

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO *LATU SENSU* EM MALACOLOGIA DE VETORES

IOLANDA DEOLINDA DE SOUZA

**COMPARAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE DUAS
ESPÉCIES DE PLANORBÍDEOS *Biomphalaria glabrata* Say, 1818
e *B. tenagophila* D'Orbigny, 1835 FRENTE À INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Angiostrongylus costaricensis* Morera &
Céspedes, 1971.**

Rio de Janeiro

2014

IOLANDA DEOLINDA DE SOUZA

**COMPARAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE DUAS
ESPÉCIES DE PLANORBÍDEOS *Biomphalaria glabrata* Say, 1818
e *B. tenagophila* D'Orbigny, 1835 FRENTE À INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Angiostrongylus costaricensis* Morera &
Céspedes, 1971.**

Trabalho apresentado à coordenação do curso de Especialização em Malacologia de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito parcial à obtenção, do grau de Especialista em Malacologia de vetores.

Rio de Janeiro

Março, 2014



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Malacologia de Vetores

IOLANDA DEOLINDA DE SOUZA

Trabalho apresentado à coordenação do curso de Especialização em Malacologia de vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito parcial necessário à obtenção do grau de Especialista em Malacologia de Vetores, pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, avaliada pela comissão formada pelos professores:

Orientadora: _____

Dra. Ester Maria Mota.

1º Examinador: _____

Dra. Monica Ammon Fernadez

2º Examinador: _____

Dra. Langia Colli Montresor

Suplente: _____

Dr. Arnaldo Maldonato

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

S729 Souza, Iolanda Deolinda de

Comparação dos aspectos histológicos de duas espécies de planorbídeos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 e *B. tenagophila* D'Orbigny, 1835 frente à infecção experimental por *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cépedes, 1971 / Iolanda Deolinda de Souza. – Rio de Janeiro, 2014.

xvi, 63 f. : il. ; 30 cm.

Monografia (Especialização) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Malacologia de vetores, 2013.
Bibliografia: f. 48-56

1. *Angiostrongylus costaricensis*. 2. *B. glabrata*. 3. *B. tenagophila*. 4. Hospedeiro intermediário. 5. Granuloma. I. Título.

CDD 571.999

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Orientadora

Dra. Ester Maria Mota

DEDICATÓRIA

A dedicatória deste trabalho vai especialmente para duas pessoas excelentes e que sempre deixarão saudades também como professores, ao Dr. Henrique Leonel Lenzi (em memória) e Dra. Jane Guilhermina Arnt Lenzi, que tiveram muita importância na minha formação acadêmica, pelos inúmeros incentivos, que não foram poucos, e que nunca deixaram de acreditar em mim, me proporcionando sonhar acordada visualizando o que para mim hoje é uma realização, onde escalo mais um degrau na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para prosseguir nesta minha caminhada.

Aos meus pais Valdemar (em memória) e Judith que apesar de tudo me mostraram o caminho a ser seguido.

Aos coordenadores do curso pela oportunidade e privilégio que nos foram dados em compartilhar tamanha experiência e competência com professores que fizeram a diferença para relevância do curso e nos temas que vão facilitar a minha trajetória no profissional.

Ao Carlos José da Silva pelo companheirismo presente em todas as horas, que me dá força para prosseguir em tudo que almejo.

Aos meus filhos Sheila, Monique e Felipe e meus netos Rodrigo e Gabriel que poderão me ter como espelho.

A minha orientadora e amiga a qual não tenho palavras para mostrar minha gratidão Dra. Ester Maria Mota.

Aos amigos do laboratório de Malacologia pela interação que sempre tiveram conosco, e que contribuíram me cedendo as *Biomphalaria* em estudo.

Ao Rodrigo Méxas do setor de imagem pela sua colaboração.

A todos os colegas do laboratório o de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz que sem os quais não seria possível a realização desse Trabalho.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indiretamente que contribuíram nas diferentes etapas do desenvolvimento deste trabalho. Somente uma palavra para expressar minha gratidão: Obrigada!

EPIGRAFE

“Grandes realizações não são feitas por impulsos, mas por uma junção de pequenas realizações.”

Vincent Van Gogh

RESUMO

O *Angiostrongylus costaricensis* é um metastrongilídeo responsável por um processo inflamatório agudo intestinal denominado angiostrongilíase abdominal, que afeta o homem. Este é considerado hospedeiro acidental, pois não elimina larvas nas fezes o que dificulta o diagnóstico parasitológico. Lesmas da família Veronicellidae são descritas como principais hospedeiros naturais do *A. costaricensis*, e já foram utilizadas no ciclo experimental. Entretanto, devido à dificuldade de procriação em laboratório, tem-se utilizado caramujos *Biomphalaria glabrata* na manutenção de ciclos experimentais. Além dessa espécie, outros moluscos também se mostraram suscetíveis à infecção. Este trabalho teve por objetivo estudar alterações histopatológicas decorrentes do desenvolvimento do *A. costaricensis* em diferentes populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e ainda comparar alguns aspectos epidemiológicos como mortalidade e eliminação larvária a fim de compreender como o *A. costaricensis* consegue burlar diferentes respostas imunes e completar seu desenvolvimento. Para tal, foram utilizados duas populações de *B. glabrata*: de Ressaca e de Barreiro de Cima e duas populações de *B. tenagophila*: de Itamaraju e Jacarepaguá. Os moluscos foram expostos individualmente a 1200 L1. Para o estudo histológico, os animais foram mortos após 1, 5, 15, 25, 35 e 45 dias de infecção (5 animais/tempo de infecção). As partes moles foram fixadas em formalina Millonig de Carson, incluídas em parafina e coradas em HE, PAS, Alcian Blue pH 1.0 e 2.5, Reticulina de Gomori, Tricrômica de Masson e Von Kossa. Durante o experimento foi anotada a mortalidade excluindo-se os animais usados no estudo hispatológico. Os animais sobreviventes após 45 dias de infecção foram mortos e submetidos à digestão artificial em solução aquosa de pepsina a 0,038% pH 1.5 a 37°C para obtenção de L3 pelo método de Baermann. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a existência de duas vias migratórias utilizadas pelas larvas que são dependentes do sítio de penetração: via tegumentar (preferencial) com desenvolvimento dos parasitos na mufla e pé, e via oral com desenvolvimento larvar em vários tecidos. O modelo *B. tenagophila* de Jacarepaguá exibiu uma resposta inflamatória mais rápida com formação de granulomas aos cinco dias

de infecção. O infiltrado inflamatório em torno das larvas evoluiu para granulomas exsudativos produtivos sem causar morte dos parasitos. As populações de *B. tenagophila* estudadas apresentaram rendimento larvário médio de 54,5% e taxa de mortalidade em torno de 30%. *B. glabrata* de Barreiro de Cima apresentou maior taxa de mortalidade e menor rendimento larvário. Concluímos que as variações encontradas entre as espécies e populações estudadas são provavelmente devido às características genéticas e, entre os moluscos estudados *B. glabrata* de Ressaca apresentou maior potencial para manutenção do ciclo experimental considerando o rendimento larvário e a menor taxa de mortalidade.

PALAVRAS CHAVE: *Angiostrongylus costaricensis*, *B. glabrata*, *B. tenagophila*, hospedeiro intermediário, granuloma.

ABSTRACT

A. costaricensis is a metastrongylide responsible for the intense inflammatory reaction on the ileo-cecal region of the intestine known as Abdominal Angiostrongyliasis that affects humans. They are considered to be accidental hosts, because the larvae of the helminths are not eliminated on feces. This is what makes difficult the diagnosis of the disease. Slugs from the Veronicellidae Family are known to be the main intermediate hosts for *A. costaricensis* and were already used on the experimental life cycle of the helminth. However, due to the difficulty in breeding those animals in laboratory, *B. glabrata* snails have been used in the maintenance of the life cycle as a substitute host. Besides this, other planorbid species were also used as susceptible hosts. The objective of this work was to study histopathological reactions caused by the development of *A. costaricensis* on different populations of *B. glabrata* and *B. tenagophila* and compare some epidemiological aspects as mortality and larval retrieval to know how the *A. costaricensis* can deceive different immune responses and complete its development. To make this work, two populations of *B. glabrata* from Ressaca and Barreiro de Cima and two populations of *B. tenagophila* from Itamaraju and Jacarepaguá were used. Molluscs were individually exposed to 1200L1. To histological study, the animals were killed at 1, 5, 15, 25, 35 and 45 days after infection (5 animals/time of infection). The soft parts of the molluscs were fixed in Carson's Millonig Formalin, embedded in paraffin and stained in HE, PAS, Alcian Blue pH 1.0 and 2.5, Gomori's Reticulin, Masson's Trichromic and Von Kossa. During the experiment the mortality was observed excluding the animals used in the histological study. Surviving animals after 45 days of infection were killed and their bodies were digested with 0,038% pepsin pH 1.5 in aqueous solution in 37°C to obtain L3 by Baermann method. The results of this study confirm the existence of two migratory pathways used by larvae that were dependent of the penetration site: tegumental pathway (mainly) with development of parasites in the headfoot region and the oral pathway with larval development in several tissues. The model *B. tenagophila* from Jacarepaguá showed a faster inflammatory response with granuloma formation on 5th day after infection. The inflammatory infiltrate evolved to exudative-productive granulomas without parasites death. The populations of *B. tenagophila* studied, showed a 54,5% of larval retrieval and 30% of mortality rate. *B. glabrata* from Barreiro de Cima presented higher mortality and lowest larval retrieval. In conclusion, the variations found between the species and populations studied are, most likely, due to genetic characteristics and, among the studied mollusks, *B. glabrata* Ressaca strain showed a higher potential for cycle maintenance, due to the better larval retrieval and lower mortality rate.

KEY WORDS: *Angiostrongylus costaricensis*, *B. glabrata*, *B. tenagophila*, intermediate host, granuloma.

LISTA DE FIGURAS

1. Distribuição geográfica do <i>A. costaricensis</i> no Brasil.....	3
2. Esquema do ciclo biológico de <i>A. costaricensis</i>	5
3. L1, L2 e L3 de <i>A. costaricensis</i>	8
 Prancha 1: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 1 dia de infecção.....	28
 Prancha 2: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 5 dias de infecção.....	29
 Prancha 3: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 15 dias de infecção.....	30
 Prancha 4: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 25 dias de infecção.....	31
 Prancha 5: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 35 dias de infecção.....	32
 Prancha 6: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 45 dias de infecção.....	33
 Prancha 7: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Barreiro de Cima) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 1 e 5 dias de infecção.....	34
 Prancha 8: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Barreiro de Cima) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 15 dias de infecção.....	35

Prancha 9: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Barreiro de Cima) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 35 dias de infecção.....	36
Prancha 10: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Barreiro de Cima) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 45 dias de infecção.....	37
Prancha 11: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Itamaraju) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 1 e 5 dias de infecção.....	38
Prancha 12: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Itamaraju) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 15 (figuras 50, 51) e 25 dias de infecção (figuras 52, 53).....	39
Prancha 13: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Itamaraju) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 35 dias de infecção.....	40
Prancha 14: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Itamaraju) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 45 dias de infecção.....	41
Prancha 15: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Jacarepaguá) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 1 dia e 5 dias de infecção.....	42
Prancha 16: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Jacarepaguá) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 15 dias de infecção.....	43
Prancha 17: <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Jacarepaguá) infectada com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> com 25 dias e 45 dias de infecção.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das larvas de <i>A. costaricensis</i> no hospedeiro experimental <i>B. glabrata</i> (Ressaca).....	21
Tabela 2: Distribuição das larvas de <i>A. costaricensis</i> no hospedeiro experimental <i>B. glabrata</i> (Barreiro de Cima).....	22
Tabela 3: Distribuição das larvas de <i>A. costaricensis</i> no hospedeiro experimental <i>B. tenagophila</i> (Itamaraju).....	23
Tabela 4: Distribuição das larvas de <i>A. costaricensis</i> no hospedeiro experimental <i>B. tenagophila</i> (Jacarepaguá).....	24
Tabela 5: Evolução das larvas de <i>A. costaricensis</i> nos hospedeiros experimentais <i>B.glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i>	25
Tabela 6: Taxa de Mortalidade de <i>B.glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> frente à infecção por <i>A.costaricensis</i>	26
Tabela 7: Número de L3 obtidas de <i>B.glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> infectadas por <i>A. costaricensis</i>	27

SUMÁRIO

I. Introdução.....	1
1.1. Distribuição do <i>A. costaricensis</i> no Brasil.....	2
1.2. Ciclo Biológico.....	4
1.3. Hospedeiro Definitivo.....	6
1.4. Hospedeiro Intermediário Natural e Experimental.....	6
1.5. Morfologia das Larvas.....	7
1.6. Patologia Humana.....	8
1.7. Distribuição do Gênero <i>Biomphalaria</i> no Brasil.....	8
1.8. Características Gerais das <i>Biomphalaria</i> em Estudo.....	9
II. JUSTIFICATIVA.....	10
III. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Manutenção do Ciclo Experimental.....	12
4.2. Animais e Infecção.....	12
4.3. Necropsia e Obtenção L3.....	13
4.4. Estudo Histopatológico.....	13

V. Resultados.....	14
5.1.Histopatológicos.....	14
5.1.1. <i>Biomphalaria glabrata</i> (Ressaca).....	14
5.1.2. <i>Biomphalaria glabrata</i> (Barreiro de Cima).....	15
5.1.3. <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Itamaraju).....	16
5.1.4. <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Jacarepaguá).....	17
5.1.5. Tabelas.....	19
5.1.6. Desenvolvimento dos Parasitos.....	23
5.1.7. Mortalidade dos Hospedeiros.....	24
5.1.8. Eliminação das L3.....	25
5.1.9. Pranchas.....	26
VI. DISCUSSÃO.....	43
VII. CONCLUSÕES.....	47
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
VIII. ANEXOS.....	57

I. INTRODUÇÃO

Angiostrongylus costaricensis (Morera & Céspedes, 1971) é um nematódeo da família Angiostrongylidae, que causa a Angiostrongilíase Abdominal (Morera & Céspedes 1971b), um processo inflamatório agudo intestinal, que afeta a região ileocecal e mesentérico e que pode ser confundido com outras etiologias. A localização preferencial do parasito é nos ramos da artéria mesentérica superior. O homem é considerado hospedeiro acidental, pois não há eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes, o que dificulta o diagnóstico. Anti-helmínticos convencionais não são eficazes contra o parasito.

Este helminto tem como hospedeiros definitivos roedores silvestres (Moreira, 1970) e como hospedeiros intermediários, moluscos pulmonados terrestres, principalmente da família Veronicellidae (Morera 1973). Os roedores infectam-se ingerindo moluscos ou alimentos contaminados com L3, que se desenvolvem e migram no sistema linfático-venoso/arterial até alcançarem o habitat final. Vermes adultos fêmeas depositam seus ovos que são embolizados para a parede intestinal, onde eclodem L1. Estas são eliminadas junto às fezes e no ambiente penetram ativamente pelo tegumento do molusco ou podem ser ingeridas por esses, junto com as fezes ou alimentos, (Morera, 1973 Thiengo; 1996). No interior dos moluscos, as L1 sofrem duas mudas (L1→ L2 e L2→ L3). As L3, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, podem ser eliminadas na secreção mucosa ou permanecer no tecido fibromuscular do molusco (Morera, 1973).

Lesões causadas pelo *A. costaricensis* foram observadas inicialmente na Costa Rica no início dos anos cinqüenta, a partir de exame de peças cirúrgicas (Morera & Céspedes, 1971). Somente após a descoberta dos hospedeiros definitivo (Morera, 1970) e intermediário (Morera & Ash, 1971) é que o *A. costaricensis* foi descrito como uma nova espécie (Morera & Céspedes, 1971a).

Estudos posteriores permitiram a descrição do ciclo de vida do parasita o que tornou possível a identificação de casos humanos em outros países (Morera, 1973).

1.1. Distribuição de *A. costaricensis* no Brasil.

A Angiostrongilíase abdominal tem ampla distribuição geográfica no continente americano. No Brasil, a doença está concentrada nas regiões Sul e Sudeste. O primeiro caso de Angiostrongilíase foi relatado em São Paulo (Ziliotto et al, 1975). Outros casos foram descritos no Distrito Federal (Barbosa et.al, 1980; Magalhães et al, 1982), Espírito Santo (Pena et al,1995), Paraná (Ayala et al, 1987; Ayala, 1982), Santa Catarina (Ayala, 1987; Luzzi & Newmann, 1989), Minas Gerais (Rochas et.al, 1991) e Rio Grande do Sul (Agostini et al, 1983 e 1984; Graeff-Teixeira, 1991) (Figura1).

Além da Costa Rica (Céspedes et al, 1967) outros casos foram relatos também na Venezuela (Zambrano, 1973), Argentina (Demo & Passat, 1986), Guatemala (Kramer et al, 1998), Martinica (Jeandel et al 1988), Nicarágua (Duarte et al 1991), Guadalupe (Juminer et al, 1992), Panamá (Sanches, 1992), Estados Unidos (Hulbert et al, 1992; Liacouras et al, 1993), México (Velázquez et al, 1974) e El Salvador (Sauerbrey, 1977). Zaire (Baiard et al, 1987), foi o único caso fora da América Latina.

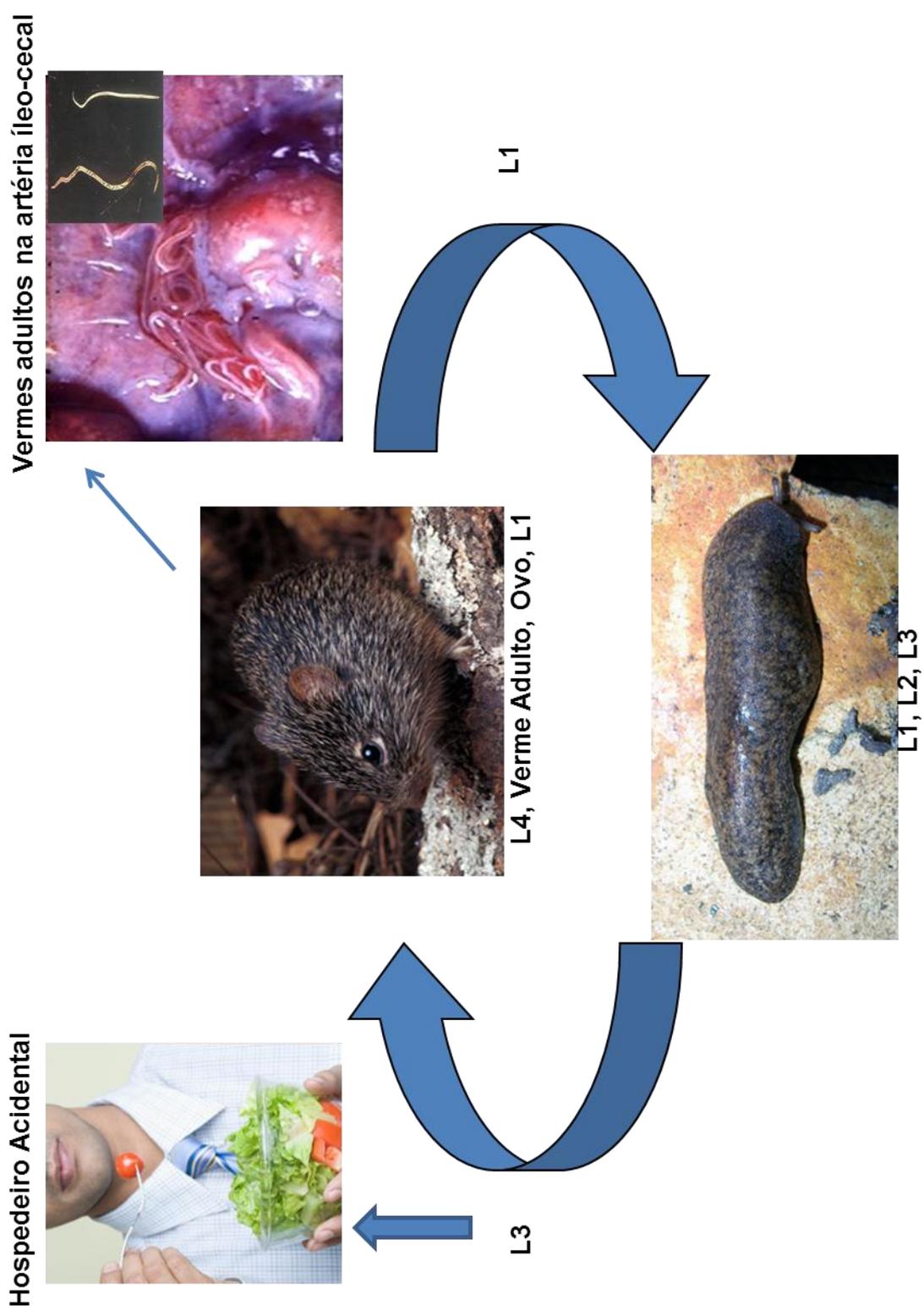
Figura 1: Distribuição geográfica do *A. costaricensis* no Brasil.



1.2. Ciclo Biológico

Vermes adultos machos e fêmeas habitam os ramos íleo-cecais da artéria mesentérica superior de seus hospedeiros vertebrados, principalmente roedores (Morera & Céspedes, 1971a). Neste local as fêmeas depositam ovos, que são carregados pela circulação sanguínea para a parede intestinal, onde eclodem L1 que são eliminadas junto com as fezes. No meio ambiente, moluscos terrestres tornam-se infectados ao se alimentarem das fezes dos roedores infectados ou de vegetais contaminados com as fezes contendo L1 (Morera, 1973; Tesh et al, 1973). A infecção do molusco também pode ocorrer pela penetração das L1 através do tegumento (Thiengo, 1996; Mendonça et al, 1999). No hospedeiro invertebrado, as L1 sofrem duas mudas: L2 e L3. As L3, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, podem ser eliminadas no muco. O hospedeiro vertebrado infecta-se quando ingere o molusco infectado ou alimentos contaminados com o muco contendo L3 (Morera, 1973). Estas penetram o trato digestório entre o estômago e o duodeno e seguem por duas vias migratórias antes de completar seu desenvolvimento em vermes adultos: via linfático/arterial (principal) e via venosa intra-hepática (secundária) (Mota & Lenzi, 2005) (Figura 2).

Figura 2: Esquema do ciclo biológico de *Angiostrongylus costaricensis* (Moreira, 1973)



1.3. Hospedeiro Definitivo

Sigmodon hispidus Say & Ord, 1825 conhecido como “rato do algodão”, é encontrado desde sul dos Estados Unidos até o norte do Peru (Rey, 2010). Este roedor é considerado o mais importante hospedeiro na Costa Rica (Morera, 1985).

Em estudos epidemiológicos observou se que vários roedores, servem de hospedeiros ao *A. costaricensis*: *Rattus rattus* Fisher de Waldheim, 1803 (Morera, 1971), *Zygodontomys microtinus* J. A. Allen & Chapman, 1893 *Liomys adpersus* Peters, 1874, *L. salvini* Thomas, 1893, *Oligoryzomys fulvescens* Saussure, 1860 (= *O. navys* Bangs, 1899), *O. caliginosus* Tomes, 1860 (= *Melanomys caliginosus*, 1860) *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, *Tylomys watsoni*, Thomas, 1899 *Proechimys* sp. Allem, 1899, *Proechimys semispinosus* Tomes, 1860 (= *Proechimys gorgonal*, 1905) *Proechimys nudipes* Tomes, 1860, *Meriones unguiculatus*, Milne –Edwards, 1867 *Oryzomys albigulares*, Hesperomys albigularis Tomes, 1860 (= *Oryzomys albigularis* Thomas, 1894), *O. fulvescens* Saussure, 1860 (= *Oryzomys navus* Bangs 1899) e *O. caliginosus* Baird, 1857. No sul do Brasil foi constatada a infecção em *O. nigripes* Olfers, 1818 (Morera, 1971), e *O. ratticeps* Hensel, 1873 (Santos 1985), (Tesh et al, 1973), (Malek, 1981), (Morera, 1986), (Morera, 1971), (Rey, 2010) (Graeff-Teixeira et al, 1990).

Apesar dos roedores serem considerados os principais hospedeiros do ciclo natural, outras espécies de mamíferos, tais como, o quati (*Nasua narica bullata*) Linnaeus, 1766, saguis *Saguinus mystax* Spix, 1803 e *Callithrix penicillata* Geoffroy, 1812 e o cão *Canis lupus familiaris* foram encontrados naturalmente infectados. (Sly et al 1982), (Brack & Schpel, 1995), (Mojon, 1994).

1.4. Hospedeiro Intermediário Natural e Experimental

As observações feitas por Morera & Céspedes (1971a) descrevem a lesma *Sarasinula plebeia* (P. Fischer, 1868) da família Veronicellidae, como principal hospedeiro intermediário no ciclo natural do *A. costaricensis* na Costa Rica.

No sul do Brasil foram encontrados os seguintes moluscos terrestres infectados naturalmente: *Limax maximus*, *L. flavus* Linnaeus, 1758, *Bradybaena similaris* Ferussac, 1821, *Phyllocaulis variegatus* Semper, 1885 (Rambo et al, 1997) e *S. linguaeformis* Semper, 1885 (Laitano et al, 2001), *P. soleiformis* D'Orgibny, 1835, *Belocaulus angustipes* Heynemann, 1885 (Graeff-Teixeira et al, 1993 e 1994; Rambo et al, 1997) e *Helix aspersa* Linnaeus, 1758 (Thiengo et al, 1993).

Lesmas *Veronicella occidentalis* (Malek, 1981), *Sarasinula marginata* (Lima et al, 1992), *P. boraceiensis* (Bonetti & Graeff-Teixeira, 1998) e caracóis do gênero *Megalobulimus* (Graeff-Teixeira, 1989) e *Achatina fulica* Ferussac, 1821 (Neuhauss et al, 2007) mostraram-se suscetíveis à infecção experimental.

Algumas espécies de planorbídeos também foram experimentalmente suscetíveis à infecção experimental: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*.

1.5. Morfologia das Larvas

As L1 são muito ativas ao saírem das fezes e medem de 0,26mm a 0,29mm de comprimento por 14µm a 15µm de largura. A extremidade anterior do corpo é arredondada e a posterior, gradualmente atenuada. Em cada lado do corpo, dividindo o em porções dorsal e ventral, percorrem duas alas membranosas, que se iniciam próximo às extremidades anteriores e se estendem posteriormente até um pequeno ponto no final da calda. Possui esôfago claviforme delgado, com 0,128mm de extensão. O intestino é tubular, repleto de material granular. O primórdio genital localiza se a 85µm da face posterior o orifício anal localiza se no lado ventral e dista 26µm da extremidade final (Morera, 1973).

As L2 chegam atingir 0,37mm de comprimento por 0,36µm de largura. Apresentam grade numero de grânulos internos, sendo a maioria de natureza lipídica (Morera, 1973; Mendonça 1999).

As L3 medem de 0,46 a 0,48µm podendo estar enrolada inerte ou em movimento (Morera, 1973). A forma do corpo e similar aos estágios anteriores. As alas laterais são mais expeças esôfago claviforme mede 0,164mm e é seguido por um intestino tubular, cuja abertura anal dista 32µm da extremidade final. O corpo excretor e o ânus situam - se no lado ventral do corpo. O anel nervoso e o poro excretor estão localizados a 0,164mm da extremidade distal. A cauda, que apresenta uma endentação do lado dorsal coincidente com um alargamento do lado ventral, tem a superfície provida de projeções minúsculas semelhantes a bolhas .(Morera,1973;ISHIH et al.,1990)



Figura 3 : L1, L2 e L3 de *A. costaricensis*

1.6. Importância da Angiostrongilíase abdominal

A angiostrongilíase abdominal é uma doença subdiagnosticada, pois apresenta características clínicas confundíveis com outras etiologias. A maioria dos casos humanos é assintomática e apenas os casos mais graves, que exigem intervenção cirúrgica, tem o diagnóstico confirmado pelo exame histopatológico. Não há testes diagnósticos aplicáveis às áreas endêmicas devido à baixa especificidade e sensibilidade dos até então concebidos.

Vermes adultos são resistentes a anti-helmínticos convencionais que provocam, quando administrados, migração dos vermes para vasos do trato genital, agravando o quadro. Há relatos de óbitos na literatura em virtude da formação de abscesso e sepse decorrentes do intenso processo inflamatório intestinal.

Apesar de não haver na cultura brasileira o uso de moluscos terrestres na alimentação, casos humanos no Brasil estão associados a ingestão destes inadvertidamente junto com verduras ou no contato da secreção mucosa contaminada com a boca após manipulação de moluscos usados como iscas. Deste modo, as principais medidas preventivas são: a higienização de frutas e verduras e a informação quanto às formas de infecção (Graeff-Teixeira et al, 1991b).

1.7. Características Gerais das *Biomphalaria* em Estudo

B. glabrata adulta tem concha grande e lisa com diâmetro de 20mm a aproximadamente 40mm; de 5mm a 8mm de largura, com cerca de 6 a 7 giros arredondados, aumentando gradativamente o seu diâmetro. Apresenta-se com uma periferia arredondada com tendências para a direita e o lado direito ligeiramente côncavo, com o giro central profundo, e o esquerdo formando cavidade rasa. A sutura encontra-se bem marcada em ambos os lados. A periferia é arredondada, tendendo para a direita, com abertura oval ou arredondada (Carvalho, 2008). A cor natural da concha é amarelo palha, mas modifica-se em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, o que pode conferir as conchas coloração mais escura, variando do marrom até o negro (Ministério da Saúde, 2008).

B. tenagophila adulta possui concha grande, apresenta na fase adulta uma “quilha” carenada em ambos os lados, com diâmetro de 15mm a aproximadamente 35mm, com cerca de 7 a 8 giros carenados, mais acentuados à esquerda, periferia arredondada, tendendo para a direita, aumentando lentamente o seu diâmetro. A diferença entre essas duas espécies é a presença de crista renal e em *B. glabrata* e a concha carenada em *B. tenagophila*.

1.8. Distribuição do gênero *Biomphalaria* no Brasil

O Brasil tem dez espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria* identificados (Paraense, 1986). No entanto, três espécies têm importância médica que são: *B. glabrata*, encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe, *B. straminea* está presente no Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins.

B. tenagophila é encontrada em algumas regiões dos estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Sergipe e Paraná.

Os moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* estão distribuídas nas regiões onde a prevalência da Esquistossomose é alta (Paraense 1986).

II. JUSTIFICATIVA

Lesmas da família Veronicellidae são descritas como principais hospedeiros naturais do *A. costaricensis*, tendo sido também utilizadas no ciclo experimental (Mendonça et al, 1999). Entretanto, esses animais são difíceis de procriar em laboratório. Atualmente, o encontro de lesmas no habitat natural tem sido dificultado também pelo uso de moluscidas (Lima, 1992). Pesquisadores da angiostrongilíase abdominal têm relatado em seus artigos a manutenção experimental em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) (Banevicius et al, 2006). A eficácia dessa espécie ao *A. costaricensis* favoreceu sua introdução como modelo experimental no estudo e manutenção do ciclo desse parasito. Outros planorbídeos, *B. straminea* Dunker, 1848 e *B. tenagophila* Orbigny, 1835 também se mostraram suscetíveis à infecção experimental (Lima et al, 1992). Estudar parâmetros parasitológicos, tais como a mortalidade, fecundidade/fertilidade, número de larvas eliminadas e análise histológica podem facilitar a compreensão do comportamento desses modelos frente à infecção por *A. costaricensis*, a fim de se conseguir melhor rendimento na obtenção de larvas para estudos morfofisiológicos, proteômicos, genéticos e para diagnóstico. A comparação entre os modelos com maior ou menor suscetibilidade pode também ajudar na compreensão de como o *A. costaricensis* consegue burlar diferentes respostas imunes e se desenvolver em diferentes hospedeiros intermediários.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações histopatológicas decorrentes do desenvolvimento do *A. costaricensis* em duas espécies de planorbídeos *B. glabrata*, e *B. tenagophila* de localidades diferentes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever alterações histopatológicas nos moluscos com 1, 5, 15, 25, 35 e 45 dias após a infecção.
2. Observar a mortalidade dos animais durante a infecção.
3. Verificar o rendimento larvar dos hospedeiros experimentais.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção do ciclo experimental

A manutenção do ciclo experimental do *A. costaricensis* é realizada no Laboratório de Patologia-IOC/Fiocruz em roedores *Sigmodon hispidus* (Say & Ord, 1825) e em *B. glabrata*. Fezes dos roedores infectados foram colocadas em aparelho de Baermann-Moraes (Moraes, 1948) por 12 horas para obtenção de L1. Cinquenta mililitros do líquido decantado foram centrifugados a 2000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado até deixar o volume de dez mililitros. Este foi homogeneizado e uma alíquota de 100µL foi usada para contagem das larvas em microscópio óptico invertido Willovert. Uma regra de três foi feita para se determinar o volume para se conter 1200 L1.

4.2. Animais e Infecção

Descendentes de *B. glabrata* (de 8mm a 10mm de diâmetro) obtidas de Barreiro de Cima (Belo Horizonte) e Ressaca (Contagem), Minas Gerais e *B. tenagophila* (de 8mm a 10mm de diâmetro) dos municípios de Jacarepaguá (Rio de Janeiro), Rio de Janeiro e Itamaraju (Bahia), criadas no Laboratório de Referência em Malacologia Médica - IOC/Fiocruz foram dispostas em placas de cultura contendo 24 poços e expostas individualmente a 1200 L1 por 24 horas. Após este período, os moluscos foram transferidos para aquários individuais, onde foi fornecida alface *ad libitum*. Foi anotado o número de animais mortos no transcurso da infecção. Cada população contou com 24 indivíduos a serem expostos as larvas.

4.3. Obtenção de L3

Os animais sobreviventes de cada grupo foram mortos a partir do esmagamento entre placas de vidro e suas partes moles foram digeridas em líquido digestivo artificial composto por: pepsina (Sigma-P7125) a 0,38% e ácido clorídrico a 0,7% em solução aquosa e incubados a 37°C por duas horas em banho maria. Foi procedido o método de Baermann conforme Moraes (1948) descrito acima para obtenção e contagem de L3.

4.4. Estudo Histológico

Cinco moluscos de cada população foram mortos através do esmagamento entre placas de Petri para retirada da concha (Brasil, 2008) 1, 5, 15, 25, 35 e 45 dias após a infecção. As partes moles foram fixadas em Formalina Millionig de Carson (Carson et al, 1973), desidratados em séries alcoólicas crescentes (etanol 20%, 30%, 50%, 70% e 95% por 30 minutos cada banho), diafanizadas em butanol absoluto (três banhos de 30, 40 e 60 minutos cada), incluídas em parafina e coradas com: Hematoxilina e Eosina, PAS (Reação do Ácido Periódico de Schiff), Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH 2.5, Tricrômica de Masson, Reticulina de Gomori e Von Kossa. As lâminas histológicas foram observadas em Microscópio Óptico Observer Z1 (Zeiss) e as imagens capturadas com câmera AxioCam HRc (Zeiss).

Foi realizado o acompanhamento dos animais restantes que não foram utilizados no estudo histológico até 98 dias após a infecção, quando os animais foram mortos a fim de se obter L3. Os dados referentes ao acompanhamento estão na Tabela 6 e também estão inclusos os dados da mortalidade dos animais usados para histologia.

5.1. ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS

5.1.1. *Biomphalaria glabrata* (Ressaca)

1 Dia de infecção

A maioria das larvas concentrou-se no pé, mas também foram observadas na mufla, camada muscular e tentáculos. Nos demais órgãos não foram encontrados parasitos. Reação hemocitária em torno dos parasitos foi observada na mufla e no pé, onde as larvas estavam na fase de L2 (Prancha 1 Figuras 1 a 4)

5 Dias de infecção

Todos os parasitos observados estavam na fase de L2 e situados na mufla e no pé, envolvidos ou não por reação inflamatória. (Prancha 2 Figuras 5 a 8)

15 Dias de infecção

Muitas larvas foram vistas na mufla, inclusive próximas ao olho, mas também estavam distribuídas nos tentáculos, na parede da cavidade do manto e no rim, envolvidas por reação granulomatosa. Neste tempo de infecção havia L2 e L3. (Prancha 3 Figuras 9 a 13)

25 Dias de infecção

L2 e L3 estavam concentradas na mufla e tentáculos, acompanhados ou não por reação inflamatória. Poucas larvas foram observadas na camada muscular e na parede da cavidade do manto. (Prancha: 4 Figuras 14 e 15)

35 Dias de infecção

Reação granulomatosa exsudativa produtiva entorno dos parasitos presentes na parede da cavidade do manto, mufla e tentáculo, apresentou carboidratos distribuídos de forma homogênea ao PAS. Larvas situadas na camada muscular estavam envoltas por infiltrado inflamatório discreto. (Prancha: 5 Figuras: 16 a 21)

45 Dias de infecção

Granulomas circundando as larvas foram encontrados nos tentáculos, próximo a parede intestinal, na glândula nidamental e no ovoteste. A maioria das larvas ainda estava concentrada na mufla, embora algumas estivessem localizadas na parede da cavidade do manto. (Prancha 6, Figuras 22 a 24).

5.1.2. *Biomphalaria glabrata* (Barreiro de Cima)

1 Dia de infecção

Várias larvas foram encontradas na mufla sem reação inflamatória. Algumas L1 também foram vistas na luz intestinal. (Prancha 7, 1 dia de infecção figuras 25 e 26)

5 Dias de infecção

Poucas L2 foram observadas na mufla com reação inflamatória. (Prancha 7) 5 dias de infecção (Figuras 27 a 30).

15 Dias de infecção

A maioria das larvas estava concentrada na mufla, mas também foram observadas nos tentáculos, rins, próximo à parede do intestino e na camada fibromuscular. (Prancha 8, Figuras 31 a 36)

25 Dias de infecção

Neste tempo de infecção foi observado maior número de larvas (L2/L3) que no modelo Ressaca. Os parasitos, com ou sem reação inflamatória envolvendo-os, ainda concentravam-se na mufla.

35 Dias de infecção

O mesmo aspecto de 25 dias foi observado neste tempo de infecção, o qual também apresentou L2/L3 envolvidos por reação inflamatória discreta na glândula digestiva. (Prancha 9, Figuras 37 a 40)

45 Dias de infecção

Foi observada poucas larvas na mufla, tentáculos e parede da cavidade do manto. L3 envolvidas por granulomas também foram vistas próximo a glândula de albúmen, a camada muscular, mufla e tentáculos e ovoteste. (Prancha 10, Figuras 41 a 46)

5.1.3. *Biomphalaria tenagophila* (Itamaraju)

1 Dia de infecção

L1 envoltas por granulomas foram observadas na mufla e tecido muscular. Prancha 11 com 1 dia de infecção (Figura 47)

5 Dias de infecção

L2 foram vistas na mufla envolvidas ou não por reação inflamatória (Prancha 11 Figuras 48 e 49, com 5 dias de infecção).

.

15 Dias de infecção

A maioria das larvas estava na fase de L2, embora algumas começassem a diferenciar-se para L3, apresentando mudanças em sua estrutura interna e no tamanho. As larvas estavam presentes nas seguintes estruturas: glândula digestiva, que apresentou diversos granulomas em sua estrutura, e mufla com e sem reação inflamatória. (Prancha 12, Figuras 50 e 51)

25 Dias de infecção

A maioria das larvas estava na fase de L3, geralmente envolvidas por reações inflamatórias. (Prancha 12, Figuras 52 e 53)

35 Dias de infecção

Foram observadas L3 próximo à glândula digestiva, rins e parede da cavidade do manto envolvida por granulomas e/ou reação granulomatosa. (Prancha 13, Figuras 54 a 59).

45 Dias de infecção

L3 estavam presentes nos tentáculos, no tecido muscular, mufla e parede da cavidade do manto, envolvidas ou não por granulomas. (Prancha 14, Figuras 60 a 65).

5.1.4. *Biomphalaria tenagophila* (Jacarepaguá)

1 Dia de infecção

Presença de larvas na mufla e na parede da cavidade do manto envolvidas ou não por reação inflamatória. Todas as larvas estavam na fase de L1/L2. (Prancha 15 com 1 dia [Figuras 66 e 67] e 5 dias de infecção [Figuras 68, 69 e 70]).

5 Dias de infecção

L2 foram observadas na mufla envolvidas ou não por granulomas e reação inflamatória. (Prancha 15, Figuras 68 a 71).

15 Dias de infecção

Foram observadas muitas L2/L3 na mufla e poucas na cavidade do manto. (Prancha 16, Figuras 72 a 77).

25 Dias de infecção

Várias L3 estavam localizadas na mufla envolvidas por granuloma. (Prancha 17, Figuras 78 a 80).

35 Dias de infecção

L3 foram observadas na mufla e parede da cavidade do manto envolvida por granulomas.

45 Dias de infecção

L3 foram vistas na mufla e na glândula digestiva, próximo ao ducto espermático. Prancha 17, Figuras 79 a 81, 45 dias de infecção.

5.2. Distribuição de larvas de *A. costaricensis* nos diversos órgãos das populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila* estudadas.

Tabela 1: Distribuição das larvas de *A. costaricensis* no hospedeiro experimental *B. glabrata* (Ressaca)

Tempo de Infecção	Órgãos								
	M	T	PCM	GD	OV	GN	INT	PÉ	RIM
1d	+++	++						++	
5d	+++								
15d		+++	++						+
25d	+++	++	+					+	
35d	++	++	+					+	
45d	+++	++	++		+	+	+		

M= mufla; T= tentáculo; PCM= parede da cavidade do manto; GD= glândula digestiva; OV= ovoteste; GN= glândula nidamental; INT= intestino; PÉ= pé; RIM= rim; GA= glândula albúmen.

Número de larvas presentes nos cortes histológicos:

+ de 1 a 5 larvas

++ de 6 a 10

+++ mais de 10 larvas

Tabela 2: Distribuição das larvas de *A. costaricensis* no hospedeiro experimental *B. glabrata* (Barreiro de Cima)

Tempo de Infecção	Órgãos								
	M	T	PCM	GD	OV	GN	INT	PÉ	RIM
1d	++	+				++	+	++	
5d	+							++	
15d	++	+					+		+
25d	++		++						
35d	++			++			+	+	
45d	+	+						+	

M= mufla; T= tentáculo; PCM= parede da cavidade do manto; GD= glândula digestiva; OV= ovoteste; GN= glândula nidamental; INT= intestino; PÉ= pé; RIM= rim; GA= glândula albúmen.

Número de larvas presentes nos cortes histológicos:

+ de 1 a 5 larvas

++ de 6 a 10

+++ mais de 10 larvas

Tabela 3: Distribuição das larvas de *A. costaricensis* no hospedeiro experimental *B. tenagophila* (Itamaraju)

Tempo de Infecção	Órgãos								
	M	T	PCM	GD	OV	GN	INT	PÉ	RIM
1d	++								
5d	++								
15d									
25d									
35d	++	++	++	+				+	++
45d	++	+	+					+	++

M= mufla; T= tentáculo; PCM= parede da cavidade do manto; GD= glândula digestiva; OV= ovoteste; GN= glândula nidamental; INT= intestino; PÉ= pé; RIM= rim; GA= glândula albúmen.

Número de larvas presentes nos cortes histológicos:

+ de 1 a 5 larvas

++ de 6 a 10

+++ mais de 10 larvas

Tabela 4: Distribuição das larvas de *A. costaricensis* no hospedeiro experimental *B. tenagophila* (Jacarepaguá)

Tempo de Infecção	Órgãos								
	M	T	PCM	GD	OV	GN	INT	PÉ	RIM
1d	++	+	+					++	
5d	++								
15d	++	+	+					++	
25d	++		+						
35d	++	+	+						
45d	+	+	+	+					+

M= mufla; T= tentáculo; PCM= parede da cavidade do manto; GD= glândula digestiva; OV= ovoteste; GN= glândula nidamental; INT= intestino; PÉ= pé; RIM= rim; GA= glândula albúmen.

Número de larvas presentes nos cortes histológicos:

+ de 1 a 5 larvas

++ de 6 a 10

+++ mais de 10 larvas

5.3. Estágios de desenvolvimento de larvas de *A. costaricensis* nos hospedeiros experimentais *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Tabela 5: Evolução das larvas de *A. costaricensis* nos hospedeiros experimentais *B. glabrata* e *B. tenagophila*

Tempo de Infecção	Hospedeiros Intermediários			
	<i>B. glabrata</i> Ressaca	<i>B. glabrata</i> Barreiro de Cima	<i>B. tenagophila</i> Itamaraju	<i>B. tenagophila</i> Jacarepaguá
1d	L1/L2	L1	L1	L1/L2
5d	L2	L2	L2	L2
15d	L2	L2/L3	L2	L2/L3
25d	L2/L3	L2/L3	L2/L3	L3
35d	L3	L2/L3	L3	L3
45d	L3	L3	L3	L3

5.4. Mortalidade dos hospedeiros intermediários.

Tabela 6: Taxa de Mortalidade de *B.glabrata* e *B. tenagophila* frente à infecção por *A. costaricensis*

Espécies	Nº de animais infectados	Nº de sobreviventes	Taxa de mortalidade
<i>B. glabrata</i> (Ressaca)	60	49	18,33%
<i>B. glabrata</i> (Barreiro de Cima)	62	40	35,48%
<i>B. tenagophila</i> (Jacarepaguá)	56	39	30,35%
<i>B. tenagophila</i> (Itamaraju)	55	39	29,09%

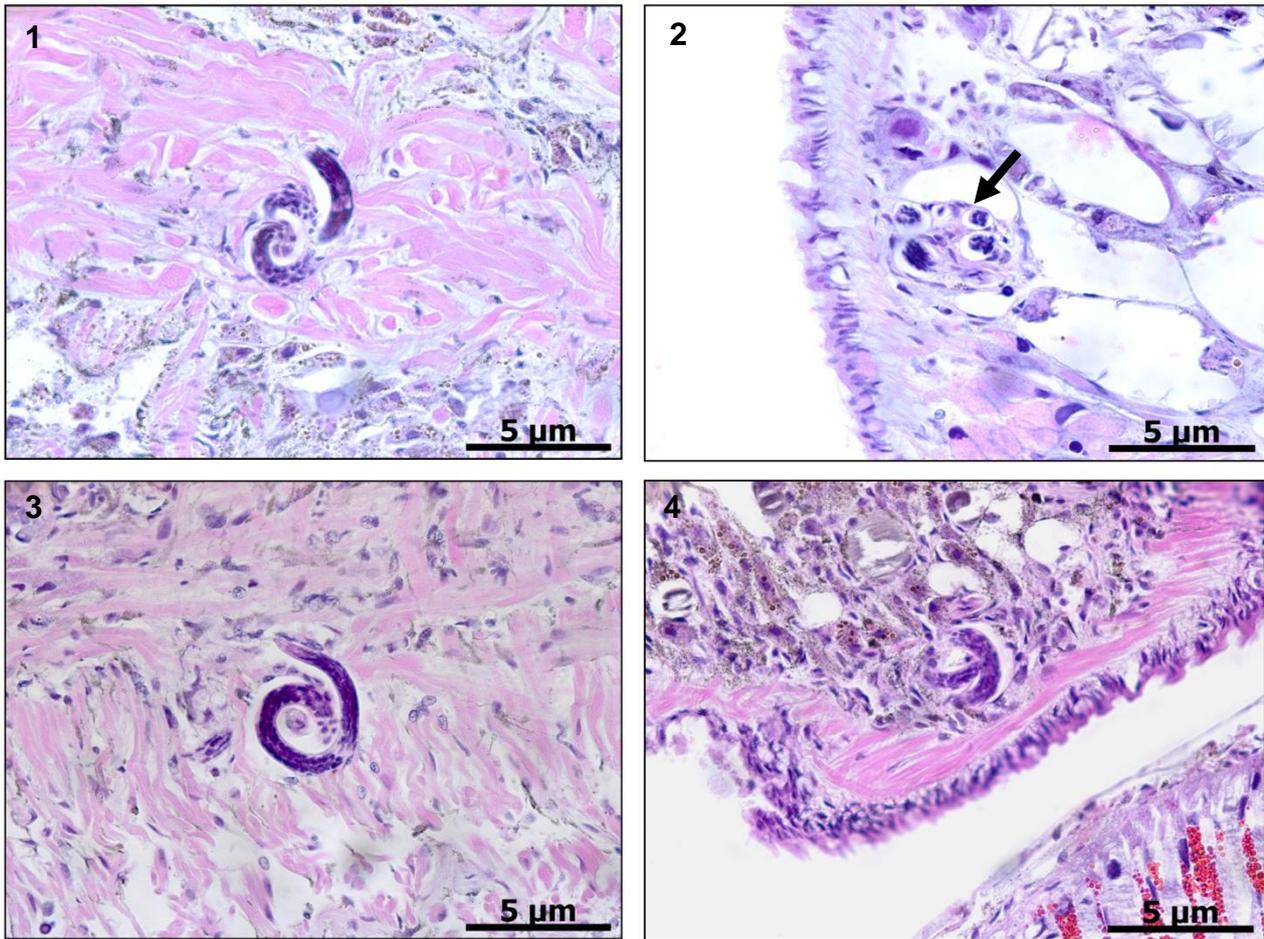
A média do número de L3 obtidas nos animais estudados é mostrada na tabela 7.

5.5. Eliminação de L3.

Tabela 7: Número de L3 obtidas de *B.glabrata* e *B. tenagophila* infectadas por *A. costaricensis*

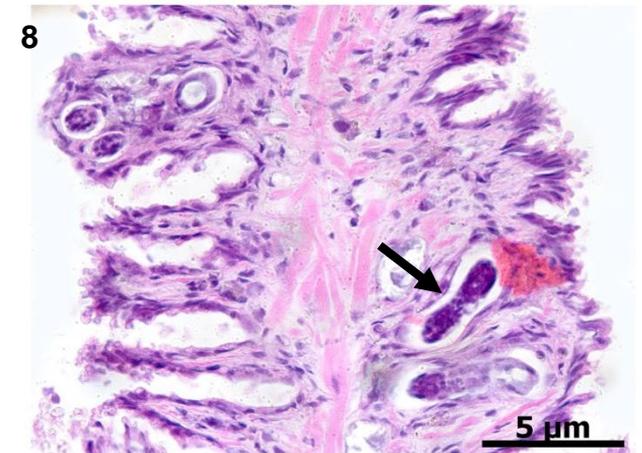
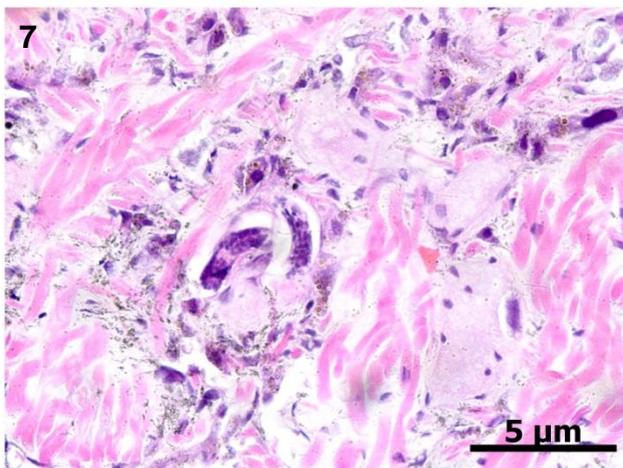
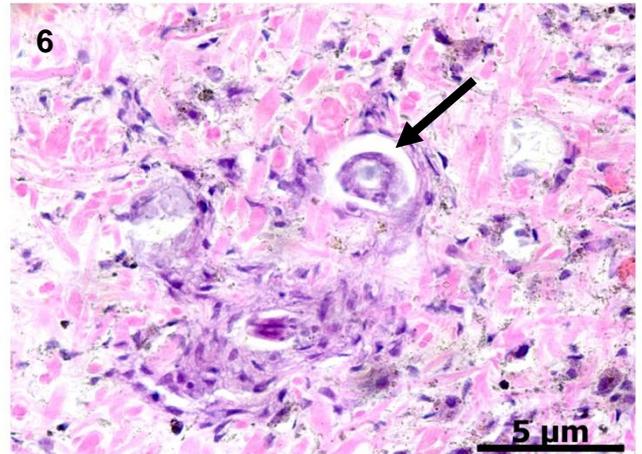
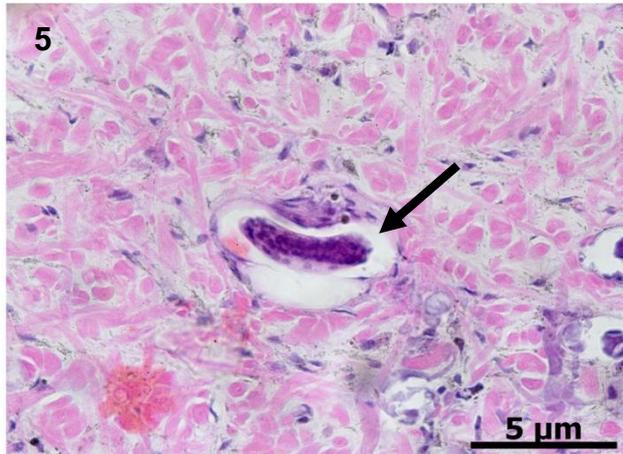
Espécies	Nº de animais	Tempo de infecção	Média do nº de L3
<i>B. glabrata</i> (Ressaca)	5	40 dias	720
<i>B. glabrata</i> (Ressaca)	6	58 dias	300
<i>B. glabrata</i> (Ressaca)	3	69 dias	0
<i>B. glabrata</i> (Ressaca)	3	97 dias	666
<i>B. glabrata</i> (Barreiro de Cima)	2	57 dias	50
<i>B. glabrata</i> (Barreiro de Cima)	12	97 dias	25
<i>B. glabrata</i> (Barreiro de Cima)	8	98 dias	787
<i>B. tenagophila</i> (Jacarepaguá)	3	32 dias	566
<i>B. tenagophila</i> (Itamaraju)	6	32 dias	750
<i>B. tenagophila</i> (Itamaraju)	1	40 dias	800

5.1.6. Pranchas



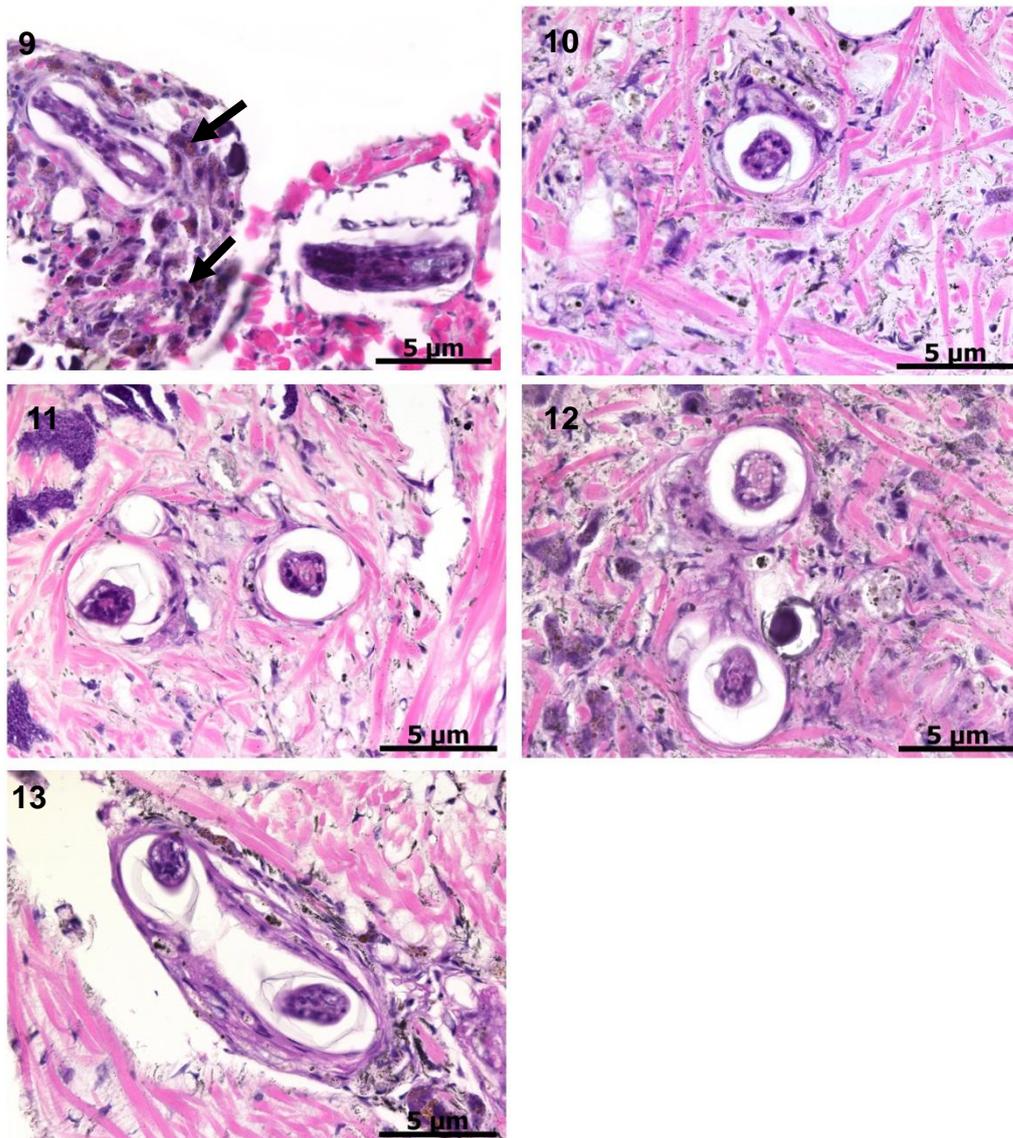
Prancha: 1 *Biomphalaria glabrata* (Ressaca) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 1 dia de infecção.

L1 situadas entre fibras musculares da mufla (Figuras 1 e 3) e tecido conjuntivo da mufla (Figura 2) e do tentáculo (Figura 4) envolvidas (seta) ou não por hemócitos. (HE).



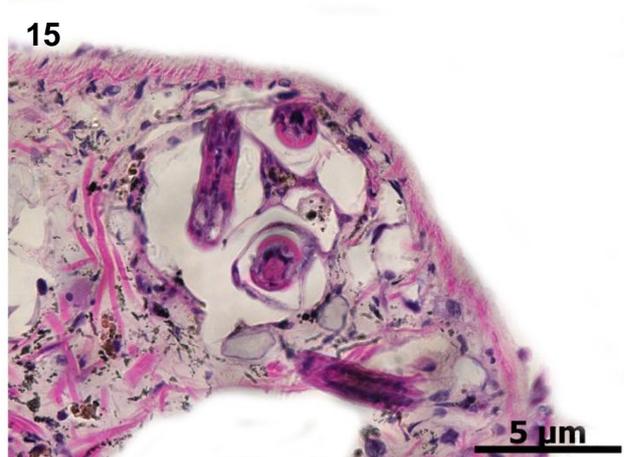
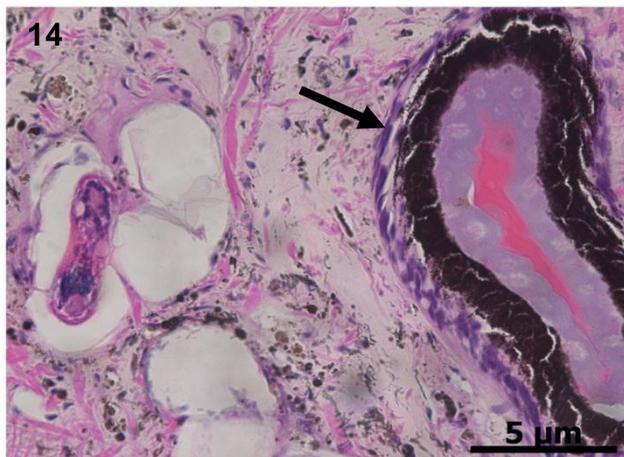
Prancha: 2 *Biomphalaria glabrata* (Ressaca) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 5 dias de infecção.

L1/L2 presentes no pé (Figuras 5, 6 e 7) e no tentáculo (Figura 8) do molusco envolto por reação hemocitária discreta. Observar um espaço claro (setas), entre as larvas e os hemócitos, causados por proteases do parasito (HE).



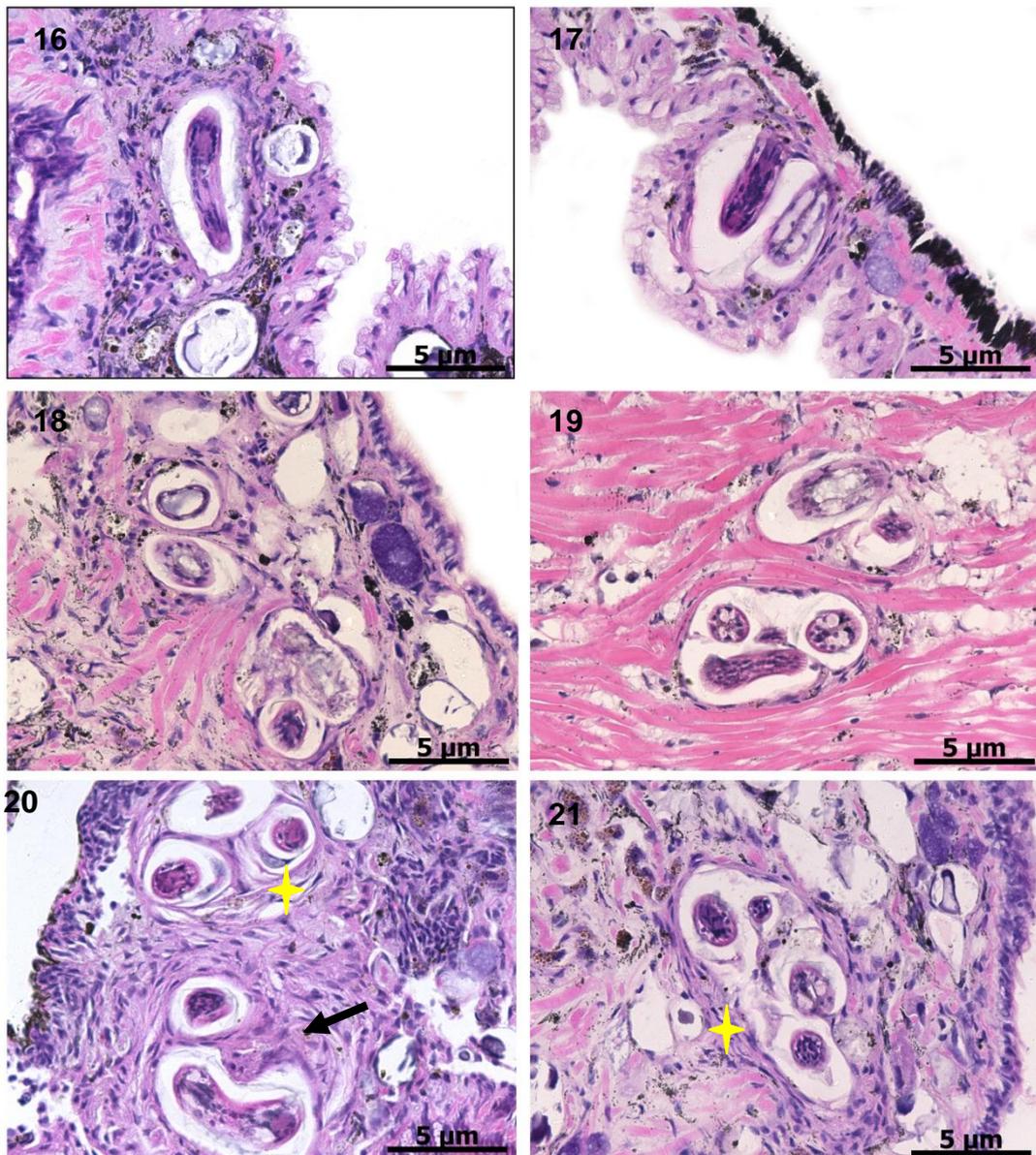
Prancha: 3 *Biomphalaria glabrata* (Ressaca) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 15 dias de infecção.

Larvas em processo de muda (L2/L3) na mufla (Figura 9) e pé do molusco (Figuras 10, 11, 12 e 13). As imagens mostram o processo de encapsulamento dos parasitos pelos hemócitos. Na mufla, células pigmentadas do tecido conjuntivo (setas) também podem participar do infiltrado perilarvar (Figura 9). Observar a produção de fibras e o aspecto fusiforme dos hemócitos constituindo uma cápsula fibrosa isolando o parasito (Figura 13) (HE).



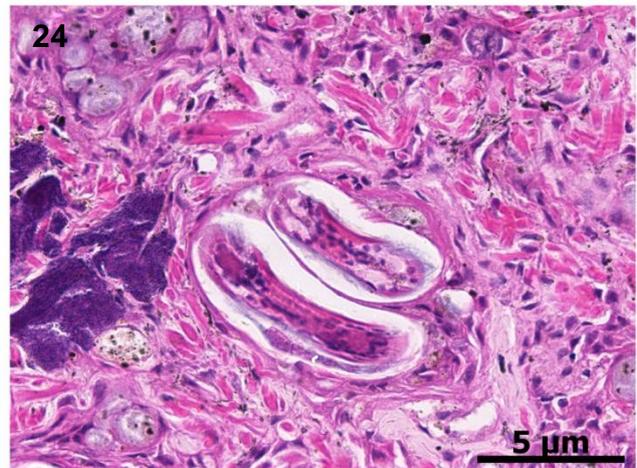
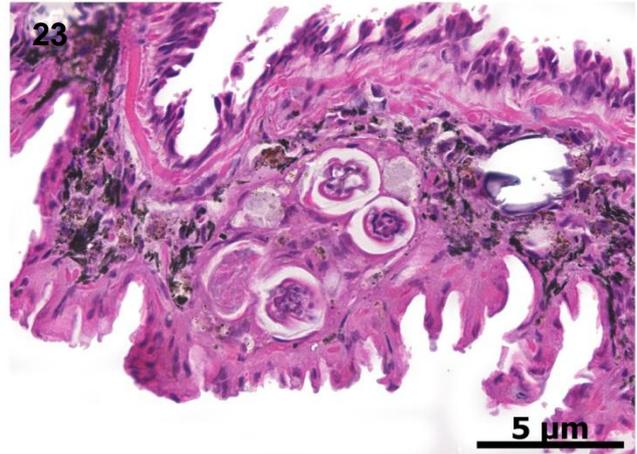
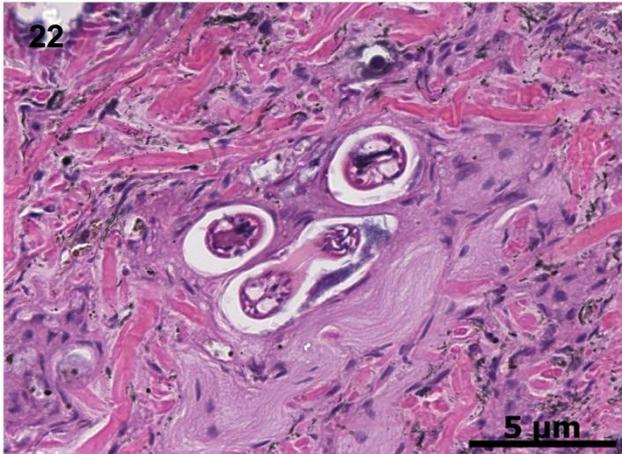
Prancha 4: ***Biomphalaria glabrata*** (Ressaca) infectada com ***Angiostrongylus costaricensis*** com 25 dias de infecção.

As larvas tem como sítio preferencial a mufla ou região cefalopodal, podendo ser encontrada em qualquer área dessa região como, por exemplo, próxima ao olho (seta) (Figuras 14), e às vezes não acompanhada por reação hemocitária (Figura 15) (HE).



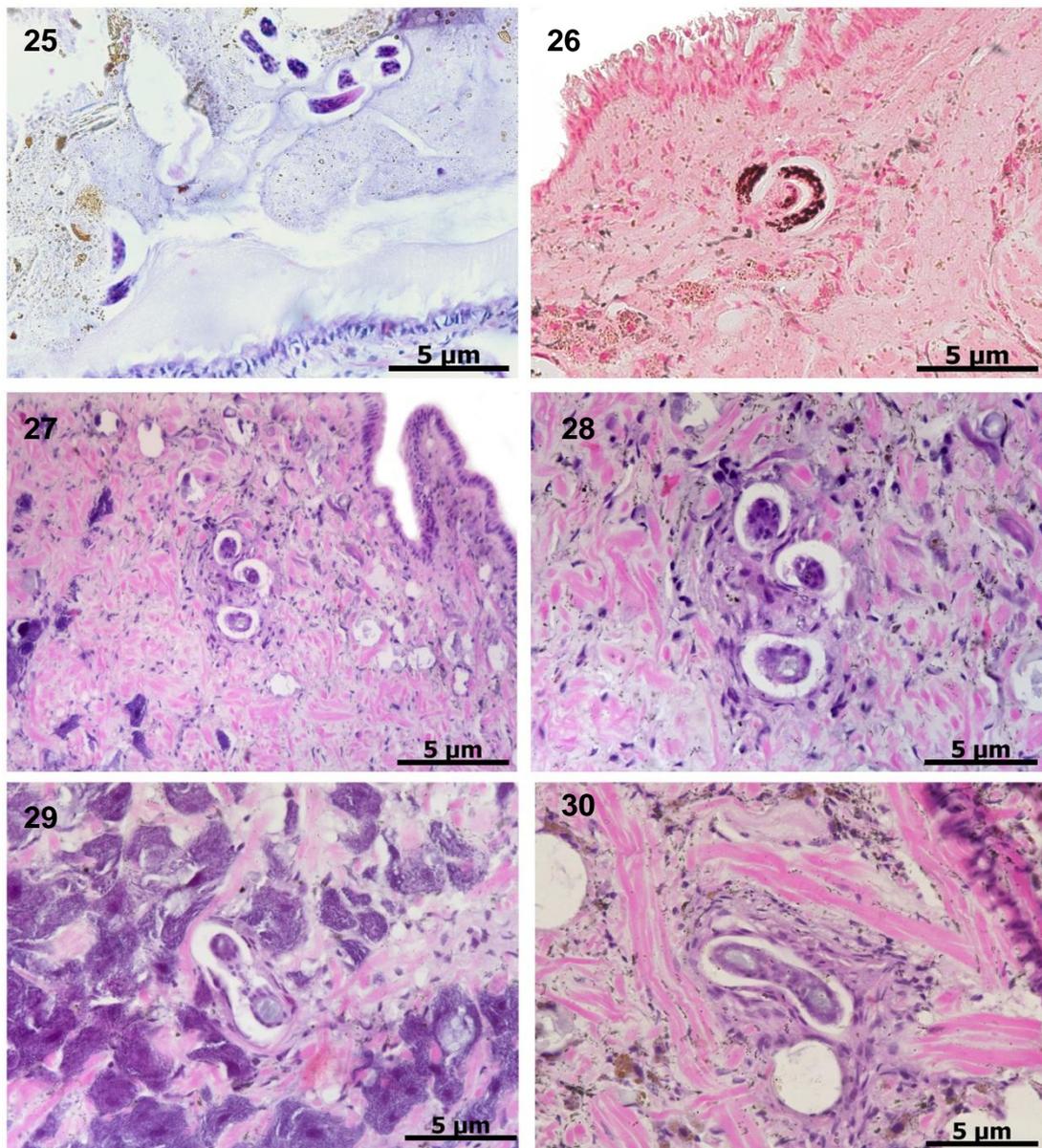
Prancha: 5 *Biomphalaria glabrata* (Ressaca) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 35 dias de infecção.

O infiltrado hemocitário perilarvar evoluiu com o avanço da infecção para granulomas exsudativos (seta) e exsudativos produtivos (estrela) os quais puderam ser observados em diversos órgãos parasitados como no tentáculo (Figura 16) e mufla (Figuras 18, 20 e 21). Mesmo aos 35 dias de infecção, reações mais discretas puderam ser evidenciadas na camada muscular do pé do molusco (Figura 19). A presença de parasitos na parede da cavidade do manto causou espessamento da mesma (Figura 17); (HE).



Prancha: 6 *Biomphalaria glabrata* (Ressaca) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 45 dias de infecção.

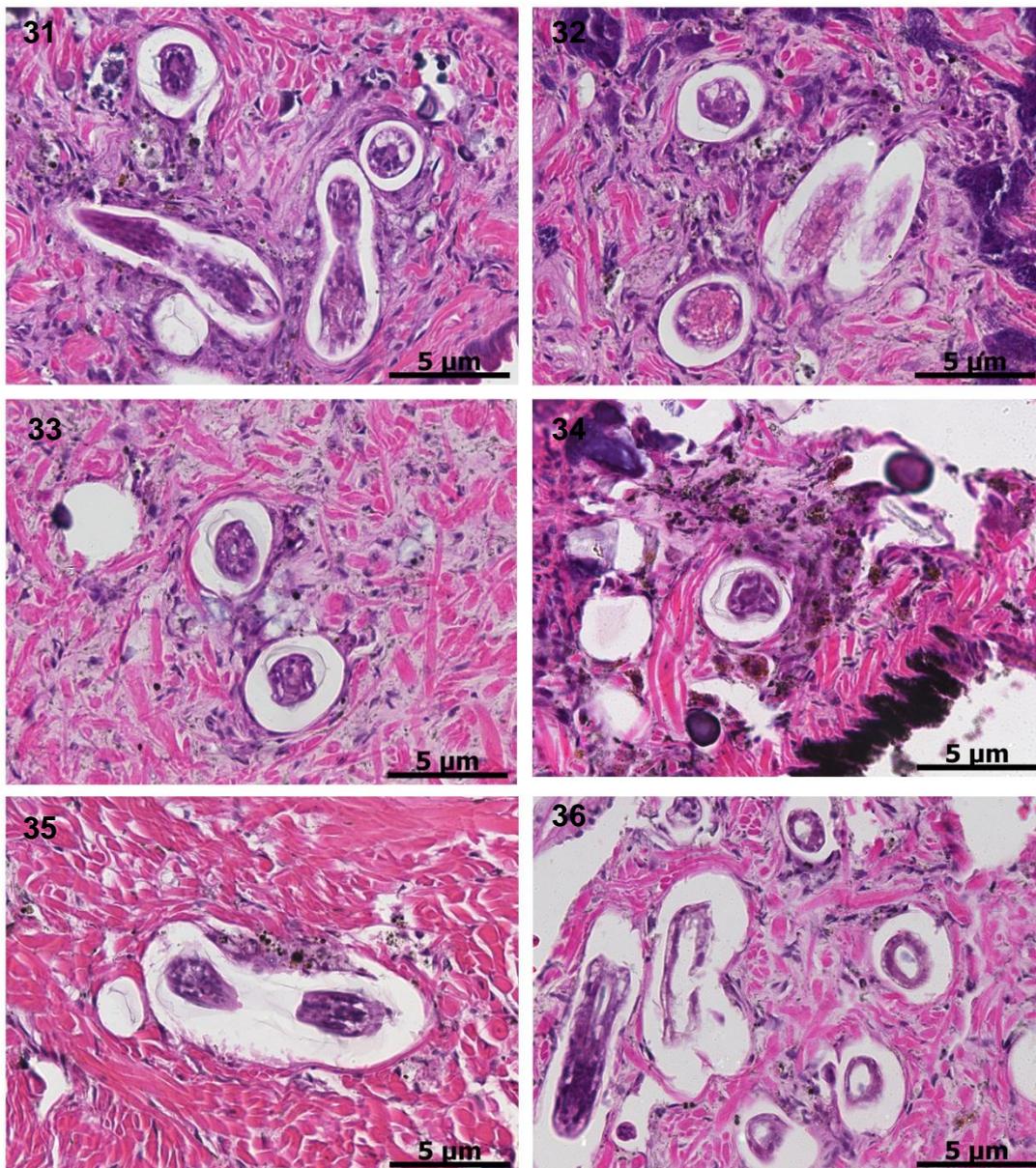
L3 íntegras envolvidas pelo infiltrado hemocitário na região cefalopodal (Figuras 22, 23 e 24); (HE).



Prancha 7: *Biomphalaria glabrata* (Barreiro de Cima) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 1 e 5 dias de infecção.

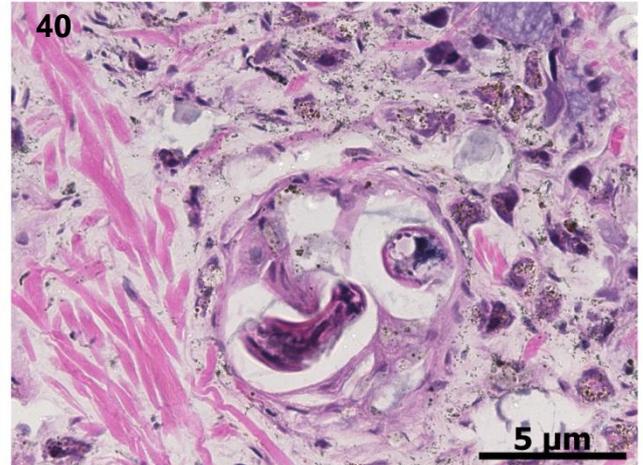
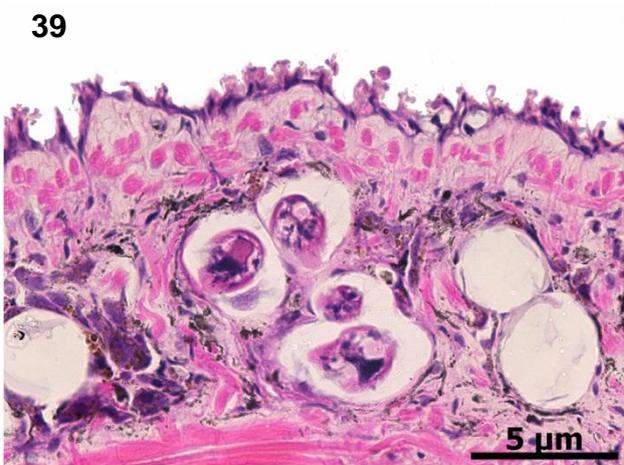
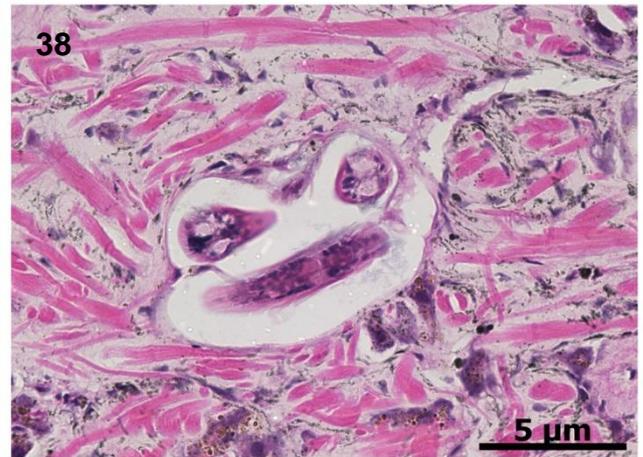
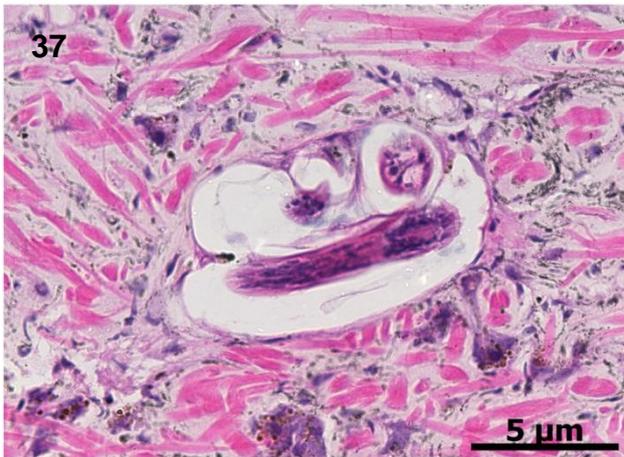
L1 presente na luz intestinal (Figura 25 (HE) (Figura 26:) L1 positiva ao Von Kossa, coloração que evidencia presença de cálcio (Figuras 25) e 26 (Von Kossa): 1 dia de infecção].

Infiltrado perilarvar na mufla (Figuras 27 a 30) (Figuras 27 a 30, 5 dias de infecção); (HE)



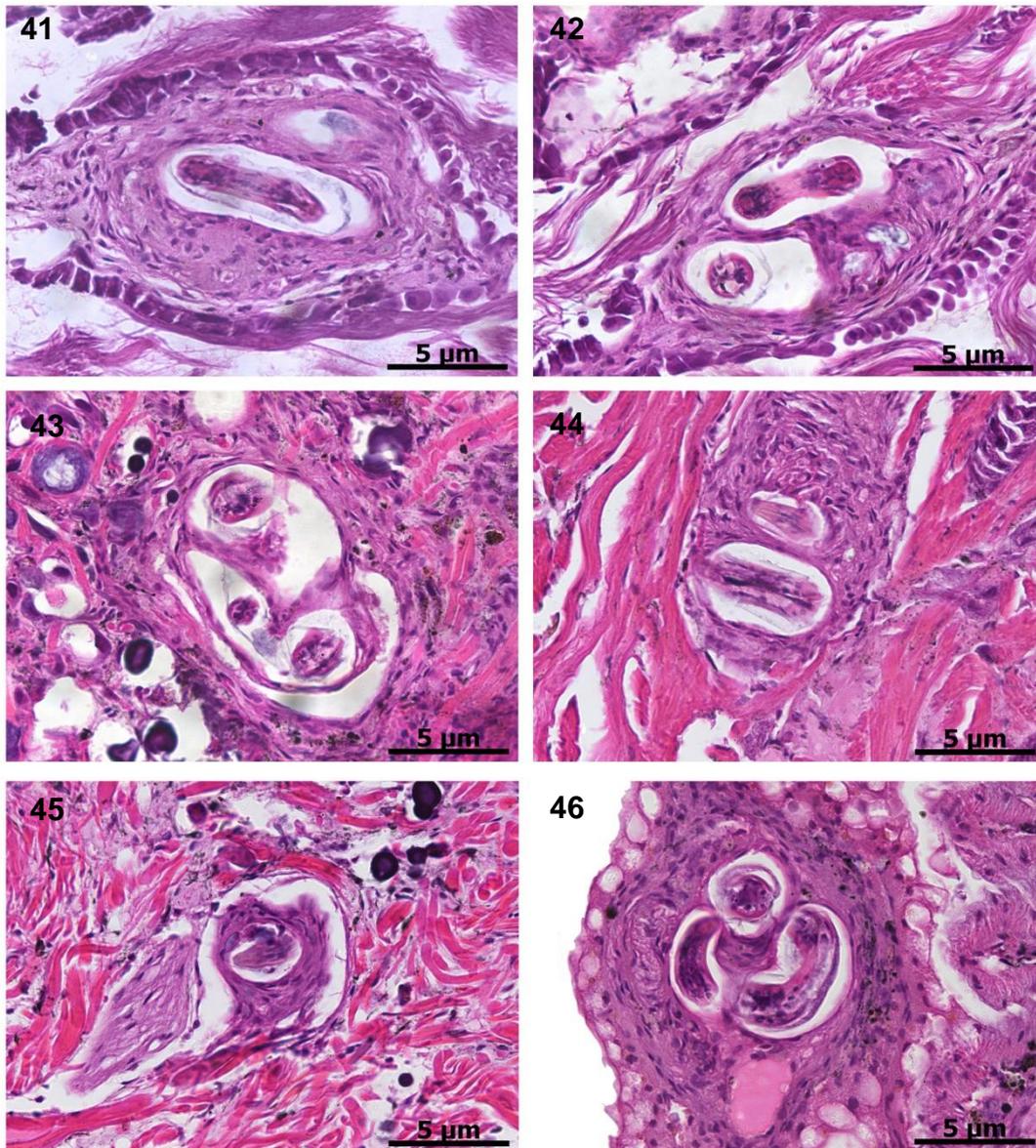
Prancha 8: *Biomphalaria glabrata* (Barreiro de Cima) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 15 dias de infecção.

Muitas larvas situam-se na região cefalopodal e são acompanhadas de reação inflamatória discreta (Figuras 33, 35 e 36) a intensa (Figuras 31, 32 e 34); (HE).



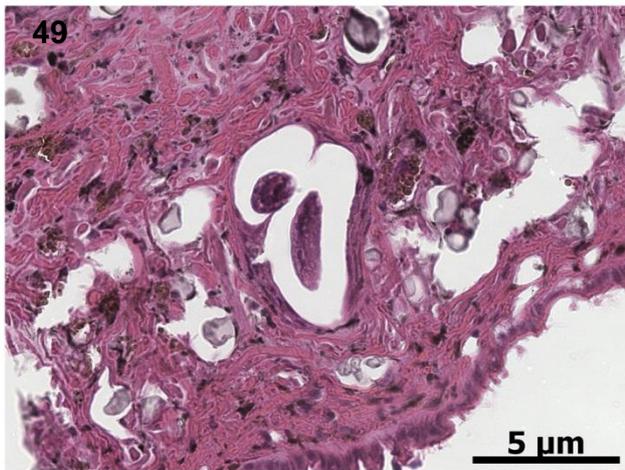
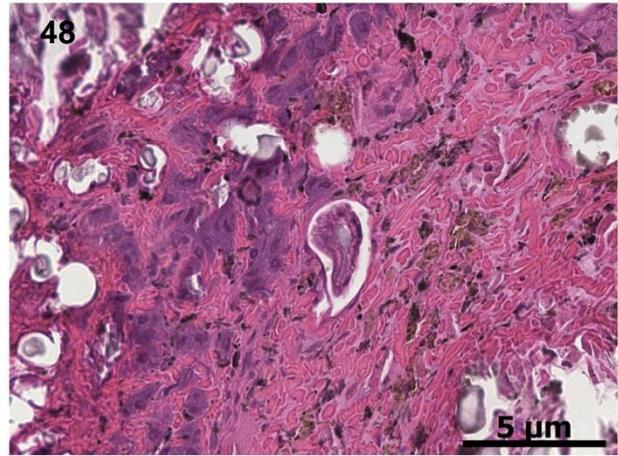
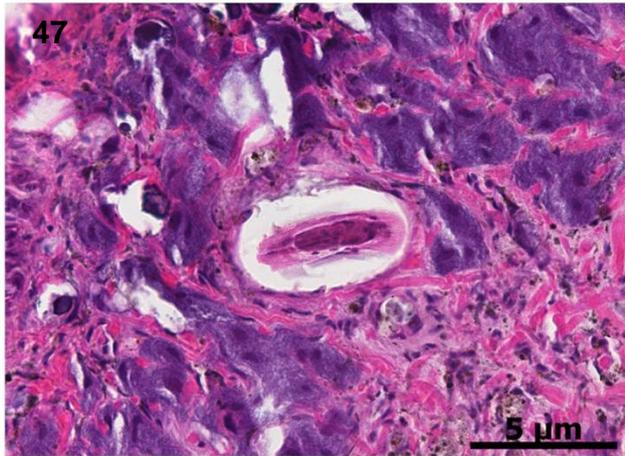
Prancha 9: *Biomphalaria glabrata* (Barreiro de Cima) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 35 dias de infecção

Figuras 37 a 40: Todas as larvas, em fase de L3, exibiram espaços claros entre elas e as células do molusco. Observar a presença de células pigmentadas do tecido conjuntivo participando da reação perilarvar na região cefalopodal (HE).



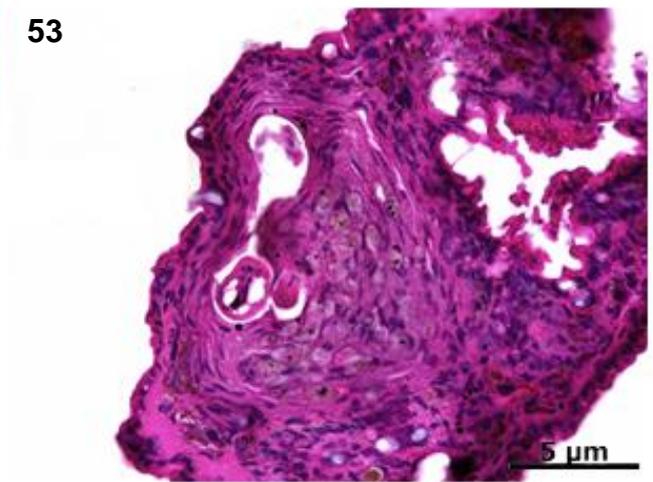
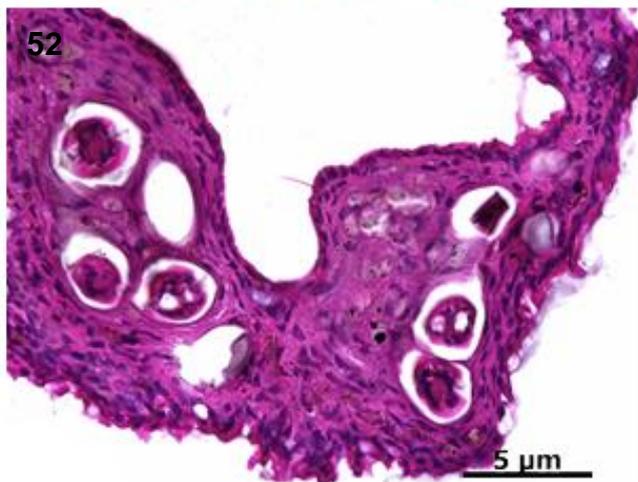
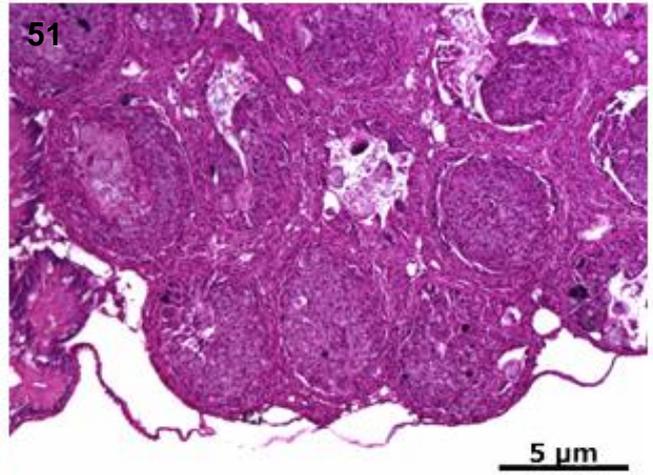
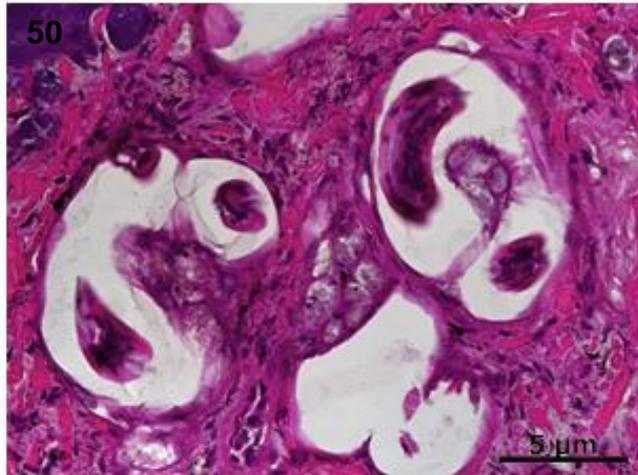
Prancha 10: *Biomphalaria glabrata* (Barreiro de Cima) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 45 dias de infecção.

Granulomas perilarvares ocupando espaço entre os ácinos do ovoteste (Figuras 41 e 42), na região cefalopodal (Figuras 43, 44 e 45) e parede da cavidade do manto (Figura 46); (HE).



Prancha 11: *Biomphalaria tenagophila* (Itamaraju) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 1 e 5 dias de infecção.

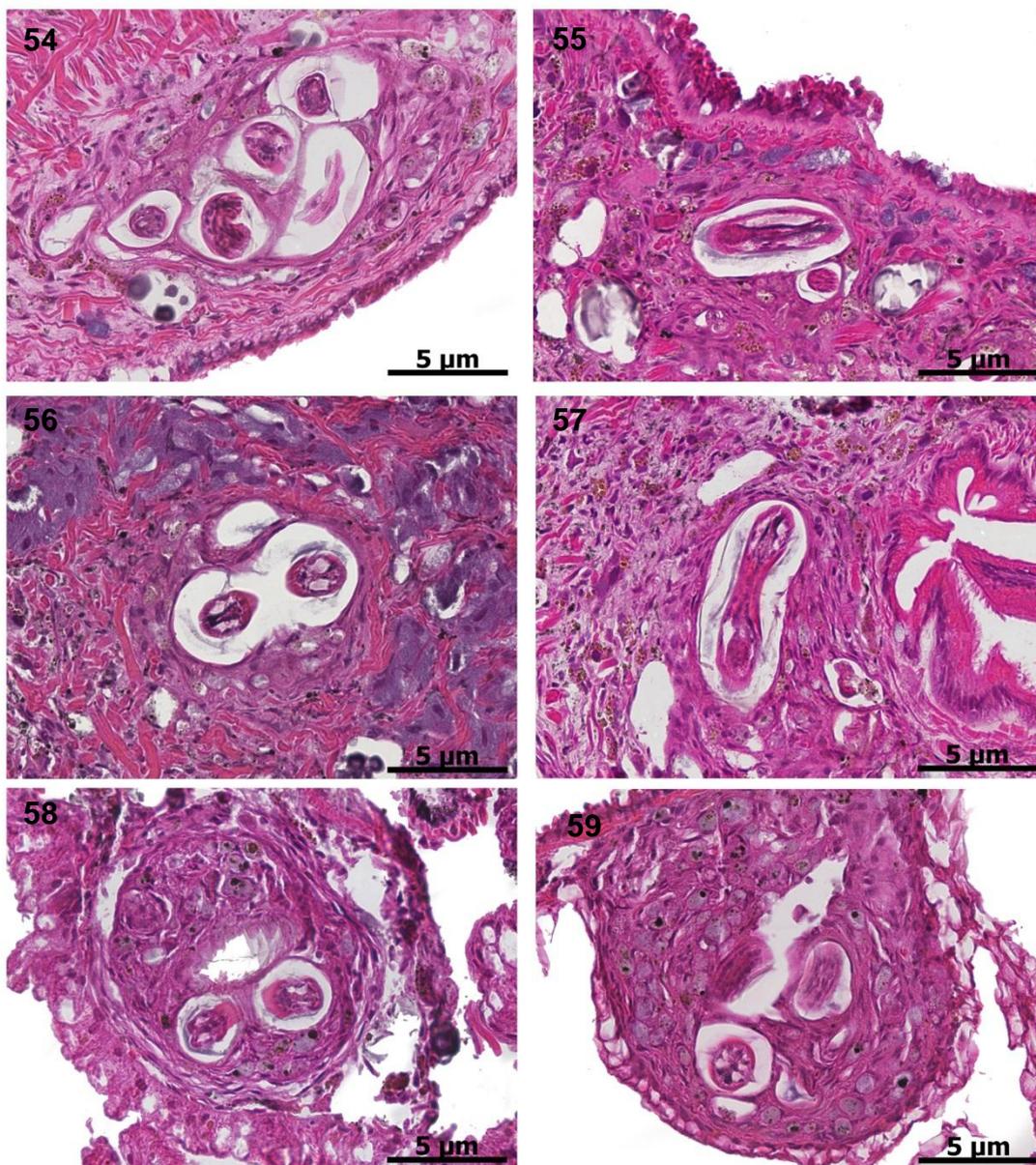
Larvas na região cefalopodal com reação hemocitária discreta (Figura 49) ou ausente (Figuras 47 e 48). (Figura 47: 1 dia de infecção; Figuras: 48 e 49: 5 dias de infecção); (HE).



Prancha 12: *Biomphalaria tenagophila* (Itamaraju) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 15 (Figuras 50 e 51) e 25 dias de infecção (Figuras 52 e 53).

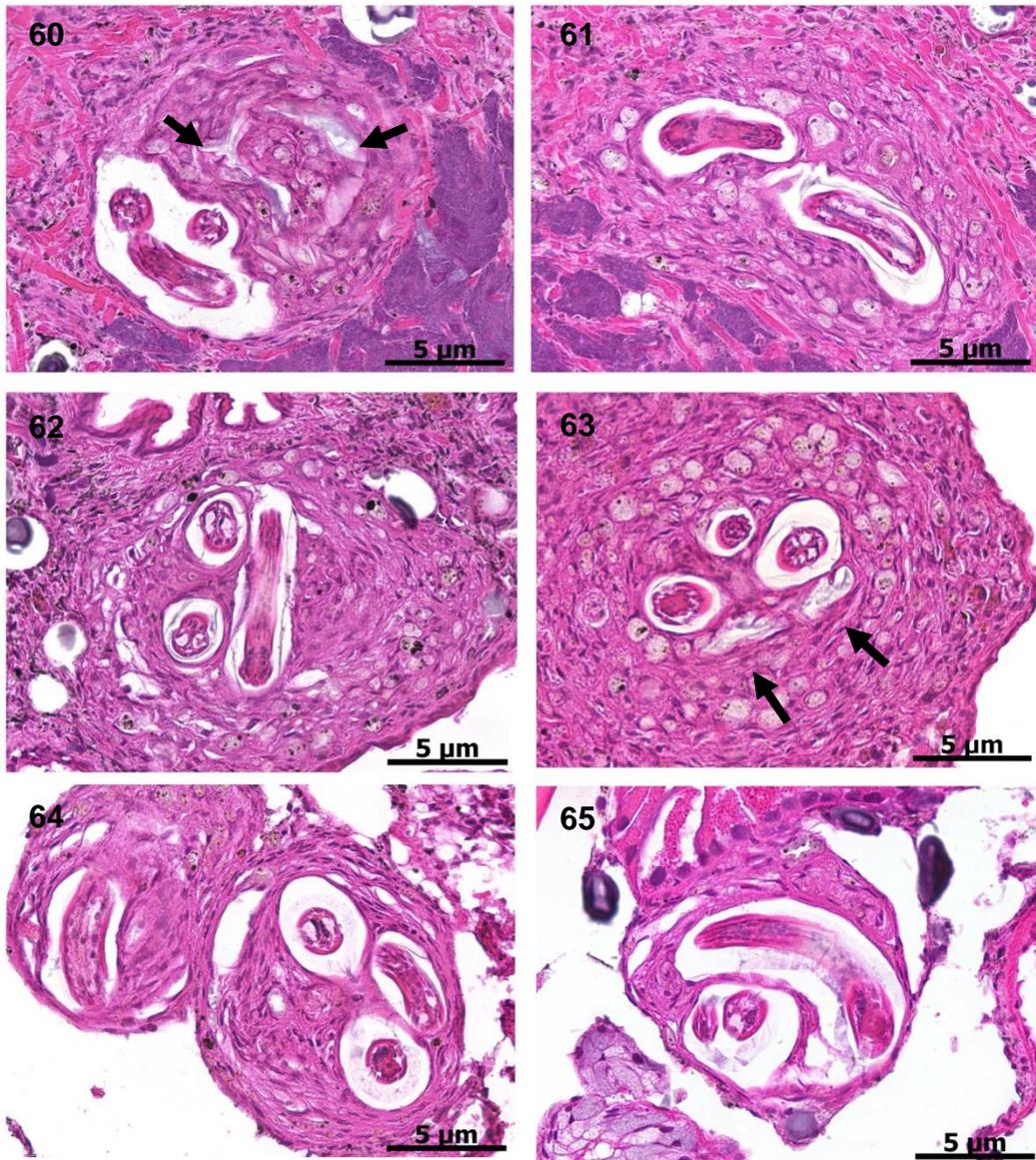
L2/L3 envoltas por reação granulomatosa na mufla (Figura 50). Glândula digestiva contendo vários granulomas exsudativos produtivos envolvendo parasitos (Figura 51). Animais com 15 dias de infecção; (HE).

L3 integras no interior de granulomas exsudativos produtivos na mufla. Observar células com pigmento dentro e fora do granuloma (Figura 52 e 53: 25 dias de infecção); (HE).



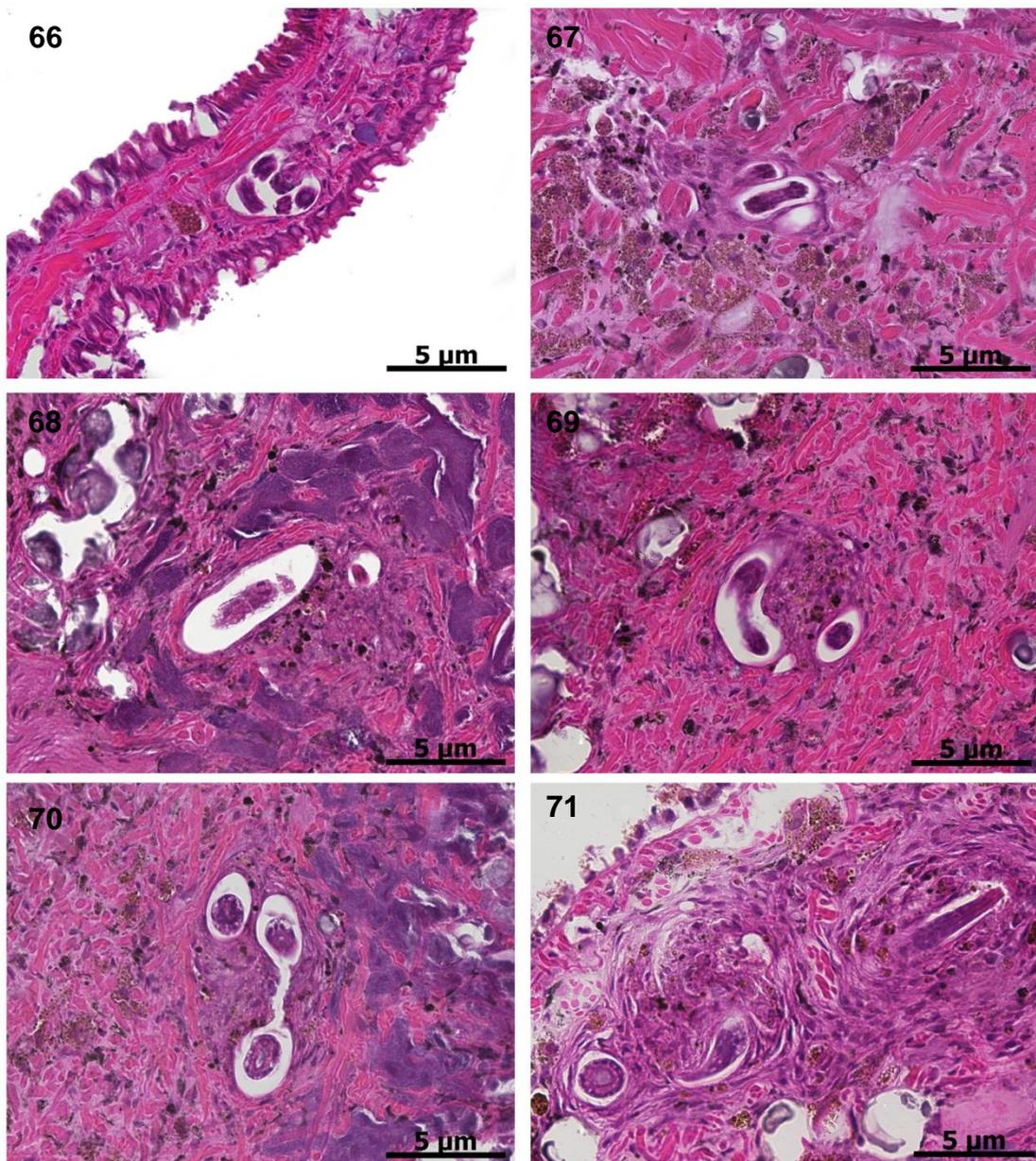
Prancha 13: *Biomphalaria tenagophila* (Itamaraju) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 35 dias de infecção.

Granulomas exsudativos e exsudativos produtivos com células epitelióides (setas) contendo L3 íntegras na região cefalopodal (Figuras 54 a 58) e no rim (Figura 59), onde pode se observar espessamento da lâmina própria que acompanha o epitélio do túbulo renal (HE).



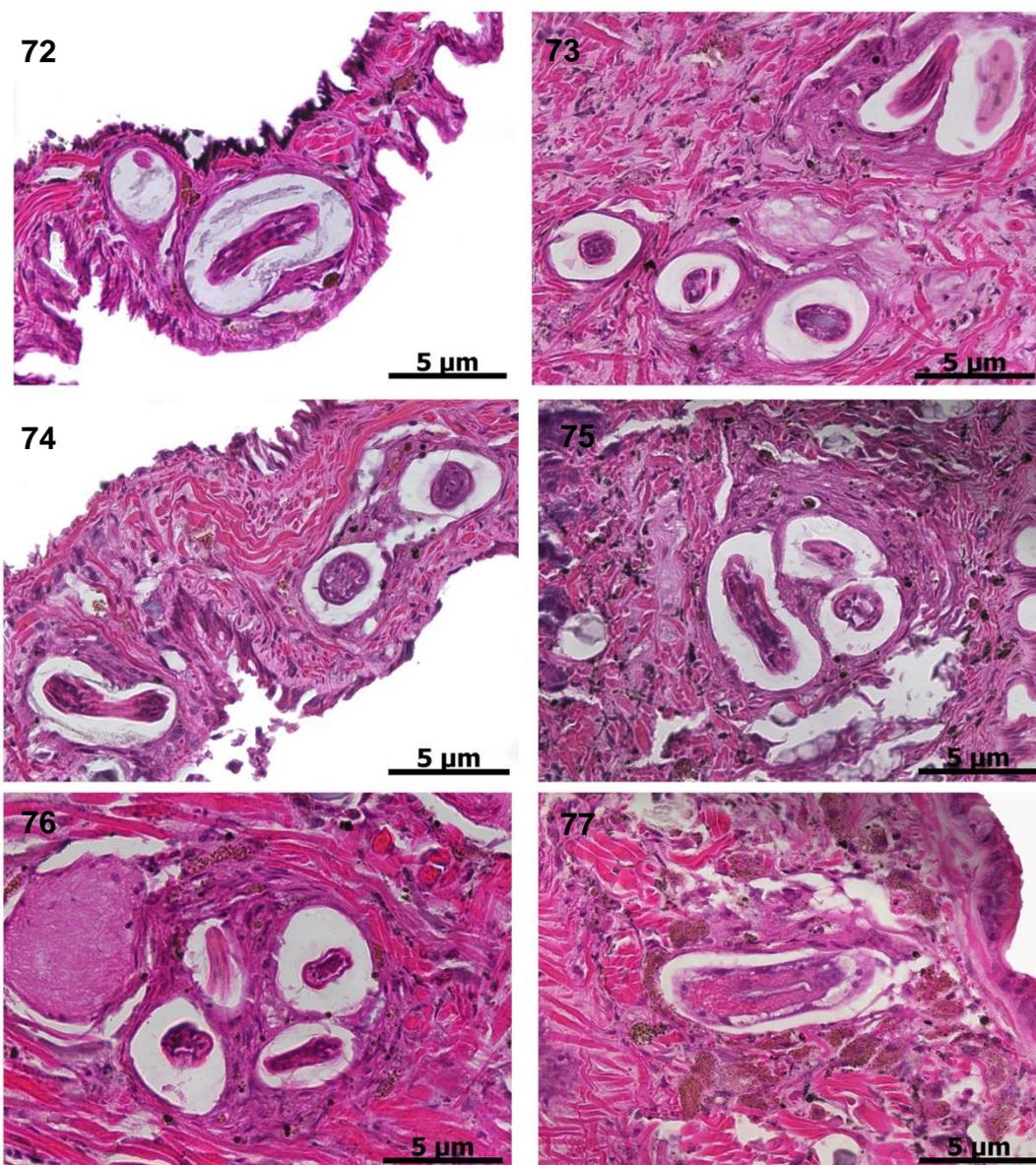
Prancha 14: *Biomphalaria tenagophila* (Itamaraju) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 45 dias de infecção.

Granulomas exsudativos produtivos com células epitelióides envolvendo L3 e suas cutículas eliminadas durante a muda (seta) na região cefalopodal (Figuras 60 a 64) e próximo à glândula nidamental (Figura 65); (HE).



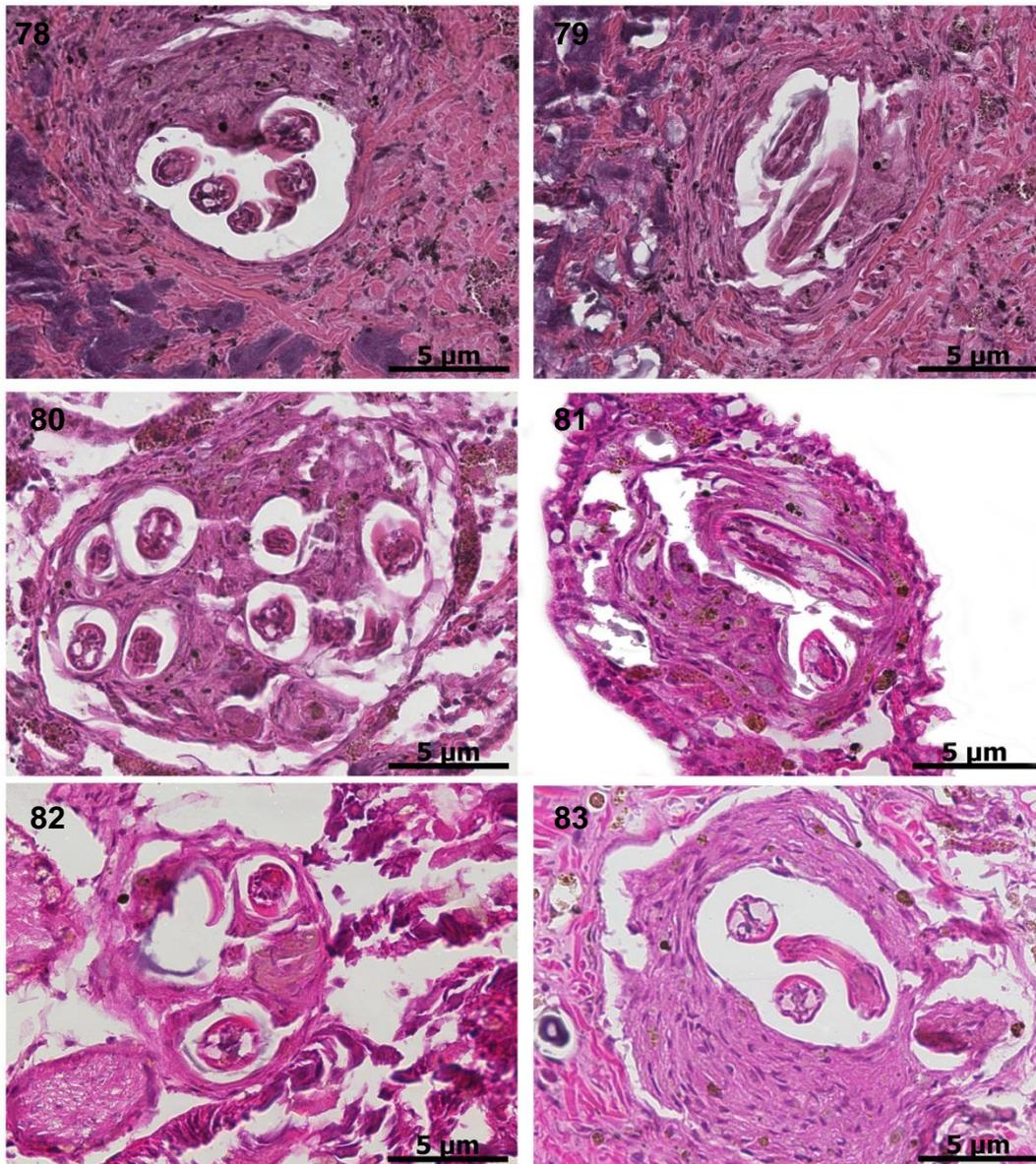
Prancha 15: *Biomphalaria tenagophila* (Jacarepaguá) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 1 dia e 5 dias de infecção.

Infiltrado hemocitário em torno de L1 no tentáculo e mufla (Figuras 66 e 67: 1 dia de infecção; HE). Granulomas exsudativos (Figuras 68, 69 e 70) e exsudativos produtivos (Figura 67) na região cefalopodal. (Figuras 68 a 71: 5 dias de infecção), (HE).



Prancha 16: *Biomphalaria tenagophila* (Jacarepaguá) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 15 dias de infecção.

Granulomas exsudativos produtivos constituindo cápsulas fibrosas contendo as larvas na parede da cavidade do manto (Figura 72) e região cefalopodal (Figuras 73 a 77); (HE).



Prancha 17: *Biomphalaria tenagophila* (Jacarepaguá) infectada com *Angiostrongylus costaricensis* com 25 dias e 45 dias de infecção.

Granulomas exsudativos produtivos contendo poucas ou muitas larvas íntegras na região cefalopodal (Figuras 78 e 80) e no rim (Figura 79). (Figuras 78 a 80: 25 dias de infecção); (HE) (Figuras 81 a 83: 45 dias de infecção); (HE).

VI. DISCUSSÃO

A suscetibilidade das três espécies de planorbídeos hospedeiras de *S. mansoni* ao *A. costaricensis* foi demonstrada por Lima et al (1992) no qual *B. straminea* mostrou-se mais eficiente na manutenção do ciclo experimental quando comparada as demais espécies. No trabalho de Lima et al (1992), os moluscos eram descendentes de matrizes coletados na região metropolitana de Belo Horizonte, MG. No nosso trabalho estudou-se a presença de diferentes padrões de resposta à infecção por *A. costaricensis* em diferentes populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Nas espécies e populações estudadas, a maioria das larvas penetrou nos moluscos através do tegumento, onde se desenvolveram até a fase de L3. Poucos parasitos tiveram acesso ao hospedeiro intermediário por meio da ingestão. Esse acesso foi evidenciado pela observação de larvas na luz intestinal em *B. glabrata* de Barreiro de Cima. As larvas que foram ingeridas provavelmente migraram através da parede intestinal e alcançaram diferentes órgãos, tais como glândula digestiva, ovoteste e glândula nidamental, nos quais também sofreram mudas até o estágio de L3. A via de infecção oral em moluscos terrestres foi descrita em *S. marginata* (Mendonça et al, 1999) e *Omalonyx* sp. (Montresor et al, 2008). Nesta última, as larvas penetraram em qualquer segmento do trato digestivo, sem sítio preferencial, atravessando o epitélio, lâmina basal, migrando através do tecido conjuntivo subepitelial, alcançando a glândula digestiva do gastrópode. Acreditamos que foi por meio da via oral que alguns parasitos alcançaram a glândula digestiva, o ovoteste e a glândula nidamental de *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Semelhante ao descrito em infecções experimentais em *Omalonyx* sp. Montresor et al (2008) as larvas podem ter atingido espaços pseudovasculares, presentes nos órgãos próximos ao trato digestório, e dessa forma serem carreadas, através da hemolinfa, para o rim e a parede da cavidade do manto. A confirmação dessas vias migratórias nos planorbídeos pode ser realizada por meio de um estudo cinético começando pelas horas iniciais após a exposição.

A principal alteração histopatológica observada em *B. glabrata* de Ressaca e Barreiro de Cima e em *B. tenagophila* de Itamaraju e Jacarepaguá,

durante a infecção por *A. costaricensis*, foi à formação de infiltrado hemocitário perilarvar que evoluiu para granuloma, sem comprometimento aparente dos órgãos e tecidos parasitados. Apesar da reação inflamatória, não se observou parasitos mortos. Harris & Cheng (1975) descreveram encapsulamento semelhante das larvas de *A. cantonensis* em *B. glabrata*. Segundo os autores esse processo iniciou entre 24 e 48 horas após a infecção e constituiu-se de duas fases, com infiltração e agregação de células basofílicas da hemolinfa em torno do parasito e subsequente transformação de nódulos celulares em nódulos de aparência mais fibrosa.

O estudo histopatológico revelou diferença no período de início da resposta inflamatória entre as duas populações de *B. glabrata* examinadas. A resposta à invasão das larvas é mais tardia na população de Barreiro de Cima que na de Ressaca, que também apresentou maior índice de mortalidade. Lima et al (1992) observaram que *B. glabrata* de Belo Horizonte infectada por *A. costaricensis* apresentou 37,4% de mortalidade e 71,3% de positividade e em *B. tenagophila* 45,5% de mortalidade e 50% de positividade.

Em nosso trabalho destacou-se um maior rendimento de L3 nas populações de *B. tenagophila* estudadas do que o relatado na literatura, (Lima et al, 1992) resultando em uma obtenção média de 47% de L3 na população de Jacarepaguá e de 62,5% na população de Itamaraju. Já a população de *B. glabrata* de Ressaca apresentou menor índice de mortalidade entre os hospedeiros experimentais utilizados.

As diferenças existentes entre o trabalho de Lima et al (1992) e o presente podem estar associadas às cepas de *B. glabrata*, à carga parasitária e ao número de exposições. Comparando com os nossos resultados, Lima et al (1992) uma única exposição dos planorbídeos à L1 resulta em maior rendimento de L3 do que várias exposições diárias.

A infecção de *B. glabrata* por larvas de *A. cantonensis* produz severas alterações metabólicas no molusco, tais como, diminuição da concentração de proteínas totais acompanhado por aumento na concentração de uréia e diminuição do ácido úrico na hemolinfa, sugerindo que neste modelo, a infecção induz à proteólise e à inversão do processo de excreção do hospedeiro (Tunholi-Alves et al, 2012). Análise de metabólitos e enzimas na

hemolinfa de planorbídeos infectados por *A. costaricensis* podem esclarecer quais tipos de alterações fisiológicas ocorrem e a relação destas com a mortalidade dos hospedeiros.

Neste trabalho, *B. glabrata* de Ressaca e as populações de *B. tenagophila* estudadas apresentaram adensamento celular em torno das larvas de *A. costaricensis* no primeiro dia após a infecção. *B. tenagophila* de Itamaraju apresentou uma resposta mais rápida que as demais populações estudadas constituindo reações granulomatosas no primeiro dia após a infecção. Apesar disto, não se detectou parasitos danificados nos cortes histológicos dessa população. Várias espécies de nematódeos estimulam reação hemocitária que culmina no seu encapsulamento em hospedeiros moluscos e apesar disto não ocorre dano ao parasito (Harris & Cheng, 1975; Lie et al., 1987) sugeriram que a ausência de morte larvária em *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis* é resultado da eliminação ineficiente de enzimas lisossomais pelos hemócitos.

Outra diferença também observada entre as populações de *B. glabrata* (Ressaca e Barreiro de Cima) foi o período de desenvolvimento da fase de L2 para L3 perdurando mais na população de Barreiro de Cima (Tabela 5). A evolução das larvas nas duas populações de *B. tenagophila* foi semelhante à população de *B. glabrata* de Ressaca. Diferenças na resposta do hospedeiro pode influenciar o desenvolvimento do parasito e pode estar relacionada com a variabilidade genética existente entre diferentes populações de moluscos, como já foi descrito por vários autores com relação aos planorbídeos e *Schistosoma mansoni* (Zanotti-Magalhães et al 1997).

Vários estudos sobre a esquistossomose têm demonstrado variações na interação parasito/hospedeiro entre diferentes espécies de planorbídeos e entre populações da mesma espécie. Essas variações ocorrem em virtude da diversidade genética tanto do molusco vetor como do trematódeo parasita. O sucesso do parasitismo depende do encontro de polimorfismos genéticos compatíveis, ou seja, na natureza apenas alguns esquistossomos são compatíveis com alguns indivíduos de uma população de moluscos (Richards & Merrit, 1967; Richards, 1975; Basch, 1976; Oliveira et al, 2008). Essa variedade e compatibilidade genética podem explicar as diferenças na porcentagem de

animais positivos e no número de L3 obtidas nas populações analisadas nesta monografia quando comparada ao trabalho de Lima et al (1992).

Este trabalho pode verificar alguns aspectos que permeiam a relação parasito/hospedeiro entre diferentes populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, entre os quais se destacam:

- 1) Vias de penetração larvária.
- 2) A caracterização histológica da reação perilarvária.
- 3) Evolução dos parasitos (1, 5, 15, 25, 35 e 45 dias).
- 4) Obtenção de L3.
- 5) Taxa de mortalidade dos hospedeiros.

A escolha do hospedeiro experimental para manutenção do ciclo do *A. costaricensis* deve considerar aspectos da mortalidade dos moluscos e o rendimento larvário que são variáveis nas diferentes populações de uma mesma espécie.

VII. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a existência de pelo menos duas vias migratórias utilizadas pelas larvas, que são dependentes do sítio de penetração das mesmas: a) penetração através do tegumento (por onde segue a maioria das larvas, posteriormente observadas na mufla) e b) ingestão das larvas pelo molusco (estas larvas podem ser encontradas inicialmente na luz intestinal e depois migram através dos vários tecidos), semelhante ao que se descreve no modelo *Sarasinula marginata* (Thiengo, 1996; Mendonça et al, 1999) e *Omalonyx* sp. (Montresor et al, 2008).
- 2) O modelo *B. tenagophila* Jacarepaguá exibiu uma resposta inflamatória mais rápida que os demais modelos estudados, o que pode ter contribuído para redução do número de larvas.
- 3) O infiltrado hemocitário que evoluiu para reação granulomatosa e para granuloma foram as principais alterações histopatológicas observadas durante o desenvolvimento do *A. costaricensis* nos moluscos, sem comprometimento aparente da histologia dos órgãos e tecidos parasitados. Apesar da reação hemocitária não se observou parasitos mortos.
- 4) As populações de *B. tenagophila* de Itamaraju e Jacarepaguá apresentaram maior rendimento larvar do que a população de Belo Horizonte descrita na literatura. As variações encontradas entre as espécies e populações estudadas são provavelmente devido às características genéticas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini, AA, Peixoto A, Caleffi A, Dexhaimer A & Camargo,RR. Angiostrongilíase abdominal: três casos observados no Rio Grande do Sul.Rev Ass Méd Rio Grande do Sul 27(2) 200 -203, 1983.

Ayala MAR, Angiostrongilíase abdominal, seis casos, observado no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 82: 29-36, 1987.

Ayala, MAR, Guerra IF, Schir RA, Motizuki A. Angiostrongilíase abdominal, apresentação de um caso. Mem Inst Oswaldo Cruz, 77: 189-193, 1982.

Baiard, JK, Neafi RC, Lanoie L & Connor DH Abdominal angiostrongylosis in an African man: case study . Am J Trop Méd Hyg, 37: 353-356, 1987.

Basch, PF, Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol, 39: 150-169, 1976.

Bonetti,VCBD. O& Graeff-Teixeira,C *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate host: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of mollusks. Rev.Soc. Bras Méd Trop,31 (3):289-294, 1998.

Banevicius, NMS, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Linhares AX. Behavior of *Angiostrongylus costaricensis* in planorbids. J. Biol.; 66 (1B):199-209, 2006.

Barbosa H,Raick AN, Magalhães AV & Otero PMF Angiostrongilose abdominal.Rev Ass Med bras; 26:178- 180, 1980.

Brack,M & Schopel,M *Angiostrongylus costaricensis* in black-eared marmoset.Trop.Geog.Med.,47 (3):136-138, 1995.

Brasil Ministério da Saúde Secretária de Vigilância em Saúde. Despacho de Vigilância Epidemiológica. Técnicas Moleculares. In Vigilância e Controle de Molusco de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) 2 ed-Brasília:Editora do Ministério da Saúde .p 81-84, 2008.

Carson, FL, Martin JH, Lynn, JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. Am-J. of Clin. Pathol. : 59: 365-373, 1973.

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma versão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.

Céspedes, R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, & Morera, P, Granulomas entérico y linfático com intensa eosinofilia tisular producidos por um estrombilídeo (*Strongylata*). Acta Méd. Cost 10 (3) 235-255, 1967.

Demo, O J, & Pessat, OAN. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado em Argentina Prensa méd, argent 73: 732-738, 1986.

Duarte, Z Morera, P & Vuong, PN. Abdominal angiostrongylosis in Nicarágua a clinico pathological study on a series of 12 cases reports Ann Parasitol Hum Comp 66: 252-262, 1991.

Graeff Teixeira, C, Camilo – Coura, L & Lenzi, HL. Angiostrongilíase abdominal nova parasitose no sul do Brasil. Rev AMRIGS 35 (2): 91-98, 1991.

Graeff Teixeira, C, Thiengo, SC, Thomé, JW, Medeiros ALB, Camilo, Coura, L, Agostini, A, A. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Moreira & Céspedes, 1971 in southern Brazil. Mem Inst. Oswaldo Cruz, 88:487 - 489, 1993.

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

Graeff Teixeira,C, Lenzi, HL & Camillo-Coura,L Suscetibilidade de *Megalobulimus* sp à infecção por larva de *Angiostrongylus costaricensis* in Congresso Brasileiro de Patologia,4Rio de Janeiro pg 151, 1989.

Graeff Teixeira C, Pinto VM, Junior EB, Agostini AA. Natural infection of *Phillocaulis soleiformis* with larve morphologically similar to L2 of *Angiostrongylus costaricensis*.Mem. Inst.Oswaldo Cruz, 89(1):121, 1994

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

Ishih AI, Sano M. Scanning electron microscopic observations of first and third stage larvae and adults of *Angiostrongylus costaricensis* Southeast Asian J.Trop. Med.Public Health 21(4) 568-573,1990.

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

JeandelR,Fortier G,Pitre, Delaunay C& Jouannelle A. Intestinal angiostrongyliasis caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Apropos of a case in Martinique.Gastroenterol Clin Biol. 12 (4):390-393, 1988.

Juminer B,Roudier M, Raccurt CP et al Presence de L "angiostrongylose abdominal en Guadalupe .A propos de deux cas recénts. Bull Soc Path Exot 85:39-43, 1992.

Kramer MH, Greer GJ, Quinones JF, Padilha NR, Hernandez B, Arana BA, Lorenzana R, Morera P, Hightower AW, Eberhard ML & Herwaldt BL. First reported outbreak of abdominal angiostrongyliasis. *Clin Infect Dis* 26 (2): 365-372, 1998.

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

Liacouras CA, Bell LA, Aliabi MC, & Piccoli DA. *Angiostrongylus costaricensis* enterocolitis mimics Cronn's disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16: 203-297, 1993.

Lie, KL, Jeong, KH, Heyneman, D. Molluscan host reaction to helminthic infection. In: E. J. Soulsby, Immune Responses in Parasitic Infections: Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol. IV: Protozoa, Arthropods and Invertebrates, Chapter 7, CRC Press, Florida, p211-270, 1987.

Lima, LC, Massara, CL, Souza, CP, Jannotti-Passos, LK & Lenzi, HL. *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) (Mollusca, Soleolifera) de Belo Horizonte (MG, Brazil) como hospedeira intermediária potencial do *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 34 (2):117-120, 1992.

Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Rev. Inst. Med. Trop.*; 34 (5): 399-402, 1992.

Luzzi CA & Newmann M Angiostrongilíase abdominal. Apresentação de dois casos Arq Catarin Méd 18: 41- 44, 1989.

Magalhães AV,Andrade GE,Koh IHJ,Soares MC,Alves E,Tubino P,Santos,FAM & Raick,AN. Novo caso de Angiostrongilose abdominal.Rev Inst Méd Trop São Paulo 24 (4):252 – 258, 1982.

Malek,E,Presenceof *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes,1971 in Colombia Amer. J.Trop.pred Hyg 30 81-83, 1981.

Mallory, FB, Pathological Technique, WB, Saunders Co. Philadelphia 1938.
Mallory, FB, Pathological Technique, Hafner Publishing., New York,p 152,1961.

Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo-Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). Mem. Inst.Oswaldo Cruz. 94 (4): 549-556, 1999.

Mojon, M Angiostrngylose humaine à *Angiostrongylus costaricensis* Bull.Acad.natle. Med,178(4):625- 633, 1994.

Montresor, LC, & Vidigala, T H D A & Mendonça C L G F, Mendonça &Fernandes, A A, & Souza, N de Souza & Omar S Carvalho & Caputo, F GL&

Mota E M, Lenzi,LH *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae):migration route in experimental infection of *Omalonyx* sp. (Gastropoda: Succineidae) Parasitol Res 103:1339 –1346, 2008

Morera,P.Granulomas entéricos y linfáticos com intense eosinophilia tisular producidos por um strongilídeo(*Strongylata*;Raillet y Henry,1913)II. Aspecto parasitológico (Nota previa). Acta Méd.Cost 10 (3):257-265,1967.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloides no Brasil. Rev. Serv. Ensp Saúde Pública.; 1: 507-624, 1948.

Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg.1971., 22: 613-621, 1973.

Morera, P 1970. Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes,1971).Bol.Chileno Parasitol.,25 (3-4) 133-134, 1970.

Morera,P. Abdominal angiostrongyliasis In SPIT TEL Jr.J,A Clinica medicine . Philadelphia ,Harper &ROW v2 cap 80 pag 1-4, 1986.

Morera, P & Ash LR. Investigación Del husped intermediário de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, Bol Chileno Parasitol 25: 135, 1971.

Morera P, Céspedes R. Angiostrongylus abdominal. Uma nueva parasitosis humana. Acta. Méd. Cost. 14: 173-189, 1971.

Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp nematoda Metastrongyloidea, a new lunhworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop 18 (12) 173-185, 1971.

Morera, P, Céspedes R.Angiostrongilosis abdominal. Uma nueva parasitosis humana.Acta Méd Costa 14 (3):159-173, 1971.

Morera, P.Life hystory and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes.Am Trop Med Hyg 1973 22 (5):613 – 621, 1971.

Morera, P, Perez F, Mora F. & Castrol. Visceral larva migrans like síndrome caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Am. J. Trop. Med.Hyg., 31 (1): 67-70, 1982.

Mota, EM & Lenzi, HL. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection Mem Inst Oswaldo Cruz. 100 (4): 407-420, 2005.

Neuhauss, E, Fitarelli, M, Romanzini, J & Graeff-Teixeira, C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 102 (1): 49-52, 2007.

Oliveira AL, Da Silva D, Zanotti-Magalhaes EM, Abdel-Hamid AZ, Ribeiro-Paes JT. Schistosome/mollusk: genetic compatibility. Genet Mol Res, 7 (2): 518–526, 2008.

Paraense, WL Fauna planorbídica do Brasil In:Lacaz .C.S,Baruzzi,R.G Siqueira Ir W Ed Introdução a geografia médica no Brasil São Paulo, Edgar Bliicher EDUSP, 213-239, 1972.

Paraense W.L Distribuição dos caramujos no Brasil. In Modernos conhecimentos sobre a *esquistossomose mansônica* .An . Academia. Mineira medicina 14: 117 -128, 1986.

Pena, GP, Andrade, Filho JS, Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*.First record of occurrence in the state of Espírito Santo,Brazil and a review of its geographic distribution.RevInst Med Trop São Paulo 37 (4):369 -374, 1995.

Rambo,PR,Agostini,AA & Graeff-Teixeira,C. Abdominal angiostrongylosis in souther Brazil.Prevalence and parasita burden in mollusc intermediate host foron eighteen endemic foci Mem.Inst Oswaldo Cruz, 92:9-14, 1997.

Rey, Luis. Bases da parasitologia médica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Richards, CS, MerrittJ,W. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in moluluscan intermediate host J.Parasitol 53 382, 1967.

Rocha,A, Sobrinho,JM & Salomão,EC. Angiostrongilíase abdominal primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais.Rev Soc Brás Méd Trop.,24:265-268, 1991.

Rodriguez R, Anatomia Patológica da Angiostrongilíase abdominal.Tese de mestrado.Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 1987.

Sanches, GA. Perforación intestinal por *Angiostrongylus costaricensis* presentacion de dois casos. Ver Méd Panamá 17:74-81, 1992.

Santos, CP. Redescrção de *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre *Proechimys* SP na Venezuela (*Metastrongyloedae* *Angiostrongylidae*) Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 80 81- 83, 1985.

Sauerbrey, M. A precipitin test for the diagnosis of human abdominal Angiostrongyliasi .J Trop Med Hyg 26: 1156- 1158, 1977.

Sierra, E & Morera,P. Angiostrongilosis abdominal.Primer caso humano encontrado em Honduras(Hospital Evangélico de Siguatepeque).Acta Médica Cost 15 (2):95-99, 1972.

Sly,DL,Toft,JD, Gardiner,CH, & London,WT. Spontaneous occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in marmoset(*saguinus mystax*).Lab.Animal Science 32 268-288,1982.

Tesh, RB, Ackerman LJ,Dietz WH,Williams, JA. *Angiostrongylus costaricensis* in Panamá Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite Amer J Trop Med Hyg 22: 348-356, 1973.

Tunholi-Alves,VM, Tunholi, VM, Pinheiro, J, Thiengo, SC. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, *Metastrongylidae*) on the

metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*
Experimental Parasitology 131 (2): 143–147, 2012.

Thiengo, SC. Mode of infection *Sarasinula marginata*(mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis*(nematode).Mem.Inst Oswaldo Cruz 97: 277-278, 1996.

Thiengo, SC. Amato, S.B. Aventino, A & Araújo,JLB. Estudo sobre os hospedeiros intermediário do *Angiostrongylus costaricensis* Morera &Céspedes 1971. Rev.BrásParasitol. Vet. 2(supl 1):64, 1993.

Velázquez, JZ, Baquedano, WR, Pérez, AR, Flores, MB.
Angiostrongilosis costarricensis primeros casos mexicanos.Rev Invest Clin (Méx) 26: 389-394 1974.

Zambrano, Z, DÍAZ, P & SALFELDER, K. *Ileocolitis pseudotumoral eosinofílica* de origen parasitario. GEN (Venezuela), 29: 87-96, 1975.

Zambrano, PZ.Ileocolitis pseudotumoral eosinofílica de origem parasitaria Rev Latinoamericana de Patológica 12: 43- 50.1973.

Zanotti-Magalhães,EM,Magalhães,LA & Carvalho,JF. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor .IV.Infecciosidade dos miracídios. Rev.Saúde Pública S Paulo,31: 488 – 494, 1997.

Ziliotto, Ajr,Kunzle JE, Rus Fernandes,LA,Prates – Campos, C & Britto –Costa R. Angiostrongilíase:apresentação de um provável casoRev Inst Méd Trop São Paulo 17:312- 318, 1975.

9.1. Técnicas Histológicas

COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

A coloração de Hematoxilina e Eosina ou simplesmente HE, é utilizada na histologia para corar todo tipo de tecido, seja em blocos de parafina ou em blocos congelados. A Hematoxilina é um corante básico, portanto cora estruturas ácidas, como o núcleo das células e a Eosina é um corante ácido, portanto cora estruturas básicas como o citoplasma.

As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho com duração de três minutos. Após a hidratação do tecido, as lâminas foram embebidas no corante Hematoxilina por 20 minutos. Após a imersão no corante, as lâminas foram deixadas sob água corrente por 25 minutos a fim de remover o excesso. Em seguida, elas foram embebidas em álcool 70% por três minutos e depois foram colocadas no corante Eosina durante três minutos. Após a imersão no corante, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (três vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (três vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

ALCIAN BLUE pH 1.0

Esta coloração é usada para verificar a presença de proteoglicanos sulfatados. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho durou três minutos. Em seguida, foram banhadas em solução tampão pH 0,65 durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso) e logo após, coradas pelo Alcian Blue pH 1.0 durante 45 minutos. O excesso do corante foi removido com a mesma solução tampão de pH 0,65, durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso) . O tampão foi escorrido e as lâminas foram oxidadas pelo Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pelo Reagente de Schiff durante 20 minutos e depois passaram por dois banhos de solução sulfurosa por cinco minutos cada, que foi preparada no momento do uso. As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e em água destilada por três minutos. Por último, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (três vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (três vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

ALCIAN BLUE pH 2.5

Esta coloração é usada para verificar a presença de proteoglicanos carboxilados. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho durou três minutos. Em seguida, foram banhadas em solução tampão pH 2,32 durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso) e logo após coradas pelo Alcian Blue pH 2.5 durante 45 minutos. O excesso do corante foi removido com a mesma solução tampão de pH 2,32, durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso). O tampão foi escorrido e as lâminas foram oxidadas pelo Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos e em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pelo Reagente de Schiff durante 20 minutos e depois passaram por dois banhos de metabissulfito de sódio a 5% durante cinco minutos cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos. Por último, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (3 vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (três vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

P.A.S. (REAÇÃO DO ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF)

Esta coloração é usada para mucoproteínas e carboidratos em geral. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho durou três minutos. Em seguida foram embebidas em Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos e depois foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pelo Reagente de Schiff (guardado na geladeira), por 15 minutos à temperatura ambiente e lavada em água destilada por quatro minutos. Depois as lâminas foram coradas pela Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos e lavadas em água corrente por cinco minutos. Por último, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (3 vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (três vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

TRICRÔMICA DE MASSON

A coloração Tricômica de Masson marca três tipos de estruturas: fibras colágenas, fibras musculares e tecido conjuntivo. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho durou três minutos. Em seguida foram colocadas em Bouin pré-aquecido a 56°C por uma hora, lavadas em água corrente até o desaparecimento da cor amarela e coradas pela Hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 minutos (a solução foi desprezada após o uso). Logo após as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e em água destilada por um minuto. Em seguida elas foram coradas em Solução de Biebrich Escarlat-Fucsina Ácida por cinco minutos e logo após foram muito bem lavadas em água destilada com várias trocas durante 20 minutos. Elas foram colocadas em Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico a 5% durante 30 minutos, depois a solução foi escorrida das lâminas e elas foram coradas pelo Azul de Anilina durante 30 minutos e lavadas em água destilada por cinco minutos. Por último, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (três vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (3 vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

RETICULINA DE GOMORI

A coloração Reticulina de Gomori cora fibras colágenas de acordo com sua abundância no tecido. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho durou três minutos. Depois foram banhadas em solução de Permanganato de Potássio a 1% durante um minuto e lavadas em água destilada por dois minutos. Em seguida, foram descoradas pelo Ácido Oxálico a 3% durante três minutos e lavadas em água corrente por três minutos e foi aplicado a elas Alúmen de Ferro a 2%, também podendo ser usado o Sulfato de Ferro e Alumínio por um minuto. As lâminas foram lavadas em água destilada por dois minutos. Logo após, foram banhadas em solução de uso de Nitrato de Prata Amoniacal durante um minuto, lavadas em água destilada por cinco minutos, em formol a 10% por três minutos e em água corrente por cinco minutos. Depois as lâminas foram banhadas em Solução de Cloreto de Ouro a 1% durante três minutos, lavadas em água destilada por dois minutos, banhadas em Tiosulfato de Sódio a 5% por dois minutos, lavadas em água corrente por dois minutos. Por último, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (três vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (três vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

VON KOSSA

A coloração de Von Kossa é utilizada para destacar cálcio presente nos tecidos e cultura de células analisadas.

As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho com duração de três minutos. Após a hidratação do tecido, as lâminas foram embebidas na solução de Nitrato de Prata 5% por uma hora e expostas a lâmpada de 100 watts. Após a imersão na solução, as lâminas foram lavadas em água destilada. Em seguida, elas foram embebidas na solução de Tiosulfato de Sódio 5% por dois minutos e lavadas em água destilada. Após a imersão, as lâminas foram contrastadas em solução de Vermelho Rápido Nuclear por cinco minutos e lavadas em água destilada. Para finalizar, as lâminas foram banhadas em uma série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (3 vezes durante 3 minutos cada) e xilol absoluto (3 vezes durante 3 minutos cada). As lâminas não foram removidas do último banho de xilol e foram montadas em goma de Damar.

Durante o banho pela solução de Nitrato de Prata 5%, a luz de 100 watts pode ser substituída por luz solar ou lâmpada ultravioleta (Mallory, 1961).