



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FREQUÊNCIA, ASPECTOS PARASITOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INFECÇÃO POR *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (NEMATODA,
ANGIOSTRONGYLIDAE) EM ROEDORES SINANTRÓPICOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO

HÉVILA MARA MOREIRA SANDES GUERRA

RECIFE
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FREQUÊNCIA, ASPECTOS PARASITOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INFECÇÃO POR *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) (NEMATODA,
ANGIOSTRONGYLIDAE) EM ROEDORES SINANTRÓPICOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO

HÉVILA MARA MOREIRA SANDES GUERRA

Tese apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Doutora
em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

G934f Guerra, Hévila Mara Moreira Sandes.
Frequência, aspectos parasitológicos e morfológicos da
infecção
por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (*Nematoda*,
Angiostrongylidae) em roedores sinantrópicos / Hévila Mara
Moreira Sandes Guerra. – Recife, 2018.
88 f.: il.

Orientador(a): Leucio Câmara Alves.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal, Recife, 2018.
Referencias e anexos.

1. Angiostrongilíase 2. *Rattus norvegicus*
3. Meningite eosinofílica 4. *Angiostrongylus cantonensis* I.
Alves,
Leucio Câmara, orient. II. Título

CDD

636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FREQUÊNCIA, ASPECTOS PARASITOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INFECÇÃO POR *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (NEMATODA,
ANGIOSTRONGYLIDAE) EM ROEDORES SINANTRÓPICOS

Tese elaborada e defendida por

HÉVILA MARA MOREIRA SANDES GUERRA

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profa. Dra. Márcia Paula de Oliveira Farias
Campus Professora Cinobelina Elvas-CPCE-UFPI

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia.
Departamento de Histologia e Embriologia – UFPE

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profa. Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Ao meu pai Januário Moreira (*in
memoriam*) e à minha mãe Marluce
Sandes, pelo apoio e amor.

A Neurisvan Guerra, meu esposo, por ser meu maior entusiasta e melhor companhia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida por todas as bênçãos e graças alcançadas;

A Januário Moreira (*in memoriam*), meu pai, por todo amor e paciência em seus ensinamentos;

A Marluce Sandes, minha mãe, por todo suporte e incentivo em minha vida acadêmica;

A Marcos, Magno e Tito, meus irmãos, pelos momentos felizes e de boa convivência;

A Neurisvan Guerra, meu esposo e companheiro de coletas, por todo carinho, estímulo, compreensão e zelo durante todas as etapas do doutorado;

Ao professor Leucio Câmara Alves, pela orientação durante o doutorado e praticamente toda a minha vida acadêmica, cooperando em todas as etapas de estudo;

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, pelo convívio e principalmente àqueles que participaram das etapas de campo: Inês Cavalcante, Wagner Araújo, Irma Yaneth, Victor Fernando, Márcia Paula e Andréa Medina e aos amigos Edson Moura, Everton Diogo, Janilene Oliveira e Maria Fernanda, pela amizade, momentos de descontração e auxílio nas coletas;

À Professora Maria Aparecida da Gloria Faustino, por sua colaboração durante minha formação acadêmica;

Ao Professor Valdemiro Júnior, ao Renan Barbosa, estudante de Medicina Veterinária e à Mariana Barreto, residente da Área de Patologia Animal, pela ajuda no processamento histológico das amostras;

À Professora Carina Scanoni, por possibilitar o processamento da Microscopia Eletrônica de Transmissão;

Ao Professor Rinaldo Mota e os colegas Pomy Kim, Givanildo Silva e Renata, pelo suporte durante o processamento das PCR's;

A Jaqueline Nipo, Maria Eugênia Farias e demais colegas da Vigilância Ambiental do Distrito Sanitário VI, por toda a compreensão durante o período de coletas e processamento de material;

À Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco.

*“É preciso calar e ter silêncio ao redor
para poder ouvir a voz de Deus”.*
(São Padre Pio de Pietrelcina)

RESUMO

Angiostrongylus cantonensis é um nematódeo de caráter zoonótico que tem roedores e moluscos terrestres como principais hospedeiros. Diversas espécies de mamíferos e aves são susceptíveis à infecção acidental, sendo a infecção por *A. cantonensis* a principal causa de meningite eosinofílica em humanos. A introdução e rápida disseminação de moluscos da espécie *Achatina fulica* tem elevado o risco da transmissão de *A. cantonensis*, pois o molusco é o seu principal hospedeiro intermediário inclusive no Brasil, onde há diversas áreas vulneráveis à introdução do parasito e são escassos os dados sobre sua epidemiologia. Em Pernambuco não há dados sobre a presença de roedores naturalmente infectados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência, distribuição, alterações estruturais, morfológicas, parasitológicas, ultraestruturais e a realização da caracterização molecular de *A. cantonensis* em roedores naturalmente infectados nas diferentes mesorregiões estado de Pernambuco. Para realização do estudo, foram capturados 94 roedores das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana) e *R. rattus* (rato-preto), provenientes de 13 municípios distribuídos em quatro mesorregiões do estado de Pernambuco, com e sem registro de casos humanos de Meningite Eosinofílica. Foi procedida a captura, eutanásia, necropsia e análise dos órgãos torácicos dos roedores e coleta de helmintos encontrados no bloco cardiopulmonar, utilizando microscopia de luz e eletrônica, além de realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi realizada a análise macroscópica e histopatológica de lesões pulmonares, posteriormente realizada a avaliação morfológica dos parasitos encontrados nas artérias pulmonares do roedor, para identificação dos parasitos; foi realizada a avaliação do exsudato pulmonar quanto à presença de ovos e larvas L₁; para o diagnóstico molecular, foi utilizada a técnica de PCR; com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, foi procedida a avaliação ultraestrutural dos enterócitos do tubo digestivo de *A. cantonensis*. Foi observada a frequência de 29,78% dos roedores infectados, pertencentes à espécie *R. norvegicus*. No estudo histológico dos pulmões foi observada pneumonite subaguda a crônica, além de fibrose pulmonar e presença de ovos e larvas do parasito no tecido pulmonar. A PCR revelou fragmentos de 1134 pb compatíveis com o gênero *Angiostrongylus* e a microscopia eletrônica de transmissão revelou ultraestruturas dos enterócitos e do epitélio intestinal do parasito. Este é o primeiro relato de infecção natural de *R. norvegicus* por *A. cantonensis* em áreas urbanas, indicando o risco de infecção para a população humana nas áreas do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil onde foi detectada a presença do parasito.

Palavras chave: Angiostrongilíase, *Rattus norvegicus*, Meningite eosinofílica, Microscopia de transmissão.

ABSTRACT

Angiostrongylus cantonensis is a zoonotic nematode that has terrestrial rodents and mollusks as the main hosts. Several species of mammals and birds are susceptible to accidental infection, and *A. cantonensis* infection is the main cause of eosinophilic meningitis in humans. The introduction and rapid dissemination of mollusks of the *Achatina fulica* species has increased the risk of transmission of *A. cantonensis*, since the mollusk is its main intermediate host, even in Brazil, where several areas are vulnerable to the introduction of the parasite and data on epidemiology. In Pernambuco there is no data on the presence of naturally infected rodents. The objective of this work was to evaluate the frequency, distribution, structural, morphological, parasitological, ultrastructural and molecular characterization of *A. cantonensis* in naturally infected rodents in the different mesoregions of the state of Pernambuco. For the study, 94 rodents of the *Rattus norvegicus* (norway rat) and *R. rattus* (black rat) species were collected from 13 municipalities distributed in four mesoregions of the State of Pernambuco, with and without human cases of Eosinophilic Meningitis. Euthanasia, necropsy and analysis of the thoracic organs of the rodents and collection of helminths found in the cardiopulmonary block, using light and electronic microscopy, and Polymerase Chain Reaction (PCR) were performed. A macroscopic and histopathological analysis of lung lesions was carried out, after which a morphological evaluation of the parasites found in the pulmonary arteries of the rodent was performed to identify the parasites. The evaluation of the pulmonary exudate was performed on the presence of eggs and L₁ larvae; for the molecular diagnosis, the PCR technique was used and with the aid of transmission electron microscopy, the ultrastructural evaluation of the enterocytes of the digestive tract of *A. cantonensis* was carried out. The frequency of 29.78% of norway rats infected by *A. cantonensis* was observed. In the histological study of the lungs it was observed subacute to chronic pneumonitis, besides pulmonary fibrosis and presence of eggs and larvae of the parasite in the lung tissue. PCR revealed 1134 bp fragments compatible with the genus *Angiostrongylus* and transmission electron microscopy revealed ultrastructures of the enterocytes and intestinal epithelium of the parasite. This is the first report of natural infection of *R. norvegicus* by *A. cantonensis* in urban areas, indicating the risk of infection to the human population in the areas of the state of Pernambuco, northeastern Brazil, where the presence of the parasite was detected.

Key words: Angiostrongyliasis, *Rattus norvegicus*, Eosinophilic meningitis, Transmission microscopy.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1.	Sistemática do gênero <i>Angiostrongylus</i>	16
2.2.	Morfologia de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	17
2.3.	Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	19
2.4.	Distribuição geográfica de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	21
2.5.	Hospedeiros.....	23
2.5.1	Hospedeiros intermediários.....	23
2.5.2	Hospedeiros definitivos.....	25
2.5.3.	Hospedeiros acidentais.....	26
2.6.	Patogenia e Sinais Clínicos.....	27
2.7.	Fatores de Risco para a população humana.....	29
2.8.	Diagnóstico da infecção por <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	30
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
5.	OBJETIVOS.....	45
5.1.	Objetivo Geral.....	45
5.2.	Objetivos específicos.....	45
	CAPÍTULO I.....	46
	Frequência e Caracterização Molecular de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em <i>Rattus norvegicus</i> e <i>R. rattus</i> naturalmente infectados nas diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco.....	46
	CAPÍTULO II.....	66
	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO PULMÃO DE <i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769) NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Chen, 1935) (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE)	66
	CAPÍTULO III - SHORT COMMUNICATION	82
	Ultrastructural aspects of the intestinal cells surface of <i>Angiostrongylus cantonensis</i> by using of transmission electron microscopy.....	82
	CONCLUSÕES GERAIS.....	88

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Descrição morfológica de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	18
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> com as possíveis vias de transmissão.....	20
Figura 3. Distribuição geográfica de <i>A. cantonensis</i> . Países com presença de hospedeiros naturalmente infectados por <i>A. cantonensis</i>	21
Figura 4. Distribuição geográfica de moluscos e roedores naturalmente infectados por <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e presença de infecção humana no Brasil.....	22

CAPÍTULO I

Figura 1. Municípios das diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco onde ocorreram capturas de roedores das espécies <i>Rattus rattus</i> e <i>R. norvegicus</i>	51
Figura 2. Bolsa copuladora de <i>A. cantonensis</i> macho.....	55
Figura 3. Exsudato pulmonar de <i>R. norvegicus</i> , contendo ovos e larva de primeiro estágio (L ₁) de <i>A. cantonensis</i>	56

CAPÍTULO II

Figura 1. Região de captura dos roedores.....	70
Figura 2. Pulmão e coração de <i>R. norvegicus</i> alterações de coloração na superfície do órgão e alterações hemodinâmicas.....	72
Figura 3. Pulmão de <i>R. norvegicus</i> com presença de abscessos múltiplos e áreas de fibrose e necrose.....	72
Figura 4. A: <i>Rattus norvegicus</i> . Pulmão. Pneumonite subaguda a crônica constituída por macrófagos, linfócitos e vários eosinófilos, observando-se ainda espesso tecido conjuntivo (fibrose pulmonar).....	76
B: <i>Rattus norvegicus</i> . Pulmão. Infiltrado inflamatório perivascular constituído por eosinófilos e alguns macrófagos. Pneumonite eosinofílica focal.....	76
C: <i>Rattus norvegicus</i> . Pulmão. Ovos de <i>Angiostrongylus</i> sp. cortados longitudinalmente no interior de capilares.....	77
D: <i>Rattus norvegicus</i> . Pulmão. Larvas de <i>Angiostrongylus</i> sp.	

cortadas longitudinalmente circundadas por escasas células inflamatorias.....	77
---	----

CAPÍTULO III

Fig. 1 (A): TEM of the intestinal epithelium of <i>A. cantonensis</i> . Part of the intestinal epithelium showing a brush border composed of microvilli (Mi) and the presence of macrovesicles and microvesicles of digestion; Intestinal cells look like a syncytium, e.g. multinucleated (N) pattern showed no limit between these cells and the presence of basal lamina (BL).....	86
(B): The lumen is filled with a granular material, which sometimes contains a few intermixed membranous structures, vesicles and partially digested red blood cells (BC) originating from host blood feeding.....	86
(C): TEM of the intestinal epithelium of <i>A. cantonensis</i> . The epithelial cells with microvilli (Mi), nuclei (N) and nucleolus (Nu) containing areas of loose and condensed chromatin. The presence of macrovesicles and microvesicles of digestion.....	86
(D): Macrovesicles of digestion and short microvilli of different sizes. The microvilli have central filaments that extend a short distance and the presence of macrovesicles of digestion.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Hospedeiros intermediários e paratênicos naturalmente infectados por <i>A. cantonensis</i>	23
Tabela 2.	Hospedeiros definitivos de <i>A. cantonensis</i> nos diferentes continentes.....	25

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Ocorrência de <i>A. cantonensis</i> em roedores nas diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco. Recife, 2018.....	54
-----------	--	----

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO I

ANEXO.	FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS ROEDORES.....	65
--------	--	----

1. INTRODUÇÃO

Angiostrongylus spp. são helmintos que têm os murídeos como hospedeiros definitivos, moluscos como hospedeiros intermediários e camarão de água doce, peixes, anfíbios e répteis como hospedeiros paratênicos (HUTTEMANN, SCHMAHL e MELHORN, 2007). Mamíferos em geral, são considerados hospedeiros acidentais e se infectam pela ingestão de hospedeiros intermediários ou vegetais crus/mal cozidos, contendo larvas infectantes de terceiro estágio (BAHETI et al., 2009).

As espécies de Angiostrongilídeos associadas a infecções zoonóticas são *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*, que são os agentes etiológicos da Meningite Eosinofílica e da Angiostrongilíase abdominal, respectivamente (THIENGO et al., 2010). Seus hospedeiros intermediários são moluscos pertencentes ao gênero *Pomacea* (ampulária) e à espécie *Achatina fulica* (caramujo-gigante-africano) (MACKERRAS e SANDARS, 1955; LV et al., 2009; THIENGO et al., 2010).

As espécies *Rattus norvegicus* (ratazana) e *R. rattus* (rato-preto) são tidas como principais hospedeiros definitivos de *A. cantonensis* e são consideradas permissivas à infecção, enquanto demais mamíferos (primatas, marsupiais, outras espécies de roedores) e também aves são consideradas não-permissivas à infecção (WEI et al., 2014).

No ciclo de *A. cantonensis*, os moluscos de água doce se infectam ao entrar em contato com as larvas de primeiro estágio (L₁), liberada nas fezes dos hospedeiros definitivos. Nos tecidos fibromusculares do hospedeiro intermediário ocorrem duas mudas, tornando-se então larvas de terceiro estágio (L₃), sendo esta a forma infectante para as demais espécies susceptíveis. As larvas podem permanecer nos tecidos do molusco ou serem liberadas em suas secreções, contaminando assim a água, alimentos e fômites (WANG et al., 2011).

Segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CPCD) dos Estados Unidos da América (EUA), até 2015 foram registrados mais de 2.800 casos humanos de Meningite Eosinofílica em todo o mundo, distribuídos em mais de 30 países.

As manifestações clínicas da Meningite Eosinofílica não são específicas, dificultando o diagnóstico inicial em casos humanos da doença (CHAN et al.,

2015). A tríade clássica da meningite: cefaleia, rigidez de nuca e febre nem sempre aparecem concomitantemente e podem aparecer sinais clínicos menos frequentes como parestesia, alterações visuais, náuseas e vômito (WANG et al., 2008). Os sinais clínicos podem evoluir com encefalite, meningoencefalite e até a morte do paciente, caso não seja instituído o tratamento adequado (SAWANYAWISUTH et al., 2009).

Durante o seu ciclo natural, as larvas infectantes (L₃) atingem o Sistema Nervoso Central e/ou Periférico do hospedeiro definitivo para realização de mudas, porém em infecções acidentais ocorrem reações inflamatórias eosinofílicas com maior intensidade em diversos órgãos (CHAN et al., 2015).

Mesmo em roedores, a infecção por *A. cantonensis* pode causar alterações macroscópicas e microscópicas pulmonares, cardíacas, hepáticas e nervosas, que variam de acordo com a carga parasitária apresentada (GARCIA et al., 2014).

No Brasil há diversas áreas vulneráveis à introdução de *A. cantonensis* e são escassos os dados sobre aspectos epidemiológicos do parasito (THIENGO et al. 2010). Em Pernambuco, há relatos de moluscos da espécie *Ac. fulica* naturalmente infectados por *A. cantonensis* (THIENGO et al., 2010) e pacientes humanos com meningite eosinofílica (LIMA et al., 2009), porém, não há dados sobre a presença de roedores naturalmente infectados pelo parasito.

Neste sentido, torna-se necessária a identificação de roedores sinantrópicos naturalmente infectados por *A. cantonensis* no estado de Pernambuco, com o objetivo de auxiliar o planejamento e adoção de medidas adequadas para o controle deste parasito. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi determinar a frequência, distribuição, aspectos morfológicos, parasitológicos, histopatológicos e também a caracterização molecular de *A. cantonensis* nas diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistemática do gênero *Angiostrongylus*

O gênero *Angiostrongylus* descrito por Kamensky (1905), encontra-se representado por nematoides da superfamília Metastrongyloidea (CRAM, 1927), família Angiostrongylidae (BOEHM e GEBAUER, 1934), parasitos do sistema respiratório e vascular de mamíferos com 20 espécies atualmente reconhecidas (MALDONADO et al., 2012) a saber: *Angiostrongylus vasorum*, *A. raillieti*, *A. gubernaculatus* e *A. chabaudi*, que têm carnívoros como seus hospedeiros definitivos e *A. taterone*, *A. cantonensis*, *A. costaricensis*, *A. sciuri*, *A. mackerrasae*, *A. sandarsae*, *A. petrowi*, *A. dujardini*, *A. schmidtii*, *A. malaysiensis*, *A. ryjkovi*, *A. siamensis*, *A. morerae* e *A. lenzii* que para completarem seu ciclo biológico, utilizam murídeos como hospedeiros definitivos (THIENGO et al., 2013).

De acordo com a revisão de Costa e Guimarães (2003) e segundo a sistemática molecular (BLAXTER et al., 1998), a classificação do gênero *Angiostrongylus* é:

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Ordem: Strongylida

Superfamília: Metastrongyloidea

Família: Protostrongylidae

Subfamília: Angiostrongylinae

Gênero: *Angiostrongylus* Kamensky, 1905

Entre as espécies de importância médica veterinária e na saúde pública, destacam-se *A. vasorum* (COLELLA et al., 2016), parasita cardiopulmonar que infecta caninos e *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, que causam em diversas espécies (inclusive o homem) a meningite eosinofílica e angiostrongilose abdominal, respectivamente (CALDEIRA et al., 2003; HELM et al., 2010).

Em razão de *A. cantonensis* estar presente no estado de Pernambuco e ser a principal causa de Meningite Eosinofílica (ME) no homem, a revisão de literatura terá como foco principal a espécie *A. cantonensis*.

A infecção por *A. cantonensis* no homem é uma enfermidade de distribuição mundial (COWIE, 2013), sendo considerada uma doença emergente no Brasil, (MORASSUTTI et al, 2014). Porém, as informações sobre o parasito em território nacional ainda são pontuais, tornando-se cada vez mais necessária a obtenção de dados relativos à infecção para que seja possível a implementação de medidas de profilaxia e controle dessa zoonose, no estado de Pernambuco, onde foram confirmados diversos casos clínicos e um óbito causados por Meningoencefalite Eosinofílica (LIMA et al., 2009).

2.2 Morfologia de *Angiostrongylus cantonensis*

A espécie *Angiostrongylus cantonensis* teve sua primeira descrição na literatura nas artérias pulmonares e coração de roedores por Chen (1933) sendo designado como *Pulmonema cantonensis*, na cidade de Guangzhou (Cantão), China. Posteriormente, uma nova espécie de helminto denominada de *Haemostromgylus ratti* foi encontrada também em roedores em Taiwan (YOKOGAWA, 1937). Após duas décadas, os nematoides foram identificados como pertencentes a mesma espécie e reclassificados como *Angiostrongylus cantonensis* por Dougherty (1946).

De uma forma geral, os espécimes adultos (machos e fêmeas) apresentam corpo filiforme (Figura 1), sendo a extremidade anterior mais afilada (THIENGO et al., 2013), com macho medindo 20 a 25 mm e as fêmeas 22 a 34 mm (ALICATA e JINDRAK, 1970). A vesícula cefálica do parasito é ausente, a abertura oral é simples com um pequeno dentículo, circular e cercada por seis papilas sendo duas dorsais, duas laterais e duas ventrais; dois anfídeos e dois deirídeos laterais na altura do esôfago. O esôfago é claviforme, o poro excretor fica posterior ao esôfago e o anel nervoso anterior ao meio do mesmo (PUTHIYAKUNNON e CHEN, 2015).

Nas fêmeas, os túbulos uterinos são espiralados em torno do intestino de coloração escura em virtude da digestão da hemoglobina, que são facilmente vistos através da cutícula transparente, formada principalmente por colágeno e na extremidade posterior da fêmea há uma cauda curta e arredondada, sem expansão da cutícula e papilas, sendo ligeiramente curvada ventralmente com a abertura da vulva abrindo a 0,2 mm anterior ao ânus, como uma abertura transversal suavemente elevada (JANOVY e ROBERTS, 2000; PUTHIYAKUNNON e CHEN, 2015).

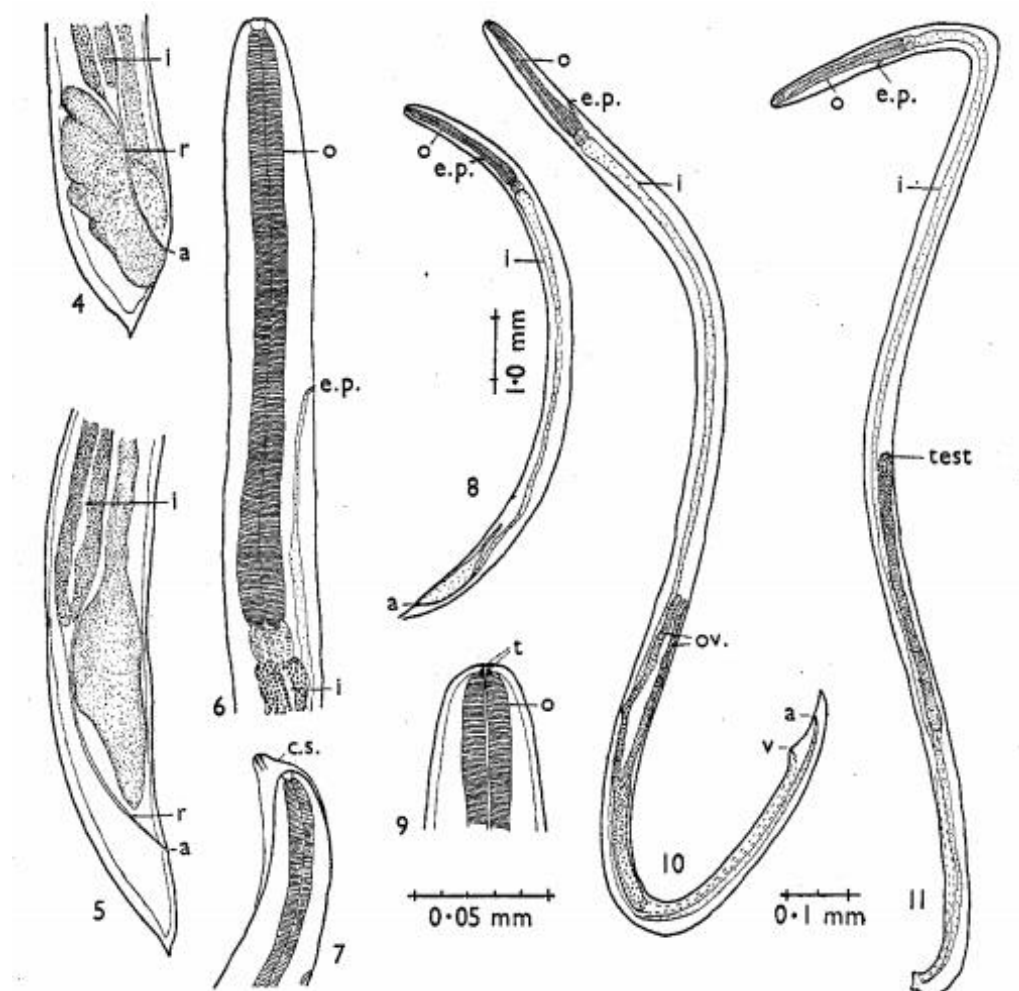


Figura 1. Descrição morfológica de *Angiostrongylus cantonensis*. Números de 4 a 11: Estágios de *A. cantonensis* nos hospedeiros definitivos. Números de 4 a 8: L₄. Números 10 e 11: fêmea e macho adultos, respectivamente. Nº 4: Extremidade posterior (macho). Nº 5: Extremidade posterior (fêmea); Nº 6: Extremidade anterior; Nº 7: Terceira muda; Nº 8: Larva (fêmea); Nº 9: Cabeça de adulto jovem, evidenciando dente (t); Nº 10: Fêmea e Nº 11: Macho; (a) - Ânus; (e.p.) - poro excretor; (i) - intestino; (o) - esôfago; (ov.) - ovários; (r) - reto; (t) - dente; (test.) - testículos; (v) - vulva. (MACKERRAS E SANDARS, 1955).

Por sua vez, os machos apresentam a bolsa copuladora pequena e levemente assimétrica (BRUSCA e BRUSCA, 1990), apresentando os raios ventrais menores que os raios ventrolaterais, com uma origem comum, bifurcando na metade proximal e não alcançando as margens bursais. Os raios laterais têm origem em um tronco comum, com o raio ventrolateral sendo em forma de fenda e menor que os outros raios laterais, com gubernáculo presente. O raio mediolateral direito é mais fino do que esquerdo, com o raio mediolateral direito e posterolateral bifurcando no meio do tronco e o raio mediolateral esquerdo e laterolateral no terço distal. O raio dorsal é espesso, bifurcando em três ramos, com raio externodorsal digitiforme separado na base (CHEN, 1935; MALDONADO et al., 2012; MOREIRA et al., 2013).

2.3 Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis*

No ciclo do parasito (Figura 2), os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão ou penetração das larvas de primeiro estágio (L₁) nos tecidos fibromusculares do hospedeiro e durante o período médio de 17 dias realizam mudas para L₂ e L₃, que é a forma infectante do parasito para os hospedeiros mamíferos (MACKERRAS e SANDARS, 1955).

As larvas infectantes (L₃) podem permanecer por períodos variados nos tecidos do caramujo e ao serem deglutidas pelos hospedeiros definitivos, passam então rapidamente ao longo do intestino delgado até ao íleo inferior, onde penetram nos vasos e por via hematológica ocorre a sua disseminação, ocorrendo a quebra da barreira hematoencefálica, e invadem o sistema nervoso central, onde realizam muda para L₄ e, via circulação sanguínea, passam pelo ventrículo direito e atingem as artérias pulmonares, onde mudam para L₅ e atingem a maturidade sexual. O principal roedor sinantrópico responsável pela perpetuação do nematoide é *R. norvegicus* (ratazana), e o período pré-patente no roedor é de 45 dias (MACKERRAS e SANDARS, 1955; SZYFRES e ACHA, 2003).

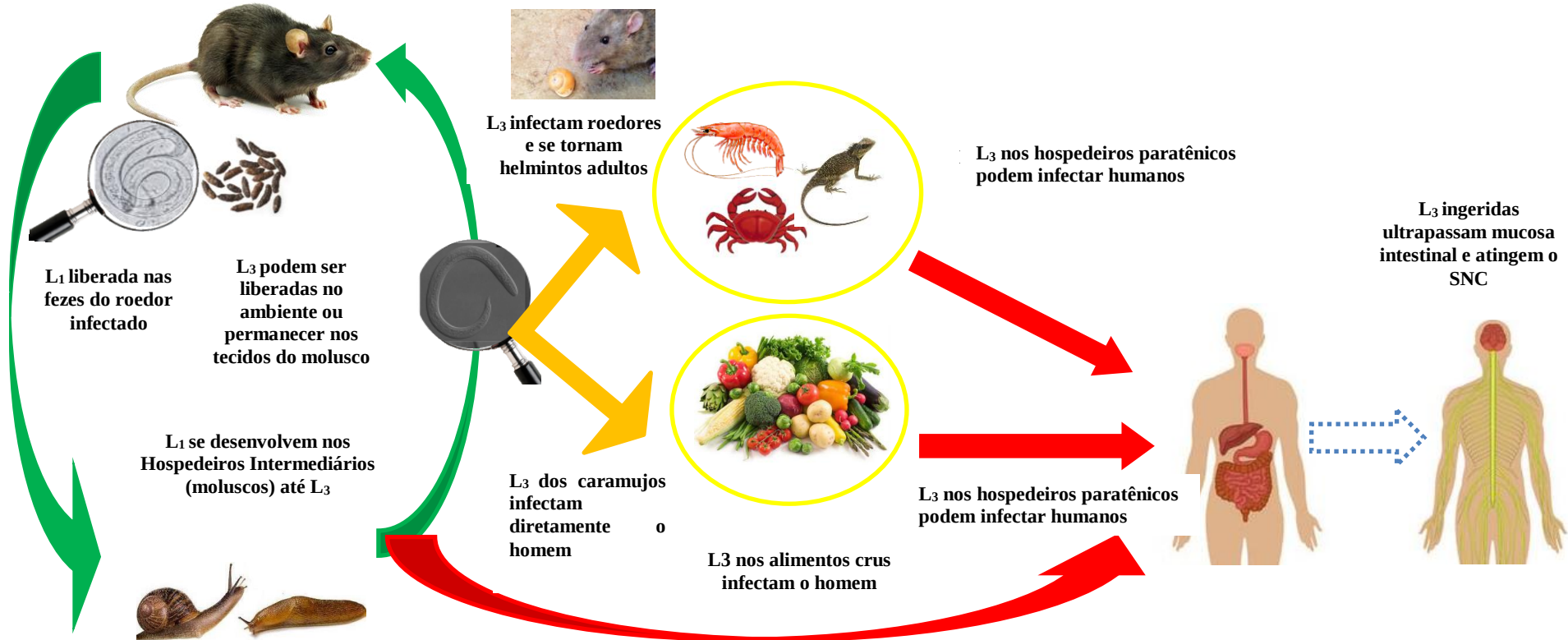


Figura 2. Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis* com as possíveis vias de transmissão (Adaptado de Wang et al., 2008).

As fêmeas fecundadas liberam os ovos férteis na corrente sanguínea, onde eclodem as larvas de primeiro estágio (L₁) nos capilares pulmonares. As L₁ rompem os alvéolos e atingem a árvore brônquica, migram até a traqueia e são eliminadas com o muco respiratório e então atingem o esôfago, sendo então deglutidas e expulsas junto às fezes dos roedores (MACKERRAS e SANDARS, 1955).

2.4 Distribuição geográfica de *Angiostrongylus cantonensis*

A. cantonensis foi descrito pela primeira vez no continente asiático, de onde provavelmente se dispersou para outras regiões do mundo por meio de dois hospedeiros importantes: murídeos e *Achatina fulica* (BOWDICH, 1822), especialmente em navios infestados por roedores infectados, durante a Segunda Guerra Mundial (KLIKIS e PALUMBO, 1992), e atualmente é relatada a presença do parasito em pelo menos 30 países (Figura 3), distribuídos na África; Oceania; Américas do Norte, Central e do Sul (PIEN e PIEN, 1999; PROCIV et al., 2000; LINDO et al., 2002; RACURT et al., 2003) e Europa (SLOM et al., 2002; LUESSI et al., 2009; PINCAY et al., 2009; CARVALHO et al., 2012; OUYANG et al., 2012; THIENGO et al., 2013).

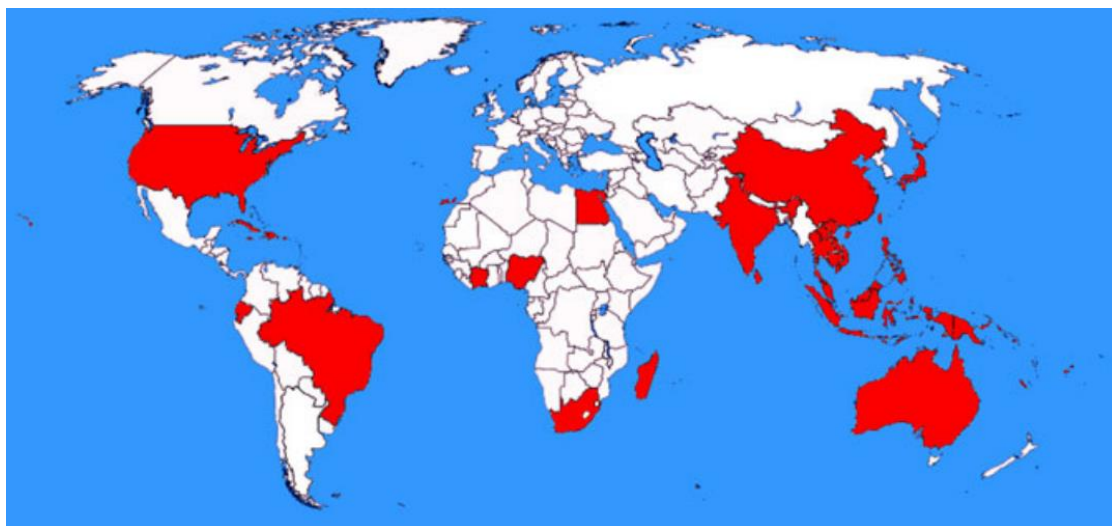


Figura 3. Distribuição geográfica de *A. cantonensis*. Em vermelho, os países com presença de hospedeiros naturalmente infectados por *A. cantonensis*. Fonte: Barratt et al., 2016.

Acredita-se que a disseminação inicial desse helminto para as Américas esteja relacionada ao transporte de roedores naturalmente infectados em

navios, vindo da Ásia (PIEN e PIEN, 1999; DIAZ, 2008). A introdução do parasito nas Américas foi primeiramente relatada em Cuba (AGUIAR, MORERA e PASCUAL, 1981) e Porto Rico (ANDERSEN et al., 1986; KLIKS e PALUMBO, 1992), com a chegada de embarcações contendo espécimes de *Rattus norvegicus* infectados pelo parasito (MALDONADO et al., 2012).

São mais de 2.800 casos humanos de Meningoencefalite Eosinofílica (ME) já registrados oficialmente (HOLLINGSWORTH e COWIE 2006; TUNHOLI-ALVES et al., 2012; COWIE, 2013). No Brasil, os casos de Meningite Eosinofílica são registrados desde 2006 e a doença é considerada emergente (Figura 4) e o primeiro registro de casos ocorreu no Rio de Janeiro (MORASSUTTI et al., 2014).

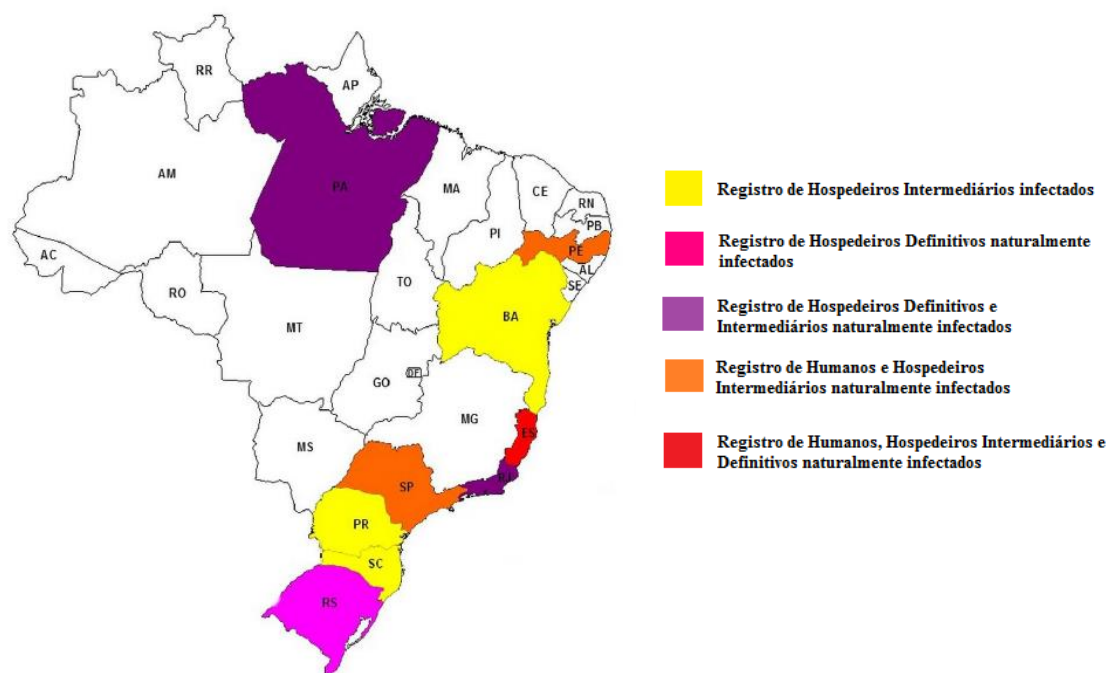


Figura 4. Distribuição geográfica de moluscos e roedores naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis* e presença de infecção humana no Brasil, Adaptado de Monte (2014) (Fonte: LABPMR).

Em 2007 ocorreram casos de ME no Espírito Santo (GARCIA et al., 2008) e em 2009 foi registrado o primeiro óbito, com confirmação da infecção por *A. cantonensis* utilizando RT-PCR, em amostra de Líquido Cefalorraquidiano (LCR), em paciente do estado de Pernambuco (LIMA et al., 2009). A presença do parasito também foi registrada em São Paulo (CALDEIRA et al., 2007; ESPÍRITO-SANTO et al., 2013), Rio de Janeiro, Santa

Catarina (MALDONADO et al., 2010), Paraná, Pará, Bahia (CARVALHO et al., 2012; MOREIRA et al., 2013) e Rio Grande do Sul (COGNATO et al., 2013).

2.5 HOSPEDEIROS

Os principais hospedeiros intermediários de *A. cantonensis* são moluscos gastrópodes (OLIVEIRA et al., 2015) e seus hospedeiro definitivos naturais são roedores murídeos, notadamente *Rattus norvegicus* e *R. Rattus*, que foram descritos na África, Austrália, América do Norte, América Central, América do Sul e na Ásia (VITTA et al., 2011; HOLLINGSWORTH et al., 2013).

2.5.1 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

No ciclo de vida de *A. cantonensis* várias espécies de moluscos terrestres e de água doce podem estar envolvidos, porém, a espécie *Achatina fulica* (BOWDICH, 1822), popularmente conhecida como caramujo-africano gigante e o molusco de água doce, notadamente a espécie *Pomacea canaliculata* (LAMARCK, 1822) são os principais hospedeiros intermediários do gênero *Angiostrongylus* em diversos países (Tabela 1), (LV et al., 2009; THIENGO et al., 2010; MONTE et al., 2012; CHEN et al., 2012; THIENGO et al., 2013; YANG et al., 2013; LI et al., 2013; SONG et al., 2016).

Tabela 1. Hospedeiros intermediários e paratênicos naturalmente infectados por *A. cantonensis* (adaptado de Barratt et al., 2016)

CONTINENTE	HOSPEDEIRO	REFERÊNCIA
Ásia	<i>Achatina fulica</i>	Vitta et al. (2016); Song et al. (2016)
	<i>Phlegm bilineatus</i>	Hu et al. (2011)
	<i>Pila pesmei</i>	Tesana et al. (2009)
	<i>Pila polita</i>	Tesana et al. (2009)
	<i>Pomacea canaliculata</i>	Deng et al. (2012); Li et al. (2013); Chen et al. (2012)
África	<i>Lanistes carinatus</i>	Ibrahim (2007)
	<i>Lymnaea natalensis</i>	Ibrahim (2007)
	<i>Melanoides tuberculata</i>	Ibrahim (2007)
Europa	<i>Plutonia lamarckii</i>	Martin-Alonso et al. (2015)
Oceania	<i>Cornu aspersum</i>	Chan et al. (2015)
América do Norte	<i>Achatina fulica</i>	Qvarnstrom et al. (2013); Iwanowicz et al. (2015)
	<i>Laevicaulis alte</i>	Qvarnstrom et al. (2010); Qvarnstrom et al. (2013)
	<i>Pallifera</i> spp.	Qvarnstrom et al. (2013)

	<i>Parmarion martensi</i>	Qvarnstrom et al. (2007); Qvarnstrom et al. (2010); Qvarnstrom et al. (2013)
	<i>Pomacea insularum</i>	Qvarnstrom et al. (2010)
	<i>Pomacea maculat</i>	Qvarnstrom et al. (2013)
	Planárias (hosp. Paratênico)	Qvarnstrom et al. (2013)
América do Sul	<i>Achatina fulica</i>	Pan et al. (2011)
	<i>Pomacea lineata</i>	Thiengo et al. (2010)

A. fulica foi introduzida no estado do Paraná no final da década de 1980, com ampla divulgação e incentivos à criação nos meios de comunicação, visando a produção de escargots (TELES et al., 1997), por suas características como: prolificidade (RAUT e BARKER, 2002), rápido ganho de peso e fácil adaptação às condições climáticas brasileiras (TELES e FONTES, 1998). Porém, a atividade de criação do molusco não obteve a aceitação esperada, ocorrendo o abandono e soltura de vários plantéis e sua consequente dispersão no meio urbano e silvestre. Tal situação levou à difusão desta espécie exótica em pelo menos 24 estados da federação e no Distrito Federal (ZANOL et al., 2010). Constitui-se atualmente uma praga em jardins, hortas e agricultura de pequena escala (THIENGO et al., 2007), além de competir com espécies nativas (FISCHER et al., 2008).

Nos últimos 30 anos a introdução e rápida dispersão da espécie *A. fulica*, aliadas às mudanças climáticas tem elevado o risco da transmissão de *A. cantonensis*, pois este molusco é o principal hospedeiro intermediário do parasito em diversos países (GRAEFF-TEIXEIRA, 2007; Pan et al., 2011), inclusive no Brasil, onde tem sido apontada em diversos estados como principal responsável pela transmissão de *A. cantonensis* (CALDEIRA et al., 2007; MALDONADO et al., 2012; MONTE et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; THIENGO et al., 2013). *A. fulica* apresenta mais de 60% de moluscos infectados em áreas portuárias do Brasil (CARVALHO et al., 2012).

No estado do Espírito Santo, outras espécies de moluscos podem atuar como hospedeiros do parasito, como *Subulina octona* (BRUGUIERE, 1792), *Sarasinula marginata* (SEMPER, 1885), *Bradybaena similaris* e *Euglandina rosea* (FERUSSAC, 1821), *Parmarion martensi* (SIMROTH, 1893), *Laevicaulis alte* (FERUSSAC, 1822), *Limax maximus* (LINNAEUS, 1758), *Oxychilus alliarius* (MILLER, 1822), entre outros, demonstrando a não especificidade do

parasito para seu hospedeiro intermediário, enquanto isso, o número de casos de meningite eosinofílica vem aumentando. A espécie *Pomacea lineata* também é relatada no Nordeste do Brasil (em Pernambuco), como hospedeiro intermediário do parasito (THIENGO et al., 2010).

2.5.2 HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

Além das espécies já relatadas como principais hospedeiros do parasito (*R. norvegicus* e *R. rattus*) outros roedores (Tabela 2) são descritos com menor frequência de infecção natural pelo parasito (AGUIAR, MORERA e PASCUAL, 1981; LINDO et al., 2002; SIMÕES et al., 2011; MOREIRA et al., 2013).

Tabela 2. Hospedeiros definitivos de *A. cantonensis* nos diferentes continentes (adaptado de Barratt et al., 2016)

CONTINENTE	HOSPEDEIRO	REFERÊNCIA
Ásia	<i>Bandicota indica</i>	Pipitgool et al. (1997); Deng et al. (2012)
	<i>Rattus flavipectus</i>	Zhang et al. (2008); Deng et al. (2012);
	<i>Rattus norvegicus</i>	Pipitgool et al. (1997); Zhang et al. (2008); Pan et al. (2011); Hu et al. (2011); Yang et al. (2012); Deng et al. (2012); Tokiwa et al. (2013)
	<i>Rattus rattus</i>	Vitta et al. (2011)
África	<i>Rattus rattus</i>	Martin-Alonso et al. (2011); Foronda et al. (2010)
Europa	<i>Rattus rattus</i>	Foronda et al. (2010)
Oceania	<i>Rattus fuscipes</i>	
	<i>Rattus lutreolus</i>	Aghazadeh et al. (2015)
	<i>Rattus norvegicus</i>	
	<i>Rattus rattus</i>	Aghazadeh et al. (2015)
América do Norte	<i>Rattus exulans</i>	Qvarnstrom et al. (2013)
	<i>Rattus norvegicus</i>	Andersen et al. (1986); Chikweto et al. (2009); Qvarnstrom et al. (2013); York et al. (2015)
		York et al. (2015)
América Central	<i>Rattus norvegicus</i>	Lindo et al. (2002)
	<i>Rattus rattus</i>	Lindo et al. (2002)
América do Sul	<i>Rattus norvegicus</i>	Simoes et al. (2011); Simoes et al. (2014)

As espécies *R. norvegicus* e *R. rattus* já foram encontradas naturalmente infectadas no Espírito Santo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (CALDEIRA et al., 2007; SIMÕES et al., 2011; MONTE et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; COGNATO et al., 2013; THIENGO et al., 2013), porém, a prevalência do parasito nesses roedores é variável (WANG et al., 2008; THIENGO et al., 2013).

2.5.3 HOSPEDEIROS ACIDENTAIS

Diversas espécies de aves (BURNS et al., 2014) e mamíferos (ANDERSON, CHABAUD e WILLMOTT, 1978; THIENGO et al., 2013), inclusive o homem, são susceptíveis à infecção acidental por *A. cantonensis*. Os helmintos jovens localizados no SNC em hospedeiros não-permissivos permanecem muitas vezes no espaço subaracnóide e nas meninges, causando reações inflamatórias (FORONDA et al., 2010; OuYANG et al., 2012; COWIE, 2013; THIENGO et al., 2013; WEI et al., 2014).

Apesar de o parasito não desenvolver seu ciclo em humanos, há relatos de que o mesmo consegue ocasionalmente realizar a migração pulmonar e alcançar suas artérias pulmonares, porém, sem atingir maturação sexual e se reproduzir (LINDO et al., 2002; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 2007; COWIE, 2013).

A espécie *A. cantonensis* é a causa mais comum de Meningoencefalite Eosinofílica no mundo (LIMA et al., 2009), sugerindo que a invasão do SNC por estes helmintos induz uma resposta inflamatória, com manifestações clínicas diversas (KOO, PIEN e KLIKS, 1988).

O primeiro caso humano da doença foi relatado em Taiwan em 1945 (BEAVER e ROSEN, 1964) e ao longo das últimas décadas, milhares de pessoas já foram diagnosticadas com o parasito *A. cantonensis*, após o consumo de água, vegetais, além de moluscos crus ou mal cozidos, contendo a larva infectante (L3) (MARTIN-ALONSO et al., 2011; COWIE, 2013). Outra forma de transmissão é pelo consumo de diferentes espécies de crustáceos,

répteis e anfíbios (BAHETI et al., 2008), que funcionam como hospedeiros paratênicos, aumentando assim as chances de transmissão do agente.

2.6. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Nos hospedeiros definitivos, a L₃ de *A. cantonensis* realiza migrações inicialmente pelos intestinos, passando ao SNC e por último nas artérias pulmonares, causando alterações estruturais que podem resultar em lesões inflamatórias secundárias no intestino delgado e fígado (GARCIA et al., 2014). A intensidade das lesões cardíacas e pulmonares são proporcionais à carga parasitária sendo a miocardite ventricular direita e a principal lesão observada no coração (WEI et al., 2014).

Em infecções experimentais utilizando *R. norvegicus*, observou-se que as lesões macroscópicas pulmonares se iniciam no 28º dia pós-infecção, sendo comum o aparecimento de edema perivascular e próximo aos bronquíolos e intenso infiltrado polimorfonuclear, com variados graus de resposta eosinofílica. Após o estabelecimento do parasito nas artérias pulmonares, o parênquima do órgão logo se torna repleto de ovos em desenvolvimento, e os pulmões aumentam em volume e peso, tornando-se as alterações perceptíveis, com manchas, áreas de atelectasia, enfisema e infiltrado inflamatório no tecido circundante e substituição por tecido fibroso (MACKERRAS e SANDARS, 1955).

As lesões em hospedeiros permissivos são bem menos pronunciadas do que em hospedeiros não-permissivos, como demonstrado por Lan e Lai (2009), que ao comparar a infecção em *Mus musculus* e *R. norvegicus*, evidenciou que em *R. norvegicus* ocorre o desenvolvimento de um número maior de parasitos, com menor inflamação e a quantidade de eosinófilos reduzida.

A resposta eosinofílica em hospedeiros não-permissivos ocasiona a morte ou degeneração de um número elevado de parasitos, porém, o eosinófilo tem um duplo papel na resposta à infecção: helmintotóxico e neurotóxico, o que eleva o grau de severidade da inflamação e mortalidade do parasito (YOSHIMURA, SUGAYA e ISHIDA, 1994; WEI et al., 2014).

Outras lesões observadas são: intensa congestão pulmonar, hiperemia difusa, edema pulmonar, hemorragias, aparecimento de grânulos rígidos no parênquima pulmonar, pneumonia granulomatosa, com variados graus de preenchimento dos espaços alveolares com infiltrado misto mononuclear/neutrofílico e/ou eritrocitário, ruptura alveolar que pode se intensificar, à medida que se aumenta a carga parasitária (WEI et al., 2014; GARCIA et al., 2014; JI et al., 2017), além de áreas de necrose e extensa fibrose, possivelmente relacionada com o desenvolvimento de hipóxia celular e alterações inflamatórias (GARCIA et al., 2014).

Em humanos, após a disseminação hematogênica, a L₃ ultrapassa a barreira hematoencefálica e a presença de larvas de *A. cantonensis* nas meninges induz uma resposta inflamatória eosinofílica (MORASSUTTI et al., 2014). O deslocamento destas larvas, somado à produção de enzimas proteolíticas e à degranulação eosinofílica, leva à produção de diversos fatores pró-inflamatórios e citotóxicos. As lesões inflamatórias no tecido nervoso causa insuficiência na circulação sanguínea local, agravando também os danos neurológicos, culminando com a morte das larvas ainda na região das meninges, potencializando a resposta inflamatória (EAMSOBHANA e YONG 2009). Também é frequente a falha na migração das larvas de *A. cantonensis* para maturação sexual e a mudança para L₅ ocorre ainda no tecido nervoso, onde muitas delas morrem (LI et al., 2014).

Em consequência das alterações inflamatórias, aparecem os sinais clínicos agudos da meningite eosinofílica, que não são patognomônicos e dependem também da localização e quantidade de larvas. Em casos com baixa carga parasitária, ocorrem desde casos assintomáticos a casos com sinais clínicos brandos, com remissão espontânea. Por outro lado, quando a quantidade de larvas é elevada ocorrem casos graves, que deixam sequelas severas e com mortalidade de cerca de 3% dos casos registrados (GRAEFF-TEIXEIRA, DA SILVA e YOSHIMURA, 2009; EAMSOBHANA e YONG 2009). Tais infecções maciças podem produzir encefalites severas, com a tríade clássica de meningite: cefaleia, rigidez de nuca e febre, que nem sempre

ocorre concomitantemente, além disso, a presença de larvas na medula espinhal pode originar radiculite (COOKE-YARBOROUGH et al., 1999).

Entre 38 a 49% dos pacientes humanos apresentam-se sinais clínicos como: diplopia ou leve turbidez visual, náuseas e vômitos. Fraqueza muscular, dor orbital, ataxia, pneumonite eosinofílica, dores no corpo, convulsões, paralisia facial, sonolência e retenção ou incontinência urinária são as manifestações clínicas menos frequentes (WANG et al., 2008; JIN et al., 2008; GRAEFF-TEIXEIRA, DA SILVA e YOSHIMURA, 2009; MORASSUTTI et al., 2014). Em cerca de 1% dos casos clínicos pode ocorrer migração de larvas para o globo ocular, o que pode levar a sequelas permanentes ou até mesmo ao déficit da acuidade visual (SAWANYAWISUTH et al., 2007).

2.7. FATORES DE RISCO PARA A POPULAÇÃO HUMANA

A expansão de casos da doença é explicada pela presença de um ou mais fatores de risco que incluem fatores ambientais e culturais, sendo considerada uma zoonose parasitária transmitida por alimentos (DTA) (PUNYAGUPTA, JUTTIJUDATA e BUNNAG, 1975; TSAI et al., 2004).

Outros fatores a serem considerados são o consumo de vegetais crus presentes em saladas, assim como em suco de vegetais crus (suco verde) contaminados com as larvas do parasito (TSAI et al., 2004).

A intensificação de viagens turísticas em áreas endêmicas, notadamente em locais com hábitos alimentares que incluem o consumo de peixes e moluscos de água doce mal cozidos, além de crustáceos ou répteis também contribuem para o aumento do risco de transmissão do parasito (SAWANYAWISUTH et al., 2009). Desta forma, o intercâmbio de hábitos culturais entre os países, têm facilitado a dispersão de hospedeiros infectados com *A. cantonensis* (COWIE, 2013; THIENGO et al., 2013).

Não obstante a ingestão de moluscos junto com bebidas alcoólicas também foi apontada como fator importante no aparecimento de novos casos da doença (WANG et al., 2011), além de outros fatores como condições

sanitárias precárias, manipulação com os hospedeiros intermediários, clima úmido, contato com hospedeiros intermediários e hábitos alimentares (WANG et al., 2011).

Em pacientes humanos com idade pré-escolar, o hábito de levar alimentos e objetos à boca, associado ao possível contato com o solo, eleva o risco de transmissão do parasito em pacientes com menos de nove anos de idade (WANG et al., 2011).

2.8. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Angiostrongylus cantonensis*

A confirmação da infecção por estes nematódeos ocorre através de técnicas morfológicas e morfométricas, encontro de larvas no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) ou na cavidade orbitária, da análise histopatológica, provas imunológicas e moleculares (PIEN e PIEN, 1999).

Apesar de os aspectos morfológicos e morfométricos tradicionais serem considerados, a identificação de várias espécies de nematódeos pode ser realizada com helmintos adultos machos que estejam com a parte posterior intacta. Estágios larvais do parasito podem apresentar características que permitam a identificação quanto à família ou gênero, dependendo do estágio e técnica de isolamento (MCKEAND, 1998; QVARNSTROM et al., 2013). A identificação específica das formas larvar e adulta do gênero *Angiostrongylus* com base nos caracteres morfológicos são viáveis, mas muitas vezes laboriosas, sendo necessária a utilização de chaves específicas para identificação de gênero e/ou espécies (UBELAKER, 1986).

Na análise bioquímica do LCR observa-se aumento dos níveis liquóricos de proteínas e leve diminuição da glicose (PUNYAGUPTA, JUTTIJUDATA e BUNNAG, 1975). Do ponto de vista físico, o LCR apresenta-se límpido ou levemente turvo e incolor (SAWANYAWISUTH e SAWANYAWISUTH, 2010). Por outro lado, não é comum a detecção de larvas de *A. cantonensis* no LCR (EAMSOBHANA, 2006) e por isso, a sorologia torna-se uma alternativa importante na realização do diagnóstico da angiostrongilíase.

No anos 1970, os testes de ELISA utilizavam extratos totais do parasito, porém, o índice de reações cruzadas era bastante elevado. Com a identificação

de antígenos proteicos individuais, utilizando técnicas de imunoblot, foi demonstrado que os anticorpos séricos de diversos pacientes reconheceram as proteínas de 29 kDa e 31 kDa, em helmintos adultos, apresentando menor reatividade cruzada e anticorpos específicos estão presentes em soro e LCR (NUAMTANONG, 1996). Posteriormente, a purificação da proteína de 31 kDa resultou em um ELISA altamente sensível e específico, incorporado em um teste multiplex para diagnóstico de angiostrongilíase (EAMSOBHANA et al., 2006). Outros estudos, desenvolveram técnicas com anticorpos monoclonais, para purificar uma proteína de 204 kDa de L₅, resultando em um teste com 91% de sensibilidade e 98% de especificidade na detecção da infecção por *A. cantonensis* (CHYE, CHANG e YEN, 2000).

Técnicas de imunodiagnóstico detectam IgG1 e IgG4 e demonstram maior sensibilidade e especificidade, principalmente quando específico para detecção da proteína de 29 kDa (INTAPAN et al., 2003), enquanto a detecção de IgA e IgM anti-*A. cantonensis* não é útil no diagnóstico (INTAPAN et al., 2002), principalmente pela limitação na detecção de anticorpos, pois sua produção ocorre após o início de sinais clínicos, na fase aguda da infecção, sendo detectáveis no início da fase de convalescença em 80% das pessoas infectadas em estudos realizados na Jamaica (SLOM et al., 2002; VAN REMOORTERE et al., 2003; ROMASANTA et al., 2003; ISHIDA et al., 2003).

Neste sentido, inúmeros marcadores moleculares mais específicos têm sido identificados como alvos antigênicos potenciais para o imunodiagnóstico da doença, e testes como ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática), Dot Blot, Western Blot, tem sido amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial da meningite eosinofílica (CALDEIRA et al., 2003; QVARNSTROM et al., 2010; MORASSUTTI et al., 2014).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e a PCR em tempo real têm mostrado serem úteis no diagnóstico de diversos patógenos, inclusive de *A. cantonensis*. Neste sentido, Caldeira et al. (2003) desenvolveram uma PCR convencional, tendo como alvo a amplificação do espaço interno transcrito do DNA ribossomal ITS2. Posteriormente, foi desenvolvida uma alternativa por meio de

uma PCR em tempo real, cujo alvo é a amplificação da região ITS1, apresentando alta sensibilidade, visto que consegue detectar DNA de menos de uma larva do parasito, sendo a PCR em tempo real mais específica, descartando a necessidade de sequenciamento do DNA para descartar falsos positivos (QVARNSTROM et al., 2010).

3. REFERENCIAS

SZYFRES, B.; ACHA, P. N. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitic Zoonoses**. Pan American Health Organization, 2003.

AGHAZADEH, M. et al. A survey of *Angiostrongylus* species in definitive hosts in Queensland. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 323–328, 2015.

AGUIAR, P.H.; MORERA, P.; PASCUAL, J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 963-965, 1981.

ALICATA, J.E.; JINDRAK, K. **Morphology of the adult parasites and larval stages**. In: ALICATA, J.E.; JINDRAK, K. (Ed). *Angiostrongyliases in the Pacific and Southeast Asia*. Thomas, p. 8-15, 1970.

ANDERSEN E, DJ, SORENSEN K, BEDDARD J, ASH LR. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 319-322, 1986.

ANDERSON, R.C.; CHABAUD, A.G.; WILLMOTT. **Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates**. Keys to Genera of the Superfamily Metastrongyloidea. Farnham Royal, UK. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1978.

BAHETI, N. N.; SREEDHARAN, M.; KRISHNAMOORTHY, T.; NAIR, M. D.; RADHAKRISHNAN, K. Eosinophilic meningitis and an ocular worm in a patient from Kerala, south India. **BMJ case reports**, v. 2009, p. bcr2007122093, 2009.

BAILLET, C. C. 1866. Strongyle des vaisseaux et du coeur du chien. *Strongylus vasorum* (Nobis). **Nouveau Dictionnaire Pratique de Medecine, de Chirurgie et d'Hygiene Veterinaires**, v. 8, p. 587-588, 1866.

BARRATT, J., CHAN, D., SANDARADURA, I., MALIK, R., SPIELMAN, D., LEE, R.; STARK, D. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. **Parasitology**, v. 143, p. 1087–1118, 2016.

- BEAVER, P. C.; ROSEN, L. Memorandum on the first report of *Angiostrongylus* in man, by Nomura and Lin, 1945. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 13, n. 4, p. 589-590, 1964.
- BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VIDA, J. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, p. 71–75, 1998.
- BOHM, L. K.; GEBAUER, O. Zum System der Familie der Metastrongylidae Leiper, 1908. **Zool. Anz**, v. 105, n. 11-12, p. 287-294, 1934.
- BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. **Invertebrates**, Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1990.
- BURNS, R. E. et al. Cerebral *Angiostrongylus cantonensis* infection in a captive African pygmy falcon (*Polihierax semitorquatus*) in southern California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 5, p. 695–698, 2014.
- CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O. S.; MENDONÇA, C. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, M. C.; BEN, R.; LENZI, H. L. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1039-1043, 2003.
- CALDEIRA, R. L. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)(Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007.
- CARVALHO, O. D. S.; SCHOLTE, R. G. C.; MENDONÇA, C. L. F. D.; PASSOS, L. K. J.; CALDEIRA, R. L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 740-746, 2012.
- CHAN, D.; BARRATT, J.; ROBERTS, T.; LEE, R.; SHEA, M.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. The prevalence of *Angiostrongylus cantonensis/mackerrasae* complex in molluscs from the Sydney region. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128128, 2015.
- CHEN, H. T. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis*, ng, n. sp. **Annales de Parasitologie humaine et compareé**, v. 13, n. 4, p. 312-317, 1935.
- CHEN, C. X.; HE, H. F.; YIN, Z.; ZHOU, J. H.; LI, S. Q.; LI, F. H.; LIU, G. P. Investigation on snails *Achatina fulica* and *Pomacea canaliculata* infected with

Angiostrongylus cantonensis in Panyu region of Guangzhou City. **Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi= Chinese journal of schistosomiasis control**, v. 24, n. 3, p. 336-338, 2012.

CHIKWETO, A.; BHAIYAT, M. I.; MACPHERSON, C. N. L.; DEALLIE, C.; PINCKNEY, R. D.; RICHARDS, C.; SHARMA, R. N.. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p.160–162, 2009.

CHYE, S.M.; CHANG, J.H.; YEN, C.M. Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L₅ with molecular weight 204 kD. **Acta Tropica**, v. 75, p. 9-17, 2000.

COGNATO, B. B.; MORASSUTTI, A. L.; SILVA, A. C. A. D.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 664-665, 2013.

COLELLA, V.; LIA, R. P.; PREMONT, J.; GILMORE, P.; CERVONE, M.; LATROFA, M. S.; OTRANTO, D. *Angiostrongylus vasorum* in the eye: new case reports and a review of the literature. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 161, 2016.

COOKE-YARBOROUGH, C. M. A fatal case of angiostrongyliasis in an 11-month-old infant. **The Medical Journal of Australia**, v. 170, n. 11, p. 541-543, 1999.

COSTA, J. O.; COSTA, H. M. A.; GUIMARAES, M. P. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951 **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 154, p. 09-16, 2003.

COWIE, R. H. Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 6, 2013.

CRAM, E. B. US Nat. **Mus. Bull**, v. 140, 1927.

DENG, Z. H.; ZHANG, Q. M.; HUANG, S. Y.; JONES, J. L. First provincial survey of *Angiostrongylus cantonensis* in Guangdong Province, China. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, p. 119–122, 2012.

DOUGHERTY, EC. The genus *Aelurostrongylus* (Cameron, 1927) (Nematoda: Metastrongylidae), and its relatives; with descriptions of *Parafilaroides* gen.

nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus* sp. nov. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 13, n. 1, p. 16-26, 1946.

EAMSOBHANA, P. et al. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-PAGE polyacrylamide gels. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, n. 2, p. 308-313, 2001.

EAMSOBHANA, P.; ONGROTCHANAKUN, J.; YOOLEK, A.; PUNTHUPRAPASA, P.; MONKONG, N.; DEKUMYOY, P. Multi-immunoblot for rapid differential diagnosis of eosinophilic meningitis due to parasitic infections. **Journal of Helminthology**, v. 80, p. 249-254, 2006.

EAMSOBHANA, P.; YONG, H. S. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 425-431, 2009.

EAMSOBHANA, P. Phylogenetics and systematics of *Angiostrongylus* lungworms and related taxa (Nematoda: Metastrongyloidea) inferred from the nuclear small subunit (SSU) ribosomal DNA sequences. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 3, p. 317-25, 2015.

ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. D.; PINTO, P. L. S.; MOTA, D. J. G. D.; GRYSCHKE, R. C. B. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 129-132, 2013.

FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M.; NERING, I. S. Utilização de recursos alimentares presentes no ambiente antrópico pelo caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822: subsídios para o manejo. **Bioikos**, v. 22, p. 91-100, 2008.

FORONDA, P.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.; MIQUEL, J.; TORRES, J.; SEGOVIA, M.; ABREU-ACOSTA, N.; FELIU, C. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). **Acta Tropica**, v. 114, p. 123–127, 2010.

GARCIA, J. S.; DOS SANTOS LÚCIO, C.; DOS SANTOS BONFIM, T. C.; JUNIOR, A. M.; TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; PINHEIRO, J. Metabolic and histopathological profile of *Rattus norvegicus* (Wistar)

experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 35-40, 2014.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.S. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 743-744, 2007.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; DA SILVA, A. C. A.; YOSHIMURA, K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 322-348, 2009.

HELM, J. R.; MORGAN, E. R.; JACKSON, M. W.; WOTTON, P.; BELL, R. Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 98–109, 2010.

HU, X.; DU, J.; TONG, C.; WANG, S.; LIU, J.; LI, Y.; HE, C. Epidemic status of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan Island, China. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 275–277, 2011.

HÜTTEMANN, M.; SCHMAHL, G.; MEHLHORN, H. Light and electron microscopic studies on two nematodes, *Angiostrongylus cantonensis* and *Trichuris muris*, differing in their mode of nutrition. **Parasitology research**, v. 101, n. 2, p. 225-232, 2007.

IBRAHIM, M. M. Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in relation to some ecological and biological factors. **Parasite**, v. 14, p. 61–70, 2007.

INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W.; POLSAN, Y.; SAWANYAWISUTH, K.; CHOTMONGKOL, V. Specific IgG antibody subclasses to *Angiostrongylus cantonensis* in patients with angiostrongyliasis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 20, p. 235-240, 2002.

INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W.; SAWANYAWISUTH, K.; CHOTMONGKOL, V. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, p. 425-429, 2003.

ISHIDA, M.M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and

cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v. 89, n. 1, p. 73-84, 2003.

IWANOWICZ, D. D.; SANDERS, L. R.; SCHILL, W. B.; XAYAVONG, M. V.; DA SILVA, A. J.; QVARNSTROM, Y.; SMITH, T. Spread of the rat lungworm (*Angiostrongylus cantonensis*) in giant African land snails (*Lissachatina fulica*) in Florida, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, p. 749–753, 2015.

JANOVY, J.; ROBERTS, L., **Foundations of Parasitology**, (6. ed), Boston, MA: McGraw-Hill, 2000.

JARVI, S. I.; FARIAS, M. E.; HOWE, K.; JACQUIER, S.; HOLLINGSWORTH, R.; PITT, W. Quantitative PCR estimates *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) infection levels in semi-slugs (*Parmarion martensi*). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, p. 174-176, 2012.

JI, L.; YIYUE, X.; XUJIN, H.; MINGHUI, Z.; MENG Ying, Z.; YUE, H.; SHUO, W. Study on the tolerance and adaptation of rats to *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1937-1945, 2017.

JIN, E. H.; MA, Q.; MA, D. Q.; HE, W.; JI, A. P.; YIN, C. H. Magnetic resonance imaging of eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* following eating freshwater snails. **Chinese Medical Journal**, v. 121, p. 67-72, 2008.

KIM, J. R.; HAYES, K. A.; YEUNG, N. W.; COWIE, R. H. Definitive, intermediate, paratenic, and accidental hosts of *Angiostrongylus cantonensis* and its molluscan intermediate hosts in Hawaii. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 2, p. 6-10, 2013.

KIM, J. R.; HAYES, K. A.; YEUNG, N. W.; COWIE, R. H. Diverse gastropod hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm, globally and with a focus on the Hawaiian Islands. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e94969, 2014.

KOO, J.; PIEN, F.; KLIKIS, M. M. *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) eosinophilic meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1155-1162, 1988.

LAN, K. P.; LAI, S. C. Differences of proteolytic enzymes and pathological changes in permissive and nonpermissive animal hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 3, p. 265-272, 2009.

LI, H.; XU, F.; GU, J. B.; CHEN, X. G. A severe eosinophilic meningoencephalitis caused by infection of *Angiostrongylus cantonensis*.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 79, p. 568–570, 2008.

LI, L. S.; ZHANG, R. Y.; FANG, Y. Y.; OUYANG, R.; XIE, H. G.; JIANG, D. W.; ZHENG, G. B. Prevalence of *Angiostrongylus cantonensis* infection in snails for sale in Fuzhou and Xiamen. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 31, n. 6, p. 464-466, 2013.

LI, S.; YANG, F.; JI, P.; ZENG, X.; WU, X.; WEI, J.; LV, Z. Eosinophil chemotactic chemokine profilings of the brain from permissive and non-permissive hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 517–525, 2014.

LIMA, A. R. M. C.; MESQUITA, S. D.; SANTOS, S. S.; AQUINO, E. R. P. D.; ROSA, L. D. R. S.; DUARTE, F. S.; FERREIRA, M. L. B. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, n. 4, p. 1093-1096, 2009.

LINDO, J. F.; WAUGH, C.; HALL, J.; CUNNINGHAM-MYRIE, C.; ASHLEY, D.; EBERHARD, M. L.; ROBINSON, R. D. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 324–326, 2002.

LV, S.; ZHANG, Y.; LIU, H. X.; HU, L.; YANG, K.; STEINMANN, P.; ZHOU, X. N. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e368, 2009.

MACKERRAS, M.J.; SANDARS, D.F. The life history of the rat lung-worm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongylidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 1-25, 1955.

MALDONADO, A.J.; SIMÕES, R.; THIENGO, S. Angiostrongyliasis in the Americas. In Zoonosis. Dr. Jacob Lorenzo-Morales (1. Ed). **InTech Open Journal**, p. 303-320, 2012. DOI: 10.5772/38632.

MARTIN-ALONSO, A.; FORONDA, P.; QUISPE-RICALDE, M. A.; FELIU, C.; VALLADARES, B. Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rodents from the Canary Islands. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27747, 2011.

- MARTIN-ALONSO, A.; ABREU-YANES, E.; FELIU, C.; MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALLADARES, B.; FORONDA, P. Intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Tenerife, Spain. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120686, 2015.
- MCKEAND, J.B. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 117, p. 87-96, 1998.
- MONTE, T. C.C. **Estudo filogenético, biológico e morfológico de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil**, Dissertação (Mestrado), Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2014.
- MORASSUTTI, A. L.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 399-407, 2014.
- MOREIRA, V. L. C.; GIESE, E. G.; MELO, F. T. V.; SIMÕES, R. O.; THIENGO, S. C.; MALDONADO, A.; SANTOS, J. N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta tropica**, v. 125, n. 1, p. 90-97, 2013.
- NUAMTANONG, S. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 27, p. 291-296, 1996.
- OUYANG, L.; WEI, J.; ZHONGDAO, W. Differences of larval development and pathological changes in permissive and non-permissive rodent hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1547, 2012.
- PAN, B.; WU, J.; RUAN, C. W.; LIANG, W. J.; DENG, Z. H.; ZHANG, Q. M.; PEI, F. Q. Investigation on *Angiostrongylus cantonensis* infection in rodents in Guangdong Province. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 29, p. 289–292, 2011.

- PIEN, F. D.; PIEN, B. C. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. **International journal of infectious diseases**, v. 3, n. 3, p. 161-163, 1999.
- PIPITGOOL, V.; SITHITHAWORN, P.; PONGMUTTASAYA, P.; HINZ, E. *Angiostrongylus* infections in rats and snails in northeast Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 28, n. 1, p. 190–193, 1997.
- PUNYAGUPTA, S.; JUTTIJUDATA, P.; BUNNAG, T. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 921-931, 1975.
- PUTHIYAKUNNON, S.; CHEN, X. *Angiostrongylus*. In: **Biology of Foodborne Parasites**. Lihua Xiao, Una Ryan, Yaoyu Feng. CRC Press, 520 p., 2015.
- QVARNSTROM, Y. et al. PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1415-1419, 2007.
- QVARNSTROM, Y.; DA SILVA, A. C. A.; TEEM, J. L.; HOLLINGSWORTH, R.; BISHOP, H.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; DA SILVA, A. J. Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer 1-based TaqMan assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5287–5289, 2010.
- QVARNSTROM, Y.; BISHOP, H. S.; DA SILVA, A. J. Detection of rat lungworm in intermediate, definitive, and paratenic hosts obtained from environmental sources. **Hawaii Journal of Medicine and Public Health**, v. 72, p. 63–69, 2013.
- RAUT, S. K.; BARKER, G. M. *Achatina fulica* Bowdich and other **Achatinidae as pests in tropical agriculture**. In: BARKER, G. M. (Ed.). Mollusks as crop pests. Wallingford: CABI Publishing, p. 55-114. 2002.
- ROMASANTA, A.; ROMERO, J. L.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; LÓPEZ, C.; SUÁREZ, J. L.; PAZ-SILVA, A. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. **Immunological Investigations**, v. 32, n. 3, p. 131-142, 2003.

SAWANYAWISUTH, K.; KITTHAWEESIN, K.; LIMPAWATTANA, P.; INTAPAN, P. M.; TIAMKAO, S.; JITPIMOLMARD, S.; CHOTMONGKOL, V. Intraocular angiostrongyliasis: clinical findings, treatments and outcomes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 497-501, 2007.

SAWANYAWISUTH, K. et al. Clinical Factors Predictive of Encephalitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 698-701, 2009.

SAWANYAWISUTH, K.; SAWANYAWISUTH, K. Drug target in eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 10, p. 322-328, 2010.

SIMÕES, R. O.; MONTEIRO, F. A.; SÁNCHEZ, E.; THIENGO, S. C.; GARCIA, J. S.; COSTA-NETO, S. F.; MALDONADO JR, A. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1331–1333, 2011.

SIMÕES, R. O.; JÚNIOR, A. M.; OLIFIERS, N.; GARCIA, J. S.; BERTOLINO, A. V. F.; LUQUE, J. L. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 100-108, 2014.

SLOM, T. J.; CORTESE, M. M.; GERBER, S. I.; JONES, R. C.; HOLTZ, T. H.; LOPEZ, A. S.; HERWALDT, B. L. An outbreak of Eosinophilic Meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 668-675, 2002.

SONG, L. et al. *Angiostrongylus cantonensis* in the vector snails *Pomacea canaliculata* and *Achatina fulica* in China: a meta-analysis. **Parasitology Research**, v. 115, p. 913–923, 2016.

TELES, H. M. S. et al. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 310-312, 1997.

TELES, H. M. S.; FONTES, L. R. Angiostrongilíase e escargot: nova ameaça a saúde pública. **Cadernos de Saúde**, v. 30, p. 24-26, 1998.

TELES, H. M. S.; FONTES, L. R. Implicações da introdução e dispersão de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 no Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12, p. 3-4, 2002.

TESANA, S. et al. Prevalence and intensity of infection with third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks from Northeast Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 983–987, 2009.

THIENGO, S. C. et al. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.

THIENGO, S. C. et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194–199, 2010.

THIENGO, S. C. et al. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. **Hawaii Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 2, p. 18-22, 2013.

TOKIWA, T., HASHIMOTO, T., YABE, T., KOMATSU, N., AKAO, N. AND OHTA, N. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) infections in invasive rodents from five islands of the Ogasawara Archipelago, Japan. **PLOS ONE**, v. 8, e70729, 2013.

TSAI, H.C. et al. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 222–226, 2004.

UBELAKER, J.E. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 237-244, 1986.

VAN REMOORTERE, A. et al. *Schistosoma mansoni*-infected mice produce antibodies that cross-react with plant, insect, and mammalian glycoproteins and recognize the truncated biantennaryN-glycan Man3GlcNAc2-R. **Glycobiology**, v. 13, n. 3, p. 217-225, 2003.

VITTA, A.; POLSEELA, R.; NATEEWORANART, S.; TATTIYAPONG, M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 597–599, 2011.

- VITTA, A. et al. Levels of infection with the lungworm *Angiostrongylus cantonensis* in terrestrial snails from Thailand, with *Cryptozona siamensis* as a new intermediate host. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 6, p. 737-741, 2016.
- WANG Q. P. et al. Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 621-630, 2008.
- WANG, J. J. et al. Eosinophilic meningitis risk associated with raw *Ampullarium canaliculatus* snails consumption. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 27, p. 184–189, 2011.
- WEI, Y. et al. Permissibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* infection and utility of this animal model for anthelmintic studies. **Parasitology Research**, v. 113, p. 1687–1693, 2014.
- YANG, X. et al. Enzootic angiostrongyliasis in Guangzhou, China, 2008–2010. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 846–849, 2012.
- YOKOGAWA, S. A new species of nematode found in the lungs of rats *Haemostrongylus ratti* sp. **Transactions, Natural History Society of Formosa**, v. 27, p. 247-250, 1937.
- YORK, E. M. et al. Geographic range expansion for rat lungworm in North America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1234–1236, 2015.
- YOSHIMURA, K.; SUGAYA, H.; ISHIDA, K. The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitology Today**, v. 10, p. 231–233, 1994.
- ZANOL, J. et al. The exotic invasive snail *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) in the State of Rio de Janeiro (Brazil): current status. **Revista Biota Neotropica**, v. 10, p. 447-451, 2010.
- ZHANG, Y. et al. Epidemiological investigation of *Angiostrongylus cantonensis* in Jiangmen of Guangdong Province. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 26, p. 370–373, 2008.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência, aspectos parasitológicos e morfológicos da infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em roedores sinantrópicos no estado de Pernambuco

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de infecção por *Angiostrongylus cantonensis* em roedores sinantrópicos provenientes de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco;
- Caracterizar morfológicamente helmintos adultos da espécie *A. cantonensis* em roedores sinantrópicos provenientes de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco;
- Avaliar as alterações estruturais em pulmão de *R. norvegicus* naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis*;
- Avaliar os enterócitos e a superfície de células intestinais de *Angiostrongylus cantonensis* pelo uso de microscopia eletrônica de transmissão;
- Realizar a caracterização molecular dos isolados de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de roedores sinantrópicos.

CAPÍTULO I

**Frequência e caracterização molecular de
Angiostrongylus cantonensis em *Rattus norvegicus* e *R. rattus*
naturalmente infectados nas diferentes mesorregiões do
estado de Pernambuco**

RESUMO

Angiostrongylus cantonensis é um parasito zoonótico heteroxeno que tem roedores sinantrópicos como principais hospedeiros definitivos e diversas espécies de moluscos como hospedeiros intermediários e constitui a principal causa de meningite eosinofílica em humanos, ao ser transmitido pela ingestão de larvas infectantes proveniente dos moluscos infectados. Diversos casos de meningite eosinofílica já foram registrados em mais de 30 países, inclusive no Brasil. Devido à ausência de dados sobre a presença de roedores naturalmente infectados por *A. cantonensis* no estado de Pernambuco, o presente estudo objetivou relatar a frequência, distribuição e caracterização molecular de *A. cantonensis* em *Rattus norvegicus* e *R. rattus* naturalmente infectados em 13 municípios de quatro diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco, Brasil. Foram capturados murídeos provenientes das mesorregiões da Região Metropolitana do Recife (n=50), Zona da Mata (n=08), Sertão (n=24) e Sertão do São Francisco (n=12), nos quais foram coletados os helmintos do bloco cardiopulmonar e procedida a identificação morfológica de parasitos adultos utilizando chaves específicas, além da identificação de ovos e larvas L₁ presentes no exsudato pulmonar. A caracterização molecular do parasito foi realizada com a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase. Foi encontrada uma frequência absoluta de 29,78% de roedores da espécie *R. norvegicus* infectados por *A. cantonensis*, provenientes da Região Metropolitana do Recife. Os roedores da espécie *R. rattus* não foram positivos para infecção pelo parasito e também não foi observada a presença de infecção de roedores nas mesorregiões da Zona da Mata, Sertão e Sertão do São Francisco. Este é o primeiro relato de infecção natural de *R. norvegicus* por *A. cantonensis* em áreas urbanas no estado de Pernambuco. Com base nos resultados, observa-se que a Região Metropolitana do Recife é endêmica para *A. cantonensis* e nas áreas estudadas pode apresentar risco de infecção para a população humana.

Palavras chave: Angiostrongilose, roedores, zoonose parasitária, Meningite Eosinofílica.

ABSTRACT

Angiostrongylus cantonensis is a zoonotic heteroxene parasite that has synanthropic rodents as the main definitive hosts and several species of mollusks as intermediate hosts and is the main cause of eosinophilic meningitis in humans, when transmitted by the ingestion of infective larvae from infected molluscs. Several cases of eosinophilic meningitis have been reported in more than 30 countries, including Brazil. Due to the lack of data on the presence of rodents naturally infected by *A. cantonensis* in the State of Pernambuco, the present study aimed to report the frequency, distribution and molecular characterization of *A. cantonensis* in naturally infected *Rattus norvegicus* and *R. rattus* in 13 municipalities of four different mesoregions of the state of Pernambuco, Brazil. Muridae were collected from the mesoregions of the Metropolitan Region of Recife (n = 50), Zona da Mata (n = 08), Sertão (n = 24) and Sertão do São Francisco (n = 12). Cardiopulmonary block and proceeded to the morphological identification of adult parasites using specific keys, besides the identification of eggs and larvae L1 present in pulmonary exudate. The molecular characterization of the parasite was carried out using Polymerase Chain Reaction. An absolute frequency of 29.78% of *R. norvegicus* rodents infected by *A. cantonensis* from the Metropolitan Region of Recife was found. The rodents of the *R. rattus* species were not positive for infection by the parasite and neither was the presence of rodent infection in the mesoregions of the Zona da Mata, Sertão and Sertão do São Francisco. This is the first report of natural infection of *R. norvegicus* by *A. cantonensis* in urban areas in the state of Pernambuco. Based on the results, it can be observed that the Metropolitan Region of Recife is endemic to *A. cantonensis* and in the studied areas may present a risk of infection to the human population.

Key words: Angiostrongylosis, rodents, parasitic zoonosis, Eosinophilic Meningitis.

1. INTRODUÇÃO

O parasito *A. cantonensis* é um nematódeo heteroxeno de caráter zoonótico (HUTTEMANN, SCHMAHL e MEHLHORN, 2007; WANG et al., 2012), sendo considerado o principal agente etiológico da Meningite Eosinofílica no mundo (PIEN e PIEN, 1999; WANG et al., 2008). As espécies *Rattus norvegicus* e *R. rattus* são hospedeiros definitivos, enquanto aves e outras espécies de mamíferos são consideradas não-permissivas à infecção (WEI et al., 2014).

Em seu ciclo evolutivo, *A. cantonensis* utiliza uma grande variedade de moluscos como hospedeiros intermediários, particularmente lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* (YANG et al., 2012; KIM et al., 2014), e moluscos das espécies *Bradybaena similaris*, *Sarasinula marginata*, *Subulina octona* (CALDEIRA et al., 2007), *Pomacea lineata* e *Achatina fulica* (THIENGO et al., 2010).

A. fulica é considerada a espécie de hospedeiro intermediário mais importante em função da sua susceptibilidade à infecção (CALDEIRA et al., 2007; GRAEFF-TEIXEIRA, 2007; THIENGO et al., 2007; THIENGO et al., 2010).

A manutenção de *A. cantonensis* no ambiente é determinada pela presença de roedores cronicamente infectados e a população de hospedeiros intermediários e paratênicos (KIM et al., 2014), como camarão, sapos e peixes entre outros (KLIKIS e PALUMBO, 1992; GUERINO et al, 2017).

A doença causada por *A. cantonensis* foi inicialmente reportada em Taiwan, no ano de 1944, disseminando-se para outras regiões durante a segunda guerra mundial (KLIKIS e PALUMBO, 1992) até chegar na África (PIEN e PIEN, 1999; ARCHER et al., 2011), Índia (PARMETER et al., 1966), Caribe (SLOM et al., 2002), Austrália (PROCIV e CARLISLE, 2001), América do Norte (CAMPBELL e LITTLE, 1988; KIM et al., 2002), Jamaica (WAUGH et al., 2005), Haiti (RACCURT, BLAISE e DURETTE-DESSET, 2003), Equador (PINCAY et al., 2009) e Brasil (CALDEIRA et al., 2007).

No território brasileiro, apesar de a ocorrência de *A. cantonensis* ter sido reportada em todos os biomas (GUERINO et al, 2017), são escassos os dados epidemiológicos da infecção por este nematódeo (THIENGO et al. 2010).

Em Pernambuco, há dados sobre a infecção por *A. cantonensis* em moluscos das espécies *Achatina fulica* e *Pomacea lineata*, além da casuística de pacientes humanos com Meningite Eosinofílica provenientes da Mesorregião Metropolitana do Recife e da Mesorregião da Zona da Mata (LIMA et al., 2009; THIENGO et al., 2010). Porém, são escassos no Brasil estudos sobre a prevalência e distribuição de roedores naturalmente infectados por *A. cantonensis*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a frequência e caracterização molecular de *A. cantonensis* em *Rattus norvegicus* e *R. rattus* naturalmente infectados provenientes de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e animais

No período de janeiro de 2015 a julho de 2017 foram capturados roedores sinantrópicos das espécies *R. norvegicus* (n=57) e *R. rattus* (n=37) de diferentes idades, ambos os sexos em áreas urbanas e periurbanas de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco. Inicialmente, foi realizada busca ativa de roedores nos locais com registro de casos de Meningite Eosinofílica na Região Metropolitana do Recife. Posteriormente, em função de um caso reportado na mesorregião do Sertão Pernambucano foram procedidas capturas de roedores nas demais mesorregiões do estado com e sem histórico de Meningite Eosinofílica (Figura 1).

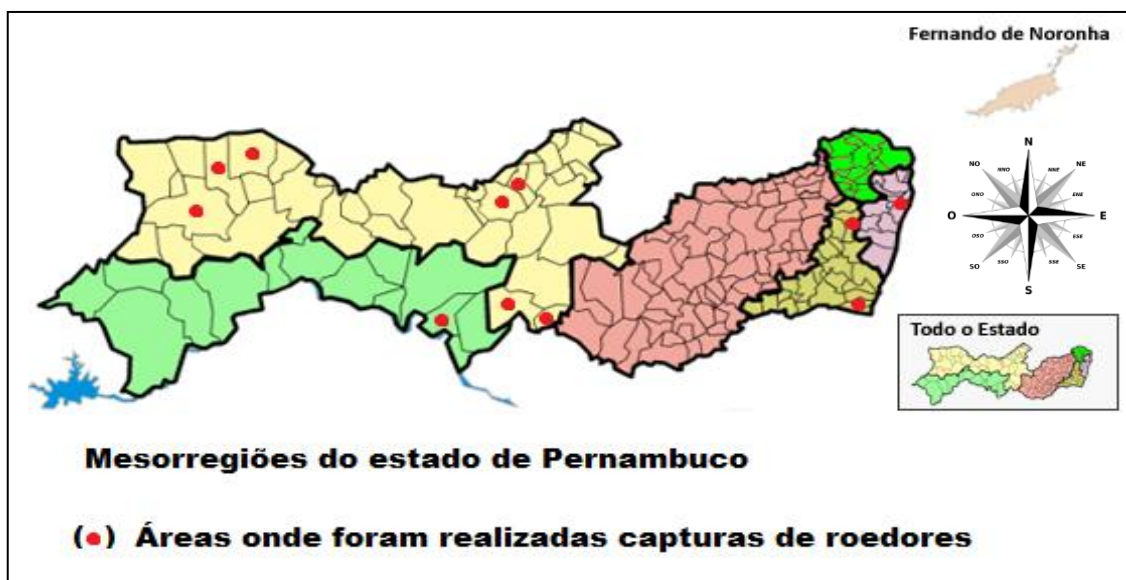


Figura 1. Municípios das diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco onde ocorreram capturas de roedores das espécies *Rattus rattus* e *R. norvegicus*.
 Fonte: <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/>

Para a captura dos animais foram utilizadas armadilhas Tomahawk® (tipo *Live Trap*), com dimensões padronizadas para animais de pequeno porte (30 x 17,5 x 15,5 cm), dispostas a cada 20m de uma armadilha, na altura do solo, sendo iscadas com abacaxi e pasta de amendoim e colocadas ao entardecer, sendo recolhidas ao amanhecer do dia seguinte à captura, obtendo-se um esforço amostral de 20 armadilhas/noite, totalizando 100 armadilhas/noites em cinco dias de capturas.

Os roedores capturados foram identificados através de chaves para gêneros baseados em características externas descritas no Guia de Roedores do Brasil (BONVICINO, OLIVEIRA e D'ANDREA, 2008; NEVES, MANCINI-FILHO e MENEZES, 2013).

Após a captura, foi preenchida uma ficha de identificação dos roedores (ANEXO 1), onde foram registradas informações sobre os animais e também dados importantes na epidemiologia da doença, entre eles, a presença ou ausência de moluscos terrestres nos locais de coleta. Para manipulação dos animais, foi procedida inicialmente a contenção física dos roedores, com luvas de raspa de couro e sacos de algodão, depois foi realizada a pesagem e administração por via intraperitoneal uma associação de cloridrato de cetamina (22-40mg/Kg) (Cetamim® 10 mL, Syntec, Santana de Parnaíba,

São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (1mg/Kg) (Rompum® 10mL, Bayer HealthCare AG, Bayer Saúde Animal Brasil). Após confirmação do efeito anestésico, foi procedida à eutanásia, utilizando-se tiopental sódico (Thionembital® 1g, Abbott Labs. do Brasil Ltda) em doses elevadas conforme recomendado pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). A confirmação da morte do roedor foi verificada pela perda de consciência e ausência de batimentos cardíacos.

Para busca dos parasitos, foi procedida a necropsia dos roedores capturados e coleta do bloco cardiopulmonar para posterior avaliação das artérias pulmonares e coração. Ao fim das coletas, foi realizado o descarte adequado do material biológico, encaminhando-o para incineração. Durante todas as etapas de captura e manipulação dos roedores foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual que proporcionaram proteção total do corpo do manipulador. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFRPE sob licença de nº 120/2015 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número: 50588-3,

2.3. Processamento do material biológico

Os pulmões e corações dos roedores foram separados e as artérias pulmonares foram examinadas minuciosamente para busca de nematódeos. Todos os helmintos encontrados foram removidos e acondicionados em tubos de polipropileno estéreis vazios, para posterior classificação taxonômica, baseadas em aspectos morfológicos da bolsa copuladora descritos por Chen (1935), Mackerras e Sandars (1955) e Uberlaker (1986). Durante a secção do tecido pulmonar, o exsudato, quando presente, foi analisado do ponto de vista parasitológico, colocando entre lâmina e lamínula, para a observação da presença de ovos e/ou larvas do parasito.

2.5. Diagnóstico e caracterização molecular

2.5.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o corpo inteiro do nematoide, através de kit comercial (Tissue & Blood Qiamp – Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

2.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da reação da PCR foram utilizados os primers ANGIOF1 e ANGIOR1, segundo o protocolo descrito por Qvarnstrom et al., (2007).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (1%) em tampão de corrida TAE 1X (Tris 4,84 g/L, Ácido acético 1,14 mL, EDTA 0,37g). A eletroforese foi realizada a 100V/50mA durante 30 minutos, fazendo-se uso de um marcador molecular de 100 pares de base, bem como de controles positivo e negativo para servirem de parâmetros para melhor caracterização dos produtos amplificados. As amostras testadas e controles foram coradas utilizando-se 0,5µL de corante *Blue Green*. Após as corridas, os géis foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador ultravioleta acoplado a um computador com programa de análise de imagens.

2.5.1 Controles positivos e negativos

O controle positivo utilizado nas PCR's foi obtido a partir de DNA de helmintos da espécie *A. cantonensis*, gentilmente cedido pelo Laboratório de Parasitologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS. Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura.

3. RESULTADOS

Foram capturados 94 roedores sinantrópicos comensais provenientes de 13 cidades de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco, Brasil. Entre eles, 60,6% (57/94) eram da espécie *Rattus norvegicus* (ratazana) e 39,4% (37/94) da espécie *R. rattus* (rato-preto).

Na Região Metropolitana do Recife, foram capturados roedores somente da espécie *R. norvegicus*, sendo 47,87% (45/94) proveniente do município de Olinda, 3,19% (3/94) de Camaragibe e 2,12% (2/94) da Cidade do Recife, totalizando 53,2% (50/94) dos animais. A frequência de animais infectados por *A. cantonensis* foi de 29,78% (28/94) (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de *Angiostrongylus cantonensis* em roedores nas diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco. Recife, 2018.

Mesorregião	Município	Espécie	Roedores (n)	Frequência relativa (%)
REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE	Olinda		45	57,7%
	Recife	<i>R. norvegicus</i>	2	50,0%
	Camaragibe		3	33,3%
ZONA DA MATA	Vitória de S. Antão	<i>R. rattus</i>	1	-
	Barreiros		7	-
	Bodocó		11	-
SERTÃO	Exu	<i>R. rattus</i>	2	-
	Ouricuri		4	-
	Flores		3	-
	Carnaíba	<i>R. norvegicus</i>	4	-
SERTÃO DO SÃO FRANCISCO	Petrolândia	<i>R. rattus</i>	5	-
	Manari	<i>R. rattus</i>	4	-
	Inajá	<i>R. rattus</i>	3	-
TOTAL	13	<i>R. rattus</i> e <i>R. norvegicus</i>	94	29,78%

Nas mesorregiões Zona da Mata, Sertão e Sertão do São Francisco foram capturadas as espécies *R. norvegicus* e *R. rattus* (Tabela 1), totalizando 46,8% (44/94) dos animais capturados e examinados, sem entretanto positividade para *A. cantonensis*.

Durante os meses de março a agosto, quando ocorre naturalmente elevação do índice pluviométrico (PIETROBON e BARROS, 2002), foi registrada nas fichas de identificação dos roedores a presença de moluscos gastrópodes da espécie *Ac. fulica* na Região Metropolitana do Recife, próximos aos locais onde foram dispostas as armadilhas.

A caracterização morfológica dos helmintos adultos foi realizada em todos os espécimes encontrados, onde observou-se que as fêmeas foram maiores e mais robustas que os machos, com tamanho médio de 33 x 0,5mm.

Os machos tiveram em média 23 x 0,3mm, com estruturas reprodutivas e digestivas de aspecto mais linear.

Foram observadas as principais características morfológicas que diferenciam *A. Cantonensis*, presentes na bolsa copuladora (Figura 2).

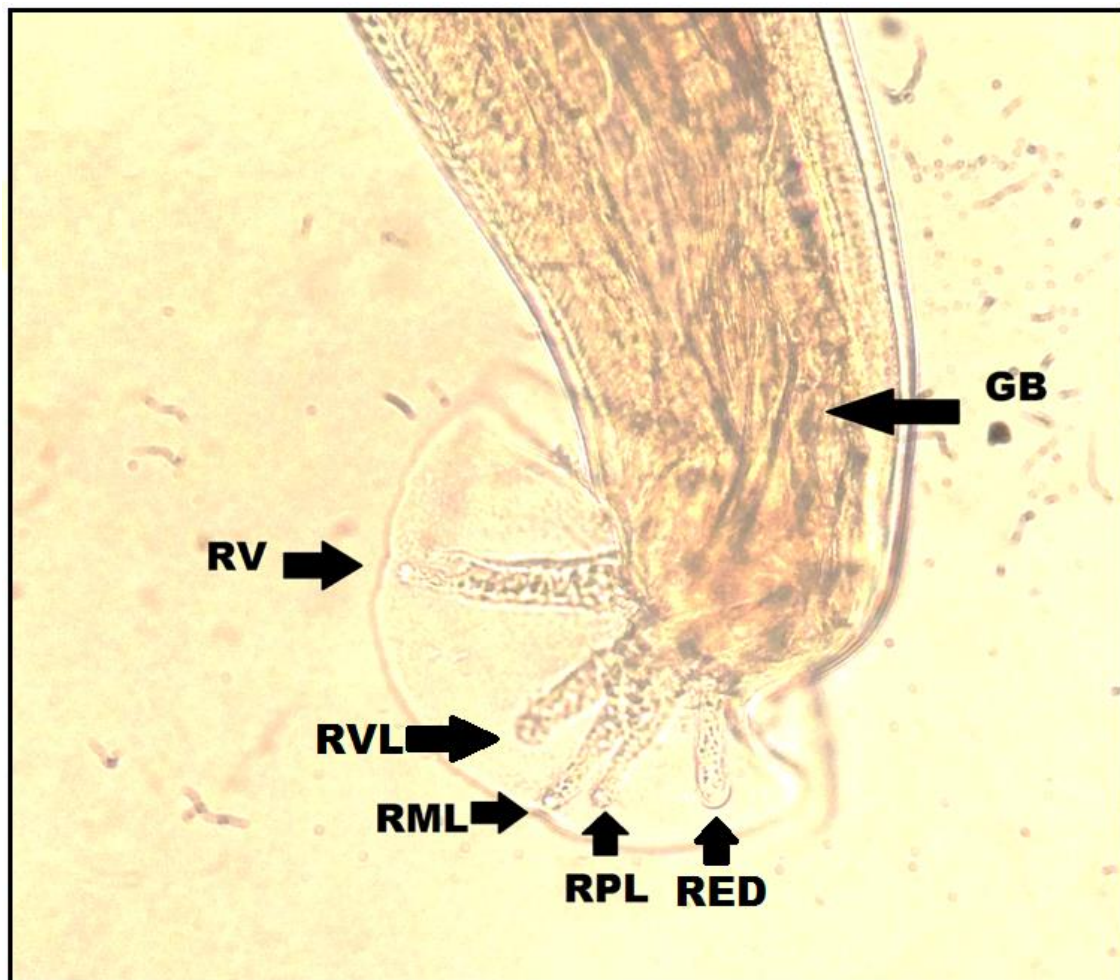


Figura 2. Bolsa copuladora de *Angiostrongylus cantonensis* macho, apresentando Gubernáculo (GB), Raios Ventrais (RV), Raio Ventrolateral (RVL), Raio Mediolateral (RML), Raio Postolateral (RPL) e Raio Externodorsal (RED).

As fêmeas do parasito apresentaram útero preenchido por ovos e o tubo digestivo de coloração avermelhada, devido ao hábito hematófago do parasito, podendo ser observados através da cutícula transparente, assim como observado por Gardiner e Poyton (1999) e também Chikweto et al. (2009).

Em algumas amostras foi observada a presença de exsudato pulmonar dos roedores, contendo ovos e larvas de primeiro estágio (Figura 3).

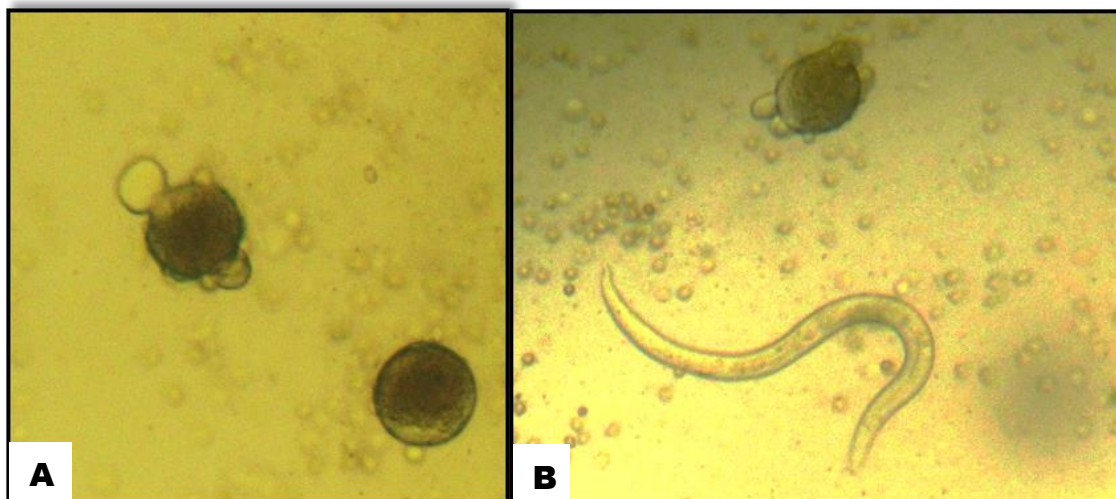


Figura 3. Exsudato pulmonar de *Rattus norvegicus*. (A) ovo de *Angiostrongylus cantonensis*; (B): Ovo e Larva de primeiro estágio (L₁) de *A. cantonensis*. Objetiva de 40x.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) amplificou fragmentos de DNA com 1.134 pares de bases do gene 18S do rDNA do parasito (QVARNSTROM et al., 2007), confirmando a identificação do gênero *Angiostrongylus*.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou a frequência de 33,3% a 57,7% de *R. norvegicus* infectados por *A. cantonensis*. Este é o primeiro relato de infecção natural de *R. norvegicus* por *A. cantonensis* em áreas urbanas no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil.

O resultado descrito nas diferentes mesorregiões do presente trabalho foi inferior àqueles encontrados em *R. norvegicus* do estado do Rio de Janeiro (SIMÕES et al., 2011; SIMÕES et al., 2014), que descreveram uma média de 71 a 74% de roedores infectados (n= 27 e n= 114), porém, foram incluídas áreas com e sem o histórico da presença do parasito, aumentando assim a abrangência da área de estudo, diferindo da metodologia adotada no estudo realizado Rio de Janeiro, apenas em áreas com registro da presença do parasito.

Por outro lado, analisando isoladamente o município de Olinda, foi observada uma frequência de 57,7% de animais infectados por *A. cantonensis*. Neste local, foi coletado um maior número de animais (n=45) e foram realizadas coletas periódicas durante os dois anos de estudo, em função da existência de óbito por meningite eosinofílica no período de 2007-2008 (LIMA et al., 2009). Vale salientar que ao longo de todo o período foi registrada na área a presença de *R. norvegicus* naturalmente infectados por *A. cantonensis*, com frequência alta e constante (>50,0%), o que demonstrou a transmissão contínua no local estudado, semelhante ao descrito por Simões et al., (2014), no Rio de Janeiro, onde foram realizadas coletas periódicas em locais com registro do parasito e foi observada uma prevalência alta e estável, sugerindo uma transmissão alta e contínua na área estudada.

A frequência aqui encontrada foi superior ao descrito por Moreira et al (2013) que reportaram uma média de 10% (n=42) de ocorrência de *A. cantonensis* entre os roedores (*R. rattus* e *R. norvegicus*) em Belém, estado do Pará, no Norte do Brasil.

O roedor *R. norvegicus* tem sido apontado como um dos principais hospedeiros definitivos do parasito, apresentando frequentemente maior prevalência e carga parasitária quando comparado a outras espécies de roedores em diversos países, entre eles: Porto Rico (ANDERSEN et al., 1986), Austrália (PROCIV e CARLISLE, 2001), Haiti (RACCURT, BLAISE e DURETTE-DESSET, 2003), China (LV et al., 2008) e Granada (CHIKWETO et al., 2009). Porém, Wang et al (2008) sugeriram que a prevalência de roedores da espécie *R. norvegicus* infectados é altamente variável.

Este achado representa um risco de infecção para a população devido à importância do hospedeiro definitivo na epidemiologia da meningite eosinofílica e pela ausência de condições sanitárias adequadas e presença dos hospedeiros intermediários do parasito, favorecendo a ocorrência de novos casos. Adicionalmente, diversos autores descreveram que a propagação de *A. cantonensis* em áreas costeiras e portuárias, ocorre devido ao fato de os roedores infectados serem transportados em navios de carga e transporte (KLIKIS e PALUMBO, 1992; CARVALHO et al., 2012).

A ocupação desordenada em áreas urbanas próximo aos canais e córregos, a precária rede de saneamento básico e as altas infestações por roedores em áreas de vulnerabilidade social, favorecem a presença de roedores e, conseqüentemente, a transmissão de doenças (HIMSWORTH et al., 2013). Deste modo, torna-se necessária a detecção de áreas de vulnerabilidade para doenças transmitidas por roedores e moluscos, para realização do adequado manejo ambiental e controle de suas populações, na elaboração de um plano integrado das ações da vigilância em saúde e demais órgãos responsáveis, com a finalidade de prevenir surtos de meningite eosinofílica no Estado.

Na Zona da Mata e Sertão do São Francisco não houve detecção de roedores infectados, porém, a maioria dos animais capturados foram da espécie *R. rattus*, que historicamente apresenta menores taxas de infecção, devido aos seus hábitos de ficarem longe do solo (JARVI et al., 2017). Tal dado pode ser ocasionado pela preferência do roedor em se aninhar em locais altos, longe do solo o que leva a espécie a ser conhecida popularmente como rato-do-telhado (JARVI et al., 2017), enquanto *R. norvegicus* tem maior acesso ao solo (MEANEY e STEWART, 1981; HIMSWORTH et al., 2013) e conseqüentemente aos hospedeiros intermediários e/ou paratênicos.

Apesar de os fatores climáticos serem importantes para a ocorrência do ciclo do parasito, este fator pode não ser determinante para sua ausência. Nas mesorregiões Sertão e Sertão do São Francisco, apesar da ausência de roedores infectados, pois o clima semiárido dificulta a sobrevivência de hospedeiros intermediários, há registro de um caso de Meningite Eosinofílica no município de Manari (dados não publicados da Secretaria Estadual de Saúde).

A análise morfológica dos espécimes machos indicou que a cepa de *A. cantonensis* circulante na Região Metropolitana do Recife corresponde ao haplótipo ac8, que possui na bolsa copuladora com diferença no nível entre as bifurcações dos raios bursais. Os raios ventrais são menores e mais finos e raios dorsais mais proeminentes, quando comparados a espécimes de outros isolados do Brasil (MONTE, 2014).

Este achado é semelhante ao descrito por Monte et al (2012) que descreveram o encontro do haplótipo ac8, porém, representou um diferente clado no estado de Pernambuco, determinado pela análise do sequenciamento genético. Este haplótipo corresponde ao isolado mais comumente encontrado no Brasil.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os primers AngioF1 e ANGIOR1 foi descrita para detecção de DNA larval de *A. cantonensis* em hospedeiros intermediários, detectando amostras com carga parasitária mínima de 10 larvas/mL (QVARNSTROM et al., 2007; KIM et al., 2014; CHAN et al., 2015). Porém, este é o primeiro registro do uso dos primers AngioF1 e AngioR1 para ampliação de fragmentos de DNA de espécimes adultos provenientes de roedores.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, observa-se que a Região Metropolitana do Recife encontra-se endêmica para *Angiostrongylus cantonensis*.

5. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, E.; GUBLER, D. J.; SORENSEN, K.; BEDDARD, J.; AND ASH, L. R. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 319-322, 1986.
- ARCHER, C. E.; APPLETON, C. C.; MUKARATIRWA, S.; HOPE, K. J. The rat lung-worm *Angiostrongylus cantonensis*: A first report in South Africa. **South African Medical Journal**, v. 101, n. 3, p. 174-175, 2011.
- BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P. S. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa; OPAS/OMS, 2008. 120p.
- CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; CARVALHO, O. D. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)(Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007.
- CAMPBELL, B. G.; LITTLE, M. D. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. . **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 3, p. 568-573, 1988.
- CARVALHO, O. D. S.; SCHOLTE, R. G. C.; MENDONÇA, C. L. F. D.; PASSOS, L. K. J., AND CALDEIRA, R. L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 740-746, 2012.
- CHAN, D.; BARRATT, J.; ROBERTS, T.; LEE, R.; SHEA, M.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. The prevalence of *Angiostrongylus cantonensis/mackerrasae* complex in molluscs from the Sydney region. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128128, 2015.
- CHEN, H.T. A new pulmonary nematode of rats, *Pulmonema cantonensis* ng, nsp from Canton. **Annals of Parasitology**, v. 113, p. 312-317, 1935.
- CHIKWETO, A.; BHAIYAT, M. I.; MACPHERSON, C. N. L.; DEALLIE, C.; PINCKNEY, R. D.; RICHARDS, C.; and SHARMA, R. N. Existence of *Angiostrongylus cantonensis* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1, p. 160-162, 2009.

GARDINER, C. H.; POYTON, S. L. Morphologic characteristics of nematodes in tissue sections. **An Atlas of Metazoan Parasites in Animal Tissues. Armed forces Institute of Pathology, USA**, p. 4, 1999.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.S. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 743-744, 2007.

GUERINO, L. R.; PECORA, I. L.; MIRANDA, M. S.; AGUIAR-SILVA, C.; CARVALHO, O. D. S.; CALDEIRA, R. L.; & SILVA, R. J. D. Prevalence and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) in Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 92-98, 2017.

HIMSWORTH, C. G.; PARSONS, K. L.; JARDINE, C.; PATRICK, D. M. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 6, p. 349-359, 2013.

HÜTTEMANN, M.; SCHMAHL, G.; MEHLHORN, H. Light and electron microscopic studies on two nematodes, *Angiostrongylus cantonensis* and *Trichuris muris*, differing in their mode of nutrition. **Parasitology research**, v. 101, n. 2, p. 225-232, 2007.

JARVI, S. I.; QUARTA, S.; JACQUIER, S.; HOWE, K.; BICAKCI, D.; DASALLA, C. and NIEBUHR, C. N. High prevalence of *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) on eastern Hawai 'i Island: A closer look at life cycle traits and patterns of infection in wild rats (*Rattus* spp.). **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0189458, 2017.

KIM, D. Y.; STEWART, T. B.; BAUER, R. W.; MITCHELL, M. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 1024-1026, 2002.

KIM, J. R.; HAYES, K. A.; YEUNG, N. W.; COWIE, R. H. Diverse Gastropod Hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm. **Globally and with a Focus**, 2014.

KLIKS, M.M.; PALUMBO, N.E. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus*

cantonensis, the nematode lungworm of rats. **Social Science & Medicine**, v. 34, p. 199–212, 1992.

LIMA, A. R. M. C. et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, n. 4, p. 1093-1096, 2009.

LV, S.; ZHANG, Y.; STEINMANN, P. AND ZHOU, X. N. Emerging angiostrongyliasis in mainland China. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 161, 2008.

MACKERRAS, M. J.; SANDARS, D. F. The life history of the rat lung-worm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen)(Nematoda: Metastrongylidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 1955.

MEANEY, M. J.; STEWART, J. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). **Animal Behaviour**, v. 29, n. 1, p. 34-45, 1981.

MONTE, T. C.; SIMÕES, R. O.; OLIVEIRA, A. P. M.; NOVAES, C. F.; THIENGO, S. C.; SILVA, A. J.; JÚNIOR, A. M. Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 248, 2012.

MONTE, T. C.C. **Estudo filogenético, biológico e morfológico de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil**, Dissertação (Mestrado), Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2014.

MOREIRA, V. L. C.; GIESE, E. G.; MELO, F. T. V.; SIMÕES, R. O.; THIENGO, S. C.; MALDONADO, A.; SANTOS, J. N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta tropica**, v. 125, n. 1, p. 90-97, 2013.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216p.

PARMETER, S. N. et al. *Angiostrongylus cantonensis* in India. **Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine**, v. 14, n. 2, 1966.

- PIEN, F. D.; PIEN, B. C. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 161-163, 1999.
- PIETROBOM, M. R.; BARROS, I. C. L. Pteridófitas de um remanescente de floresta atlântica em São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil: Pteridaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 457-479, 2002.
- PINCAY, T.; GARCÍA, L.; DECKER, O.; MARTINI, L.; MOREIRA, J. M. Angiostrongiliasis por *Parastrongylus* (*Angiostrongylus*) *cantonensis* en Ecuador. **Bol. Epidemiol. (Ecuador)**, v. 52, p. 25-32, 2009.
- PROCIV, P.; CARLISLE, M. S. The spread of *Angiostrongylus cantonensis* in Australia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, p. 126-128, 2001.
- QVARNSTROM, Y.; SULLIVAN, J. J.; BISHOP, H. S.; HOLLINGSWORTH, R., AND DA SILVA, A. J. PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1415-1419, 2007.
- RACCURT, C. P.; BLAISE, J.; DURETTE-DESSET, M. C. Présence d'*Angiostrongylus cantonensis* en Haïti. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 5, p. 423-426, 2003.
- SIMÕES, R. O.; MONTEIRO, F. A.; SÁNCHEZ, E.; THIENGO, S. C.; GARCIA, J. S.; COSTA-NETO, S. F.; MALDONADO JR, A. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1331, 2011.
- SIMOES, R. O. et al. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, p.100, 2014.
- SLOM, T. J.; CORTESE, M. M.; GERBER, S. I.; JONES, R. C.; HOLTZ, T. H.; LOPEZ, A. S.; HERWALDT, B. L. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 9, p. 668-675, 2002.
- THIENGO, S. C.; FARACO, F. A.; SALGADO, N. C.; COWIE, R. H.; FERNANDEZ, M. A. Rapid spread of an invasive snail in South America: the

giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007.

THIENGO, S. C. et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194–199, 2010.

UBELAKER, John E. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. **The Journal of Parasitology**, p. 237-244, 1986.

WANG Q. P. et al. Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 621-630, 2008.

WANG, Q. P.; WU, Z. D.; WEI, J.; OWEN, R. L.; LUN, Z. R. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 389-395, 2012.

WAUGH, C. A.; SHAFIR, S.; WISE, M.; ROBINSON, R. D.; EBERHARD, M. L.; LINDO, J. F. Human *Angiostrongylus cantonensis*, Jamaica. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1977, 2005.

WEI, Y. et al. Permissibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* infection and utility of this animal model for anthelmintic studies. **Parasitology Research**, v. 113, p. 1687–1693, 2014.

YANG, X.; QU, Z.; HE, H.; ZHENG, X.; HE, A.; WU, Y.; ZHAN, X. Enzootic angiostrongyliasis in Guangzhou, China, 2008–2010. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 846–849, 2012.

ANEXO 1

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE ROEDORES

Data: ___/___/___ Horário: _____ Responsável (is): _____

1. LOCAL DE COLETA

Endereço: _____

Presença de *Achatina fulica*: () NÃO () SIM

Casos humanos de Meningite Eosinofílica: () NÃO () SIM

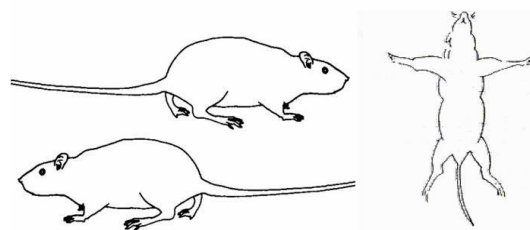
2. FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO ROEDOR

Espécie: _____ Sexo: () M () F

Idade estimada: () Jovem () Adulto () Idoso

3. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Condição física	
FR	
FC	



4. PROTOCOLO ANESTÉSICO

Peso: _____ (gramas)

Anestésico:		
Dose:		

5. AMOSTRA COLETADA

Tipo de Amostra	Sim	Não	Resultado Parasitológico	
			POSITIVO	NEGATIVO
Sangue				
Pulmão				
Coração				

Observações: _____

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO PULMÃO DE *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE)

RESUMO

Angiostrongylus cantonensis é um parasito que naturalmente infecta roedores, porém, apresenta baixa especificidade parasitária sendo descrito em infecções acidentais em pôneis, lêmures, marsupiais, tatus, aves, primatas e acidentalmente o homem, sendo o principal agente etiológico responsável pela Meningite Eosinofílica. No Brasil, estudos em roedores naturalmente infectados por *A. cantonensis* ainda são pontuais, sendo a maioria pautada em áreas de ocorrência de casos humanos de Meningite Eosinofílica. Entre os roedores, a infecção foi descrita principalmente em *Rattus norvegicus* e *R. rattus*, onde os helmintos adultos se localizam nas artérias pulmonares. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações morfológicas no pulmão de *Rattus norvegicus* naturalmente infectados por *A. cantonensis*. Para tanto foram capturados 12 roedores da espécie *Rattus norvegicus*, nos quais foi realizada a eutanásia, coleta e análise histopatológica do tecido pulmonar. Na análise morfológica macroscópica observou-se que o parênquima apresentava edema, congestão e presença de exsudato pulmonar e dilatação das artérias pulmonares. No estudo histológico dos pulmões foram observados pneumonite subaguda a crônica, fibrose pulmonar, além da presença de ovos e larvas. Apesar do processo inflamatório presente no parênquima pulmonar do hospedeiro, os animais apresentavam bom escore corporal e não demonstravam sinais clínicos de alterações cardiorrespiratórias, sugerindo que a infecção por *A. cantonensis* não induziu sofrimento e morte dos roedores infectados, em função do processo de adaptação parasito e hospedeiro.

Palavras chave: Meningite Eosinofílica, roedores, histopatologia, lesões pulmonares, *Angiostrongylus cantonensis*.

ABSTRACT

Angiostrongylus cantonensis is a parasite that naturally infects rodents. However, it presents low parasitic specificity, being described in accidental infections in ponies, lemurs, marsupials, armadillos, birds, primates and accidentally man, being the main etiological agent responsible for Eosinophilic Meningitis. In Brazil, studies on rodents naturally infected by *A. cantonensis* are still punctual, with most of them occurring in human cases of Eosinophilic Meningitis. Among rodents, the infection was described mainly in *Rattus norvegicus* and *R. rattus*, where adult helminths are located in the pulmonary arteries. The objective of this work was to evaluate the morphological alterations in the lung of *R. norvegicus* naturally infected by *A. cantonensis*. Twelve rodents of the *R. norvegicus* species were captured, in which euthanasia, collection and histopathological analysis of the lung tissue were performed. In the macroscopic morphological analysis, it was observed that the parenchyma presented edema, congestion and presence of pulmonary exudate and dilation of the pulmonary arteries. In the histological study of the lungs, chronic subacute pneumonitis, pulmonary fibrosis, and the presence of eggs and larvae were observed. Despite the inflammatory process present in the lung parenchyma of the host, the animals presented good body score and did not show clinical signs of cardiorespiratory alterations, suggesting that *A. cantonensis* infection did not induce suffering and death of infected rodents, due to the parasite adaptation process and host.

Key words: Eosinophilic Meningitis, rodents, histopathology, lung lesions, *Angiostrongylus cantonensis*.

1. INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis foi descrito pela primeira vez por Chen (1935), parasitando nas artérias pulmonares e coração de roedores das espécies *Rattus rattus* e *R. norvegicus* na cidade de Guangzhou (Cantão), China (MACKERRAS E SANDARS, 1955; SPRATT, 2015). Apresentando baixa especificidade, o parasito tem sido descrito em pôneis (COSTA et al., 2000), lêmures, marsupiais, tatus (KIM et al., 2002; DALTON et al., 2017), aves (SPRATT, 2015), primatas (DUFFY et al., 2004), e acidentalmente no homem, sendo neste último o agente etiológico responsável pela meningite eosinofílica, também denominada angiostrongilíase cerebral (ROSEN, LAIGRET e BOILS, 1961; LIMA et al., 2009).

Entre os roedores, a infecção tem sido descrita em sete espécies de murídeos, notadamente *Rattus norvegicus* e *R. Rattus* (VITTA et al., 2011; HOLLINGSWORTH et al., 2013; JI et al., 2017), que atuam como hospedeiros definitivos tendo um importante papel em sua perpetuação, através da eliminação das larvas de primeiro estágio (L₁) em suas fezes, tanto os roedores machos, quanto as fêmeas (SIMÕES et al., 2014; BARRATT et al., 2016).

Na biologia parasitária, após a ingestão de hospedeiros crus ou mal cozidos ou de alimentos contaminados com a larva infectante (L₃), ocorre a penetração na mucosa gástrica e por via hematogênica atinge o Sistema Nervoso Central (SNC), onde realiza mudas para larva de quarto e quinto estágio (L₄ e L₅). A L₅ retorna à circulação sanguínea, atingindo as artérias pulmonares e posteriormente realiza a oviposição no parênquima pulmonar, a qual é acompanhada de resposta inflamatória no local (BHAIBULAYA, 1979).

Durante sua evolução nos roedores, o parasitismo por *A. cantonensis* pode causar lesões de grau variado, de acordo com a espécie de roedor infectada, carga parasitária, tempo de infecção e resposta individual do hospedeiro. Mesmo em hospedeiros permissivos, durante a migração do parasito ocorrem lesões no Sistema Nervoso Central, na dependência do número de larvas utilizados na infecção experimental (WANG et al., 2015; JI et al., 2017).

No Brasil, estudos em roedores naturalmente infectados por *A. cantonensis* ainda são pontuais, sendo a maioria realizada em áreas de ocorrência de casos humanos de Meningite Eosinofílica. Em Pernambuco, há relatos de casos humanos de Meningite Eosinofílica (LIMA et al., 2009; THIENGO et al., 2010). Porém, ainda não há registros sobre a infecção em roedores e seus aspectos patológicos. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é descrever as alterações estruturais no pulmão de *Rattus norvegicus* naturalmente infectados por *A. cantonensis*.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Animais e local de estudo

Foram capturados 12 roedores da espécie *Rattus norvegicus* no período de 2015 a 2017, na Região Metropolitana do Recife (Figura 1). Esta área apresenta clima tropical, altitude média de 10m, com alta umidade relativa do ar e temperatura média anual de 25°C (NÓBREGA e LEMOS, 2011).

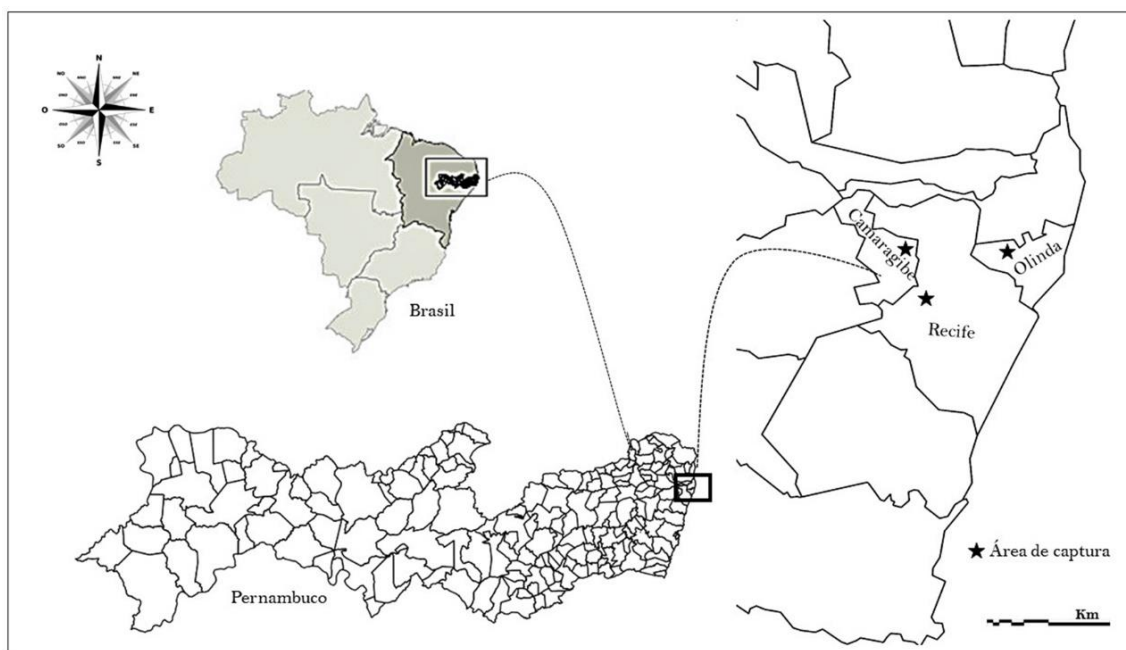


Figura 1. Região de captura dos roedores.

1.2. Captura dos animais e coleta de material biológico

Os roedores foram capturados utilizando armadilhas do tipo Tomahawk, para captura viva (Live Trap) segundo descrito por Pereira et al. (2013). Os animais capturados foram contidos inicialmente de forma física, com luvas de raspa de couro e sacos de algodão e posteriormente foi realizada a contenção química e eutanásia, conforme protocolo recomendado pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Em seguida, foi realizada a necropsia, para coleta de fragmentos de pulmão.

Os pulmões foram analisados macroscopicamente e fragmentos foram coletados sendo acondicionados em formalina tamponada a 10% para posterior realização de análise histopatológica.

1.3. Processamento histológico

Os fragmentos de pulmão foram mantidos em solução de formalina tamponada a 10% para fixação por 48 horas. Em seguida, foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Por fim, cortes de 5 µm foram montados em lâmina e corados por Hematoxilina e Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003). Na análise histopatológica, os fragmentos foram analisados e descritos de acordo com o tipo de lesão observada.

1.4. Aspectos éticos

O estudo foi realizado com autorização para atividades com finalidade científica pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número: 50588-3, aprovado também pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFRPE sob licença de nº 120/2015.

2. RESULTADOS

Na análise morfológica macroscópica, durante o momento da necropsia observou-se que o parênquima pulmonar dos animais apresentava-se friável com áreas de edema, manchas irregulares de coloração variável na superfície do órgão e alterações hemodinâmicas caracterizadas por congestão (Figura 2)

e petéquias, além da presença de exsudato no interior dos brônquios e dilatação das artérias pulmonares.

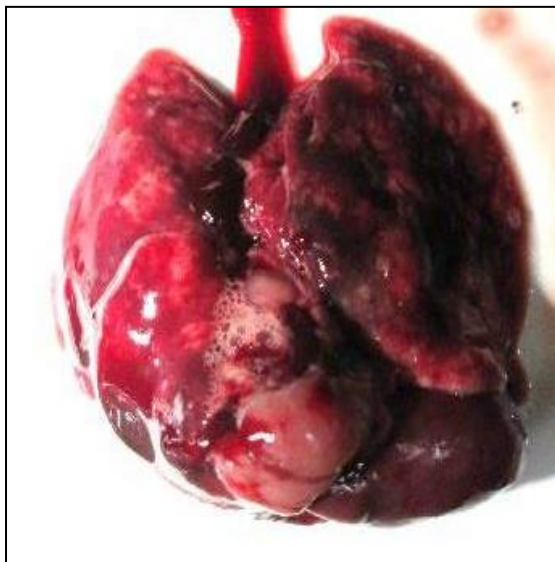


Figura 2: Pulmão e coração de *R. norvegicus* alterações de coloração na superfície do órgão e alterações hemodinâmicas.

Em um dos animais, foi observada também a presença de abscessos múltiplos que ocupavam quase 1/3 da superfície pulmonar esquerda e direita (Figura 3). Na área do abscesso havia adesão pleural e o órgão apresentava sua arquitetura completamente alterada, com poucas áreas funcionais e presença de fibrose e necrose. Ao corte, o abscesso apresentava grande quantidade de secreção purulenta.



Figura 3: Pulmão de *R. norvegicus* com presença de abscessos múltiplos e áreas de fibrose e necrose.

Em todos os animais analisados foi observada a presença de helmintos adultos da espécie *A. cantonensis*, identificados de acordo com parâmetros morfológicos e morfométricos descritos por Chen, (1935), Mackerras e

Sandars, (1955) e Uberlaker, (1986). A carga parasitária variou de três a 25 helmintos, com média 10,2 helmintos/roedor.

No estudo histológico dos pulmões foram observados pneumonite subaguda a crônica, com presença de macrófagos, linfócitos e vários eosinófilos (Figura 4 - A), assim como áreas de infiltrado inflamatório crônico (Figura 4 -B), presença de espesso tecido conjuntivo (fibrose pulmonar); áreas de hiperplasia de túnica média vascular, com lesão de endotélio além da presença de ovos (Figura 4 - C) e larvas em desenvolvimento nas artérias e capilares (Figura 4 - D).

4. DISCUSSÃO

As lesões macroscópicas observadas no parênquima pulmonar foram compatíveis com hipertensão pulmonar, em decorrência da presença dos helmintos adultos e consequente obstrução das artérias pulmonares. A dilatação dos vasos e sobrecarga cardíaca originam uma insuficiência cardíaca congestiva, com o aparecimento de alterações hemodinâmicas, áreas de hemorragias puntiformes e edema congestão pulmonar, estes achados corroboram com o descrito por Mackerras e Sandars (1955), em infecções experimentais por *A. cantonensis* em roedores.

A presença de *R. norvegicus* com dilatação das artérias pulmonares devido à infecção por *A. cantonensis* sem a ocorrência de espessamento da parede arterial foi descrita em literatura (SPRATT, 2015). O encontro de helmintos adultos tem sido facilmente visibilizado em infecções experimentais (MONTE et al., 2014) e naturais (AGHAZADEH et al., 2015), particularmente pela sua aparência de coloração branco e vermelho entrelaçados (LINDO et al., 2002; THOMAS, THANGAVEL e THOMAS, 2015).

A carga parasitária pode influenciar na ocorrência de alterações hemodinâmicas, particularmente a congestão pulmonar que pode estar presente em infecções com grande quantidades de helmintos adultos (MACKERRAS e SANDARS, 1955; JI et al., 2017). Quando a carga parasitária atinge uma média de 40 helmintos, foi observado em infecções experimentais

que a congestão pulmonar se intensifica, com o preenchimento dos alvéolos com infiltrado mononuclear/neutrofílico misto, além de infiltrado eosinofílico peri-arterial (MACKERRAS e SANDARS, 1955; JI et al., 2017).

A presença de exsudato observado no interior dos brônquios é provável que seja decorrente da reação inflamatória direcionada à presença de ovos e larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis*. Neste sentido, a ocorrência destes estágios de desenvolvimento dos helmintos é comum em função da biologia parasitária no interior do compartimento vascular, funcionando como êmbolos, onde as larvas de primeiro estágio (L₁) eclodem, rompendo pequenos capilares e alvéolos, intensificando a reação inflamatória no local (NEW, LITTLE e CROSS, 1995; LAI, 2014).

Abscessos múltiplos tem sido reportados em roedores infectados por *A. cantonensis* (MACKERRAS e SANDARS, 1955), porém, pode não ter relação direta com a ocorrência do helminto, podendo estar ainda relacionada à infecção por outros agentes que podem causar pneumonia e formação de abscessos em roedores (FOURIEZ-LABLÉE et al., 2017).

Frequentemente também tem sido relatado em infecções por *A. cantonensis* lesões do tipo granulomatosa relacionada à presença de larvas e ovos embrionados nos alvéolos, além de trombozes causadas pela obstrução da artéria pulmonar (CHIKWETO et al., 2009).

As alterações microscópicas descritas no parênquima pulmonar são indicativas de resposta inflamatória subaguda a crônica caracterizada por infiltrado de macrófagos, linfócitos e eosinófilos nas áreas onde há presença de ovos e larvas em desenvolvimento, sendo este achado frequente em infecções parasitárias por helmintos no parênquima pulmonar (JI et al., 2017). Sendo assim, o tecido funcional pulmonar é gradativamente substituído por tecido fibroso (MACKERRAS e SANDARS, 1955; TU e LAI, 2006), como observado em Pernambuco.

Por outro lado, as áreas dilatação e hiperplasia de túnica média vascular observadas podem ser decorrentes da lesão da parede vascular e hipertensão

pulmonar, pela presença de *A. cantonensis*, sendo este aumento do número de células, uma resposta adaptativa normal das artérias ao estresse hemodinâmico causado pela presença e dilatação das artérias pulmonares (DAVIES e HAGEN, 1994).

Vale salientar que *R. norvegicus* é considerado permissivo à infecção, indicando que o parasito e o hospedeiro sofreram adaptações num processo de coevolução, o que torna a infecção mais tolerável nessa espécie, sendo comum a presença de células inflamatórias em menor quantidade (OUYANG, WEI e ZHONGDAO, 2012).

5. CONCLUSÃO

Embora *R. norvegicus* seja considerado hospedeiro permissivo do parasito, o parasitismo induz a formação de lesões inflamatórias no parênquima pulmonar.

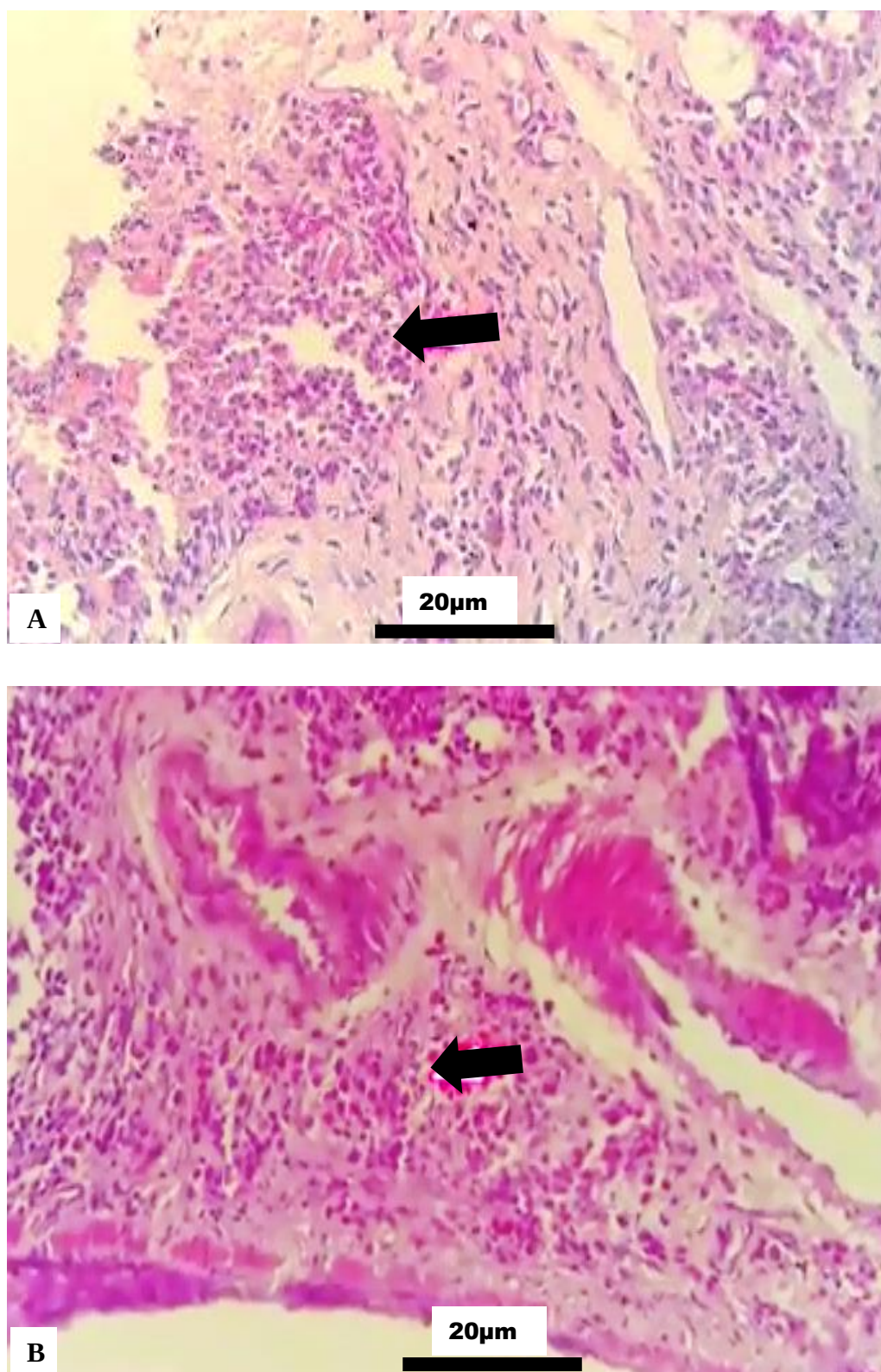


Figura 4. A: *Rattus norvegicus*. Pulmão. Seta: Pneumonite subaguda a crônica constituída por macrófagos, linfócitos e vários eosinófilos, observando-se ainda espesso tecido conjuntivo (fibrose pulmonar). Aum. 1000x; B: *Rattus norvegicus*. Pulmão. Seta: Infiltrado inflamatório perivascular constituído por eosinófilos e alguns macrófagos. Pneumonite eosinofílica focal. Aum. 1000x.

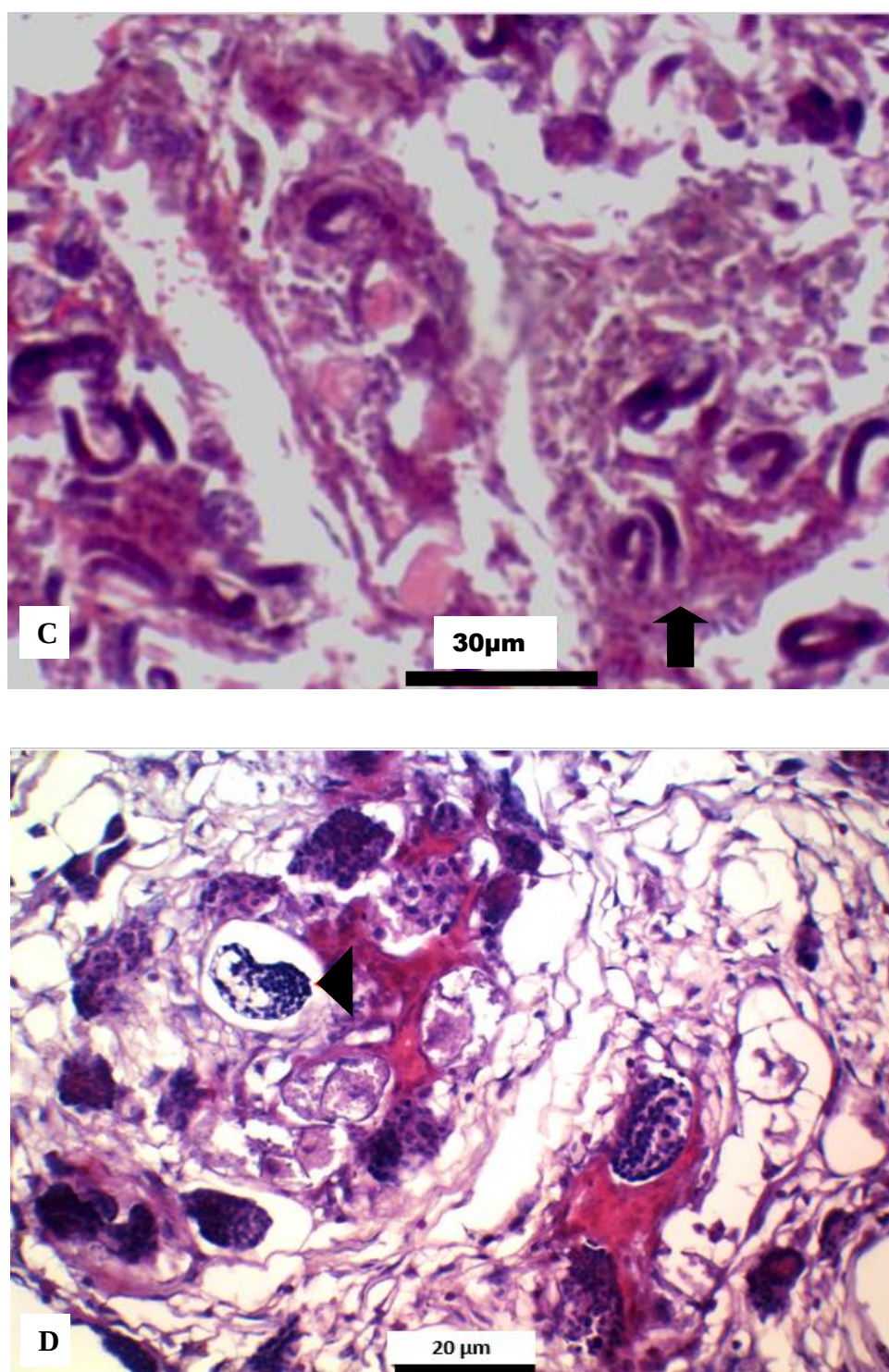


Figura 4. C: *Rattus norvegicus*. Pulmão. Ponta de seta: Ovos de *Angiostrongylus* sp. cortados longitudinalmente no interior de capilares. Aum. 400x. D: *Rattus norvegicus*. Pulmão. Seta: Larvas de *Angiostrongylus* sp. cortadas longitudinalmente circundadas por escassas células inflamatórias. Aum. 400x.

6. REFERÊNCIAS

- AGHAZADEH, M. et al. A survey of *Angiostrongylus* species in definitive hosts in Queensland. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 323–328, 2015.
- BARRATT, J. et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. **Parasitology**, v. 143, p. 1087–1118, 2016.
- BHAIBULAYA, M. **Morphology and taxonomy of major *Angiostrongylus* species of Eastern Asia and Australia**. In: Cross, J.H. (Ed.), *Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*, v. 2. n.44, p. 4–13, 1979.
- CFMV, Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais - conceitos e procedimentos recomendados**. Brasília: CFMV, 2013. 62p.
- CHEN, H.T. A new pulmonary nematode of rats, *Pulmonema cantonensis* ng, nsp from Canton. **Annals of Parasitology**, v. 113, p. 312-317, 1935.
- CHIKWETO, A.; BHAIYAT, M. I.; MACPHERSON, C. N. L.; DEALLIE, C.; PINCKNEY, R. D.; RICHARDS, C.; and SHARMA, R. N. Existence of *Angiostrongylus cantonensis* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **Veterinary parasitology**, v. 162, n. 1, p. 160-162, 2009.
- COSTA, L. R. R. et al. Verminous meningoencephalomyelitis by *Angiostrongylus* (= *Parastrongylus*) *cantonensis* in an American Miniature Horse. **Equine Veterinary Education**, v. 12, p. 2–6, 2000.
- DALTON, M. F. et al. Eosinophilic meningoencephalitis associated with rat lungworm (*Angiostrongylus cantonensis*) migration in two nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and an opossum (*Didelphis virginiana*) in the southeastern United States. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 2, p. 131-134, 2017.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Pathobiology of intimal hyperplasia. **British Journal of Surgery**, v. 81, n. 9, p. 1254-1269, 1994.

DUFFY, M. S. et al. *Parastrongylus cantonensis* in a Nonhuman Primate, Florida. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2207-2210, 2004.

FOURIEZ-LABLÉE, V. et al. Comparison between thoracic radiographic findings and postmortem diagnosis of thoracic diseases in dyspneic companion rats (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v. 58, p. 133–143, 2017.

HOLLINGSWORTH, R. G.; HOWE, K.; JARVI, S. I. Control measures for slug and snail hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, with special reference to the semi-slug *Parmarion martensi*. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 75, 2013.

Jl, L. et al. Study on the tolerance and adaptation of rats to *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1937-1945, 2017.

KIM, D.Y. et al. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* Now Endemic in Louisiana Wildlife. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 1024-1026, 2002.

LAI, S. C. Angiostrongyloidosis. In: **Helminth Infections and their Impact on Global Public Health**. Springer Vienna, 2014. p. 461-477.

LIMA, A. R. M. C. et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, n. 4, p. 1093-1096, 2009.

LINDO, J. F. et al. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 324–326, 2002.

MACKERRAS, M.J.; SANDARS, D.F. The life history of the rat lung-worm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) (Nematoda: Metastrongylidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 1-25, 1955.

MONTE, T. C.C. **Estudo filogenético, biológico e morfológico de isolados de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil**, Dissertação (Mestrado), Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2014.

NEW, D.; LITTLE, M. D.; CROSS, J. *Angiostrongylus cantonensis* infection from eating raw snails. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 16, p. 1105-1106, 1995.

NÓBREGA, R. S.; LEMOS, T. V. S. O microclima e o (des)conforto térmico em ambientes abertos na cidade do Recife. **Revista de Geografia (UFPE)**, v. 28, n. 1, p. 93-109, 2011.

OUYANG, L.; WEI, J.; ZHONGDAO, W. Differences of larval development and pathological changes in permissive and non-permissive rodent hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1547, 2012.

PEREIRA, M. R et al. Structure of Small Mammal Assemblages Across Flooded and Unflooded Gallery Forests of the Amazonia-Cerrado Ecotone. **Biotropica**, v. 1, p. 1-8, 2013.

ROSEN, L.; LAIGRET, J.; BOILS, P. L. Observation on an outbreak of eosinophilic meningitis on Tahiti, French Polynesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 12, p. 613-615, 1961.

SIMÕES, R. O. et al. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality

and host features on the pattern of infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, p.100, 2014.

SPRATT, D.M. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 178-189, 2015.

THIENGO, S. C. et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194–199, 2010.

THOMAS, M.; THANGAVEL, M.; THOMAS, Rogimon P. *Angiostrongylus cantonensis* (NEMATODA, METASTRONGYLIDAE) in bandicoot rats in Kerala, South India. **International Journal of Pure and Applied Zoology**, v. 3, n. 1, 2015.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas normal e patológica**. São Paulo: Manole, p.331, 2003.

TU, W. C.; LAI, S.C. Induction of tumour necrosis factor, interleukin-1 β and matrix metalloproteinases in pulmonary fibrosis of rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of helminthology**, v. 80, n. 3, p. 305-311, 2006.

VITTA, A.; POLSEELA, R.; NATEEWORANART, S.; TATTIYAPONG, M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 597–599, 2011.

WANG, L.C. et al. Temporal-spatial pathological changes in the brains of permissive and non-permissive hosts experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 177–184, 2015.

SHORT COMMUNICATION

**Ultrastructural aspects of the intestinal cells surface of
Angiostrongylus cantonensis by using of transmission electron
microscopy**

SHORT COMMUNICATION

Ultrastructural aspects of the intestinal cells surface of *Angiostrongylus cantonensis* by using of transmission electron microscopy

GUERRA, H.M.MS.; MAIA, C.S.; GUERRA, N.R.; MONTEIRO, M.F.M.; SILVA, E.M.; ALVES, L.C.

ABSTRACT

The rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* is a zoonotic parasite and the main cause of eosinophilic meningitis in the world. The intermediate hosts are terrestrial snails and rats are the definitive hosts. Its main source of nutrients originates from the degradation of host hemoglobin in blood-feeding helminths, such as *A. cantonensis*. Although the helminth was described for more than eighty years, the digestion process of this nematode is still not clearly understood. The purpose of this study was to observe the surface of the intestinal cells by using of transmission electron microscopy (TEM). *A. cantonensis* worms obtained from *Rattus norvegicus* (norway rats) from endemic area were used for TEM. The ultrastructural analysis was performed using fragments cut from the middle part of the worms, and the TEM study revealed the cells with microvilli and nuclei containing areas of loose and condensed chromatin and the presence of macrovesicles and microvesicles of digestion and it was observed in this study that intestinal epithelium is look like a syncytium. The ultrastructural aspects of the intestinal cells surface of *A. cantonensis* showed the intricate function of the multinucleated mosaic in nutrition mode of this nematode.

Key words: *Angiostrongylus cantonensis*, *Rattus norvegicus*, eosinophilic meningitis, Pernambuco, Brazil

Angiostrongylus cantonensis or rat lungworm inhabit the pulmonary arteries of rodents, primarily synanthropic commensals species. Terrestrial snails serve as intermediate hosts until they are ingested by definitive hosts (RAMIREZ-AVILA et al., 2009). Humans can be incidentally infected by eating poorly cooked or raw intermediate snails where some of them developed the eosinophilic meningitis (THIENGO et al., 2010).

A. cantonensis digests large amount of haemoglobin in order to obtain amino acids (HUTTEMANN et al., 2007), and the degradation process occurs in a lysosome-type digestive vacuole (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2015)

The nematode digestive system is divided into three parts include the stomodeum, intestine, and proctodeum. The stomodeum consists of a buccal cavity and esophagus. The intestine is a simple tubular structure formed by just a one-layered epithelium and the third part incorporates in male cloaca and female the rectum. However, the internal surface of the intestinal cells may be variable depend on the species of nematodes compounded by cilia associated with basal granules (HETHERINGTON, 1924), or have a brush border lining the gut lumen (CHITWOOD and CHITWOOD, 1938).

Although *A. cantonensis* was described for more than eighty years, the digestion process of this nematode is still not clearly understood. The purpose of this study is to observe the surface of the intestinal cells by using of transmission electron microscopy (TEM).

A. cantonensis worms obtained from *Rattus norvegicus* from endemic area were used for TEM. The ultrastructural analysis was performed using fragments cut from the middle part of the worms, not more than 1 mm in length, which were fixed in Karnovsky solution in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Some pieces were fixed in 2% osmium tetroxide and inclusion medium (Epoxy/Sigma resin) was performed. The material was placed in an oven at 60 ° C for 72 hours for polymerization of the resin. The obtained blocks were sectioned in ultramicrotome with the use of glass razors. The sections were stained with toluidine blue II and after drying, examined under a light microscope.

After selecting the area to be studied, the blocks were made in ultra thin sections with a thickness of 40 nm, using diamond razors. The obtained cuts were placed in copper grids and contrasted with alcohol solution of 5% uranyl acetate and final treatment with lead citrate. After these procedures, the screens were taken to the MET (Tecnai G2 200 kV / FEI) and the electromicrographs were obtained. The study was approved by the Research Ethics Committee of UFRPE, under #120/2015.

It was observed in this study that intestinal epithelium is look like a syncytium, e.g. multinucleated pattern resulted from multiple cellular fusion

showed no limit between these cells (Fig. 1 - A). This aspect was only reported by Byers and Anderson (1972) when studied the morphology and ultrastructure of the phytophagous nematode *Tylenchorhynchus dubius*.

The TEM study revealed the cells with microvilli and nuclei containing areas of loose and condensed chromatin and the presence of macrovesicles and microvesicles of digestion (Fig. 1 – A and C). The presence of many vesicles suggests a vesicular transport of the material as describe in *A. cantonensis* by Hüttemann et al., (2007). The cytoplasm of the intestinal cells showed a moderate number of mitochondria that are concentrated in the basal portion of the cells.

The lumen, including the spaces between the microvilli, is filled with a granular material, which sometimes contains a few intermixed membranous, vesicles and partial digested red blood cells originating from host blood (Fig. 1-B). These aspects were reported by Byers and Anderson (1972) and Hüttemann et al., (2007) in different nematodes respectively.

Part of the epithelium showing a brush border composed of short microvilli of different sizes. The microvilli have central filaments which extend a short distance into the submicrovillar cytoplasm (Fig. 1 - D). The microvilli aspects was also observed by Hüttemann, Schmahl and Mehlhorn (2007) in *A. cantonensis* by light and electron microscopic studies in order to clarify the mode of nutrition of this nematode.

The ultrastructural aspects of the intestinal cells surface of *A. cantonensis* showed the intricate function of the multinucleated mosaic in nutrition mode of this nematode.

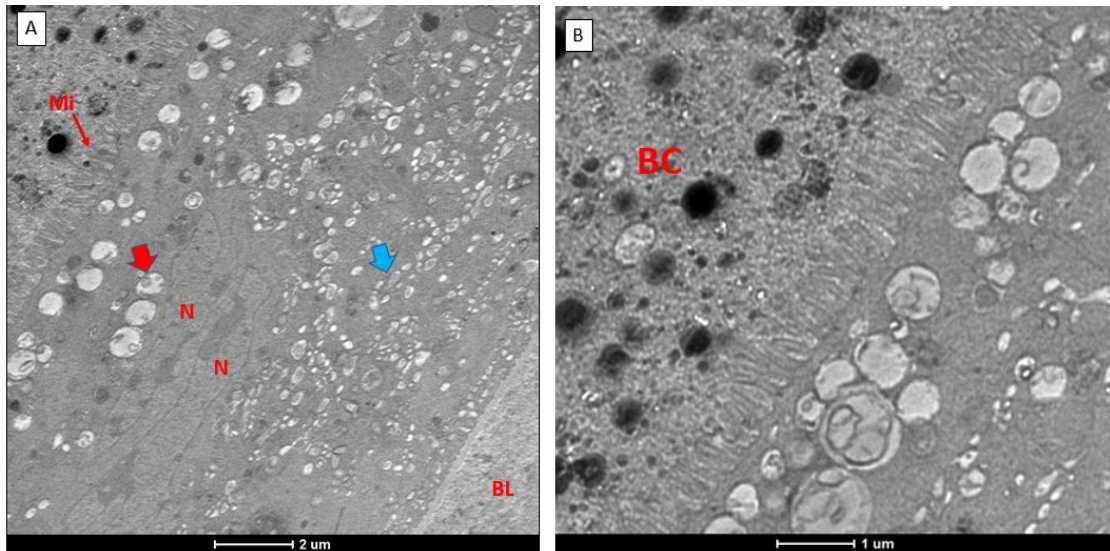
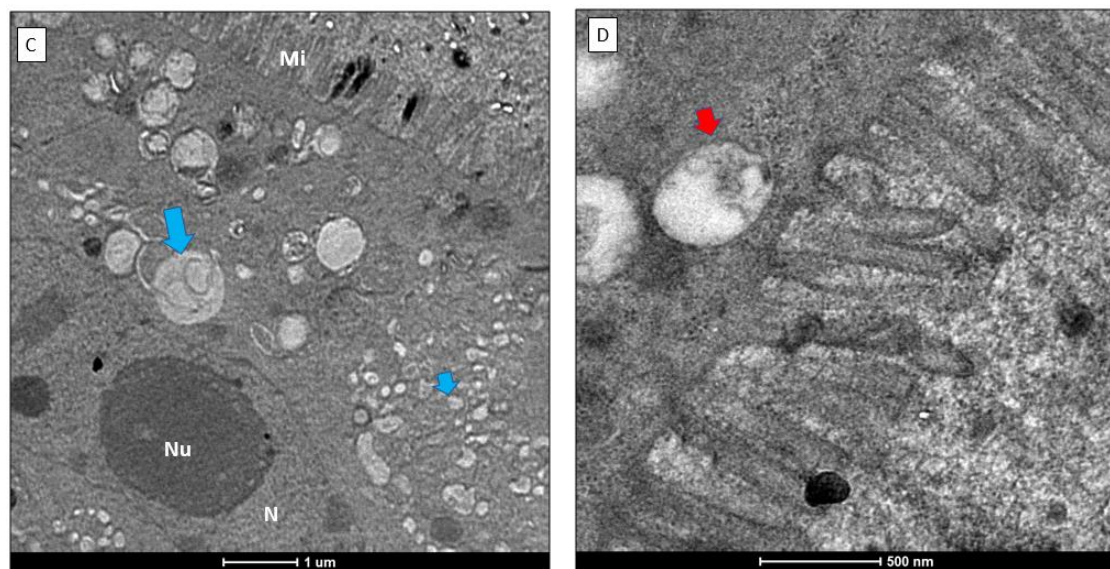


FIG. 1: (A) TEM of the intestinal epithelium of *A. cantonensis*. Part of the intestinal epithelium showing a brush border composed of microvilli (Mi) and the presence of macrovesicles (red arrow) and microvesicles (blue arrow) of digestion; Intestinal cells look like a syncytium, e.g. multinucleated (N) pattern showed no limit between these cells and the presence of basal lamina (BL);

(B): The lumen is filled with a granular material, which sometimes contains a few intermixed membranous structures, vesicles and partially digested red blood cells (BC) originating from host blood feeding;



(C): TEM of the intestinal epithelium of *A. cantonensis*. The epithelial cells with microvilli (Mi), nuclei (N) and nucleolus (Nu) containing areas of loose and condensed chromatin. The presence of macrovesicles (larger arrow) and microvesicles (smaller arrow) of digestion;

(D): Macrovesicles of digestion (red arrow) and short microvilli of different sizes. The microvilli have central filaments that extend a short distance and the presence of macrovesicles (red arrow) of digestion.

REFERENCES

- BYERS, J. R.; ANDERSON, R. V. Ultrastructural morphology of the body wall, stoma, and stomatostyle of the nematode, *Tylenchorhynchus dubius* (Bütschli, 1873) Filipjev, 1936. **Canadian Journal of Zoology**, v. 50, n. 4, p. 457-465, 1972.
- CHITWOOD , B.G. and CHITWOOD, M. B. An introduction to nematology. **An introduction to nematology.**, n. Part 1, 1937.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.
- HETHERINGTON, D. C. Comparative studies on certain features of nematodes and their significance, 8. **Illinois biological monographs; v. 8, no. 2**, 1924.
- HÜTTEMANN, M.; SCHMAHL, G.; MEHLHORN, H. Light and electron microscopic studies on two nematodes, *Angiostrongylus cantonensis* and *Trichuris muris*, differing in their mode of nutrition. **Parasitology research**, v. 101, n. 2, p. 225-232, 2007.
- RAMIREZ-AVILA, L.; SLOME, S.; SCHUSTER, F.L.; GAVALI, S.; SCHANTZ P.M.; SEJVAR, J. and GLASER, C.A. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus* and *Gnathostoma* species. **Clinical Infectious Diseases**, 48, n. 3, p. 322-327, 2009.
- THIENGO, S. C. MALDONADO, A., MOTA, E. M., TORRES, E. J. L., CALDEIRA, R., CARVALHO, O. D. S. and LANFREDI, R. M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194–199, 2010.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Com base nos resultados, observa-se que a Região Metropolitana do Recife encontra-se endêmica para *Angiostrongylus cantonensis*, sendo este o primeiro relato de infecção natural de *R. norvegicus* por *A. cantonensis* em áreas urbanas no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil.
- Embora *R. norvegicus* seja considerado hospedeiro permissivo do parasito, o parasitismo induz a formação de lesões inflamatórias no seu parênquima pulmonar.
- Os aspectos ultraestruturais da superfície das células intestinais de *A. cantonensis* mostram a intrincada função do mosaico multinucleado no modo nutritivo desse nematoíde.