grupo CIC) promoveram alterações antagônicas em *Rattus norvegicus* (Wistar), havendo diminuição e aumento, respectivamente, da atividade sérica da fosfatase alcalina (FA). Quando esses dois agentes são associados (grupos GIE e GEI), tal diferença é corroborada, uma vez que seus resultados se demonstram diminuídos em relação ao grupo somente infectado cronicamente (CIC), indicando que a exposição influenciou nos efeitos que o helminto provoca nos roedores. Esse efeito do herbicida pode ser explicado pelo caráter inibitório que o Glifosato possui sobre a FA, uma vez que ele talvez cause dano estrutural no maquinário celular, comprometendo a produção desta.

Apesar de os grupos CIA, CIC, CEHC e CEHT terem apresentado aumento dos níveis séricos de bilirrubina total (BT), em comparação ao grupo CL, nenhum dos grupos diferiu-se significativamente, entre si, indicando que os efeitos de ambos os agentes são semelhantes. O grupo GIE, por sua vez, apresentou aumento da concentração de BT, somente quando comparado ao grupo CL, assemelhando-se

aos demais grupos experimentais. Tal resultado indica que a exposição posterior ao herbicida, potencializa o efeito da infecção por *A. cantonensis*, porém, não configurando um efeito sinérgico, uma vez que essa intensificação é sutil, não ocorrendo soma dos efeitos.

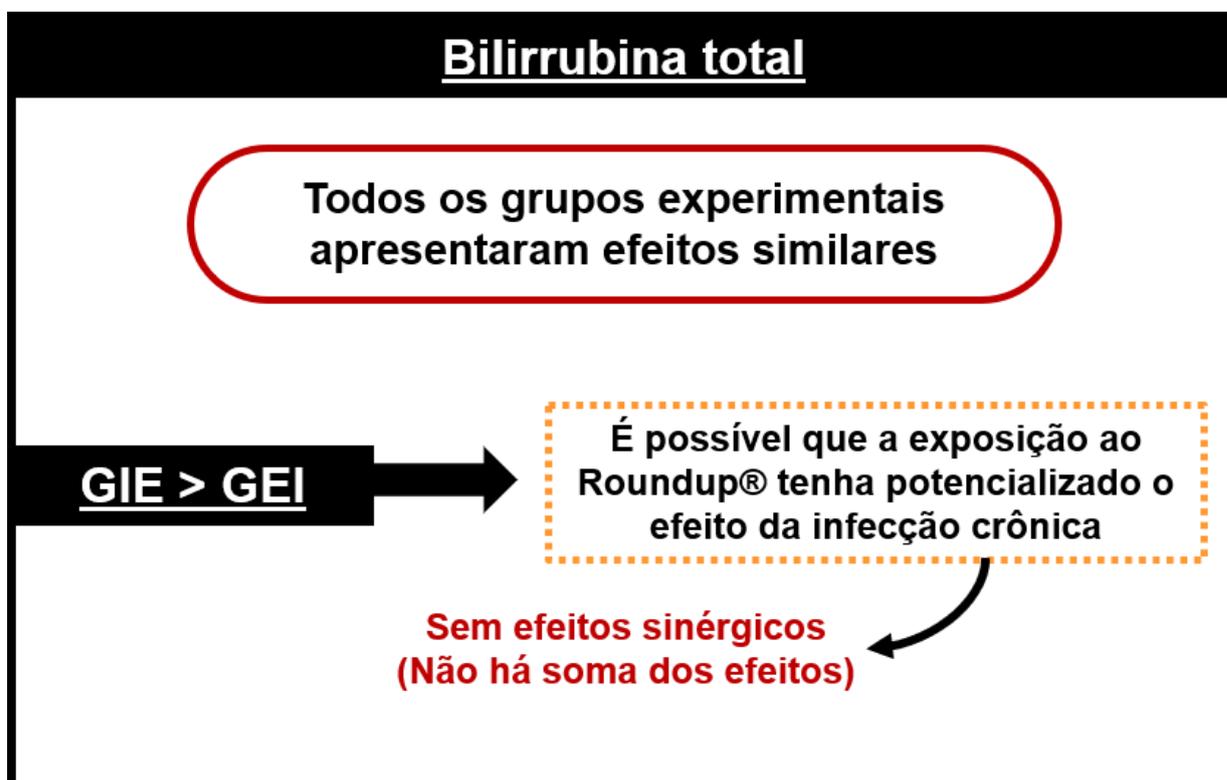


Figura 41: A infecção por *Angiostrongylus cantonensis*, assim como a exposição ao herbicida Roundup® promovem efeitos similares sobre os níveis séricos de bilirrubina total em *Rattus norvegicus* (Wistar). Porém, quando há a associação desses dois agentes (grupos GIE e GEI), os efeitos não se somam, ou seja, não são sinérgicos, ainda que o grupo GIE tenha demonstrado um aumento mais evidente que os demais grupos experimentais.

6.3.3.2 Proteínas totais e albumina

O grupo GIE apresentou aumento significativo nos níveis séricos das proteínas totais, em relação ao grupo CIA e, igualmente ao grupo GEI, em comparação ao controle limpo (CL). Geralmente, o aumento, no plasma sanguíneo, da concentração dessas proteínas está associado à elevação dos níveis séricos da albumina, pois essa constitui mais de 50% das proteínas totais presentes no sangue (Santos et al., 2004; Telega, 2018b). Porém, assim como ocorreu com o grupo CIC, não foi observada diferença significativa nos níveis séricos de albumina nos roedores. Portanto, sabendo-se que a infecção provoca uma resposta imunológica, a

qual estimula a produção de imunoglobulinas, é preconizado que a explicação para tal aumento, nos grupos GIE e GEI tenha sido devido à elevação da concentração desses anticorpos, no sangue (Scott et al., 2005; Silva et al., 2009). Além disso, ainda que não tenha sido um efeito sinérgico, a exposição ao herbicida Roundup® contribuiu para que a concentração de proteínas totais, desses grupos, fosse sutilmente maior que a observada no grupo CIC, ainda que de forma não significativa, levando à hipótese de que caso a exposição fosse prolongada, esse efeito seria mais evidente.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de albumina, dos grupos GIE e GEI, quando comparados aos demais grupos experimentais, apresentando resultados próximos ao observado no grupo CIC. Observando o controle exposto ao herbicida CEHT, controle equivalente aos grupos GIE e GEI, percebe-se um leve aumento dessa proteína, em comparação a esses grupos associados, indicando que a infecção por *A. cantonensis* influenciou nesse efeito do herbicida. June-Der et al., (2006) mediram os níveis de albumina no líquido cefalorraquidiano (LCR) de camundongos C57BL/6 infectados por *A. cantonensis* e observaram aumento significativo dessa proteína, em tal amostra. Segundo os autores, a albumina detectada era proveniente do sangue, devido a uma disfunção da barreira hematoencefálica, redirecionando-a para o LCR. Logo, tal fenômeno poderia ter contrabalanceado o aumento que a exposição promoveria, caso o animal não estivesse infectado.

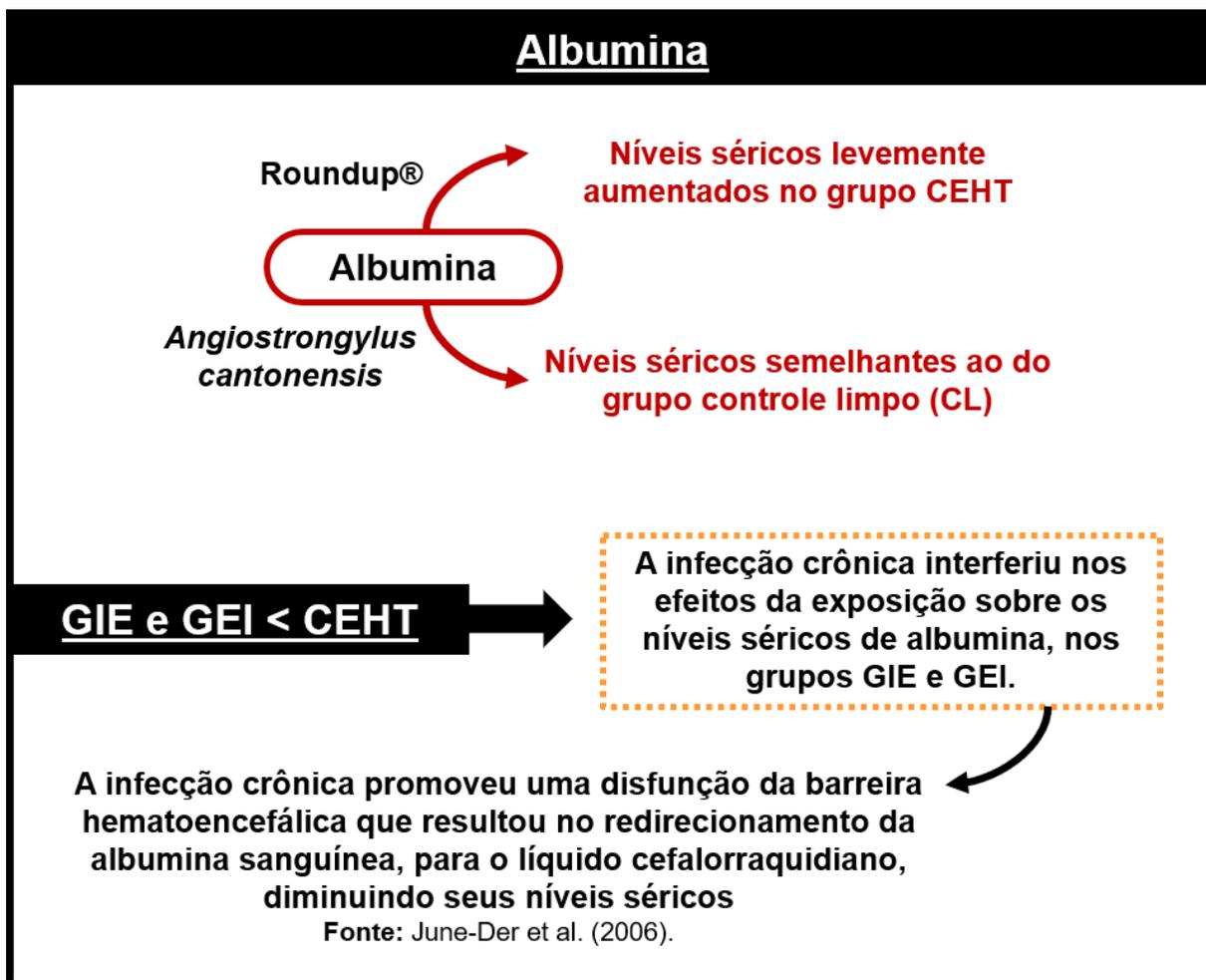


Figura 42: No presente trabalho, foi observado que o herbicida Roundup® promoveu hiperalbuminemia em *Rattus norvegicus* (Wistar) analisados semanas após a exposição (grupo CEHT). Por outro lado, a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* (grupos CIA e CIC) resultou em efeitos semelhantes aos observados nos animais do grupo controle limpo (CL). Nos grupos associados (GIE e GEI), houve um leve aumento nos níveis séricos dessa proteína, porém, não de forma significativa, indicando que a infecção pode ter influenciado no efeito da exposição ao herbicida. Tal hipótese pode ser elucidada pelo fato de que a infecção por *A. cantonensis* acarreta numa disfunção da barreira hematoencefálica, permitindo o redirecionamento de albumina sanguínea para o líquido cefalorraquidiano e, portanto, diminuindo seus níveis séricos e o aumento provocado pelo herbicida.

6.3.3.3 Metabolismo de carboidratos

As análises estatísticas realizadas entre os controles demonstraram que os grupos CIA vs. CEHC e CIC vs. CEHT possuem efeitos antagônicos: a infecção, inicialmente, promove o aumento da concentração de glicogênio hepático (CIA), devido à demanda de células fagocíticas que utilizam tal energia, durante o intenso processo inflamatório ocorrido no fígado (Moxon e Anderson, 1979; Garcia et al., 2014b). Quando a infecção alcança a fase crônica, a concentração de glicogênio

hepático tende a diminuir, equiparando-se ao grupo controle limpo (CL); a exposição ao herbicida, por sua vez, promove o contrário – primeiramente, há uma queda dos níveis de glicogênio no fígado que, segundo Salbego et al. (2010) seja devido ao estado de estresse provocado pelo agrotóxico. Porém, ao longo do tempo, a concentração do glicogênio hepático vai se restabelecendo, através do processo fisiológico de gliconeogênese (Owagboriaye et al., 2019), até ultrapassar os níveis do controle limpo (CL). No grupo GEI, foi observada diminuição acentuada do glicogênio hepático, em relação aos grupos CL, CIA, CEHC e CEHT. Nesse caso, o fato de a infecção ter sido realizada no dia seguinte ao término da exposição, fez com que o organismo dos roedores, que já estava com a concentração de glicogênio diminuída devido à exposição prévia, ao invés de alcançar a homeostase, como ocorre no grupo CEHT, entrasse em outro estado de estresse, que é o caso do processo inflamatório promovido pelo *A. cantonensis*, cuja células fagocíticas podem ter utilizado o pouco da reserva energética que havia sobrado, no fígado, para conter a infecção. Chegando à fase crônica da infecção, houve o desenvolvimento de helmintos adultos que captaram glicose no sangue, para sua demanda energética (Garcia et al., 2014b), promovendo a hipoglicemia também observada, no grupo GEI. Esse declínio glicêmico pode ter estimulado o processo de glicogenólise, suprimindo essa perda de glicose, porém, diminuindo ainda mais o nível de glicogênio hepático dos roedores desse grupo. Portanto, apesar de o herbicida e a infecção promoverem efeitos antagônicos, quando são analisados separadamente, ao serem associados, eles provocam um efeito sinérgico, no roedor, comprometendo o metabolismo de carboidratos.

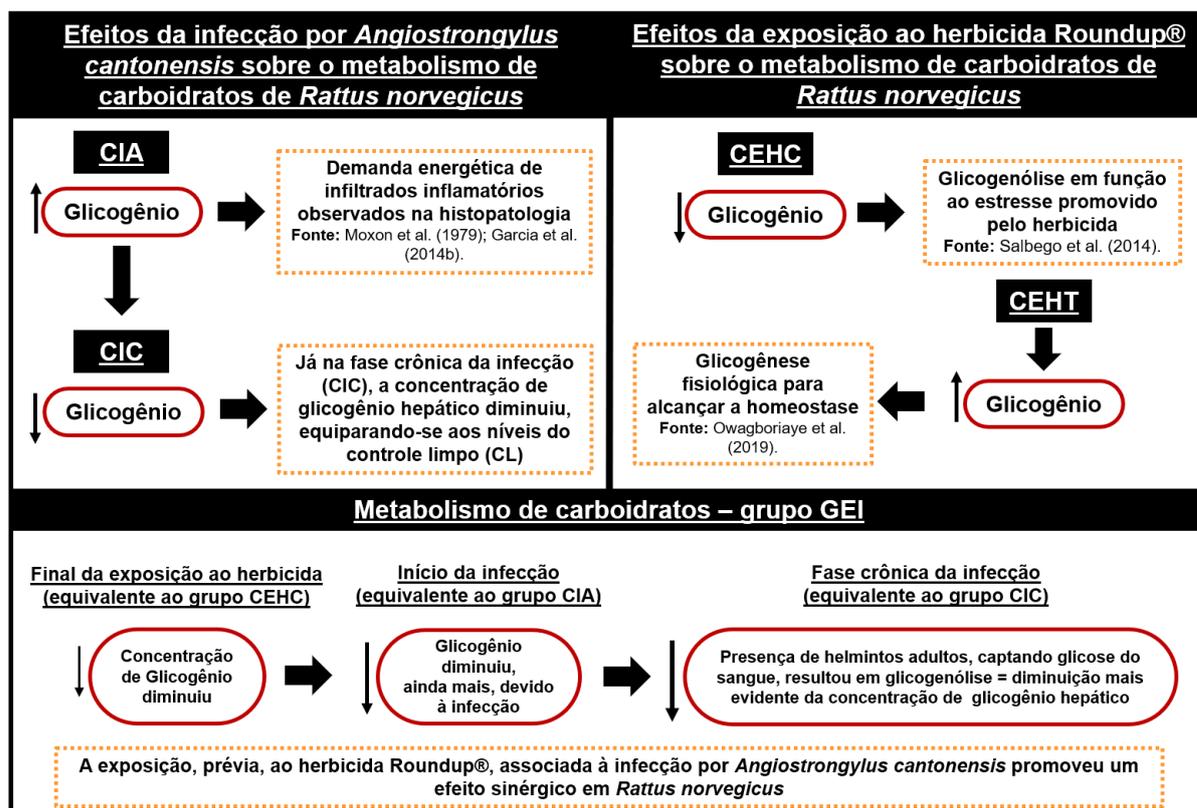


Figura 43: Ambas a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* e a exposição ao herbicida Roundup® promoveram alterações no metabolismo de carboidratos de *Rattus norvegicus* (Wistar). Porém, os efeitos foram antagônicos: no primeiro caso, a infecção aguda promove um aumento da concentração de glicogênio hepático que, ao alcançar à fase crônica, sofre um declínio; no segundo caso, por sua vez, logo ao final da exposição, a concentração de glicogênio hepático diminuiu e, após algumas semanas, ele tende a elevar-se. No caso de haver a associação desses dois agentes, a exposição prévia à infecção promoveu alterações significativas nos animais do grupo GEI, sendo observado um efeito sinérgico, uma vez que a fase aguda da infecção promove um declínio mais acentuado dos níveis de glicogênio, no fígado, além daquele já causado pela exposição e, ainda, a presença de helmintos adultos, já na fase crônica, promove uma hipoglicemia, gerando uma glicogenólise para suprir essa perda de glicose, no sangue.

A diferença significativa entre os grupos GIE e GEI demonstra que quando a infecção é previamente realizada à exposição ao herbicida, ela, provavelmente, supre a diminuição acentuada de glicogênio, no fígado, promovida pelo efeito contínuo do herbicida (CEHC). E, ainda que a fase crônica se estabeleça e promova a diminuição sutil desse parâmetro, o efeito tardio do agrotóxico se contrapõe, mantendo a concentração do glicogênio hepático similar àquela observada no grupo CL. Nesse caso, portanto, vemos um efeito antagônico entre a infecção por *A. cantonensis* e a exposição ao herbicida Roundup®.

Ao que diz respeito à glicemia, os grupos GIE e GEI apresentaram diminuição significativa, quando comparados aos grupos CL, CIA e CEHT, aproximando-se do resultado obtido no grupo CIC, o qual foi o único em que houve declínio glicêmico, quando comparado aos demais controles. Essa hipoglicemia pode ser explicada pela demanda energética que o helminto adulto de *A. cantonensis* exige, para sua sobrevivência e que, por isso, capta a glicose do sangue do hospedeiro definitivo (Garcia et al., 2014b). Vale perceber que por mais que o grupo GEI não tenha apresentado diferença significativa em relação ao grupo GIE, quando comparados, o primeiro grupo demonstra uma concentração levemente menor que o segundo, podendo ser explicado pelo fato de a carga parasitária de helmintos adultos recuperados ser maior, nesse grupo, que no grupo GIE e, conseqüentemente, havendo uma captação maior de glicose do sangue.

6.3.3.4 Função renal

Os grupos GIE e GEI não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros referentes aos testes de função renal, corroborando os resultados abordados, anteriormente, em que foi demonstrado que as infecções aguda e crônica (CIA e CIC) com 50 larvas L₃ de *A. cantonensis*, assim como a exposição à concentração de 500 mg/kg do herbicida Roundup® (CEHC e CEHT) não promovem alterações nos rins, a nível bioquímico.

6.4 Avaliação da carga parasitária

Foi recuperado um número maior de helmintos adultos de *A. cantonensis* dos animais do grupo GEI, em relação aos grupos CIC e GIE, devido à quantidade significativamente elevada de fêmeas também recuperadas nesse grupo. Como previamente abordado, o herbicida Roundup® atuou como agente imunodepressor nos roedores dos grupos CEHC e CEHT, sendo observada neutropenia, em ambos, e linfocitopenia, no segundo grupo. A resposta imunológica observada em roedores infectados por *A. cantonensis* é do tipo Th₂, conduzida por linfócitos T auxiliares, que estimulam a produção da interleucina IL-5, cuja função, entre outras, é a ativação dos eosinófilos (Sugaya e Yoshimura, 1988; Aoki et al., 1998). Essas células, por sua vez, liberam grânulos danosos ao parasito, a fim de conter a

infecção (Chauffaile, 2010). Porém, no caso de uma imunodepressão dos linfócitos, toda essa resposta pode ser prejudicada, permitindo que uma quantidade maior de larvas se desenvolva e migre para as artérias pulmonares, alcançando a fase adulta (helmintos). Isso pode ser corroborado pelo trabalho de Aoki et al. (1998) que observaram que camundongos BALB/c tratados com anticorpos anti-CD4 apresentaram maior número de larvas recuperadas do espaço intracraniano, levando a uma maior sobrevivência e melhor desenvolvimento desses parasitos.

O grupo GIE não demonstrou diferença significativa em relação ao número de machos, fêmeas e total de helmintos, assemelhando-se ao grupo CIC. Esse resultado sugere que a exposição posterior à infecção não promove, aparentemente, efeitos sobre a carga parasitária. A exposição ao herbicida, dos roedores desse grupo, foi realizada 15 dias pós-infecção, sendo um período considerável para as larvas L₃ já terem sofrido uma reação imunológica por parte do hospedeiro (Garcia et al., 2014a) o que, dessa forma, pode ter impedido que algumas delas sobrevivessem e alcançassem a fase adulta.

6.5 Análise coproparasitológica

O grupo GEI apresentou período pré-patente no 40º dia p.i, enquanto os grupos CIC e GIE iniciaram sua eliminação de larvas L₁, nas fezes, no 42º dia p.i. Segundo os autores Mackerras e Sandars (1955) e Acha e Szyfres (2003), o período pré-patente do *A. cantonensis* é de 45 dias (Hévila, 2018), o que indica que os animais do grupo GEI iniciaram a eliminação de larvas L₁, em suas fezes, precocemente, em relação aos demais.

Apesar de já ter sido demonstrado que a formulação comercial Roundup® Ready-To-Use promove toxicidade na reprodução de nematoides *C. elegans*, devido à presença de metais pesados residuais em sua composição (Jacques et al., 2019), o presente trabalho não observou diferença significativa na eliminação de larvas L₁ por fêmea recuperada, de cada grupo, sugerindo que a concentração utilizada não cause efeitos sobre a taxa de fecundidade das fêmeas de *A. cantonensis*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil encontra-se entre os países que mais consomem agrotóxicos, no mundo (ANVISA, 2012), havendo a autorização de utilização, no setor agropecuário, de cerca de 500 produtos (Dias et al., 2018), incluindo o glifosato. Apesar de esse princípio ativo ser considerado de menor toxicidade em comparação a outros herbicidas (OMS, 1994), os produtos à base de glifosato possuem substâncias inertes, surfactantes e, em alguns casos, metais pesados residuais que podem amplificar seu efeito tóxico sobre organismos não alvo (Langiano e Martinez, 2008; Lanctôt et al., 2014; Navarro-Martín et al., 2014; Defarge et al., 2018).

Existem diferentes estudos que testaram a toxicidade de formulações comerciais, bem como a do glifosato puro, em modelos experimentais convencionais. Neles, foi demonstrado que esse herbicida pode promover alterações hematológicas, bioquímicas, histopatológicas e imunológicas (Jasper et al., 2012; Séralini et al., 2014; Dedeke et al., 2018). Outros trabalhos, por sua vez, avaliaram os seus efeitos sobre diferentes espécies helmínticas, verificando alterações sobre o ciclo evolutivo e a biologia desses animais, como também sua influência sobre os organismos hospedeiros (Rohr et al., 2008; Raffel et al., 2009; Negga et al., 2011; Monte et al., 2016; 2018; 2019).

Como foi apresentado nesta dissertação, o herbicida glifosato, sob a formulação Roundup®, provocou alterações significativas em diversos parâmetros de *Rattus norvegicus* (Wistar), reforçando a concepção de que a utilização de defensivos agrícolas deve ser realizada de forma cuidadosa, visando a proteção da saúde humana, animal e do meio ambiente. É importante também ressaltar que a exposição a esse produto, concomitante à infecção pode gerar prejuízos ainda mais relevantes à saúde do animal, podendo traçar um paralelo à saúde de trabalhadores rurais que estão constantemente expostos a esses produtos e a diferentes infecções helmínticas, levando a um agravamento do parasitismo, nessas pessoas.

Portanto, os resultados obtidos, no presente trabalho, contribuem para um maior entendimento acerca dos efeitos do agrotóxico mais comercializado no Brasil, o glifosato (Bombardi, 2017), além de corroborar para os cuidados durante a sua aplicação.

8 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que a administração oral do herbicida Roundup® alterou o perfil da infecção por *Angiostrongylus cantonensis*, em *Rattus norvegicus* (Wistar).

- A infecção crônica, por *A. cantonensis*, promoveu alterações hematológicas e bioquímicas, configurando um quadro anêmico microcítico, intensa reação inflamatória, dano tecidual hepático, esplenomegalia, colestase e alterações no metabolismo de carboidratos.
- A administração oral do Roundup® promoveu neutropenia e linfocitopenia, indicando imunodepressão, além de alterações bioquímicas – sugerindo dano hepático, e no metabolismo de carboidratos.
- Os efeitos da infecção por *A. cantonensis* e da exposição ao herbicida Roundup® foram antagônicos em relação aos parâmetros leucocitários, havendo intensa reação inflamatória e imunodepressão, respectivamente. Porém, ambos promoveram efeitos sinérgicos em relação ao metabolismo de carboidratos.
- A associação da infecção com a exposição ao herbicida promoveu aumento sérico de biomarcadores de função hepática, além de provocar hepatomegalia.
- A exposição ao herbicida anteriormente à infecção resultou em monocitose possivelmente causada por dano tecidual.
- A infecção por *A. cantonensis*, assim como a administração oral do herbicida Roundup® não promoveram alterações bioquímicas nos parâmetros relacionados ao teste de função renal (ureia, creatinina e ácido úrico), indicando uma não influência sobre os rins dos roedores.
- A exposição prévia ao agrotóxico influenciou na carga parasitária do grupo GEI, possivelmente, por sua capacidade imunodepressora. Além disso, tal grupo eliminou uma quantidade maior de larvas L₁, explicado pelo aumento do número de fêmeas recuperadas, em relação aos grupos CIC e GIE.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lichtman A, Shiv Pillai. *Imunologia Básica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

Abensur H. *Biomarcadores na nefrologia*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Nefrologia; 2011 [acesso em 20 abril 2018]. Disponível em: <https://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>.

Acha PN, Szyfres B. *Zoonoses and Communicable Diseases Man and Animals (Volume 3)*. 3. ed. Washington (DC): Pan American Health Organization, Scientific and Tech. 2003.

Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P, et al. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect* 2004 Mar;112(3): 321-6.

Aghazadeh M, Reid SA, Aland KV, Restrepo AC, Traub RJ, McCarthy JS et al. A survey of *Angiostrongylus* species in definitive hosts in Queensland. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2015 Dez;4(3):323-8.

Alicata JE. The Discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitol Today* 1991 Jun;7(6):151-3.

Alleyne GA, Scullard GH. Alterations in carbohydrate metabolism in Jamaican children with severe malnutrition. *Clin Sci*. 1969 Dez;37(3):631-42.

Amarante Junior OP, Dos Santos TCR. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím Nova* 2002 Jul;25(4):589-93.

Andrades TO, Ganimi RN. Revolução verde e a apropriação capitalista. *CES Revista* 2007;21:43-56.

Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res* 2001 Mai;18(5):632-9.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HÁ, Rozo CT, Boucher JL et al. Memory T_H2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 2006 Ago;12(8):955-60.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007 Dez;7(12):975-87.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Seminário de Mercado de Agrotóxico e Regulação*. Brasília: UFPR; 2012.

Aoki M, Sugaya H, Ishida K, Yoshimura K. The role of CD4+ and CD8+ T-cells in host morbidity and innate resistance to *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasitol Res* 1998;84(2):91-9.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Glyphosate. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2019.

Baer KN, Marcel BJ. Glyphosate. In: Wexler P. *Encyclopedia of Toxicology*. 3. ed. Cambridge (USA): Academic Press; 2014; 2: 767-769.

Barrat J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology* 2016 Ago;143(9):1087-118.

Basten G. *Introduction to Clinical Biochemistry: Interpreting blood results*. Book Boon Ventus; 2011 [acesso em 10 set 2019]. Disponível em: <http://www.fulviofrisone.com/attachments/article/415/introduction-to-clinical-biochemistry.pdf>.

Beaver PC, Rosen L. Memorandum on the first report of *Angiostrongylus* in man, by Nomura and Lin, 1945. *Am J Trop Med Hyg* 1964 Jul;13:589-90.

Benedetti AL, Vituri CL, Trentin AG, Domingues MAC, Alvarez-Silva M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol Lett* 2004 Nov;153(2):227-32.

Berne RM, Levy MN. *Fisiologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009

Bombardi, LM. *Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia*. 1. ed. São Paulo: FFLCH – USP, 2017.

Borges KE, Polizer KA, Silvério MR, Gimenes TF, Bermejo VJ, Sacco SR. Exames de função renal utilizados na medicina veterinária. *Rev Cientif Eletro Med Vet* 2008 Jul;6(11).

Bourdeaux, P. L'angiostrongylose canine. *Rev Méd Vét* 1993;5/6: 401-407.

Brasil. Lei nº. 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 11 jul 1989; 168º da Independência e 101º da República.

Brewster DW, Warren J, Hopkins WE. Metabolism of Glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of Glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol* 1991 Jul;17(1):43-51.

Brito LL, Barreto ML, Silva RCR, Assis AMO, Reis MG, Parraga IM et al. Fatores de risco para anemia por deficiência de ferro em crianças e adolescentes parasitados por helmintos intestinais. Ver Panam Publica/Pan Am J Public Health 2003;14(6):422-31.

Brock F, Bettinelli LA, Dobner T, Stobbe JC, Pomatti G, Telles CT. Prevalência de hipoalbuminemia e aspectos nutricionais em idosos hospitalizados. Rev Latinoam Enferm (Online) 2016;24:e2736.

Bulusu S, Chakravarty I. Effect of subacute administration of three Organophosphorus pesticides on the hepatic phosphatases under various nutritional conditions. Environ Res 1987 Out;44(1):126-35.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Amsterdam: Elsevier; 2005.

Bush BM. Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos animais. São Paulo: Roca; 2004.

Cağlar S, Kolankaya D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the Glyphosate-Based Herbicide Roundup. Environ Toxicol Pharmacol 2008 Jan;25(1):57-62.

Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007 Nov;102(7):887-9.

Carneiro FF. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

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

Cavuşoğlu K, Yapar K, Oruç E, Yalçın E. Protective effect of Ginkgo Biloba L. Leaf extract against Glyphosate toxicity in Swiss albino mice. J Med Food 2011 Out;14(10):1263-72.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention [homepage na internet]. *Angiostrongylus cantonensis*: Epidemiology and risk factors [acesso em 03 set 2019a]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/angiostrongylus/epi.html>.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention [homepage na internet]. *Angiostrongylus cantonensis*: additional resources acesso em 03 set 2019b]. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/angiostrongylus/add_resources.html.

Chapman J, Bansal P, Goyal A, Azevedo AM. Splenomegaly. StatPearls Publishing; 2020 [acesso em 14 dez 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430907/?report=printable>.

Chauffaile MLLF. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica idiopática. Rev Bras Hematol Hemoter 2010;32(5):395-401.

Chen HT. Un nouveau nematode pulmonaire: *Pulmonema cantonensis* n. g. n. sp., des rats de Canton. Ann Parasit Hum Comp 1935;13:312-17.

Chih-Cheng C, Chi-Wu C, Chia-Kwung F, Kua-Eyre S, Yueh-Ting T, Chih-Li C, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: apoptosis of inflammatory cells induced by treatment with Mebendazole or/and Interleukin 12 in mice. Exp Parasitol 2007 Mar;115(3):226-32.

Chotmongkol V, Sawanyawisuth K, Thavornpitak Y. Corticosteroid treatment of eosinophilic meningitis. Clin Infect Dis 2000 Set; 31(3):660-2.

Chotmongkol V, Yimtae K, Intapan PM. *Angiostrongylus* eosinophilic meningitis associated with sensorineural hearing loss. J Laryngol Otol 2004 Jan;118(1):57-8.

Chotmongkol V, Kittimongkolma S, Niwattayakul K, Intapan PM, Thavornpitak Y. Comparison of prednisolone plus albendazole with prednisolone alone for treatment of patients with eosinophilic meningitis. Am J Trop Med Hyg 2009 Set;81(3):443-5.

Cognato BB, Morassutti AL, Silva ACA, Graeff-Teixeira C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013 Set/Out;46(5):664-5.

Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. Bioaccumulation of Glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus varegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. Environ Pollut 2009 Jan;157(1):57-63.

Corless JK, Middleton III HM. Normal Liver Function: a basis for understanding hepatic disease. Arch Intern Med 1983 Dez;143(12):2291-4.

Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop 2008 Jul/Ago;41(4):390-3.

Cowie RH. Pathways for transmission of *Angiostrongylus* and the risk of disease associated with them. Hawaii J Med Public Health 2013 Jun;72(6 Suppl 2):70-4.

BioRender; 2020 [acesso em 31 ago de 2020]. Disponível em: <https://app.biorender.com/>.

Crook MA. Clinical biochemistry and metabolic medicine. ed. Londres: Hodder e Stoughton Ltd; 2012.

Cury MC, Guimarães MP, Lima WS, Caldeira MCM, Couto TR, Murta K, et al. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Vet Parasitol 2005 Mar;128(1-2):121-7.

Das RN, Mukherjee S, Sharma I. Alkaline Phosphatase determinants of liver patients. *J Pancreas (Online)*. 2018 Jan;19(1):18-23.

De Araujo, NJ. Avaliação da fosfatase alcalina em ratos alcoolizados portadores de periodontite experimental. Araçatuba (SP). Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Odontologia] – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2014.

Dedeke GA, Owagboriaye FO, Ademolu KO, Olujimi OO, Aladesida AA. Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of Roundup herbicide and Glyphosate alone in male albino Rat. *Int J Toxicol* 2018 Jul/Aug;37(4):285-95.

Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol Rep* 2018 Dez;30(5):156-63.

Delgado IF, Paumgarten, FJR. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública (Online)* 2004;20(1):180-6.

Diao Z, Wang J, Qi H, Li X, Zheng X, Yin C. Human ocular *Angiostrongylus* infection: a literature review. *Trop Doct* 2011 Abr;41(2):76-8.

Dias AP, Gurgel AM, Búrigo AC, Oliveira AC, de Niemeyer CB, Santos EHA, et al. Agrotóxicos e saúde. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2018. 120 p. (Série Fiocruz - Documentos Institucionais; 2. Coleção Saúde, Ambiente e Sustentabilidade).

Dracz, RM. Interação entre *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum*: aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos em cães experimentalmente infectados. Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Parasitologia] – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); 2012.

Eamsobhana P. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: a neglected disease with escalating importance. *Trop Biomed* 2014 Dez;31(4):569-78.

Edge C, Thompson D, Hao C, Houlahan J. The response of amphibian larvae to exposure to a glyphosate-based herbicide (Roundup WeatherMax) and nutrient enrichment in an ecosystem experiment. *Ecotoxicol Environ Saf* 2014 Nov;109:124-32.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Elagamy, EI. Influence of Paraquat, Glyphosate, and Cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*In vitro*). *J Environ Sci Health B* 2001 Jan;36(1):29-42.

El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient Glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009 Nov;28(3):379-85.

Espírito-Santo MCC, Pinto PLS, Mota DJG, Gryscek RCB. Primeiro caso de meningite eosinofílica diagnosticado na cidade de São Paulo, SP, Brasil. Rev Inst Med Trop 2013 Mar/Abr;55(2):129-132.

Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinária: Volume 1. 4. ed. São Paulo: Manole; 1997.

Evans TW. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. Aliment Pharmacol Ther 2002 Dez;16(Suppl. 5):6-11.

Falcão H, Japiassú AM. Uso de albumina humana em pacientes graves: controvérsias e recomendações. Rev Bras Ter Intensiva 2011 Jan/Mar;23(1):87-95.

Feng Y, Nawa Y, Sawanyavisuth K, Lv Z, Wu ZD. Comprehensive review of ocular Angiostrongyliasis with special reference to optic neuritis. Korean J Parasitol 2013 Dez;51(6):613-619.

Fernandes WR, Larsson MHMA. Alteração nas concentrações séricas de glicose, sódio, potássio, ureia e creatinina, em equinos submetidos a provas de enduro de 30 km com velocidade controlada. Ciências Rural 2000;30(3):393-8.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil. 1997 Jan/Mar;43(1):61-8.

Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. Glyphosate: a unique global herbicide. Washington: American Chemical Society; 1997.

Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ, Abraham D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. Infect Immun 2006 Out;74(10):5730-8.

Galli AJB, Montezuma MC, Rodrigues JD, Guaggio JÁ, Christoffoleti PJ. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editoria; 2005.

Garcia BP, Prado RNA, Rennó PP, Simões MM, Neves MF. Angiostrongilose canina: Revisão de literatura. Rev Cientif Eletro Med Vet 2008 Jul;6(11):1-6.

García-Espiñeira M, Tejeda-Benitez L, Olivero-Verbel J. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. Ecotoxicol Environ Saf 2018 Jul;156:216-22.

Garcia JS, Hooper CS, Simões RO, Dos Santos MA, Maldonado Júnior A, Pinheiro J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). Vet Parasitol 2011 Mai; 178(1-2):86-92.

Garcia JS, Pinheiro J, Hooper CS, Simões RO, Ferraz JS, Maldonado Júnior A. Haematological alterations in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with

Echinostoma paraensei (Trematoda: Echinostomatidae). Exp Parasitol 2012 Jul;131(3):300-3.

Garcia, JS. Avaliação bioquímica, hematológica e histopatológica da infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis* no hospedeiro definitivo *Rattus norvegicus* (Wistar) e estudo da interação *Angiostrongylus cantonensis* / *Echinostoma paraensei* no hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata*. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.

Garcia JS, Bonfim TCS, Maldonado Junior A, Tunholi VM, Tunholi-Alves VM, Mota EM, et al. Hematological and histopathological changes in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). Parasitol Int 2014a Ago;63(4):631-7.

Garcia JS, Lúcio CS, Bonfim TCS, Maldonado Junior A, Tunholi VM, Tunholi-Alves VM, et al. Metabolic and histopathological profile of *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). Exp Parasitol 2014b Fev;137:35-40.

Garcia-Navarro CEK. Manual de hematologia veterinária. 2. ed. São Paulo: Editora Varela; 2005

Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly D St. J. Bioquímica Clínica. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Gehin A, Guyon C, Nicod L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of vitamins C and E. Environ Toxicol Pharmacol 2006 Jul;22(1):27-34.

Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology – Volume 167. Nova York: Springer; 2000.

Gill TS, Tewari H, Pande J. Use of the fish Enzyme System in Monitoring Water Quality: Effects of Mercury on Tissue Enzymes. Comp Biochem Physiol C 1990;91(2):287-92.

Gobatto CA. Alterações Metabólicas do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas] – Universidade Estadual de Campinas; 1993.

Gonzalez FHD, Conceição TR, Siqueira AJ, La Rosa VL. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. A Hora Vet 2000;20:59-62.

Google Imagens; 2020 [acesso em 31 ago 2020]. Disponível em: <https://www.google.com/imghp?hl=pt-BR>.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 2005 Dez;5(12):953-64.

Gosnell WL, Kramer KJ. The role of eosinophils in Angiostrongyliasis: multiple roles for a versatile cell? *Hawaii J Med Public Health* 2013 Jun;72(6 Supl 2):49-51.

Gowda S, Desai PB, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN, Kulkarni SS. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med J.* 2009 Nov;22:3-17.

Gruys KJ, Sikorski JA. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. Singh BK. In: *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology.* New York: Marcel Dekker; 1999.

Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. European Eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup: a Glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 2010 Set;25(5):523-30.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 2001;4(1):9.

Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K. Glyphosate in Northern Ecosystems. *Trends Plant Sci* 2012 Out;17(10):569-74.

Hendrix CM, Robinson E. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians.* 4. ed. Elsevier Health Sciences; 2012.

Hévila MMSG. Frequência, aspectos parasitológicos e morfológicos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda, Angiostrongylidae) em roedores sinantrópicos no estado de Pernambuco. Recife. Tese [Doutorado em Biociência Animal] – Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2018.

Hoffbrand AV. *Fundamentos em hematologia.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

Ibrahim NM, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012 Jan;2(1):41-6.

Jacobs DS, Kasten BL, Demott, Wolfson WL. *Laboratory Test Handbook.* 4. ed. Hudson: Lexi-Comp; 1996.

Jacques MT, Bornhorst J, Soares MV, Schwerdtle T, Garcia S, Ávila DS. Reprotoxicity of glyphosate-based formulation in *Caenorhabditis elegans* is not due to the active ingredient only. *Environ Pollut.* 2019 Set;252(Pt B):1854-62.

Jarvi SI, Pitt WC, Farias ME, Shiels L, Severino MG, Howe KM, et al. Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the blood and peripheral tissues of wild Hawaiian Rats (*Rattus rattus*) by a Quantitative PCR (qPCR) assay. *PLoS One* 2015 Abr;10(4):e0123064.

Jasper R, Locatelli GO, Pilati C, Locatelli C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip Toxicol* 2012 Set;5(3):133-40.

Jitpimolmard S, Sawanyawisuth K, Morakote N, Vejjajiva A, Puntumetakul M, Sanchaisuriya K, et al. Albendazole therapy for eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 2007 Mai;100(6):1293-6.

Jorge MLLA, Viscardi V, Silva KM, Otaka JNP, de Alencar NX, Torres Filho RA et al. Atividade da fosfatase alcalina no lavado broncoalveolar de equinos de policiamento montado no Estado do Rio de Janeiro. *Cien Rural (Online)* 2014 Jan;44(1):92-6.

June-Der L, Li-Yu T, Chun-Hsiang C, Jiun-Jye W, Jen-Kuei H, Chuan-Min Y. Blood-brain barrier dysfunction occurring in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop* 2006 Fev;97(2):204-11.

Kaneko JJ. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic; 1989.

Kaplan MM. In: Schiff L, Schiff ER. *Diseases of the liver*. J. L. Filadélfia; Wiley-Blackwell; 1987.

Kliks MM, Palumbo NE. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Soc Sci Med* 1992 Jan;34(2):199-212.

Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, et al. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 2008 Jun;20(6):791-800.

Kovalszki A, Weller PF. Eosinophilia. *Prim Care* 2016 Dez;43(3):607-17.
Kruse ND, Trezzi MM, Vidal RA. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. *Rev Bras Herbic* 2000;1(2).

Kum WSW. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in permissive and non-permissive hosts. Hong Kong. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de Hong Kong; 1983.

Kumar S, Khodoun M, Kettleison EM, McKnight C, Reponen T, Grinshpun SA, et al. Glyphosate-rich air samples induce IL-33, TSLP and generate IL-13 dependent airway inflammation. *Toxicol* 2014 Nov;325:42-51.

Kwiatkowska M, Jarosiewicz P, Michalowicz J, Koter-Michalak M, Huras B, Bukowska B. The impact of Glyphosate, its metabolites and impurities on viability, ATP level and morphological changes in human peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS One* 2016 Jun;11(6):e0156946.

Lafferty KD, Kuris AM. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnol Oceanogr* 1999 Mai;44(3, part 2):925-31.

Lambertucci JR, Silva LCS, Voieta I. Esquistossomose mansônica. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lancôt C, Navarro-Martín L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli BD, et al. Effects of Glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 2014 Set;154:291-303.

Langiano VC, Martinez CBR. Toxicity and effects of a Glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008 Mar;147(2):222-31.

Larsson MHNA, Lucas SRR, Mirandola RMS, Lazaretti P, Feduho JDL, Guimarães MABV. Valores de Referência das Provas de Funções Hepática, Renal e de alguns eletrólitos em *Cebus paella*, anestesiados com cetamina. *Ciências Rural* 1997;27(2).

Latorre MA, González ECL, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. *J Immunotoxicol* 2013 Out/Dez;10(4):349-54.

Lee JD, Wang JJ, Chang JH, Chung LY, Chen ER, Yen CM. Role of T cell subpopulations in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *J Helminthol* 1996 Set;70(3):211-14.

Li S, Yang F, Ji P, Zeng X, Wu X, Wei J, et al. Eosinophil chemotactic chemokine profilings of the brain from permissive and non-permissive hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 2014 Fev;113(2):517-25.

Lima ARMC, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS, et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2009 Dez;67(4):1093-6.

Liu J, Xu Y, He X, Zheng M, Zhang M, Hu Y, et al. Study on the tolerance and adaptation of rats to *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitol Res* 2017a Jul;116(7):1937-45.

Liu Z, Wu Y, Feng Y, Wu F, Liu RF, et al. Spleen atrophy related immune system changes attributed to infection of *Angiostrongylus cantonensis* in mouse model. *Parasitol Res* 2017b Fev;116(2):577-87.

Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011.

Lu XT, Gu QY, Limpanont Y, Song LG, Wu ZD, Okanurak K, et al. Snail-borne parasitic diseases: an update on global epidemiological distribution, transmission interruption and control methods. *Infect Dis Poverty* 2018 Abr;7(1):28.

Lushchak OV, Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 2009 Ago;76(7):932-7.

Mackerras MJ, Sandars DF. The life history of the rat lung-worm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae). *Australian J Zoo* 1955;3:1-25.

Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2012;63:73-105.

Maldonado Júnior A, Simões RO, Oliveira APM, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010 Nov;105(7):938-41.

Marion M, de Carvalho JAM, Bochi GV, Sangoi MB, Moresco RN. Ácido úrico como fator de risco para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. *Rev Bras Farm* 2011;92(1):3-8.

Martins RN, de Cleve R, Gouveia EM, Ghosn NB, Herman P. Correlação entre esplenomegalia e plaquetopenia na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2010 Out/Dez;23(4):254-8.

Martins YC, Tanowitz HB, Kazacos KR. Central nervous system manifestations of *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Acta Trop* 2015 Jan;141(Pt A):46-53.

Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005 Ago;5(8):606-16.

Mendes DM, de Camargo MF, Aun VV, Fernandes MFM, Aun WT, de Mello JF. Eosinofilia. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2000;23(2):84-91.

Mengying Z, Yiyue X, Tong P, Yue H, Limpanont Y, Ping H, et al. Apoptosis and necroptosis of mouse hippocampal and parenchymal astrocytes, microglia and neurons caused by *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasit Vectors* 2017 Dez;10(1):611.

Mesnage R, Moesch C, Le Grand Grand R, Lauthier G, Vendômois JS, Gress S, et al. Glyphosate exposure in a farmer's family. *J Environ Protect* 2012 Set;3(9):1001-3.

Mesnage R, Defarge N, Vendômois JS, Séralini GE. Potential toxic effects of Glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol* 2015 Out;84:133-53.

Mesnage R, Renney G, Séralini GE, Ward M, Antoniou MN. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Sci Rep* 2017 Jan;7:39328.

Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, De Souza AWS, Cruvinel Wde M, Andrade LEC, Da Silva NP. Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(5):552-80.

Migaud P, Marty C, Chartier C. What is your diagnosis? *Angiostrongylus vasorum* infection in dog. *Point Vet* 1992;23(141):989-91.

Milić M, Zunec S, Micek V, Kasuba V, Mikolic A, Lovakovic BT, et al. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole Blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to Glyphosate. *Arh Hig Rada Toksikol* 2018 Jun; 69(2):154-68.

Mladinic M, Berend S, Vrdoljak AL, Kopjar N, Radic B, Zeljezic D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by Glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. *Environ Mol Mutagen* 2009 Dez;50(9):800-7.

Monquero PA, Christoffoleti PJ, Osuna MD, De Prado RA. Absorção, translocação e metabolismo do Glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha* 2004 Jul/Set;22(3):445-51.

Monte TCC. Estudo filogenético, biológico e morfológico de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.

Monte TCC, Gentile R, Garcia JS, Mota E, Santos JN, Maldonado Júnior A. Brazilian *Angiostrongylus cantonensis* haplotypes, ac8 and ac9, have two different biological and morphological profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014 Dez;109(8):1057-63.

Monte TC, Garcia J, Gentile R, de Vasconcellos MC, Souza J, Braga BV, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup® on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. *Exp Parasitol* 2016 Out;169:43-50.

Monte TCC, Braga BV, Vasconcellos MC, Jurberg AD, Mota EM, Barbosa HS, et al. Efeitos morfológicos em helminto parasito causado por herbicida em condições experimentais. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018 Mar;27(1):41-50.

Monte TCC, Chometon TQ, Bertho AL, de Moura VS, de Vasconcellos MC, Garcia J, et al. Changes in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *Echinostoma paraensei* and exposed to Glyphosate-based herbicide. *J Invertebr Pathol* 2019 Jan;160:67-75.

Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014 Jul;109(4):399-407.

Moreira VLC, Giese EG, Melo FTV, Simões RO, Thiengo SC, Maldonado Junior A, et al. Endemic Angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric Giant African Land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trop* 2013 Jan;125(1): 90-7.

Morimoto M, Morimoto M, Whitmire J, Xiao S, Anthony RM, Mirakami H, et al. Peripheral CD4 T cells rapidly accumulate at the host: parasite interface during an inflammatory Th2 memory response. *J Immunol* 2004 Feb;172(4):2424-30.

Motta VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 5. ed. Rio de Janeiro: MedBook; 2009.

Moxon ER, Anderson P. Meningitis caused by *Haemophilus influenzae* in infant rats: protective immunity and antibody priming by gastrointestinal colonization with *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1979 Oct;140(4):471-8.

Navarro-Martín L, Lanctôt C, Jackman P, Park BJ, Doe K, Pauli BD, et al. Effects of Glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquat Toxicol* 2014 Sep;154:278-90.

Negga R, Rudd DA, Davis NS, Justice AN, Hatfield HE, Valente AL, et al. Exposure to Mn/Zn Ethylene-bis-dithiocarbamate and Glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 2011 Jun;32(3):331-41.

Neiva TJC, Moraes ACR, Schwyzer R, Vituri CL, Rocha TRF, Fries DM, et al. *In vitro* effect of the herbicide Glyphosate on human Blood platelet aggregation and coagulation. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010 Jul;32(4):291-4.

Newsome PN, Cramb R, Davison SM, Dillon J, Foulerton M, Godfrey EM, et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut* 2018 Jan;67(1):6-19.

Nicotera P, Leist M, Ferrnando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998 Dec;102-103:139-42.

Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000 Jan;148(1):131-9.

NTP – National Toxicology Program. Glyphosate administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Toxicity Rep Series* 1992;16.

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

Oliveira Júnior RS, Constantin J, Inoue MH. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Omnipax; 2011.

Olorunsogo OO, Bababunmi EA, Bassir O. Effect of Glyphosate on rat liver mitochondria. *Bull Environ Contam Toxicol* 1979;22:357-64.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Glyphosate: Environmental. Health Criteria. Genève: WH; 1994;159 [acesso em 27 dez 2018]. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>.

OPAS/OMS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília: Ministério da Saúde; 1996.

Orihel TC, Ash LR. Parasites in human tissues. Chicago: ASCP Press; 1995.

Ortiz-Ordoñez E, Uría-Galicia E, Ruiz-Picos RA, Duran AGS, Trejo YH, Sedeño-Díaz JE, et al. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011 Oct;61(3):443-52.

OuYang L, Wei J, Wu Z, Zeng X, Li Y, Jia Y, et al. Differences of larval development and pathological changes in permissive and nonpermissive rodent hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitol Res* 2012 Oct;111(4):1547-57.

Owagboriaye FO, Dedeke GA, Ademolu KO, Olukimi OO, Ashidi JS, Adeyinka AA. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp Toxicol Pathol* 2017 Set;69(7):461-8.

Owagboriaye F, Dedeke G, Ademolu K, Olujimi O, Aladesida A, Adeleke M. Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to Roundup herbicide and its active ingredient Glyphosate. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019 Mai;26(14):14502-12.

Perez O, Capron M, Lastre M, Venge P, Khalife J, Capron A (1989) *Angiostrongylus cantonensis*: role of eosinophils in the neurotoxic syndrome (Gordon-like Phenomenon). *Exp Parasitol* 1989 Mai;68(4):403-13.

Pinheiro J, Amato SB. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaenasimilaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994 Jul/Set;89(3):407-10.

Pinheiro, J, Gomes EM. Method for glycogen determination in mollusc. *Arq Biol Tecnol* 1994 Jan;37(3):569-76.

Pinto SB. Comparação entre as dosagens de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) em presença e na ausência de pyridoxal fosfato. Porto Alegre. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Farmácia] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Pöppel AG, Gonzalez FHD, da Silva SC. Alterações Clínico-laboratoriais em transtornos renais de cães (*Canis familiaris*). *Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim* 2004;2(6):92-8.

Prasad S, Srivastava S, Singh M, Shukla Y. Clastogenic effects of Glyphosate in bone marrow cells of Swiss albino mice. *J Toxicol* 2009 Dez;2009:308985.

Prociv P. Parasitic meningitis. *Med J Aust* 1999 Jun;170(11):517-8.

Prociv P, Spratt DM, Carlisle MS. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. *Inter J Parasitol* 2000 Nov;30(12-13):1295-303.

Puértolas L, Damásio J, Barata C, Soares AMVM, Prat N. Evaluation of side-effects of Glyphosate mediated control of Giant Reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. *Environ Res* 2010 Ago;110(6):556--64.

Raffel TR, Sheingold JL, Rohr JR. Lack of pesticide toxicity to *Echinostoma trivolvis* eggs and miracidia. *J Parasitol* 2009 Dez;95(6):1548-51.

Rahman WA, Collins GH. Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *Br Vet J* 1990 Nov/Dez;146(6):543-50.

Ramirez-Avila L, Slome S, Schuster FL, Gavali S, Schantz PM, Sejvar J, et al.. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus* and *Gnathostoma* species. *Clin Infect Dis* 2009 Fev;48(3):322-7.

Ramos G, Marini, DC. Exames bioquímicos relacionados a alterações renais. *Foco* 2014 Jan/Jun;6:6-25.

Rej R. *Clinical Chemistry*. 1971.

Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Rey L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Ribeiro L, Costa E, Cleto E, Barbot J. Uma visão da abordagem da neutropenia. *Nascer e Crescer* 2011;20(4):255-61.

Rohr JR, Raffel TR, Sessions SK, Hudson PJ. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecol Appl* 2008 Out;18(7):1743-53.

Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013 Jan;13(1):9-22.

Rowlands GJ. A review of variations in the concentrations of metabolites in the Blood of beef and dairy cattle associated with physiology, nutrition and disease, with

particular reference to the interpretation of metabolic profiles. *World Ver Nutr Diet* 1980;35:172-235.

Salbego J, Pretto A, Gioda CR, de Menezes CC, Lazzari R, Neto JR, et al. Herbicide formulation with Glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol* 2010 Abr;58(3):740-45.

Samsel A, Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy* 2013 Abr;15(4):1416-63.

Santos NSJ, Draibe SA, Kamimura MA, Cuppari L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev Nutr* 2004;17(3):339-49.

Sasaki O, Sugaya H, Ishida K, Yoshimura K. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol* 1993 Jun;15(6):349-54.

Sawanyawisuth K, Takahashi K, Hoshuyama T, Sawanyawisuth K, Senthong V, Limpawattana P, et al. Clinical factors predictive of encephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Out;81(4):698-701.

Sawanyawisuth K, Chotmongkol V. Eosinophilic meningitis. *Handb Clin Neurol* 2013;114:207-15.

Schinoni MI. Fisiologia hepática. *Gaz Med Bahia* 2006;76(1):5-9.

Schnyder M, Fahrion A, Riond B, Ossent P, Webster P, Kranjc A, et al. Clinical, laboratory and pathological findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res* 2010 Nov;107(6):1471-80.

Scott PR, Sargison ND, Macrae A, Rhind SR. An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: ultrasonographic biochemical and histological studies. *Vet J* 2005 Nov;170(3):325-31.

SEI/ANVISA – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Nota técnica Nº 23 – 0370960. Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida à consulta pública. 2018 [acesso em 01 dez 2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018++Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>.

Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, et al. Replublished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur* 2014 Jun; 26(1):14.

Sergi CM. Glyphosate: a herbicide. In: Nriagu J. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier. 2. ed. Elsevier; 2019.

Shan LV. Epidemiology of *Angiostrongylus cantonensis* and eosinophilic meningitis in the People's Republic of China. Xinyang. Dissertação [Doutorado em Ciências] – University of Basel; 2011.

Shan LV, Mahamood M. Nematology: Concepts, diagnosis and control. Croácia: National and University Library in Zagreb; 2017.

Sharma S, Sarkar JJ, Haldar C, Sinha S. Melatonin Reverses Fas, E₂F-1 and Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis and Dysregulation of Autophagy Induced by the Herbicide Atrazine in Murine Splenocytes. PLoS One 2014 Set;9(9):e108602.

Shu-hua X, Ju S. *Schistosoma* hemozoin and its possible roles. Inter J Parasitol 2017;47:171-83.

Silva RC. Avaliação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 em um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T, utilizando a Citometria de Fluxo. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

Simões RO, Monteiro FA, Sanchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF, et al. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. Emerg Infect Dis 2011 Jul;17(7):1331-3.

Sinawat S, Sanguansak T, Angkawinijwong T, Ratanapakorn T, Intapan PM, Yospaiboon Y. Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases. Eye 2008 Jun;22:1446-8.

Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, et al. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. N Engl J Med 2002 Fev;246(9):668-75.

Slom T, Johnson S. Eosinophilic meningitis. Curr Infect Dis Rep 2003 Ago;5(4):322-8.

Smyth JD. Introduction to animal parasitology. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.

Sochová I, Hofman J, Holoubek I. Using nematodes in soil ecotoxicology. Environ Int 2006 Abr;32(3):374-83.

Sodré FL, Costa JCB, Lima JC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. J Bras Patol Med Lab 2007 Set/Out;43(5):329-37.

Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Environ Toxicol Chem 1996;15(1):10-1.

Spratt DM. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in Wildlife: a review. Inter J Parasitol 2015 Ago;4(2):178-89.

Stevens WJ, Bortier H, Van Meir F. Anatomy, Embryology, Histology and Physiology of the Spleen. In: De Schepper AM, Vanhoenacker F. Medical Imaging of the Spleen: Medical Radiology (Diagnostic Imaging). Berlin: Springer; 2000.

Sugaya H, Yoshimura K. T-cell-dependent eosinophilia in the cerebrospinal fluid of the mouse infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasite Immunol 1988 Mar;10(2):127-38.

Sugaya H, Aoki M, Abe T, Ishida K, Yoshimura K. Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res 1997a;83(1):10-5

Sugaya H, Aoki M, Yoshida T, Takatsu K, Yoshimura K. Eosinophilia and intracranial worm recovery in interleukin-5 transgenic and interleukin-5 receptor a chain-knockout mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res 1997b;83(6):583-90.

Sumner JB. A method for colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1924;133:539.

Tarouco FM, De Godoi FGA, Velasques RR, Guerreiro AS, Geihs MA, da Rosa CE. Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta *Laeonereis Acuta*: Cholinesterases and oxidative stress. Ecotoxicol Environ Saf 2017 Jan;135:259-66.

Telega GW. Hepatomegaly. In: Kliegman RM, Lye PS, Bordini B, Toth H, Basel D. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis. Filadélfia: Elsevier; 2018a.

Telega GW. Jaundice. In: Kliegman RM, Lye PS, Bordini B, Toth H, Basel D. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis. Filadélfia: Elsevier; 2018b.

Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation. Indian J Pediatr 2007 Jul; 74(7):663-71.

Thiengo SC, Maldonado Júnior A, Mota EM, Torres E JL, Caldeira R, Carvalho OS, et al. The Giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, Northeast Brazil. Acta Trop 2010 Set; 115(3):194-9.

Thiengo SC, Simões RO, Fernandez MA, Maldonado Júnior A. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. Hawaii J Med Public Health 2013 Jun;72(6 Suppl 2):18-22.

Tizhe EV, Ibrahim NDG, Fatihu MY, Ignokwe IO, George BDJ, Ambali SF, et al. Serum biochemical assessment of hepatic and renal functions of rats during oral exposure to Glyphosate with zinc. Comp Clin Path 2014;23(4):1043-50.

Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. N Engl J Med 1998 Out;339(17):1217-27.

Travassos L. Introdução ao estudo da helmintologia. Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Biologia; 1950.

Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006;24(5):548-65.

Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, et al. Eosinophilic Meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases.

Tsai HC, Lee SSJ, Huang CK, Yen CM, Chen ER, Liu YC. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in Southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 2004 Ago;71(2):222-6.

Valero MA, Gironès N, García-Bodelón MA, Periago MV, Chico-Calero I, Khoubbane M, et al. Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Trop* 2008 Out;108(1):35-43.

Valero MA, Perez-Crespo I, Chillón-Marinas C, Khoubbane M, Quesada C, Reguera-Gomez M, et al. *Fasciola hepatica* reinfection potentiates a mixed Th1/Th2/Th17/Treg response and correlates with the clinical phenotypes of anemia. *PLoS ONE* 2017;12(3):e073456.

Vitorino RR, Souza FPC, Costa Ade P, Faria Júnior FC, Santana LA, Gomes AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev Bras Clin Med* 2012 Jan-Fev;10(1):39-45.

Wallace GD, Rosen L. Studies on eosinophilic meningitis. 2. Experimental infection of shrimp and crabs with *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Epidemiol* 1966 Jul;84(1):120-31.

Wallace GD, Rosen L. Studies on eosinophilic meningitis. IV. Experimental infection of fresh-water and marine fish with *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Epidemiol* 1967 Mai;85(3):395-402.

Wang LC, Chao D, Chen ER. Experimental infection routes of *Angiostrongylus cantonensis* in mice. *J Helminthol* 1991 Dez;65(4):296-300.

Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 2008 Out;8(10):621-30.

Wang QP, Wu ZD, Wei J, Owen RL, Lun ZR. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012 Abr;31(4):389-95.

Wang L, Deng Q, Hu H, Liu M, Gong Z, Zhang S, et al. Glyphosate induces benign monoclonal gammopathy and promotes multiple myeloma progression in mice. *J Hematol Oncol* 2019 Jul;12(1):70.

Wen-Yuan D, Chi-Wu C, Feng-Kuan L, Chih-Cheng C. IL-33 mediates the expressions of IL-5 and IL-13 in *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Exp Parasitol* 2013 Nov;135(3):587-94.

Willard M, Tvedten H, Turnwald GH. Diagnóstico clínico patológico práctico en los animales pequeños. Buenos Aires: Intermedica; 1993.

Williams GM, Kroes R, Munro, IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, Glyphosate, for humans. Regul Toxicol Pharmacol 2000 Abr;31(2 Pt 1):117-65.

Yamada T, Castro PRC. Efeitos do Glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. Encarte do Informações Agronômicas 2007 Set;119:1-32.

Yoshimura K, Sugaya H, Kawamura K, Kumagai M. Ultrastructural and morphometric analyses of eosinophils from the cerebrospinal fluid of the mouse and guinea-pig infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasite Immunol 1988 Jul;10(4):411-23.

Yoshimura K, Sugaya H, Ishida K. The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. Parasitol Today 1994 Jun;10(6):231-3.

Yousef MI, Ibrahim HZ, Yacout MHM, Hassan AA. Effects of Cypermethrin and Dimethoate on Some Physiological and Biochemical Parameters in Barki Sheep. Egyptian J Nutr Feed 1998;1:41-52.