

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

JOANA BORGES OSÓRIO

INTERAÇÃO ENTRE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* E *ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS* (NEMATODA; METASTRONGYLOIDEA) COM MOLUSCOS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS E PESQUISA DE BIOMARCADORES DE INFECÇÃO

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOLOGIA**

Interação entre *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*
(Nematoda; Metastrongyloidea) com moluscos hospedeiros intermediários e pesquisa
de biomarcadores de infecção

Joana Borges Osório

TESE DE DOUTORADO

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL Av.
Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429 - Fone: (051) 3320-3500 - CEP 90619-900
Porto Alegre – RS Brasil
2017**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOLOGIA

Interação entre *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*
(Nematoda; Metastrongyloidea) com moluscos hospedeiros intermediários e pesquisa
de biomarcadores de infecção

Joana Borges Osório
Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE - RS – BRASIL
2017

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Apresentação.....	13
Introdução.....	14
Objetivos.....	27
Justificativa.....	27
Referências Bibliográficas.....	29
Capítulo I – “ Biomarkers of <i>Angiostrongylus cantonensis</i> and <i>Schistosoma mansoni</i> infection in intermediate hosts ”.....	39
Capítulo II – “ Infection of <i>Angiostrongylus costaricensis</i> associated with the slug <i>Meghimatium pictum</i> (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming ”.....	76
Capítulo III – Outros resultados de estudos sobre o parasito e seus hospedeiros	86
Considerações Finais	107
Apêndices.....	112

Introdução, Objetivos e Justificativa

Figura 1: Vermes machos (sistema digestório reto linear) e fêmeas (sistema digestório espiralado) de *Angiostrongylus cantonensis* em artérias pulmonares de roedor *Rattus norvegicus* após 42 dias de infecção..... 15

Figura 2: Vermes machos (sistema digestório reto) e fêmeas (sistema digestório espiralado) de *Angiostrongylus costaricensis* em artéria mesentérica de roedor *Oligorizomys nigripes* após 42 dias de infecção. 15

Figura 3: Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*..... 19

Figura 4: Esquema com características da visão ventral de lesmas da família Veronicellidae..... 21

Figura 5: *Phyllocaulis soleiformis*. 21

Figura 6: *Limacus flavus*..... 22

Figura 7: *Biomphalaria glabrata*. 23

Capítulo I – “**Biomarkers of *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni* infection in mollusks intermediate hosts**”

Figure 1. Microbiome from *Biomphalaria glabrata* treatment groups (CG, control group; IGAc, infected group with *A. cantonensis*; IGSm, infected group with *S. mansoni*). (A) Phyla relative abundance of each *B. glabrata* treatment group; (B) genera relative abundance of each *B. glabrata* treatment group; (C) Alpha diversity rarefaction curve of richness estimates by Chao 1; (D) Principal Coordinates Analysis (PCoA) summarize the microbial community compositional differences between samples (PC 101-103: control group in blue; PC104-106: infected group with *A. cantonensis* in red; PC107-109: infected group with *S. mansoni* in orange). *p* values indicate the phyla that differed significantly among samples ($p < 0.05$) 53

Figure 2. Microbiome from *Phyllocaulis* sp. treatment groups (CG, control group; IGAc, infected group with *A. cantonensis*). (A) phyla relative abundance of each *Phyllocaulis* sp. treatment group; (B) genera relative abundance of each *Phyllocaulis* sp. treatment group; (C) Alpha diversity rarefaction curve of richness estimates by CHAO 1; (D) Principal Coordinates Analysis (PCoA) summarize the microbial community compositional differences between samples (PC101-105: control group in blue and PC106-110: infected group with *A. cantonensis* in red). p values indicate the phyla that differed significantly among samples ($p < 0.05$)..... **55**

Figure 3. Proteins variation among infected and non-infected mucus of *Phyllocaulis* slugs. Not infected animals (represented as the time zero)..... **57**

Appendices 1: Third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in *Biomphalaria glabrata* tissue after 30 days of infection **63**

Capítulo II – “**Infection of *Angiostrongylus costaricensis* associated with the slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming**”

Figure 1: A: eggs inside small vessels, with intense infiltration of eosinophils (HE 400x); B: worm of *A. costaricensis* inside branche of the mesenteric artery (HE 200x); C: intense eosinophilic infiltration in the liver (HE 400x)..... **81**

Capítulo III – **Outros resultados de estudos sobre o parasito e seus hospedeiros**

Observações do desenvolvimento embriológico dos moluscos terrestres *Limacus flavus* e *Phyllocaulis* sp.

Figura 1: A: Postura de *Limacus flavus* depositada em cavidade na terra; B: Individuo de *Phyllocaulis* sp. fazendo a deposição dos ovos..... **90**

Figura 2: Posturas em espiral de *Phyllocaulis* sp. destacando as fezes e muco em torno dos ovos..... **91**

Figura 3: Ovo de *Phyllocaulis* sp. destacando a membrana perivitelínica (MP), o albúmen ou vitelo (AL) e o embrião (EM)..... **92**

Figura 4: Primeiros dias do desenvolvimento de *Limacus flavus*, após completa liberação da postura (de 24 à 48 horas). A: dia 3, destacando as células embrionárias; B: dia 4 e C: dia 5, destacando o desenvolvimento do saco anterior ou saco visceral; D: dia 6, destacando o

aumento do saco anterior e o desenvolvimento do podocisto ou saco posterior; E: dia 7 e F: dia 8, destacando o início da formação da protoconcha; G: dia 9, destacando uma diminuição do podocisto; H: dia 10, destacando a formação de um tentáculo ainda em formato de disco; I, dia 11 e J, dia 12: evidencia o aumento do tamanho do embrião; L, dia 13 e M, dia 14: destacam o pneumostômio, orifício respiratório; M: destacam-se a diminuição tanto do saco anterior quanto do podocisto; N, dia 15: ocorre redução quase total dos saco anterior e podocisto e apresenta a grande proporção do corpo da lesma em relação ao ovo; O: ovo sem desenvolvimento embrionário, destacando o embrião não desenvolvido.....94

Figura 5: Desenvolvimento de *Phyllocaulis* sp. A: cerca de 5 dias após a postura, observa-se o embrião; B: cerca de 7 dias, destaca-se o saco anterior e podocisto; C: cerca de 15 dias, observa-se o aumento no tamanho do embrião e o quase completo desaparecimento do saco anterior e podocisto; D: cerca de 18 dias, molusco já formado dentro do ovo.....95

Figura 6: Postura de *Phyllocaulis* sp. após cerca de 18 dias de desenvolvimento. A e B: destacam indivíduos já fora do ovo; C: os indivíduos já formados ainda dentro dos ovos...95

Observações da interação entre ácaros e moluscos terrestres

Figura 1: Organismos presentes em postura de *Limacus flavus* e *Phyllocaulis* sp., criados em laboratório. A. mostra hifas ao redor de um dos ovos; B. Invertebrado filiforme não identificado ao lado de um pequeno artrópoda; C: Pequeno artrópoda sob as fezes ao redor de ovo.....99

Figura 2: Indivíduos de *Caloglyphus berlesei* em espécime de *Phyllocaulis* sp. em decomposição. A, B, C: flechas destacam as diferentes fases de vida de *C. berlesei*; B,C: círculo destaca a presença do invertebrado nematoide (forma de verme); D: Espécime de *C. berlesei* destacando as setas, estruturas utilizadas na identificação de ácaros.....101

*À minha querida amiga e colega, Angélica da Paz Ramirez
(In memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família o amor, carinho, cuidado e ao apoio incondicionais que sempre dedicaram a mim. Essa conquista é para vocês também. Em especial para as mulheres que tanto me inspiram mãe, vó e Nessinha: vocês são meus exemplos e meu porto seguro. Não existe maneira para agradecer tudo o que vocês fazem por mim.

Ao meu orientador Prof. Carlos Graeff-Teixeira. Alguém que modificou minha visão sobre a vida, me ensinando a olhar para o mundo da parasitologia com os seus olhos. Ali cruzei uma linha que não teve mais volta: a beleza do mundo surreal desses pequenos grandes guerreiros, os quais a maioria não tem o prazer de se aventurar. Obrigada por me aceitar em todas as fases acadêmica, pela paciência e por ter acreditado que eu conseguiria.

A minha co-orientadora Prof. Alessandra Morassutti. Ale, eu deveria escrever uma pagina inteira de “obrigadas” mas nem assim chegaria perto de te agradecer por me guiar e orientar nessa caminhada. És uma pessoa que tenho como exemplo de perseverança e profissionalismo. Tua força de buscar o que almejas serve como fonte de inspiração para todos nós que temos a sorte de conviver contigo. Te agradeço demais a paciência e a dedicação comigo e com meu trabalho.

Ao Prof. Malcolm Jones, quem abriu as portas da Austrália para que eu pudesse realizar o Doutorado Sanduíche. Talvez tu não saibas a grandiosidade do teu gesto, mas essa oportunidade foi como um divisor de águas ou um *life-changing*, como aprendi aí, para minha vida. Além de poder desenvolver grande parte desse trabalho, meu crescimento pessoal foi imensurável. Muito obrigada por ser quem me oportunizou esse presente e por todo o cuidado nesses 8 meses de pura felicidade.

Ao incrível Laboratório de Biologia Parasitaria da PUCRS. Poucos sabem a sorte de trabalhar nesse laboratório. Em quase 10 anos de convivência, vivi momentos indescritíveis e fiz amizades para a Vida. A todos os que já passaram, obrigada por cada troca, cada ensinamento. Especialmente Bianca, Carla, Catieli, Renata, Vivian, e Vanessa: tenho muita sorte de ter cruzado com vocês e nossos caminhos terem se ligado dessa maneira tão rica e especial. Cada risada, cada choro, dúvidas, certezas, abraços, imitações e todos os apelidos fazem parte desse universo lindo que temos juntas. Obrigada pelo amor. Obrigada por cada minuto.

Renata Russo. Ah, como agradecer esse presente que a vida me deu? Minha irmã mais velha, irmã do coração ou minha irmã espiritual, quando que eu imaginei te achar no meio de cocôs, vermes e alfaces? Tua irmandade é algo que não consigo expressar em palavras. Poder contar contigo para qualquer coisa, sem medo de ser julgada, ter a liberdade de conversar sobre qualquer assunto e ainda contar com teus conselhos não é algo que um obrigada se torne suficiente. Meu caminho é trilhado com a certeza de que sempre te terei ao meu lado, mesmo que 15.577,86 km estejam entre nós. Obrigada pelo incansável apoio nesses 4 anos e pela tua dedicação especialmente no meu doutorado sanduíche.

Às minhas amigas que a Biologia lindamente me presenteou, meu trevo de quatro folhas. Três pessoas que compõem essa pequena rede de seres que te seguram em qualquer ocasião, em qualquer etapa da vida, longe ou perto. Aquela definição de amizade. Aquela definição de trevo da sorte. Nome que decorre da dificuldade em ser encontrado, assim como as verdadeiras amizades. À cada folha é atribuído um significado: esperança, fé, amor e sorte, mas no nosso caso é a mistura de todos esses sentimentos que vem de cada uma, acompanhados de muitas risadas e alegrias. Bianca, Chalissa e Katiúcia, vocês foram essenciais em momentos muito delicados que vivi. Assim será, pra sempre, como no braço de cada uma de nós. Obrigada por serem vocês. Da mesma maneira, agradeço a um grupo muito especial, que nasceu sem saber a proporção que tomaria. “Please call me doctor” criado para um momento de desabafo se tornou um grupo de autoajuda de 4 doutorandas passando pelo mesmo momento caótico que só quem vive para saber. Ana Carolina, melhor ideia da vida. Além de poder dividir esse momento e todos os outros que começamos a compartilhar a partir de então, pudemos nos aproximar e assim ganhar mais uma peça essencial para a vida. Ana, Bi e Chali, esse momento não teria sido o que foi e o que representa na minha vida, se não fossem vocês ao meu lado. Não tenho palavras para agradecer o apoio, força e torcida. Amo vocês.

À PUCRS, à PPG-Zoologia, funcionários e especialmente aos professores que participaram da minha formação como bióloga e ser humano.

À banca Dra. Adriana, Dra. Renata e Dra. Silvana, por aceitarem fazer parte deste trabalho. Adriana, especialmente, obrigada pelo teu apoio e generosidade.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche que possibilitou a existência desse momento.

À todos que me ajudaram na busca de lesmas.

À todos que de alguma forma ajudaram na construção desse trabalho.

Estudos sobre a interação entre *Angiostrongylus* spp. (Nematoda: Metastrongylidae), seus hospedeiros intermediários e outros organismos

Angiostrongylus cantonensis e *A. costaricensis* podem infectar o ser humano acidentalmente causando a meningite eosinofílica e a angiostrongilíase abdominal, respectivamente. Ambos possuem diversas espécies de moluscos como hospedeiros intermediários. O diagnóstico da infecção requer a morte destes moluscos, interferindo em estudos de conservação e dinâmica populacional. Este trabalho teve como objetivo principal encontrar possíveis marcadores biológicos para a infecção de hospedeiros intermediários, bem como investigar fatores relacionados a relação parasito-hospedeiro entre moluscos e *Angiostrongylus cantonensis*. Exemplares de *Phyllocaulis* sp. foram infectados com larva de primeiro estágio de *A. cantonensis*. O muco e fezes destes animais infectados e não infectados foram utilizados para análise de expressão diferencial de proteínas por espectrometria de massas e análise do perfil do microbioma por sequenciamento do gene ribossomal 16S, respectivamente. As análises de espectrometria por LC-MS/MS mostraram um aumento das proteínas da subfamília F-BAR e diminuição do fator de alongamento de *Mycoplasma* spp. O microbioma das fezes de lesmas infectadas apresentou uma diminuição do filo Bacteroidetes. Também foram analisados o perfil do microbioma de fezes de *Biomphalaria glabrata* infectadas com *A. cantonensis* e *Schistosoma mansoni*. Nas fezes de caramujos infectados com *A. cantonensis* foram observados uma diminuição do gênero *Vogesella*; Já quando infectados com *S. mansoni*, houve redução dos gêneros *Mycoplasma* e *Nitrospira* e aumento de *Niabella*. Em ambas as infecções, a diminuição de *Fluviicola* e o aumento de organismos da família *Weeksellaceae* foram significativos. Estes resultados mostram que proteínas e microorganismos são promissores biomarcadores da infecção de *A. cantonensis* em hospedeiros intermediários, objetivando o desenvolvimento de métodos diagnósticos *in vivo*. Durante as coletas de moluscos, foi encontrada, pela primeira vez, a espécie invasora *Meghimatium pictum* infectada com *A. costaricensis* associada a um caso de Angiostrongilíase abdominal, relato que compõe essa tese. Paralelamente a este estudo, foram acompanhadas as posturas de *Limax* sp. e *Phyllocaulis* sp. durante o desenvolvimento embrionário, com o objetivo de registrar e investigar a embriogênese destes hospedeiros. Nas posturas e em moluscos em decomposição, foram identificados ácaros da espécie *Caloglyphus berlesei*, em associação observada pela primeira vez.

Palavras-chave: proteoma; microbioma; relação parasito-hospedeiro; molusco.

ABSTRACT

Studies on the interaction between *Angiostrongylus* spp. (Nematoda: Metastrongylidae), its intermediary hosts and other organisms

Angiostrongylus cantonensis and *A. costaricensis* can accidentally infect humans causing eosinophilic meningitis and abdominal angiostrongyliasis, respectively. Both species have several mollusks as intermediate hosts. Diagnosing the infection requires killing the mollusks, interfering in conservational and population dynamics studies. This work had the objective to demonstrate possible biological markers in infected intermediate hosts, as well as to investigate specific factors related to the parasite-host relationship of mollusks and *Angiostrongylus* parasites. Mollusks of the Veronicellidae family were infected with *A. cantonensis* L1. Mucus and feces from these infected and uninfected animals were used for differential expression analysis of proteins using mass spectrometry and the microbiome profile analysis was performed through the 16S gene sequencing, respectively. LC-MS/MS spectrometry analysis showed an increase in F-BAR proteins subfamily and a decrease in the elongation factor of *Mycoplasma* spp. Microbiome of feces from infected slugs presented a decrease of the Bacteroidetes phylum. We have also analyzed the microbiome profile of *Biomphalaria glabrata* feces infected with *A. cantonensis* and *Schistosoma mansoni*. We could observe a decrease of *Vogesella* genus. When infected with *S. mansoni*, a reduction of *Mycoplasma* and *Nitrospira* genera and an increase in *Niabella* genus could be demonstrated. In both infections, decrease of *Fluviicola* genus and increase of organisms of the *Weeksellaceae* family were significant. Our results showed that proteins and microorganisms could be promising biomarkers of *A. cantonensis* infection in intermediate hosts *in vivo*. During the collection of the mollusks, the invasive species *Meghimatium pictum* infected with *A. costaricensis* was found, associated to a case of abdominal angiostrongyliasis, reported in this thesis. Parallel to this study, the postures of *Limax* sp. and *Phyllocaulis* sp. were registered to investigate the embryogenesis of these animals. In postures and in decomposing mollusks, mites of the species *Caloglyphus berlesei* were also identified and this association was observed for the first time.

Keywords: proteome; microbiome; host-parasite relationship; mollusk.

APRESENTAÇÃO

A presente tese intitulada “**Interação entre *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda; Metastrongyloidea) com moluscos hospedeiros intermediários e pesquisa de biomarcadores de infecção**” foi organizada em três capítulos, que mostram os principais achados deste trabalho. Inicialmente são apresentados a Introdução, os Objetivos e a Justificativa, contextualizando o assunto desta tese. O Capítulo I apresenta o manuscrito mostrando as principais contribuições científicas deste trabalho, intitulado “**Biomarkers of *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni* infection in intermediate hosts**”. O Capítulo II apresenta o manuscrito “**Infection of *Angiostrongylus costaricensis* associated with the slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming**”. O Capítulo III engloba outros trabalhos realizados durante o doutorado, que ainda não foram finalizados. Após, seguem as Considerações Finais e então os Apêndices.

Os Capítulos I e II apresentam os artigos científicos em inglês, em fase final de redação, que será submetido à revista *Parasitology* e *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, respectivamente, após a incorporação das recomendações recebidas pela banca examinadora.

A banca examinadora é composta por: **Doutora Adriana Giongo Borges** (Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais – PUCRS), **Doutora Renata Medina da Silva** (Faculdade de Biociências – PUCRS) e **Doutora Silvana Carvalho Thiengo** (Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro).

1. Introdução

1.1 *Angiostrongylus*

Angiostrongylus Kamensky, 1905, é um gênero pertencente ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Strongylida, superfamília Metastrongyloidea e à família Angiostrongylidae, na qual engloba cerca de 20 espécies (Bhaibulaya, 1991; Spratt, 2015) parasitas de veias sanguíneas de roedores, felídeos, canídeos e, ocasionalmente, primatas (Robles et al., 2008). Dentre essas espécies, três são ocorrentes no Brasil: *Angiostrongylus vasorum* (Kamenski, 1905), parasita de coração e pulmão de cães domésticos e selvagens (Ferdushy and Hasan 2010); *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), parasita de artérias pulmonares de roedores urbanos (**Fig. 1**) (Wang et al., 2008) e *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971, parasita de artérias mesentéricas de roedores silvestres (**Fig. 2**) (Morera & Céspedes, 1971). *A. cantonensis* e *A. costaricensis* destacam-se por poderem, acidentalmente, infectar o ser humano causando infecções conhecidas por meningite eosinofílica (Wang et al., 2008) e angiostrongilíase abdominal (Mota & Lenzi, 1995), respectivamente. As espécies têm o ciclo de vida heteroxeno, ou seja, necessitam de um hospedeiro definitivo e um hospedeiro intermediário para completar o desenvolvimento.



Figura 1: Vermes machos (sistema digestório reto linear) e fêmeas (sistema digestório espiralado) de *Angiostrongylus cantonensis* em artérias pulmonares de roedor *Rattus norvegicus* após 42 dias de infecção. Fonte: Morassutti et al., 2014.



Figura 2: Vermes machos (sistema digestório reto) e fêmeas (sistema digestório espiralado) de *Angiostrongylus costaricensis* em artéria mesentérica de roedor *Oligoryzomys nigripes* após 42 dias de infecção. Fonte: Morassutti et al., 2014.

1.2 Ciclo Biológico do *Angiostrongylus cantonensis*

Angiostrongylus cantonensis foi descrito em Guangzhou (Cantão), China, por Chen em 1935 (Chen, 1935 apud Wang et al., 2008). O indivíduo adulto macho mede de 20 a 25 mm x 0.32 a 0.42 mm e a fêmea mede de 22 a 34 mm x 0.34 a 0.56 mm (Wang et al., 2008). O ciclo de vida desta espécie envolve as espécies de roedores urbanos *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) e *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), como hospedeiros definitivos, e moluscos, como por exemplo o caramujo *Achatina fulica* Bowdich, 1822, atuando como hospedeiro intermediário (Alicata, 1965; Caldeira et al., 2007). Outros animais podem atuar como hospedeiros paratênicos, como crustáceos, ácaros da terra, planárias, sapos e lagartos (Wang et al., 2008). O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir as larvas de terceiro estágio ao se alimentar dos hospedeiros intermediários ou paratênicos ou de alimentos que contenham o muco do molusco infectado, com larvas do parasito, como por exemplo, em um surto ocorrido com turistas na Jamaica que apresentaram os sintomas da infecção após a ingestão de saladas mal higienizadas (Slom et al., 2002). As larvas ingeridas penetram o estômago, acessando, assim, os vasos do sistema porta hepático e sistema linfático mesentérico. Após, são carregadas ao longo do corpo pela circulação arterial e levadas ao sistema nervoso central, dois ou três dias pós-infecção. As larvas sofrem duas mudas enquanto migram para o cérebro, de 12 a 14 dias pós-infecção. De 28 a 33 dias, os vermes (fase adulta/reprodutiva) migram para o coração e artérias pulmonares onde então amadurecem. Os ovos, liberados pela fêmea nas artérias pulmonares, são carregados até os pulmões pela circulação, onde embrionam. A partir daí, eclodem larvas de primeiro estágio que penetram nos alvéolos e transitam pela árvore brônquica, sendo deglutidas e saindo com as fezes. Quando o hospedeiro intermediário ou paratênico ingere fezes contaminadas com as larvas, o ciclo se completa (Alicata, 1965).

Do mesmo modo que o roedor, o ser humano se infecta ao ingerir as larvas de terceiro estágio do parasito. Uma vez engolidas, as larvas invadem o tecido intestinal causando enterite, antes de chegar no fígado. Sintomas como tosse, rinorréia, garganta inflamada, mal-estar e febre são comumente relatados quando os vermes chegam aos pulmões. Depois de duas semanas, as larvas alcançam o sistema nervoso central, o que causa uma severa reação inflamatória retendo, assim, as larvas que

acabam morrendo nas meninges e, por sua vez, causam outra forte reação inflamatória desenvolvendo a meningite eosinofílica seguida de encefalite (Sawanyawisuth et al., 2009) ou a angiostrongilíase ocular (Sinawat et al., 2008). Esta infecção não possui tratamento comprovado, apenas corticoides para o alívio da pressão intracraniana e sintomas neurológicos, devido à reação inflamatória (Pien & Pien, 1999) (**Fig.3**).

Até 2008, existe o registro de 2827 casos desta infecção distribuídos em 30 países (Wang et al., 2008). Os locais caracterizados como regiões endêmicas abrangem o continente asiático e ilhas do Pacífico. Os continentes Americano, Africano e Oceania possuem surtos e casos esporádicos da infecção (Wang et al., 2012, 2008; Aghazadeh et al., 2015; Epelboin et al., 2016). No Brasil, a meningite eosinofílica foi reportada pela primeira vez em 2007 e desde então foram identificados hospedeiros intermediários, definitivos e acidentais por toda a costa do país (Caldeira et al., 2007; Maldonado Jr. et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Cognato et al., 2013) Até a presente data, 34 casos de angiostrongilíase cerebral foram reportados (Morassutti et al., 2014).

1.3. Ciclo Biológico do *Angiostrongylus costaricensis*

Angiostrongylus costaricensis é outra espécie capaz de infectar o ser humano, tendo sido relatado pela primeira vez por Morera e Céspedes em 1971 (Morera & Céspedes, 1971), na Costa Rica, principalmente em crianças que apresentavam granulomas com severa infiltração eosinofílica na cavidade abdominal. Os vermes machos medem de 15 mm a 18 mm de comprimento (Santos, 1985), já as fêmeas medem de 24 mm a 27 mm de comprimento (Morera & Céspedes, 1971). Este parasito tem como hospedeiros definitivos pequenos roedores silvestres, como a espécie encontrada no Brasil, *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818), em que indivíduos infectados foram encontrados no Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira et al., 1990). Também possuem os moluscos como hospedeiro intermediário, principalmente da família Veronicellidae (Morera, 1988).

Da mesma forma que a espécie congênica, as larvas de primeiro estágio são liberadas juntamente com as fezes de roedores infectados. Os moluscos, ingerindo as fezes contaminadas, permitem que as larvas cheguem ao tecido fibromuscular, local onde sofrem a primeira muda durante o quarto dia de infecção, se transformando em

larvas de segundo estágio. Entre o 11^o e o 12^o dia pós-infecção sofrem mais uma muda, tornando-se larvas de terceiro estágio, infectantes para os vertebrados, podendo, também, ser eliminadas juntamente com o muco liberado pelos moluscos. A ingestão dessas larvas através da alimentação por frutas, verduras mal lavadas ou o próprio molusco cru ou mal cozido, possibilita que essas larvas penetrem à parede do íleo terminal, onde migram pelos vasos linfáticos mesentéricos, diferenciando-se em larvas de quinto estágio. Após cerca de uma semana, essas larvas de quinto estágio retornam ao intestino onde vão atingir a maturidade sexual, tornando-se vermes (Mota & Lenzi, 1995) (**Fig. 3**).

O homem, ingerindo as larvas de terceiro estágio, pode desenvolver a infecção chamada de angiostrongilíase abdominal e apresentar a doença, que por sua vez é reconhecida a partir de quadros clínicos de abdômen agudo. Os vermes podem determinar lesões sobre o endotélio das artérias mesentéricas, além do desenvolvimento de reações inflamatórias associados aos ovos, larvas e produtos excretados por estes parasitos (Morera & Céspedes, 1971; Morera, 1988). Como sintomas, os pacientes apresentam dores abdominais, febre, anorexia, mal-estar, náusea, vômitos, constipação ou diarreia (Rambo et al., 1997). Essa infecção também não possui tratamento efetivo (Mentz et al., 2004) e a sua rápida evolução pode necessitar intervenção cirúrgica (Graeff-Teixeira et al., 1991). A angiostrongilíase abdominal abrange a maioria dos países das Américas, a partir do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, incluindo Brasil (Morera, 1988; Mentz et al., 2004). O Estado que mais tem registros reportados é o Rio Grande do Sul, ocorrendo em roedores, moluscos e humanos (Laitano et al., 2001; Graeff-Teixeira et al., 1991; Graeff-Teixeira et al., 2005; Rodriguez et al., 2008).

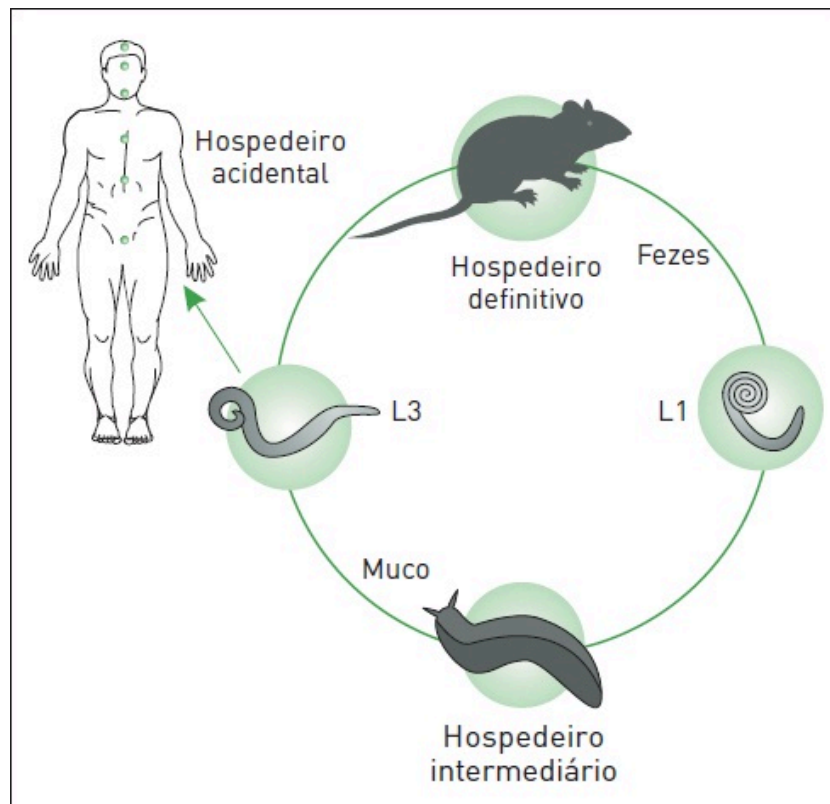


Figura 3: Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*. Fonte: Morassutti et al., 2013.

1.4. Principais Hospedeiros Intermediários de *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*

Diversos moluscos são naturalmente suscetíveis ao nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*.

Como hospedeiros intermediários naturais de *A. cantonensis*, destacam-se caramujos ampularídeos como: *Pila* spp. e *Ampullarius canaliculatus* Lamarck, 1819; os caracóis: *Bradybaena similares* Férrussac, 1821, *Subulina octona* Brugüiere, 1789 e *Achatina fulica* Bowdich, 1822; as lesmas terrestres: *Veronicella* spp., *Deroceras* spp. e *Limax* spp. (Malek and Cheng, 1974; Graeff-Teixeira et al., 2009). Moluscos naturalmente infectados com larvas de *A. cantonensis* foram identificados nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Caldeira et al., 2007; Maldonado Jr. et al., 2010).

Para *A. costaricensis*, as lesmas terrestres americanas – veronicelídeos – são os mais importantes hospedeiros intermediários, sendo representados por

Phyllocaulis variegatus (Semper, 1885) e *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Classe Gastropoda; Heterobranchia; Euthyneura; Panpulmonata; Eupulmonata; Subordem Systellommatophora; Superfamília Rathousioidea; Família Veronicellidae) no Brasil (Lima et al. 1992).

1.4.1. *Phyllocaulis* sp.

Os veronicelídeos são moluscos pulmonados (clado Panpulmonata) que englobam animais com a concha presente, interna ou ausente e são desprovidos de opérculo. O sistema digestório possui mandíbula e rádula com numerosos dentes, o sistema respiratório é modificado em uma cavidade do manto vascularizada. Têm como características a ausência de brânquias, possuindo uma cavidade respiratória que permite utilizar o oxigênio diretamente do ar (pulmão), hermafroditismo, e presença de concha sem opérculo. Habitam o solo ou água doce, podendo ter hábito anfíbio (Thomé, 1976; Rey, 2008).

Graeff-Teixiera e colaboradores (1989) apontaram *Phyllocaulis variegatus* como o principal hospedeiro intermediário natural de *Angiostrongylus costaricensis* no Rio Grande do Sul. Este molusco distribui-se pelo alto Uruguai, planalto médio (norte do RS), serra do sudeste, depressão central, encosta inferior do nordeste, campos de cima da serra, encosta superior do nordeste e litoral (Thomé et al., 1999).

A família Veronicellidae é representada por lesmas sem concha, noto dorsal inteiriço e abaulado, sola do pé ventral-central, delimitada por sulcos pediosos longitudinais e ladeada por largos hiponotos (**Fig. 4**). A cabeça é anterior, com dois pares de tentáculos, sendo os superiores omatóforos contrácteis. O ânus e poro excretor localizam-se posteriormente. Esse táxon possui sistema genital diáulico (duas aberturas genitais), fazem respiração cutânea e sua distribuição abrange locais tropicais e subtropicais. Já foram descritas mais de 100 espécies, ocorrendo cerca de 10 no Brasil. O gênero *Phyllocaulis* (**Fig. 5**) é endêmico do sul da América do Sul (Brasil, Argentina, Uruguai e Chile) e cinco espécies são encontradas no Brasil (Thomé et al., 2006; Rey, 2008).

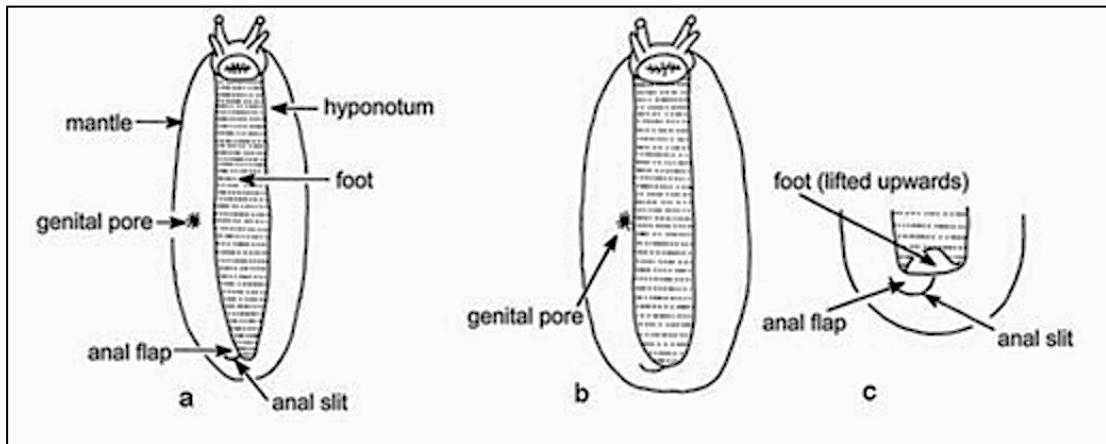


Figura 4: Esquema com características da visão ventral de lesmas da família Veronicellidae. Fonte: Extraído de Capinera et al., 2011.



Figura 5: *Phyllocaulis soleiformis*. Fonte: Agudo-Padrón, A.I., extraído de Paustian, 2003.

1.4.2. *Limacus flavus*

A infraordem Stylommatophora apresenta moluscos com a concha geralmente helicóide, reduzida (podendo estar oculta pelo manto) ou ausente. A cabeça possui dois pares de tentáculos invagináveis, os superiores com omatóforos. Todos são representantes terrestres. A subordem Sigmurethra é o grupo mais numeroso de gastrópodes terrestres. Na família Limacidae, as lesmas têm pequena concha cuneiforme sob a região anterior do manto, com a região posterior do corpo carenada e afilada. Todas as espécies são nativas da Europa e partes adjacentes da Ásia e África. Três gêneros foram introduzidos no Brasil, sendo, um deles o gênero *Limacus*

(Classe Gastropoda; Heterobranchia; Euthyneura; Panpulmonata; Eupulmonata; Infraordem Stylommatophora; Sigmurethra; Superfamília Limacoidea; Família Limacidae) que engloba grandes lesmas europeias de corpo cinza ou amarelado, com manchas mais escuras, possuindo concha interna em forma elíptica ou ovoide (Thomé et al., 2006; Rey, 2008) (**Fig. 6**).



Figura 6: *Limacus flavus*. Fonte: Dilian Georgiev extraído de (Welter-Schultes, 2009).

1.4.3. *Biomphalaria glabrata*

Dentro do clado Hygrophila estão as espécies de moluscos pulmonados aquáticos como os vetores da esquistossomose, fasciolíase e de outros trematódeos. Estes animais possuem apenas um par de tentáculos moveis e não retráteis, olhos sésseis e tegumento liso. A família Planorbidae engloba animais com concha espiral plana ou em hélice, com tentáculos cilíndricos e finos e os órgãos genitais localizados no lado esquerdo do corpo, juntamente com o orifício anal e a pseudobrânquia (prega vascularizada que permite ao animal obter oxigênio da água). Têm a característica peculiar de ter o sangue de cor vermelha. Os animais do gênero *Biomphalaria* (Classe Gastropoda; Heterobranchia; Euthyneura; Panpulmonata; Hygrophila; Superfamília Planorbidae; Família Planorbidae;) (*bis*, dois; *omphalos*, umbigo) possuem concha calcária que cresce na medida em que o animal se desenvolve. As partes moles compreendem cabeça, pé e massa visceral sendo que, esta última, nunca exteriorizada, é abrigada por uma prega do tegumento chamada manto. Quando isolados, os indivíduos podem autofecundar-se. Estão presentes na África e Américas. A espécie *B. glabrata* (**Fig. 7**) caracteriza-se por possuir um tamanho variável entre 1 a 4 cm de diâmetro (dependendo se criada na natureza ou em aquário) e ter uma concha lisa. É encontrada em todos os estados brasileiros situados entre a Paraíba e o Rio Grande do Sul, e também nos estados do Pará, Maranhão e

Piauí, constituindo o mais eficiente vetor da esquistossomose mansônica nas Américas (Rey, 2008).

Além de outros trabalhos já terem explorado e mostrado a susceptibilidade *B. glabrata* ao gênero *Angiostrongylus* (Yousif and Lammler, 1975; Barçante et al., 2003; Banevicius et al., 2006; Tunholi-Alves et al., 2012) sugere-se a possibilidade deste nematódeo terrestre adaptar-se em novos hospedeiros intermediários aquáticos devido à pressão de mudanças climáticas extremas que vem ocorrendo com frequência (Ibrahim, 2007; Morley et al., 2010).



Figura 7: *Biomphalaria glabrata*. Fonte: Grupo de Helminologia e Malacologia Médica (HMM) da Fiocruz Minas, extraído de <http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/esquistossomose-sequenciado-genoma-de-caramujo-hospedeiro-do-parasita-causador-da-doenca/>.

1.5. Diagnóstico da infecção por *Angiostrongylus* sp. em moluscos

A identificação da presença de larvas de *Angiostrongylus* em moluscos naturalmente infectados, já foi realizada por Alicata (1962), Wallace & Rosen (1969), Andersen e colaboradores (1986), Graeff-Teixeira e colaboradores (1989), Caldeira e colaboradores (2007), Maldonado Júnior e colaboradores (2010), entre outros. Na maioria destes estudos o método de escolha para o diagnóstico é o método padronizado por Ash (1970), baseado na digestão artificial do animal. Alguns métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção. A técnica de RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase e Análise do Polimorfismo de Fragmentos de Restrição) desenvolvida por Caldeira e colaboradores (2003) é capaz de discernir as diferentes espécies de *Angiostrongylus*, porém não apresenta sensibilidade compatível com a PCR (Reação

em Cadeia da Polimerase) em tempo real desenvolvida por Qvarnstrom e colaboradores (2007) que é capaz de identificar a presença do DNA do parasito a partir de apenas uma larva. Outros testes também foram desenvolvidos para rápida identificação de moluscos infectados que visam aplicação em estudos de campo, como o método de Amplificação Isotérmica (LAMP) desenvolvido por Chen e colaboradores (2011).

1.5.1. Análise do microbioma como recurso diagnóstico

Os animais e plantas possuem micro-organismos residentes que vem desempenhando funções metabólicas por, pelo menos, 500 milhões de anos (Cho Ilseung, 2012). Essa persistente associação demonstra que tanto os hospedeiros eucariotos como os micro-organismos simbioss são beneficiados por esta relação cooperativa (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). A microbiota intestinal, por exemplo, é encontrada em praticamente qualquer metazoário - invertebrados e vertebrados - e, sabe-se que a atividade dessa comunidade de micro-organismos e seus produtos metabólicos influenciam diretamente uma variedade de aspectos da fisiologia dos metazoários (Lee & Hase, 2014). O microbioma é altamente dependente de cada espécie e meio ambiente, afetando o *fitness* da população (Bahrndorff et al., 2016). Inclui bactérias, vírus, arqueias e fungos que vivem em todos os organismos, sendo a composição dessas comunidades variável de acordo com a localização anatômica (Cho Ilseung, 2012; Bahrndorff et al., 2016).

Os micro-organismos do intestino de animais de solo desempenham um papel indispensável na digestão dos alimentos e são de extrema importância ecológica no ciclo global do carbono (Bahrndorff et al., 2016). Os simbioss desempenham um papel importante na fixação, reciclagem e melhoramento do nitrogênio, além da enorme capacidade de degradação da celulose (Bahrndorff et al., 2016; Anderson et al., 2012). Essa capacidade explicaria a extraordinária eficiência na digestão das fibras vegetais pelos gastrópodes pulmonados e a grande dependência destes com os micro-organismos do intestino (Davidson, 1976; Charrier and Daguzan, 1980; Charrier et al., 2006).

O potencial diagnóstico e terapêutico do microbioma vem tomando espaço na comunidade médica e científica nos últimos dez anos. O conhecimento acerca do papel do microbioma tem importância na orientação clínica e pode se tornar um forte

aliado na busca de respostas sobre decisões terapêuticas e no monitoramento de tratamentos (Bahrndorff et al., 2016; Machiels et al., 2017). Pesquisas desenvolvidas para essa investigação têm permitido identificar a composição das comunidades de micro-organismos também em animais não modelos (Bahrndorff et al., 2016) uma vez que contribui na diversidade genética, modula doenças, influencia processos metabólicos e é essencial para a imunidade (Grice, 2014). Uma vez que se sabe que perturbações ambientais tem efeito no microbioma (Feldahaar, 2011; Engel & Moran, 2013; Bahrndorff et al., 2016), existe, atualmente, um grande interesse em compreender quais outros fatores podem afetar o microbioma dos animais, a fim de entender como ocorrem as diferenças das colonizações entre os ecossistemas, espécies e/ou populações (Bahrndorff et al., 2016).

1.5.2. Análise proteômica como recurso diagnóstico

A proteômica consiste na abordagem em larga escala de produtos de genes para pesquisas envolvendo apenas proteínas (Graves & Haystead, 2002), através da identificação e quantificação das proteínas de um sistema biológico (como células, órgãos, fluidos biológicos, organismos) em um determinado momento (Valledor & Jorin, 2011; Barbosa et al., 2012). Assim, a proteômica comparativa se torna uma ferramenta promissora na identificação de proteínas biomarcadoras (Rifai et al., 2006), através da identificação da expressão de proteínas alteradas – em nível celular ou tecidual, sub-celular, em complexos de proteínas e em fluidos biológicos e também no diagnóstico e detecção precoce de doença (Hanash, 2003).

Na infecção de moluscos já se demonstrou que o estresse causado pela infecção de *Schistosoma mansoni* faz os níveis de proteínas e carboidratos diminuírem drasticamente em indivíduos de *B. glabrata*, durante a fase de desenvolvimento larval do trematódeo (Becker, 1980). Em moluscos infectados com *Angiostrongylus* spp., estudos têm demonstrado alterações em *B. glabrata* com relação a biologia reprodutiva do caramujo afetando a oviposição e também modificações no metabolismo do animal, diminuindo, por exemplo, a quantidade de proteínas na hemolinfa (Tunholi et al., 2011; Tunholi-Alves et al., 2011).

Além da hemolinfa, outro material biológico que apresenta proteínas é o muco dos moluscos. Composto por 90% de água, lectinas, mucopolissacarídeos,

glicoproteínas, ácido urônico, ácido siálico, hexosaminas e proteínas - entre outros componentes - (Davies et al., 1990; Skingsley et al., 2000; Smith, 2002), o muco dos moluscos possui diversas funções, como auxiliar na alimentação, na proteção contra a dessecação, na reprodução, na locomoção, na defesa contra predadores e na adesão do animal ao substrato (Denny & Gosline, 1980; Smith, 2002).

O precursor do muco é produzido pelo molusco sob a forma de pequenos grãos altamente higroscópicos que são armazenados dentro das células epiteliais na forma de grânulos revestidos com uma membrana protetora resistente à água que os mantém secos. Esses grânulos revestidos só se abrem depois que liberados da célula, um processo varia de acordo com a espécie de molusco mas que sugere-se ser mediado pelo contato com ATP que atua na ativação de canais de cálcio ou por meio de elevado pH (Deyrup-Olsen et al., 1992; Deyrup-Olsen, 1996; Thomas, 2013). Quando liberados, os grânulos absorvem muito rapidamente até 100 vezes o volume inicial de água formando então o muco (Thomas, 2013). Assim sendo, este é um material biológico de fácil coleta e não necessita intervenção invasiva no animal para sua obtenção.

2. Objetivo

Investigar aspectos moleculares, microbiológicos e biológicos da relação entre *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis* e hospedeiros intermediários e suas repercussões na rede de interações com outros organismos.

2.1 Objetivos Específicos:

- Através da análise do proteoma do muco, comparando a expressão de proteínas deste material biológico de moluscos não infectados e infectados com *Angiostrongylus cantonensis*;
- Através da análise do microbioma das fezes, comparando a comunidade de microorganismos das fezes de moluscos não infectados e infectados com *Angiostrongylus cantonensis* e moluscos infectados com *Schistosoma mansoni*;
- Através da observação de aspectos da biologia do hospedeiro e da relação paraisto-hospedeiro;

3. Justificativa

Os invertebrados compreendem quase 99% de toda a diversidade de animais (Ponder & Lunney, 1999; Lydeard et al., 2004). Estes organismos ocupam um nível trófico importante na pirâmide ecológica de energia, entretanto, a maioria já foi extinta ou esta severamente ameaçada e ainda recebem pouca atenção científica do que os vertebrados, atraindo um esforço menor na pesquisa (Lydeard et al., 2004). A malacofauna terrestre é um dos mais diversos e ameaçados grupos de invertebrados (Lydeard et al., 2004) e apresenta reconhecida importância na manutenção dos ecossistemas, principalmente em virtude da ciclagem de nutrientes (Colley, 2012).

As rápidas mudanças no meio ambiente e a perda da biodiversidade, combinadas com a escassez de recursos para resolver estes problemas são uma grande preocupação global (Berg et al., 2004). Em diversas partes do mundo a degradação ambiental induzida pelo ser humano tem afetado negativamente esse grupo de animais (Backeljau et al., 2001). Este cenário tem despertado maior atenção da sociedade sobre a importância da conservação da biodiversidade, tema atualmente prioritário nas

agendas políticas nacionais e internacionais (de Marques et al., 2002), e, em vista disso, o aumento do conhecimento sobre os padrões de distribuição de espécies diferentes e suas associações com fatores ambientais, fator-chave para a conservação e gestão da biodiversidade (Berg et al., 2004). Desta maneira, intensifica-se cada vez mais o reconhecimento do valor intrínseco da diversidade biológica e do seu papel na manutenção dos sistemas necessários à vida (de Marques et al., 2002).

Moluscos infectados com *Angiostrongylus* são alvos de estudos de prevalência da infecção, nos quais são coletados em grande quantidade para posterior análise em busca da identificação do parasito. Além de espécies invasoras, moluscos endêmicos também podem agir como hospedeiros intermediários, sofrendo perda da população para essas coletas (Caldeira et al., 2007; Qvarnstrom et al., 2007; Martin-Alonso et al., 2015; Kim et al., 2014; Spratt, 2015), além das populações já sofrerem com a perda de habitat para os moluscos introduzidos e desenvolvimento humano (Lydeard et al., 2004).

As técnicas de diagnóstico da infecção por *Angiostrongylus* em moluscos, não levam em consideração aspectos ecológicos e de conservação da biodiversidade - uma vez que para total eficácia de tais identificações é sempre necessária a morte do hospedeiro intermediário, mesmo nas técnicas moleculares como o polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (Caldeira et al., 2003), o método de amplificação isotérmica (Chen et al., 2011) e o PCR em tempo real, que identifica a presença do DNA do parasito no tecido e muco, necessitando de ao menos uma larva presente (Qvarnstrom et al., 2007).

Assim, o desenvolvimento de uma metodologia capaz de identificar moluscos infectados *in vivo*, onde não será necessária a eliminação do molusco, contribuirá para a conservação destes animais em áreas de constante vigilância.

Compreender efeitos biológicos na infecção como a investigação das proteínas no muco e o microbioma nas fezes de moluscos infectados poderá auxiliar na melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro, ainda pouco explorada em hospedeiros intermediários. Biomarcadores associados ao microbioma já foram identificados para uso em estudos de metabolismo e doenças autoimunes (Finucane et al., 2014; Dietert & Silbergeld, 2015). Ademais, bactérias, além de serem potenciais biomarcadores também podem atuar no controle ou interrupção da transmissão de parasitos. A bactéria do gênero *Enterobacter* foi encontrada em mosquitos resistentes à *Plasmodium falciparum*, interferindo no desenvolvimento do parasito no momento

que precede a invasão do epitélio intestinal do inseto (Djadid et al., 2011). *Trypanosoma cruzi* também foi afetado por ação da prodigiosina, substância produzida por bactérias intestinais de insetos vetores (Azambuja et al., 2005).

Estabelecer e compreender as associações entre parasito e hospedeiro e ainda entre o microbioma, parasito e hospedeiro podem revelar inovações no diagnóstico e ainda estratégias para a interrupção da transmissão de parasitos.

4. Referências Bibliográficas

Aghazadeh, M., Reid, S.A., et al. (2015). A survey of *Angiostrongylus* species in definitive hosts in Queensland. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **4**(3), 323–328. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.06.003.

Alicata, J.E. (1962). *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningoencephalitis of man in Hawaii and Tahiti. *Canadian Journal of Zoology* **40**(1), 5–8. doi:10.1139/z62-002.

Alicata, J.E. (1965). Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Advances in Parasitology* **3**, 223-248.

PMID: 5334821.

Andersen, E. et al. (1986). First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **35**(2), 319–322. doi:

10.4269/ajtmh.1986.35.319.

Anderson, K.E. et al., (2012). Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. *Molecular Ecology* **21**(9), 2282–96. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05464.x.

Ash, L.R. (1970). Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *The Journal of Parasitology* **56**(2), 249–253. PMID: 5445821.

Bahrndorff, S. et al. (2016). The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics* p.5304028. doi: 10.1155/2016/5304028.

Banevicius, N.M.S. et al. (2006). Behavior of *Angiostrongylus costaricensis* in Planorbids. *Brazilian Journal of Biology* **66**(1B), 199–204. doi: 10.1590/S1519-69842006000200003.

Barçante, T.A. et al. (2003). *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology Research* **91**(6), 471–475. doi: 10.1007/s00436-003-1000-9.

Caldeira, R.L. et al. (2007). First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**(7), 887–889. doi: 10.1590/S0074-02762007000700018.

Caldeira, R.L. et al. (2003). Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**(8), 1039–1043. doi: 10.1590/S0074-02762003000800011.

Capinera, J.L., White, J. & Bernon, G. (2011). Terrestrial Slugs of Florida. University of Florida. http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/misc/gastro/slugs_of_florida.htm#top

Carvalho, O.D.S. et al. (2012). *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**(6), 740–746. doi: 10.1590/S0074-02762012000600006.

Charrier, M. et al. (2006). Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol Res* **39**, 669–681. doi: /S0716-97602006000500010.

Charrier, M. & Daguzan, J. (1980). Food consumption, production and energy evaluation in *Helix aspersa* Müller (a terrestrial pulmonated gasteropod). *Annales de la nutrition et de l'alimentation* **34**(1), 147–66. doi: 10.4067/S0716-97602006000500010.

Chen, R. et al. (2011). Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasites & Vectors* **4**(1), 204. doi: 10.1186/1756-3305-4-204 doi: 10.1186/1756-3305-4-204.

Cho Ilseung, B.M.J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature* **13**, 260–270. doi: 10.1038/nrg3182.

Cognato, B.B. et al. (2013). First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **46**(5), 664–665. doi: 10.1590/0037-8682-0073-2013.

Colley, E. (2012). Moluscos terrestres e a malacologia paranaense: histórico e importância no cenário nacional. *Estudos de Biologia* **34**(303), 75. doi: 10.7213/estud.biol.6127.

- Davidson, D.H.** (1976). Assimilation efficiencies of slugs on different food materials. *Oecologia*, **26**(3), 267–273. doi: 10.1007/BF00345295.
- Engel, P. & Moran, N.A.** (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews* **37**(5), 699–735. doi: 10.1111/1574-6976.12025.
- Epelboin, L. et al.** (2016). *Angiostrongylus cantonensis* infection on Mayotte Island, Indian Ocean, 2007-2012. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**(5), p.e0004635.
- amplicon reads. *Nature methods* **10**(10), 996–998. doi: 10.1371/journal.pntd.0004635.
- Feldahaar, H.** (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* **36**(5), 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x.
- Graeff-Teixeira, C. et al.** (1990). Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **32**(3), 147–150. doi: 10.1590/S0036-46651990000300001.
- Graeff-Teixeira, C. et al.** (2005). Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38**(4), 310–315. doi: 10.1590/S0037-86822005000400006.
- Graeff-Teixeira, C. et al.** (1993). On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **88**(3), 487–489. doi: 10.1590/S0074-02761993000300020.

Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H.L. (1991). Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **33**(5), 373–378. doi: 10.1590/S0036-46651991000500006.

Graeff-Teixeira, C., da Silva, A.C.A. & Yoshimura, K. (2009). Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* **22**(2), 322–348. doi: 10.1128/CMR.00044-08.

Graeff Teixeira, C. et al. (1989). *Phillocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**(1), 65–68. doi: 10.1590/S0074-02761989000100012.

Graves, P.R. & Haystead, T.A.J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(1), 39–63. doi: 10.1128/MMBR.66.1.39–63.2002.

Grice, E.A. (2014). The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* **33**(2), 98–103. doi: 10.12788/j.sder.0087.

Ibrahim, M.M. (2007). Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in relation to some ecological and biological factors. *Parasite* **14**(1), 61–70. doi: 10.1051/parasite/2007141061.

Kim, J.R. et al. (2014). Diverse Gastropod Hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm, Globally and with a Focus on the Hawaiian Islands. *PLoS ONE* **9**(5), p.e94969. doi: 10.1371/journal.pone.0094969.

- Laitano, A.C. et al.** (2001). Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae: Gastropoda). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **34**(1), 95–97. doi: 10.1590/S0037-86822001000100015.
- Lima, L.C. et al.** (1992). *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) (Mollusca: Soleolifera) from Belo Horizonte (MG, Brasil) como hospedeira intermediária potencial do *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **34**(2), 117–120. doi: 10.1590/S0036-46651992000200006.
- Machiels, K. et al.** (2017). Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. *Gut* **66**(1), 79–88. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309398.
- Maldonado Jr, A. et al.** (2010). First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**(7), 938–41. doi: 10.1590/S0074-02762010000700019.
- Malek, E.A. & Cheng, T.C.** (1974). Medical and economic malacology. Academic Press, Inc. pp.398 New York, NY.
- Mentz, M.B., Graeff-teixeira, C. & Garrido, C.T.** (2004). *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **46**(2), pp.73–75. doi: S0036-46652004000200003.

Morassutti, L.A. Graeff-Teixeira, C and Rodrigues, R. (2013). Zoonoses. In *Medicina interna na prática clínica* (ed. Filho, F. L. and Barros, E.), pp. 530-535. Artmed, Porto Alegre, BR.

Morassutti, A.L. et al. (2014). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **109**(4), 399–407. doi: 10.1590/0074-0276140023.

Morera, P. (1988). Angiostrongilíase abdominal um problema de saúde pública? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **21**(2), 81–83.

Morera, P. & Céspedes, R. (1971). *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **18**(1,2), 173–185. PMID: 5527668.

Morley, N.J., Wilson, M.J. & Glen, D.M. (2010). Aquatic molluscs as auxiliary hosts for terrestrial nematode parasites: implications for pathogen transmission in a changing climate. *Parasitology* **137**(7), 1041–1056. doi: 10.1017/S0031182010000016.

Mota, E.M. & Lenzi, H.L. (1995). *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**(6), 707–709. doi: 10.1590/S0074-02761995000600010.

Rodriguez, R. et al. (2008). Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **50**(6), 339–341. doi: 10.1590/S0036-46652008000600005.

Paustian, M. (2003). *Phyllocaulis soleiformis* (d'Orbigny, 1835). Terrestrial Slugs Web.
Extraído de: <http://terrrslugs.myspecies.info/taxonomy/term/2003>

Pien, F.D. & Pien, B.C. (1999). *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. *International Society for Infectious Diseases*, **3**(3), 161–163. doi: 10.1016/S1201-9712(99)90039-5.

Qvarnstrom, Y. et al. (2007). PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(5), 1415–1419. doi: 10.1128/AEM.01968-06.

Rambo, P.R., Agostini, A.A. & Graeff-Teixeira, C. (1997). Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil - Prevalence and parasite burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**(1), 9–14. doi: 10.1590/S0074-02761997000100002.

Rey, L. (2008). Parasitologia 4a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Santos, C.P. (1985). Redescricao de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre, *Proechimys* sp., na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongyloidea). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**(1), 81-83.

Sawanyawisuth, K. et al. (2009). Clinical Factors Predictive of Encephalitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **81**(4), 698–701. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0309.

Slom, T. et al. (2002). An Outbreak of Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis* in Travelers Returning from the Caribbean. *New England Journal of Medicine* **346** (9), 668-675. doi: 10.1056/NEJMoa012462.

Sinawat, S. et al. (2008). Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases. *Eye* (London, England) **22**(11), 1446–1448. doi: 10.1038/eye.2008.135.

Thomé, J.W. (1976). Revisão do gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 (Mollusca Veronicellidae). *Inheringia* **49**, 67–90.

Thomé, J.W., da Silva, R.S., Gomes, S.R., Pitta, I.R.C. (1999). Registro de cópula cruzada e concomitante em *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **16**(3), 909-911. doi: 10.1590/S0101-81751999000300029.

Thomé, J.W., Gomes, S.G. & Picanço, J.B. (2006). Os caracóis e as lesmas dos nossos bosques e jardins. 1st ed. USEB, ed., Brasil: USEB.

Tunholi-Alves, V.M. et al. (2011). Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**(3), 220-223. doi: 10.1016/j.jip.2011.08.009.

Tunholi-Alves, V.M. et al. (2012). Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* **131**(2), 143–147. doi: 10.1016/j.exppara.2012.03.003.

Wallace, G. & Rosen, L. (1969). Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacologia* 7: 427–438. 57.

Wang, Q.-P. et al. (2008). Human angiostrongyliasis. *The Lancet Infectious Diseases*, **8**(10), 621–630. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70229-9.

Wang, Q.-P. et al. (2012). Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**(4), 389–95. doi: 10.1007/s10096-011-1328-5.

Welter-Schultes, F. (2009). Species summary for *Limax flavus*. AnimalBase. Early zoological literature online - AnimalBase Project Group.

Yousif, F. & Lammler, G. (1975). The suitability of several aquatic snails as intermediate hosts for *Angiostrongylus cantonensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **47**(3), 203–210.

CAPÍTULO I

Manuscrito 1

Biomarkers of *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni* infection in intermediate hosts

Journal: *Parasitology*

Title: Biomarkers of *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni* infection in intermediate hosts

Running title: Biomarkers of infection in mollusks

Joana Borges Osório^a, Alessandra Loureiro Morassutti^{a*}, Leandro de Mattos^a, Jeremy Potriquet^b, Adriana Giongo^c, Renata Russo F. Cândido^a, Jason Mulvenna^b, Malcolm Jones^d, Carlos Graeff-Teixeira^a

^a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Instituto de Pesquisas Biomédicas (Laboratório de Parasitologia Molecular), Faculdade de Biociências (Laboratório de Biologia Parasitária), Porto Alegre, RS 90060-900, Brazil

^bQIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, Herston Road, Queensland 4006, Australia

^c Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Instituto do Petróleo e Recursos Naturais, Porto Alegre, RS 90060-900, Brazil

^dThe University of Queensland, School of Veterinary Science, Gatton, Queensland 4343, Australia

*Corresponding author: Alessandra Loureiro Morassutti

Address: Laboratório de Biologia Parasitaria, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),

Porto Alegre, RS

CEP: 90060- 900, Brazil.

Telephone: +55 51 33534947

Fax number: +55 51 33203000 ext:3568

E-mail address: almorassutti@gmail.com

ABSTRACT

Current tools for diagnosis of infected mollusk requires the death of the animal, which may dramatically affect ecological parameters. This work aimed to identify biological markers for diagnosing mollusks infection *in vivo*, by microbiome and proteome profile, using *Biomphalaria glabrata* and *Phyllocaulis* sp. as intermediate hosts, and *Schistosoma mansoni* and *Angiostrongylus cantonensis* as parasitic infection. For proteomic studies, proteins were extracted from mucus samples and identified by LC-MS/MS. For microbiome analysis, DNA was extracted from mollusks fecal samples for 16S rRNA high-throughput sequencing. Mucus from infected *Phyllocaulis* sp. revealed 26 proteins were up-regulated and 15 proteins were down-regulated compared to non-infected slugs. Microbiome of *B. glabrata* infected with *A. cantonensis*, revealed a decrease of the genus *Vogesella*, while *B. glabrata* infected with *S. mansoni*, showed a reduction of the genus *Mycoplasma* and an increase of genus *Niabella*. All infected mollusks presented a significant decrease of the genus *Fluviicola* and an increase of the family *Weeksellaceae*. Our results showed that both protein and microbiome profiles are promising markers of parasite infection, and these methods could be used for *in vivo* diagnosis. Further studies approaching other infectious agents of mollusks should be considered to validate its uses.

Keywords: Biomarkers; Mollusk Infection; Proteomics; Microbiome; Host-parasite Relationship

KEY FINDINGS

- Infected snails revealed 26 proteins up-regulated and 15 proteins down-regulated;
- Infected *Phyllocaulis* fecal microbiome had a significant decrease of Bacteroidetes phylum;
- Fecal microbiome of *B. glabrata* infected with *A. cantonensis* revealed a decrease of the genus *Vogesella*;
- Fecal microbiome of *B. glabrata* infected with *S. mansoni*, showed an increase of the genus *Niabella*;
- The genus *Fluviicola* and the family *Weeksellaceae* might be used as infection biomarkers.

INTRODUCTION

The nematode *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935), originally from China, is the most important causative agent of eosinophilic meningitis (Graeff-Teixeira et al., 2009). This parasite infects humans accidentally, being reported in approximately 30 countries, especially in Asia (Barratt et al., 2016) and recently in the Americas, Australia and the Mayotte Island (Morassutti et al., 2014; Aghazadeh et al., 2015; Epelboin et al., 2016).

A. cantonensis has rodents as definitive hosts and a wide range of intermediate hosts (Wang et al., 2008; Wang et al., 2012; Chan et al., 2015), being able to infect a large number of terrestrial and aquatic mollusks (Caldeira et al., 2007; Carvalho et al., 2012). *Angiostrongylus costaricensis*, an endemic species of South America, has as its most important intermediate host, slugs belonging to the family Veronicellidae (Morera and Ash, 1970; Graeff Teixeira et al., 1989; Graeff-Teixeira et al., 1993; Pena et al., 1995; Laitano et al., 2001). *Sarasinula* and *Phyllocaulis* are the most widespread genera distributed throughout Argentina, South Brazil, Paraguay and Uruguay (Thomé, 1976).

Studies to identify *A. cantonensis* infection in natural populations of mollusks have as the standardized technique by Ash (1970) based on the artificial digestion of the animal with pepsin and hydrochloric acid. Some molecular methods have been developed in order to increase the sensitivity and specificity of detection such as the restriction fragment length polymorphism (Caldeira et al., 2003); the isothermal amplification method (Chen et al., 2011) and real-time PCR (Qvarnstrom et al., 2007). However, all of these diagnostic methods require tissues of the snails for

analysis, being impossible to keep the animals alive, directly affecting the population dynamics of hosts, and consequently impairing studies on natural infection in these animals (Wobeser, 2006).

An alternative for alive diagnostic would be the only use of mucus instead of whole mollusk, however, a very low number of infected animals present larvae in their mucus (Bonetti and Graeff-Teixeira, 1998; Qvarnstrom et al., 2007). Therefore, the aim of this study was to investigate possible changes in the fecal microorganism's community and in the proteins of mucus from the terrestrial slug *Phyllocaulis* sp. and the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with *A. cantonensis* and *Schistosoma mansoni*, without neither killing nor harming the mollusks, as an alternative method of detecting this infection.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

Experiments were performed with the approval of the Animal Ethics Committee of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Brazil) under the registration number 14/00399 and with the approval of the Animal Ethics Committee from the QIMR Berghofer Medical Research Institute (Australia) under Project P1468.

Collection of mollusks and maintenance of the parasite lifecycle

This study was conducted using two different mollusks as experimental intermediate hosts for *Angiostrongylus cantonensis*: *Phyllocaulis* sp. (Gastropoda: Veronicellidae) slugs were collected in the city of Porto Alegre, Brazil, and reared at

the Laboratory of Biological Parasitology, at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Brazil). For the *A. cantonensis* infection, it was used a Vila Fátima strain (Cognato et al., 2013), maintained through passages in *B. glabrata* and *Rattus norvegicus* at the Laboratório de Biologia Parasitária at PUCRS.

Biomphalaria glabrata snails were provided by the Schistosomiasis Resource Center, National Institute of Allergy and Infectious Disease (USA) and reared at the Queensland Institute of Medical Research (QIMR Berghofer), Australia, for *Schistosoma mansoni* and *A. cantonensis* infection. The strain of *A. cantonensis* used for this infection was sourced from Dr. Rogan Lee at Westmead Hospital and kept at QIMR Berghofer in *B. glabrata* and *Rattus norvegicus* (Aghazadeh et al., 2015).

Biomphalaria glabrata infection and collection of feces

Biomphalaria glabrata snails were kept in glass aquaria with autoclaved dechlorinated water and fed with lettuce leaves *ad libitum*. Twenty-seven snails were randomly split into three groups of nine individuals each, separated into triplicates of three specimens each. The experimental groups were categorized as control group (CG), infected with *A. cantonensis* (IGAc) and infected with *Schistosoma mansoni* (IGSm).

Each snail was infected with 6 miracidia of *S. mansoni* or 10,000 first stage larvae of *A. cantonensis*. After one-week post infection of IGSm and 30 days post infection of IGAc, pools of three specimens of each replicate were placed in a 50 mL polypropylene container tube with 4 mL of autoclaved dechlorinated water for 24 hours. Feces were collected and stored at -80°C for microbiome studies. In order to confirm the infection of snails, larval stages of parasites were searched into tissues. Snails were anesthetized by hypothermia and then placed in Fekete solution (37%

Formaldehyde; 70% Ethanol; Glacial Acetic Acid) for fixation of the snail's soft body and then imbedded into paraffin for 12h. Sections of 4 µm were stained with hematoxylin/eosin and larvae were visualized and recorded by Aperio ScanScope® AT (Leica Biosystems) (Appendices 1).

Phyllocaulis sp. infection and collection of feces and mucus

Ten specimens of slugs were kept into plastic bowls with garden soil and fed with lettuce leaves, carrot, chayote and potato *ad libitum*. The slugs were fasted for 6 days. Two groups of five animals each were categorized as control group (CG) and infected with *A. cantonensis* (IGAc). Approximately 6,000 *A. cantonensis* first-stage larvae were used for slug infection. After approximately 30 days post-infection, the snail's bodies were gently scraped with a swab moistened with distilled water for the mucus collection and stored in a micro tube with 0.5 mL of distilled water in the freezer at -80°C. For the collection of feces, the slugs were kept in individual containers until defecate and samples were collected and stored in the freezer at -80°C for posterior DNA extraction for microbiome studies. For confirmation of the infection slugs were anesthetized by hypothermia, euthanized and artificially digested with 0.03% pepsin (Sigma P-7125) solution in 0.7% HCl for 2 hours at 37°C. The digested tissue was observed with stereomicroscope for larvae visualization.

Microbiome assays

Biomphalaria glabrata

Total DNA extraction was performed using the DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. This experiment was made in

triplicate for each group treatment, using the feces pool of three snails for each sample. DNA samples with concentration of 5 ng/μL, determined by NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) were submitted to the Australian Centre for Ecogenomics (ACE, Australia). DNA amplification was performed using the universal primers 926F and 1392wR (reference) that target the 16S rRNA V6/V8 region. The amplicons were paired-end sequenced on an Illumina MiSeq platform at the ACE. The raw paired reads from Illumina sequencing with 150 nucleotides length were joined using `join_paired_ends.py` (http://qiime.org/scripts/join_paired_ends.html) with `fastq-join` method.

Phyllocaulis sp.

DNA extraction was performed as described for *B. glabrata* and experiments were also in triplicates. PCR amplification was done by using the prokaryotic primers targeting the V4 region 515f and 806r according to Bates et al. (2011). DNA samples were quantified using Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen) and sequenced through Ion PGM high-throughput sequencing (Thermo Fisher) at the Instituto do Petróleo e Recursos Naturais (IPR-PUCRS, Brazil).

High throughput sequencing analysis

To remove platform specific adapters, primer sequences, short (< 100 bp) and low quality reads (< Phred scale 30), PRINSEQ was used (PREprocessing and INFORMATION of SEquences) (Schmieder and Edwards, 2011). The remaining sequences were de-replicated and sorted in descending order of abundance of reads in operational taxonomic units (OTUs) using a 99% identity value through the USEARCH program v7.0.1090 (Edgar, 2010), according to the algorithm UPARSE

(Edgar, 2013). The chimeras were removed using *RDP gold* database (Cole et al., 2014).

The taxonomic assignment was obtained using QIIME v1.8 (Caporaso et al., 2010) through RDP Naive Bayesian Classifier (Wang et al., 2007) algorithm with 1.0 score confidence using the GreenGenes 13.8 database (DeSantis et al., 2006).

Community diversity analyses were also performed using QIIME software v1.8 (Caporaso et al., 2010). Alpha diversity was used to assess the microorganism diversity within the community, comparing the total diversity in the different experimental groups (Lozupone and Knight, 2008). The method of choice used to measure the diversity was Chao 1 as the qualitative species-based measurement and Shannon as the quantitative species-based measurement (Lozupone and Knight, 2008). A phylogenetic diversity rarefaction curve was generated to observe the cumulative number of species recorded as a function of sampling effort with the aim to estimate species richness (Hughes et al., 2001; Lozupone and Knight, 2008). The alpha diversity comparison between treatments was performed through T-test

Beta diversity was used to measure the partitioning of diversity among more than one community (Koleff et al., 2003) examining the extent to which these communities differences can be used to evaluate microbial community changes over time and different disease states (Lozupone and Knight, 2008). Unique Fraction metric was used for that purpose (UniFrac), a qualitative measure that considers the presence or absence of lineages (Lozupone and Knight, 2008). Ordination of samples was assessed with the multivariate statistical technique Principal Components Analysis (PCoA) Jackknifing (Gower, 1966; Lozupone and Knight, 2008). To evaluate the significance of observed difference of the beta diversity found in the different groups,

the nonparametric Analysis of Similarities Method was used (ANOSIM) (Clarke, 1993).

Statistical assessment of the data was performed using Statistical Analyses of Metagenomic Profiles (STAMP) software v 2.1.3 (Parks et al., 2014) for the detection of biological relevancy of the data. The microbiome analysis of *B. glabrata* was performed comparing the results from the three experimental groups (CG, IGAc and IGSm) using ANOVA for multiple groups with Tukey-Kramer *post hoc* test (confidence level = 0.95) and Eta-squared as effect size measurement. The microbiome analysis of *Phyllocaulis* sp. was performed comparing the results from CG samples with samples from the IGAc assessed by the Two Tailed T-Test. Results were significant when *p*-value was less than 0.05.

Proteomic experiment

Using the mucus collected from *Phyllocaulis* specimens, the extraction of proteins and generation of peptides were performed by the combined and modified method FASP (Potriquet et al., 2017) using 0.5 M Dithiothreitol (Astral Scientific), 0.5 M Iodocetoamide (BioRad), PNGase F (New England BioLabs), 8 M urea (SIGMA) cellulose filters for centrifuge 30 kDa (Millipore) with 100 mM TEAB (Buffer bicarbonate triethylammonium - SIGMA), 20 µg of trypsin (Sigma) in 40 µL of 1 mM Hydrochloric acid 1:20. The samples were left overnight at 37°C. Samples were centrifuged three times in 50 mM TEAB and placed in Speed Vac (Savant SPD121P). The assessment of the concentration of the peptides was performed using Millipore ZipTip pipette tips Carbon 18 (Sigma-Aldrich) in 70% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid.

Eluted peptides were analysed by LC-MS/MS on a Shimadzu Prominence Nano

HPLC (Shimadzu Scientific Instruments) coupled into a nanoelectrospray ion source of a TripleTOF 5600+ mass spectrometer (AB SCIEX) for tandem mass spectrometry with the following parameters: ion spray voltage was set to 2300V, de-clustering potential of 150 V, curtain gas flow 25, nebuliser gas 1 (GS1) 15 and interface heater at 150°C (Potriquet et al. 2016). All analyses were performed using Information Dependant Acquisition. Analyst 2.0 (Applied Biosystems) was used for data analysis. The acquisition protocol consisted of the use of an Enhanced Mass Spectrum scan with 10 seconds exclusion time and 50 mDa mass tolerance. A cycle of 2800 ms was used to acquire full scan TOFMS data over the mass range 320 – 2000 m/z and product ion scans over the mass range of 100–2000 m/z for up to 25 of the most abundant ions with a relative intensity above 100 and a charge state of +2 – +4. Full product ion spectra for each of the selected precursors were then used for subsequent database searches (Brinkman et al., 2015).

Searches were performed using ProteinPilot (version 4, ABSCIEX). All searches were conducted using X! Tandem v.2013.09.01.1 (Craig and Beavis, 2004). Spectral data was also searched against a database composed of Gastropod protein sequences from GenBank and *Angiostrongylus* worms transcriptomic data (angiostrongylus.lad.pucrs.br, *in preparation*). The quantification of these identified proteins was performed using the Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Spectra (SWATH) (Gillet et al., 2012). Validation of the results was performed with False Discovery Rate (FDR), where peptides with low scores (FDR = 0.02) were removed. After performing quality control, one comparison analysis matrix was created and then applied the significance test with $p < 0.05$.

RESULTS

Microbiome analysis of Biomphalaria glabrata

After trimming low-quality bases and removing short reads, a total of 162,980 16S rRNA sequences for CG, 177,668 sequences for IGAc and 177,668 sequences for IGSm were classified in 1192 OTUs. Bacteria sequences were distributed within 9 phyla, 17 classes, 29 orders, 33 families, and 25 genera (or respective OTU). Archaea sequences were lower than the established cut down of 1% of reads.

The dominant phylum was Bacteroidetes with mean abundance of 49.2% for the CG, 50.8% for IGAc and 69.4% for IGSm, followed by the phylum Proteobacteria with mean abundance of 12.4% for CG and 24% for IGAc and 18.6% for IGSm. Four groups were statistically significant ($p \geq 0.05$) compared to the control group: Nitrospirae and Tenericutes presented a decrease in the infected groups; Bacteroidetes had a significant increase in IGSc and Verrucomicrobia was significant in the snails infected with *A. cantonensis* (Fig. 1A).

Regarding bacterial families, 17 of them composed more than 1% of the total reads each and all those families together were responsible for more than 97% of the total reads in the samples. *Cryomorphaceae* represented almost half of the entire samples in the CG and in both IGAc and IGSm decreased abruptly. *Weeksellaceae* was the most representative family in infected snails having the relative abundance of less than 1% in the CG. Statistical analysis ($p \geq 0.05$) showed that organisms from *Cryomorphaceae*, *Comamonadaceae* and *Nitrospiraceae* families had a negative correlation to the infections, showing a decrease and occasionally an absence of these organisms in the two infected groups. The family *Xanthomonadaceae* showed to be significantly present in mollusks infected with *S. mansoni*, and so a

Sphingobacteriales OTU. *Mycoplasmataceae*, in contrast, showed a significant decrease in snails infected with *S. mansoni*. Families *Rhodocyclaceae* and *Weeksellaceae* exhibited a positive correlation with the infected animals, the latter mainly present in IGSm. *Chitinophagaceae* exhibited significant difference in all of the groups being absent in the CG, present in IGAc and increased in IGSc.

At the genus level, the most abundant CG organism was the genus *Fluviicula*. Likewise, both infected groups presented similar results, being its most representative organisms from a *Weeksellaceae* OTU (Fig. 1B). Statistical analysis showed that the genus *Fluviicula* and a *Comamonadaceae* OTU were significantly lower in infected snails. Genera *Nitrospira* and *Mycoplasma* showed a decrease in the IGSm, and *Vogesella* showed a decrease in the IGAc. *Niabella*, OTUs from *Xanthomodaceae* and *Sphingobacteriales* groups were absent in the CG and present in IGSm. A *Weeksellaceae* OTU had significant difference between all the samples being almost absent in the CG, present in IGAc and representing more than 50% of the reads from snails infected with *S. mansoni* (Fig. 1B).

The alpha diversity analysis of species richness of the groups was performed considering the maximum depth for the rarefaction curve at 10.000 sequences per sample. The metrics used were Chao1 (Fig. 3), PD Whole Tree, Observed Species/OTUS and Shannon. All of the results of alpha diversity analysis showed an increase of diversity in *A. cantonensis* (IGAc) and *Schistosoma mansoni* (IGSm) groups in relation to the control group (Fig. 1C). The beta diversity UNIFRAC Unweighted analysis shown by PCoA plots, it is possible to verify the formation of three distinct clusters (Fig. 1D)

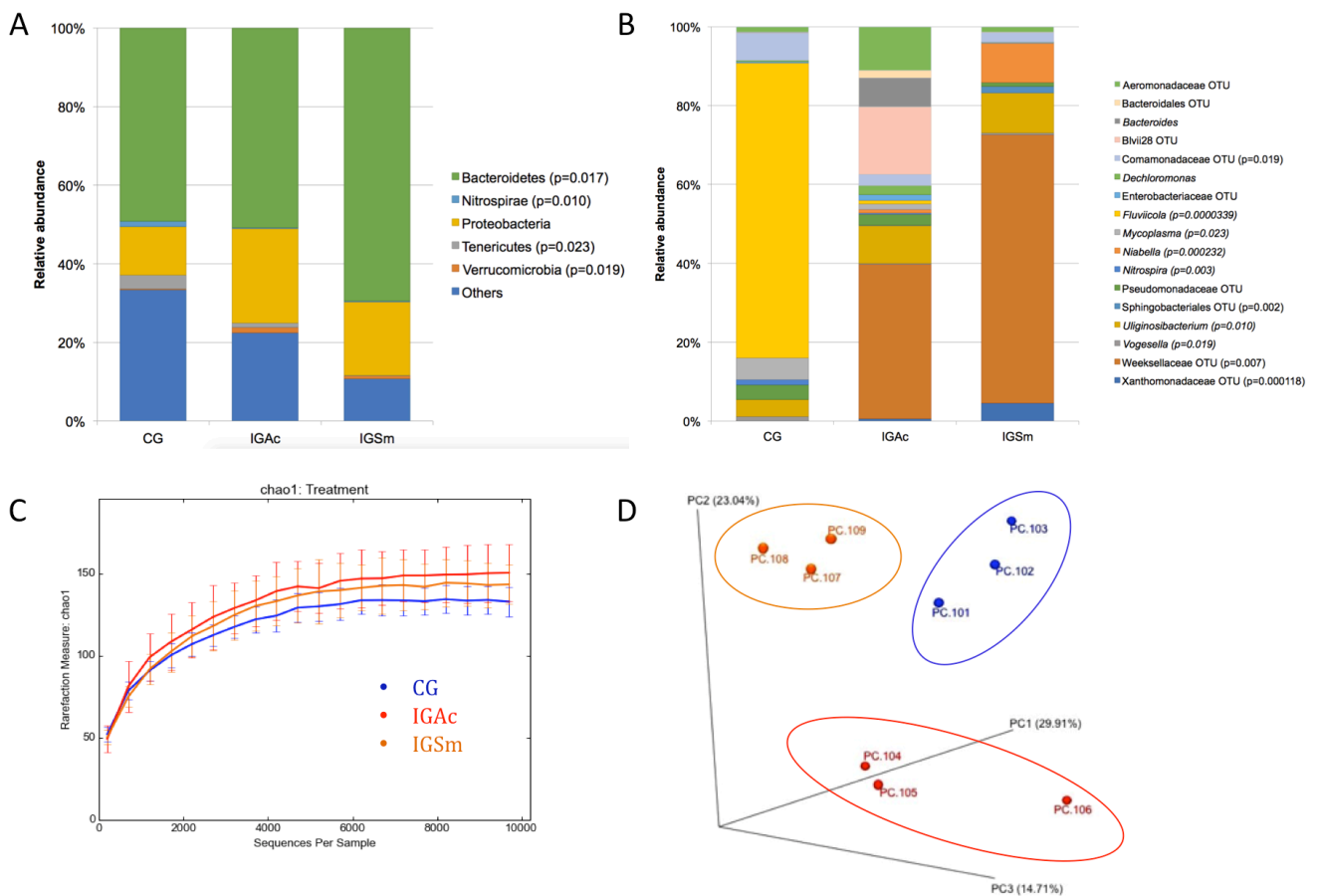


Figure 1. Microbiome from *Biomphalaria glabrata* treatment groups (CG, control group; IGAc, infected group with *A. cantonensis*; IGSm, infected group with *S. mansoni*). (A) Phyla relative abundance of each *B. glabrata* treatment group; (B) genera relative abundance of each *B. glabrata* treatment group; (C) Alpha diversity rarefaction curve of richness estimates by Chao 1; (D) Principal Coordinates Analysis (PCoA) summarize the microbial community compositional differences between samples (PC 101-103: control group in blue; PC104-106: infected group with *A. cantonensis* in red; PC107-109: infected group with *S. mansoni* in orange). *p* values indicate the phyla that differed significantly among samples ($p < 0.05$)

Microbiome analysis of *Phyllocaulis*:

After trimming low-quality bases and removing short reads, a total of 162,980

16S rRNA sequences for the CG and 177,668 sequences for IGAc were classified in 4728 OTUs. Bacteria sequences were distributed within 15 phyla, 23 classes, 40 orders, 51 families, and 42 genera (or respective OTU) classified based on QIIME taxonomy. Excluded taxa had an average of 5% between samples.

Using the cut down of 1% of reads, 6 phyla had representativeness. The phylum Proteobacteria presented a mean of 38.3% and 37.7% for the CG and IGAc, respectively, followed by 36.2% for the CG and 28.9% for IGAc of phylum Bacteroidetes. *Phyllocaulis* sp. microbiome was mainly dominated by the phylum Actinobacteria and Fusobacteria. Bacteroidetes was the only phyla presenting statistically significant difference ($p \geq 0.05$), showing a decrease when the slugs were infected with *A. cantonensis* (Fig. 2A).

In the family level, 12 taxa were representative with more than 1% of reads. To both groups, *Sphingobacteriaceae* family exhibited higher abundance but no statistical significant was observed.

At the genus level, 9 genera could be included with more than 1% of reads. For the CG, *Sphingobacterium* and a Bacteria OTU showed more abundance between the samples. For IGAc, the largest representativeness was *Sphingobacterium* with not difference statistically significant as well (Fig. 2B).

The alpha diversity analysis of species richness of the groups was performed considering the maximum depth for the rarefaction curve at 10.000 sequences/sample. The metrics used were Chao 1 (Fig. 2C), PD Whole Tree, Observed Species and Shannon (Appendices 3). The results showed no differences in species richness considering the different measures applied for alpha-diversity. The analysis of beta diversity UNIFRAC unweighted using the Principal Coordinates Analysis plots (PCoA) indicated relative approximation of all the samples, being impossible to

separate the groups by distinct clusters (Fig. 2D).

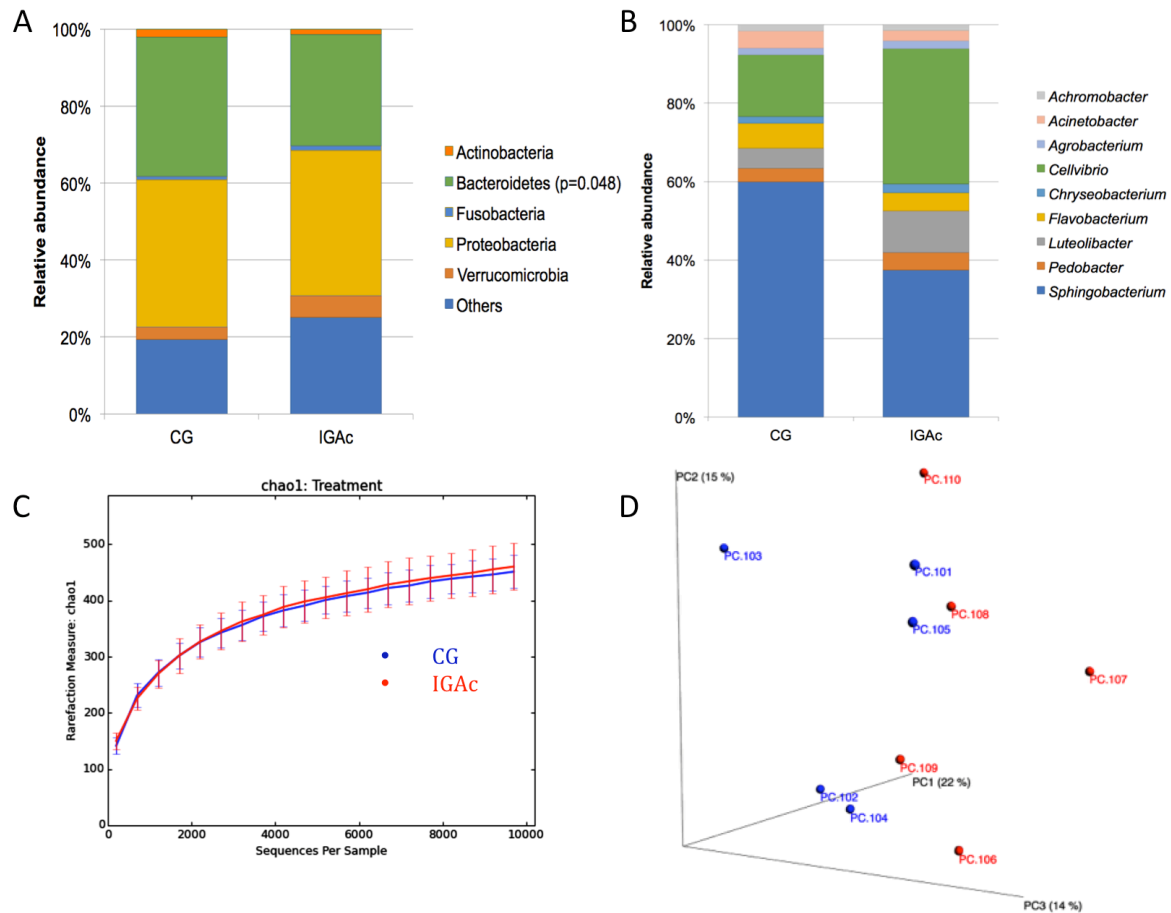


Figure 2. Microbiome from *Phyllocaulis* sp. treatment groups (CG, control group; IGAc, infected group with *A. cantonensis*). (A) phyla relative abundance of each *Phyllocaulis* sp. treatment group; (B) genera relative abundance of each *Phyllocaulis* sp. treatment group; (C) Alpha diversity rarefaction curve of richness estimates by CHAO 1; (D) Principal Coordinates Analysis (PCoA) summarize the microbial community compositional differences between samples (PC101-105: control group in blue and PC106-110: infected group with *A. cantonensis* in red). p values indicate the phyla that differed significantly among samples ($p < 0.05$)

Proteomic analysis of Phyllocaulis mucus:

Through ESI-MS, a total of 103 proteins were found in samples of *Phyllocaulis* sp. mucus of infected and not infected snails. Four proteins were identified associated with *Angiostrongylus* transcriptomic data

(angiostrongylus.lad.pucrs.br, *in preparation*) being Actin, ATP synthase subunit alpha, ATP synthase subunit beta, AAA family ATPase CDC48 subfamily and ribosomal protein S11 domain in mucus from infected slugs. Moreover, the group IGAc showed 41 proteins differentially expressed. Twenty-six over expressed proteins and fifteen less expressed proteins, compared to the CG (Fig. 7). The most up-regulated protein was classified as F-BAR protein with SH3 domain. The down-regulated protein presented a similarity related to the Elongation Factor-Tu from *Mycoplasma* sp. All the proteins have matched with *Biomphalaria glabrata* sequences database.

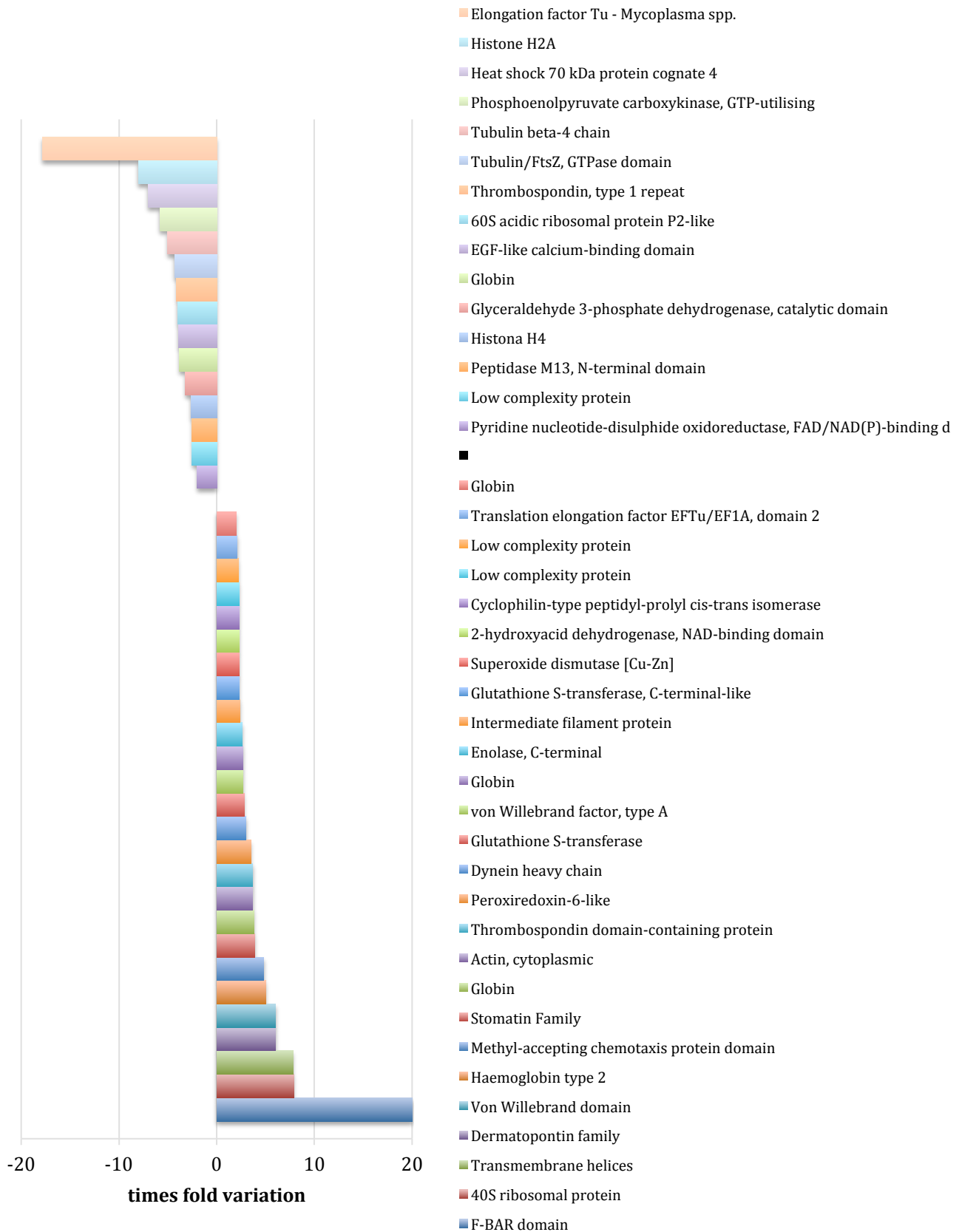


Figure 3: Proteins variation among infected and non-infected mucus of *Phyllocaulis* slugs. Not infected animals (represented as the time zero).

DISCUSSION

The association between host and microorganisms involves defense, reproduction and metabolism functions (Benson et al., 2010). Diseases can cause changes and disturbances in the pattern of naturally associated microorganisms of hosts (Pantos et al., 2003; Nobre et al., 2004; Pantos and Bythell, 2006; Mouchka et al., 2010; Cho Ilseung, 2012; Kay et al., 2015).

Our results from culture-independent 16S rRNA gene-based analyses revealed 23 possible markers for *Biomphalaria glabrata* infection, highlighting the genus *Fluviicula* and *Mycoplasma*. Little is known about the genus *Fluviicula*, but it has been found associated in the upper respiratory tract microbiota of healthy bottlenose dolphins (Johnson et al., 2009) and not related with disease. Here it was found decreasing to less than 1% of the total fecal bacteria composition of infected snail. Comparing to the almost 50% composition into non-infected controls, we suggest its possible use as a control marker of non-infection, however further studies are necessary to better characterize this genus among healthy marker.

The *Mycoplasma* genus is associated to disease in bivalve mollusks (Romalde and Barja, 2010). Our analyses, showed a decrease of this genus when snails were infected with *A. cantonensis* and even more when infected with *S. mansoni*. Our proteomic approach corroborate whit this findings, showing the elongation factor Tu (EF-Tu) of *Mycoplasma* being the most down regulated protein found in infected slugs. This protein is involved in the bacteria adhesion to the host cells (Jonák, 2007), and this down-regulation could be an effect of the immune response by the mollusk against *Angiostrongylus* infection affecting *Mycoplasma* colonization. Together these

findings may suggest a positive association of these helminths infection on disburden of *Mycoplasma* infestation by interfering either in the *Mycoplasma* process of infection or possibly promoting more efficient defensive response of snails, allowing resistance of infection.

On the other hand, microorganisms of the order Sphingobacteriales, family *Xanthomonadaceae* and genus *Niabella* were absent in control snails and present in infected groups and the family *Weeksellaceae* had a significant increase in infected molluscs. Interestingly, taxa Sphingobacteriales, *Xanthomonadaceae* and *Weeksellaceae* are within microbiome microorganism of the nematode *Caenorhabditis elegans*. We hypothesize that these present/increased microorganisms could represent the natural components of microbiota of the *Angiostrongylus* and *Schistosoma* larvae. Further investigations are needed to better characterize the larvae microbiota components because members of the family *Weekselaceae* may not be exclusive of all nematodes since it was not a prominent microbe within the infection of cockroaches with the nematode *Leidynema appendiculatum* (Vicente et al., 2016).

Snails infected with *Schistosoma mansoni* demonstrated here an increase in bacteria from the genus *Niabella*. These taxa includes gram-negative bacteria initially described from greenhouse soil (Kim et al., 2007) but recently isolated from nephridia and bladder of *Hirudo verbana*, the medicinal leeches (Nelson and Graf, 2012; Glaeser et al., 2013). This association has been suggested for acting as nutrients recycling to promote the fasting of leeches (Kikuchi et al., 2009). Together with its strictly adapted infection to *B. glabrata*, the infections with *S. mansoni* associated with *Niabella* microorganism increase, may suggest a co-evolutionary process, which allows adaptation of *B. glabrata* during the stressing infection with schistosomatide, possibly revealing an important mechanism of parasitism establishment.

An interesting fact observed among the infected groups of *B. glabrata* was that the IGSm group presented a greater genetic diversity of taxa, but a smaller number of rare OTUs estimated by CHAO1. On the other hand, the IGAc group showed a greater value of CHAO1. PCoA analysis suggests a distinct pattern of presence and absence taxa among the infected groups. The results of beta-diversity UNIFRAC unweighted showed that the bacterial community structure of fecal samples from *B. glabrata* had a more uniform distribution between the three groups, indicative of the similarity of communities between the samples and distinct patterns of dissimilarity between the groups.

Four possible markers of protein could be highlighted into mucus of infected mollusks with *A. cantonensis*: Actin, ATP synthase subunit beta, AAA family ATPase and ribosomal protein S11 domain sequences. Those proteins are actually from *Angiostrongylus* repertory, since sequences matched with *A. cantonensis* transcriptomic data. As these proteins are not being secreted by nematode cells, one explanation for these obtained results could be the death of larvae during infection, killed by the mollusk immune system (Bonetti and Graeff-Teixeira, 1998; Lange et al., 2017) and possibly released into mucus as degradation products or as a consequence of larvae molting process (Page et al., 2014). Also, L3 may be shed by the encapsulation process by the granuloma formation which normally occurs next to the mucus channel (Mendonca et al., 2003). However, not many larvae are released by this process as shown by others studies (Bonetti and Graeff-Teixeira, 1998; Qvarnstrom et al., 2007). Thus, reinforces the idea of this work of finding proteins instead of larval stages of parasites as a more sensitive diagnostic tool.

At the same meaning, the proteins BgLBP/BPI1 and LBP/BPI1.2 were found only in infected *Phyllocaulis* mucus. These proteins have been identified in egg

masses from *B. glabrata* suggesting a parental investment for immunoprotection against pathogens (Hathaway et al., 2010; Baron et al., 2013). These two proteins have lipopolysaccharide binding function and bactericidal permeability increased power, representing an important component of innate immune system against gram-negative bacteria (Bingle and Craven, 2004; Beamer et al., 2008; Baron et al., 2013). Interestingly, the most bacteria highlighted here being differentially expressed during infection are gram-negative, possibly showing a complex feedback process of microbiota interactions together with protein response during parasite infection. In addition, the most over expressed protein of infected mollusk was the F-BAR family. These proteins are cytosolic proteins with membrane-deforming function (Itoh et al., 2005). They serve as linkers between the cytoskeleton and lipid membranes, allowing fundamental processes to occur such as cell migration, endocytosis and exocytosis (Jeon, 2009). Mollusk tissue damage provoked by the helminthic infection during intimate contact with the larvae could be the explanation for the up-regulation of F-BAR protein as a way to mediate the mechanic injury and immune cells migration response to the location of the larvae (Frost et al., 2009).

CONCLUSION

Little is known about the composition of snail microbiota (Cardoso et al., 2012), the mucus composition, dynamics and pathogen shedding (Loker, 2013). These pattern variations can be associated with host stress or disease (Zilber-Rosenberg et al., 2008). Our results have shown that the infection by *A. cantonensis* can modify the expression of proteins in the mucus secretions and the microbiological community of the intermediate host, most likely because of the immune response elicited by the infection. Those proteins and microorganisms taxa found in the

infected groups could be a starting point to the development of molecular markers and better tools for studying processes such as transmission, the evolution of host specificity and patterns of speciation (Criscione et al., 2005). These findings contribute to the currently limited state of knowledge regarding the host-parasite and host-microbiome interactions, generating more contents to the knowledge resources that will allow fundamental advances in the study of microbial biodiversity, biogeography, ecology, global protein and gene diversity, evolution and community dynamics (Gilbert et al., 2011). Further studies should be performed to understand the alterations in the proteome and microbiome expanding host-parasite models. This improved knowledge may lead to better methods development and to establish the role of biomarkers as a noninvasive approach for infection diagnosis.

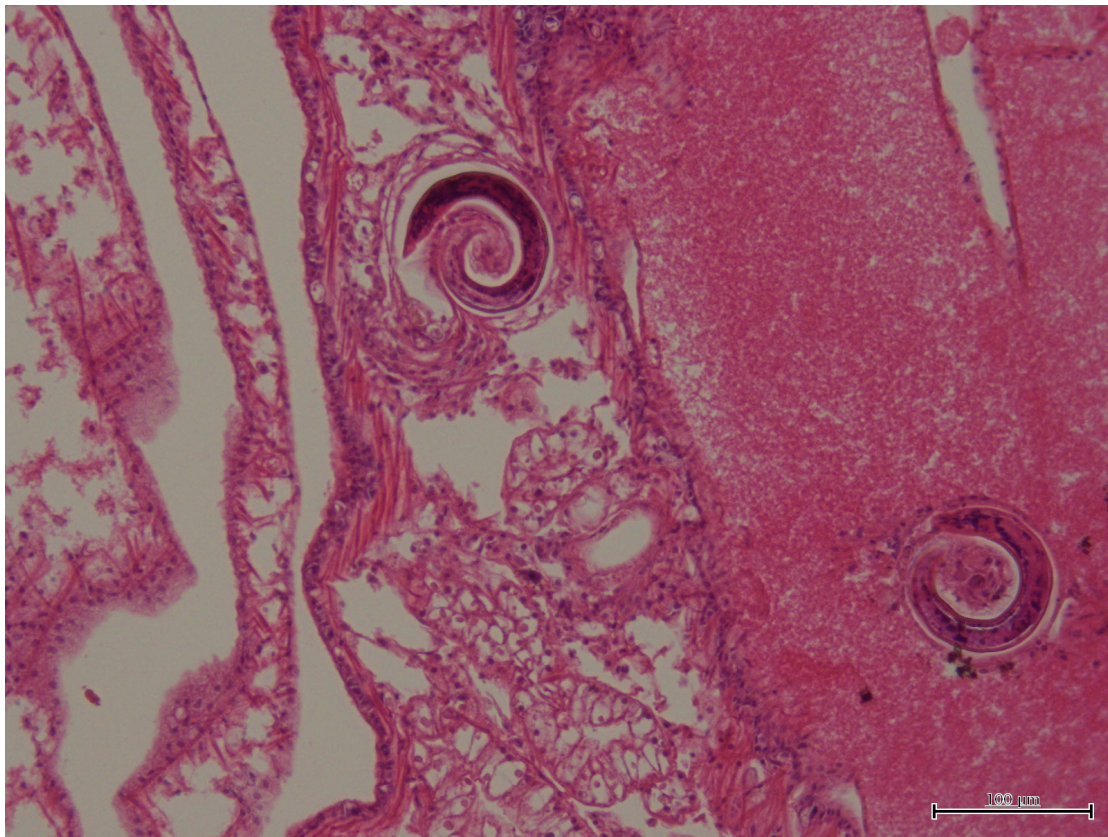
ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank High Performance Computing Lab - LAD/PUCRS for allowing access to run the high-throughput sequences analyses.

FINANCIAL SUPPORT:

Financial support was provided by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Brasil (CNPq,401904/2013-0), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) “Edital 32/2010”. C. Graeff-Teixeira received a CNPq PQ 1D fellowship and grants 307005/2014-3.

APPENDICES



A1: Third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in *Biomphalaria glabrata* tissue after 30 days of infection (HE x100µm).

REFERENCES

Aghazadeh, M., Reid, S.A., et al. (2015). A survey of *Angiostrongylus* species in definitive hosts in Queensland. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **4**(3), 323–328. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.06.003

Ash, L.R. (1970). Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *The Journal of Parasitology* **56**(2), 249–253. PMID: 5445821

Baron, O.L. et al. (2013). Parental transfer of the antimicrobial protein LBP/BPI protects *Biomphalaria glabrata* eggs against oomycete infections. *PLoS Pathogens* **9**(12), p.e1003792. doi: 10.1371/journal.ppat.1003792

Barratt, J. et al. (2016). *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*, **143**(9), 1087–1118. doi: 10.1017/S0031182016000652

Beamer, L.J., Carroll, S.F. & Eisenberg, D. (2008). The BPI/LBP family of proteins: A structural analysis of conserved regions. *Protein Science* **7**(4), 906–914. doi: 10.1002/pro.5560070408

Benson, A.K. et al. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(44), 18933–18938. doi: 10.1073/pnas.1007028107

Bingle, C.D. & Craven, C.J. (2004). Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends in Immunology* **25**(2), 53–5. doi: 10.1016/j.it.2003.11.007

Bonetti, V.C.B.D. de & Graeff-Teixeira, C. (1998). *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of molluscs. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* **31**(3), 289–294. doi: 10.1590/S0037-86821998000300006

Brinkman, D.L. et al. (2015). Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *BiomedCentral Genomics* **16** (407). doi: 10.1186/s12864-015-1568-3

Caldeira, R.L. et al. (2007). First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**(7), 887–889. doi: 10.1590/S0074-02762007000700018

Caldeira, R.L. et al. (2003). Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**(8), 1039–1043. doi: 10.1590/S0074-02762003000800011

Caporaso, J.G. et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**(5), 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303

Cardoso, A.M. et al. (2012). Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes. *PLoS ONE* **7**(11), p.e48505. doi: 10.1371/journal.pone.0048505

Carvalho, O.D.S. et al. (2012). *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**(6), 740–746. doi: 10.1590/S0074-02762012000600006

Chan, D. et al. (2015). The Prevalence of *Angiostrongylus cantonensis/mackerrasae* complex in molluscs from the Sydney region. *PLOS ONE* **10**(5), p.e0128128. doi: 10.1371/journal.pone.0128128

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265–270. doi: 10.2307/4615964

Chen, R. et al. (2011). Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasites & Vectors* **4**(1), 204. doi: 10.1186/1756-3305-4-204

Cho Ilseung, B.M.J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature* **13**, 260–270. doi: 10.1038/nrg3182

Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* **18**(1), 117–143. doi: 10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x

Cognato, B.B. et al. (2013). First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **46**(5), 664–665. doi: 10.1590/0037-8682-0073-2013

Cole, J.R. et al. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **42**(Database issue), D633-642. doi: 10.1093/nar/gkt1244

Craig, R. & Beavis, R.C. (2004). TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* **20**(9), 1466–1467. doi: 10.1093/bioinformatics/bth092

Criscione, C.D., Poulin, R. & Blouin, M.S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* **14**(8), 2247–2257. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02587.x

DeSantis, T.Z. et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental microbiology* **72**(7), 5069–5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05

Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* (Oxford, England) **26**(19), 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461

Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial. *Nature Methods* **10**(10), 996-998. doi: 10.1038/nmeth.2604

Epelboin, L. et al. (2016). *Angiostrongylus cantonensis* infection on Mayotte Island, Indian Ocean, 2007-2012. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**(5), p.e0004635. amplicon reads. *Nature methods* **10**(10), 996–998. doi: 10.1371/journal.pntd.0004635

Frost, A., Unger, V.M. & De Camilli, P. (2009). The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell* **137**(2), 191–196. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.010

Gilbert, J.A. et al. (2011). The Earth Microbiome Project: The Meeting Report for the 1st International Earth Microbiome Project Conference, Shenzhen, China, June 13th-15th 2011. *Standards in Genomic Sciences* **5**(2), 243–247. doi: 10.1371/journal.ppat.1003216

Gillet, L.C. et al. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**(6), p.O111.016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717

Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**(3/4), 325. doi: 10.2307/2333639

Graeff-Teixeira, C. et al. (1990). Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **32**(3), 147–150. doi: 10.1590/S0036-46651990000300001

Graeff-Teixeira, C. et al. (2005). Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38**(4), 310–315. doi: 10.1590/S0037-86822005000400006

Graeff-Teixeira, C. et al. (1993). On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **88**(3), 487–489. doi: 10.1590/S0074-02761993000300020

Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H.L. (1991). Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **33**(5), 373–378. doi: 10.1590/S0036-46651991000500006

Graeff-Teixeira, C., da Silva, A.C.A. & Yoshimura, K. (2009). Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* **22**(2), 322–348. doi: 10.1128/CMR.00044-08

Graeff Teixeira, C. et al. (1989). *Phillocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**(1), 65–68. doi: 10.1590/S0074-02761989000100012

Hathaway, J.J.M. et al. (2010). Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Mollusca). *Developmental and Comparative Immunology* **34**(4), 425–435. doi: 10.1016/j.dci.2009.12.001

- Hughes, J.B. et al.** (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10), 4399–4406. doi: 10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001
- Itoh, T. et al.** (2005). Dynamin and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Developmental Cell* **9**(6), 791–804. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.005
- Johnson, W.R. et al.** (2009). Novel diversity of bacterial communities associated with bottlenose dolphin upper respiratory tracts. *Environmental Microbiology Reports* **1**(6), 555–562. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00080.x
- Jonák, J.** (2007). Bacterial elongation factors EF-Tu, their mutants, chimeric forms, and domains: Isolation and purification. *Journal of Chromatography B* **849**(1), 141–153. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.053
- Kay, G.L. et al.** (2015). Differences in the faecal microbiome in *Schistosoma haematobium* infected children vs. uninfected children. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**(6), p.e0003861. doi: 10.1371/journal.pntd.0003861
- Kikuchi, Y., Bomar, L. & Graf, J.** (2009). Stratified bacterial community in the bladder of the medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Environmental Microbiology* **11**(10), 2758–2770. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02004.x

- Kim, B.-Y. et al.** (2007). *Niabella aurantiaca* gen. nov., sp. nov., isolated from a greenhouse soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(3), 538–541. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02004.x
- Koleff, P., Gaston, K.J. & Lennon, J.J.** (2003). Measuring beta diversity for presence –absence data. *Journal of Animal Ecology* **72**(72), 367–382. doi: 10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x
- Laitano, A.C. et al.** (2001). Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae: Gastropoda). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **34**(1), 95–97. doi: 10.1590/S0037-86822001000100015
- Lange, M.K. et al.** (2017). Gastropod-derived haemocyte extracellular traps entrap metastrongyloid larval stages of *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior*. *Parasites & Vectors* **10**(1), 50. doi: 10.1186/s13071-016-1961-z
- Loker, E.S.** (2013). Gastropod Immunobiology. In Invertebrate Immunity (ed. Söderhäll K.), *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience, Austin, TX.
- Lozupone, C.A. & Knight, R.** (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *Federation of European Microbiological Societies of Microbiology Reviews* **32**(4), 557–78. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x

Morassutti, A.L. et al. (2014). Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **109**(4), 399–407. doi: 10.1590/0074-0276140023

Morera, P. & Ash, L.R. (1970). Studies on the intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971). *Boletín Chileno de Parasitología* **25**(3/4). ISSN: 0365-9402

Morera, P. & Céspedes, R. (1971). *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **18**(1,2), 173–185.

Mouchka, M.E., Hewson, I. & Harvell, C.D. (2010). Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integrative and Comparative Biology* **50**(4), 662–674. doi: 10.1093/icb/icq061

Nelson, M.C. & Graf, J. (2012). Bacterial symbioses of the medicinal leech *Hirudo verbana*. *Gut Microbes* **3**(4), 322–331. doi: 10.4161/gmic.20227

Nobre, V. et al. (2004). Alteration in the endogenous intestinal flora of swiss webster mice by experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**(7), 717–720. doi: 10.1590/S0074-02762004000700009

Romalde, J.L. & Barja, J.L. (2010). Bacteria in molluscs: good and bad guys. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (ed. Méndez-Vilas A.). Microbiology Series No 2, Vol 1. pp. 136-147, FORMATEX, Santiago de Compostela, Spain.

Page, A.P. et al. (2014). Enzymology of the nematode cuticle: a potential drug target? *International Journal for Parasitology - Drugs and drug resistance* **4**(2), 133–141. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.05.003

Pantos, O. et al. (2003). The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. *Environmental Microbiology* **5**(5), 370–82. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00427.x

Pantos, O. & Bythell, J.C. (2006). Bacterial community structure associated with white band disease in the elkhorn coral *Acropora palmata* determined using culture-independent 16S rRNA technique. *Diseases of Aquatic Organisms* **69**(1), 79-88. doi: 10.3354/dao069079

Parks, D.H. et al. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* (Oxford, England) **30**(21), 3123–3124. doi: 10.1093/bioinformatics/btu494

Pena, G.P.M., Andrade Filho, J. de S. & de Assis, S.C. (1995). *Angiostrongylus costaricensis*: First record of its occurrence in the state of Espírito Santo. *Revista do*

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **37**(4), 369–374. doi: 10.1590/S0036-466519950004000

Thomé, J.W. (1976). Revisão do gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 (Mollusca Veronicellidae). *Inheringia* **49**, 67–90.

Potriquet, J. et al. (2017). A modified FASP protocol for high-throughput preparation of protein samples for mass spectrometry. *PLoS ONE* **12**(7): e0175967. doi: 10.1371/journal.pone.0175967

Qvarnstrom, Y. et al. (2007). PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(5), 1415–1419. doi: 10.1128/AEM.01968-06

Schmieder, R. & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* (Oxford, England), **27**(6), 863–864. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026

Schulz, C. & Faisal, M. (2010). The bacterial community associated with the leech *Myzobdella lugubris* Leidy 1851 (Hirudinea: Piscicolidae) from Lake Erie, Michigan, USA. *Parasite* **17**(2), 113–121. doi: 10.1051/parasite/2010172113

Vicente, C.S.L. et al. (2016). Composition of the cockroach gut microbiome in the presence of parasitic nematodes. *Microbes and Environments* **31**(3), 314–320. doi: 10.1264/jsme2.ME16088

Wang, Q. et al. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(16), 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07

Wang, Q.-P. et al. (2008). Human angiostrongyliasis. *The Lancet Infectious Diseases*, **8**(10), 621–630. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70229-9

Wang, Q.-P. et al. (2012). Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**(4), 389–95. doi: 10.1007/s10096-011-1328-5

Wobeser, G.A. (2006). Essentials of disease in wild animals. Blackwell Publishing Professional, pp. 243, Ames, IA. isbn: 0813805899

Zilber-Rosenberg, I. et al. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **32**(5), 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

CAPÍTULO II

Manuscrito 2

Infection of *Angiostrongylus costaricensis* associated with the slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming

Journal: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Infection of *Angiostrongylus costaricensis* associated with the slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming

Rubens Rodriguez¹, Aline Saldanha da Silva Sandri¹, Matheo Foresti Casagrande, Sérgio Machado Porto¹, Suzete R. Gomes², Joana Borges Osório³, Carla Aristonara Muller³, Bianca Barbieri Cognato³, Carlos Graeff-Teixeira³, Alessandra L. Morassutti³.

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo e Instituto de Patologia de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Laboratório de Malacologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Brasil.

³Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências e Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Abdominal Angiostrongyliasis (AA) is an inflammatory disease caused by the colonization of mesenteric arteries by *Angiostrongylus costaricensis*, marked by the presence of eosinophilic infiltrate. The disease is acquired by ingestion of raw infected mollusks with the third stage larvae of the parasite. Many species of terrestrial mollusks have been reported to successfully develop *Angiostrongylus* spp. larvae, in different countries from Central and South America. Here, we describe the case of a female patient, 69 years, farmer, from Marau - Rio Grande do Sul. She reported consuming of grapes from her backyard. Serum sample was collected for immunological tests, showing positivity for *Angiostrongylus* infection. After the surgical treatment the patient improved her symptoms and the liver lesion disappeared. Slugs climbing at grapevine localized on the backyard of residence were collected, weighted and digested individually for larvae examination. The specie was identified as *Meghimatium pictum*, using morphological and molecular criteria by the PCR of COI gene fragments. It has a parasitic burden of 4,5%, corroborating with previous findings in natural infection of mollusks with *A. costaricensis*. This is the first time that this specie of mollusk, native from China, was found as intermediary host of *A. costaricensis*.

Introduction

Abdominal Angiostrongyliasis (AA) is an inflammatory disease caused by the colonization of mesenteric arteries by *Angiostrongylus costaricensis* Morera and

Cespedes, 1971. The disease is marked by the presence of eosinophilic infiltrate, due to eggs and larva (L1) trapped in tissues, causing vasculitis more frequently affecting the enteric-intestinal portions than the appendix and the cecum (Graeff-Teixeria, 1991). AA has been found mimicking acute appendicitis (Kröner and Argueta, 2015) and Meckel's diverticulum (Hulbert et al, 1992) which challenges pathologists for accurate diagnosis of AA infection. Nodules in liver are often caused by carcinoma, bacterial infection or other parasites specially *Entamoeba histolytica* (Lübbert et al, 2014) and *Echinococcus granulosus* the latter, particularly in endemic areas (Srinivas et al, 2016). AA was reported once causing liver nodules but it is very unusual (Rodriguez et al., 2008).

The disease is acquired by ingestion of raw infected mollusks with the third stage larvae of the parasite (L3), which is also infective to mice, the natural definitive host. After ingestion L3 penetrates the wall of intestine and migrates through blood vessels or lymphatic system to mesenteric arteries. There, sexual mating occurs producing eggs and lately larvae of first stage (L1), which is infective to mollusks, the intermediate host.

Many species of terrestrial mollusks have been reported to successful develop *Angiostrongylus* spp. larvae, in different countries from Central and South America. They are mainly Veronicellidae slugs, as species from the genus *Phyllocaulis*, *Sarasinula* and *Belocaulus*, although several other families of terrestrial mollusks, including snails, have been found naturally infected with this nematode (Graeff-Teixeira et al., 1993; Ohlweiler et al., 2010).

Here we present a case of AA with intestinal and liver affection as well as a new risky host involved in AA transmission, the Chinese slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873), involving grape consuming. The specie was recently recorded in Brazil (Gomes et al., 2011) and became a grape pest in South Brazil, causing losses during the harvest and production seasons of grapevines in several municipalities of Serra Gaucha, State of Rio Grande do Sul, considered the center of Brazilian vineyards production (Baronio et al., 2014).

Case Report:

Patient female, 69 years, farmer, from Marau-Rio Grande do Sul, stopped to evacuate and eliminate gases for 48 hours. Refers abdominal bloating without pain, with discomfort, evolving into episodes of vomiting and abdominal cramps. With moderate dehydration and secondary malnutrition. Distended abdomen, tympani, RH transit

disorders absent without signals of peritonism. Loss of approximately 10% of corporal weight in 6 months. Previous diagnosis of hyperthyroidism and hypertension, both controlled. Chronic atrial fibrillation, denies previous surgeries. Hospitalized for 12 h, she was transferred to the Passo Fundo Hospital with indication for surgery. Clinical signs were: blood pressure: 100/60 mm Hg; heart rate: 110 bpm; respiratory frequency: 23 ipm. Complete blood count (CBC) presented 31% of eosinophilia. X Ray exam presented segment distension of small bowel loops in mesogastrium. Presence of gas in the distal colon. Absence of pneumoperitoneum. Tomography exam shown two heterogeneous contrasted nodules in the liver that were visible only in the portal phase. Mass of small proportions at left adrenal (adenoma) and a cyst in the right kidney. An exploratory videolaparoscopy diagnostic allowed biopsy of the liver lesions and visualization of areas of stenosis in the intestine, inflammatory, transmural and “skip lesions” from 90 to 100cm. A minilaparotomy (6cm) was done with enterectomy of 100 cm and enteroenterostomy. Seven days after hospitalization another CBC revealed 53% of eosinophilia and other blood parameters altered such as low count of red blood cells (RBC: 3,810,000 / mm³); Hemoglobin: 11.0 g / dL, hematocrit: 33% 36-54; Prothrombin time: (activity): 60.7% 1h: 75mm; Urea: 47mg / dL; Albumin: 3.0 g / dL. Serum sample was collected for immunological tests, showing positivity for *Angiostrongylus* infection. After the surgical treatment the patient improved her symptoms and the liver lesion disappeared.

Investigation of mollusks in Patient Peridomicile:

After surgery patient reported consuming of grape. An investigative effort was made to elucidate the source of infection. Surprising a hundred of slugs were seen climbing at grapevine localized on the backyard of residence. 10 slugs, visually identical were then collected. A sample of three mollusks were used for morphological identification of specie and the seven remaining slugs were in pool digested with pepsine solution according to Wallace (1969). Recovered larvae were inoculated into 8 mice with 10 larvae each. After 30 days mice were euthanized and adult worms were recovered from arteries of intestine.

After confirmation of *A. costaricensis* infection in experimental mice, and positive results for *M. pictum* as the transmission agent, the area of grapevines of this residence was scrutinized for more infected mollusks: the collection of slugs was made randomly during two nights in the period of three hours between 10 p.m. and 1 a.m. in

November 26-27th, 2015. The specimens were collected, weighted and digested individually for larvae examination.

Identification of the mollusks

Samples of three specimens were used for morphological analysis. The lot was deposited in the Malacological Collection of the Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (CMIOC 9.997).

The specie was identified using morphological and molecular criteria. Specimens were dissected and examined under stereomicroscope for morphological analysis. Morphological diagnostic characters were based on Tsai et al. (2011) and Gomes et al. (2011). The partial 5' region of the cytochrome oxidase c subunit I (COI) gene, from one specimen was generated and deposited in GenBank (Accession Number KX781994). COI gene fragments were amplified using a Polymerase Chain Reaction (PCR) with the primers LCO-1490 (5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) and HCO-2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer et al. 1994). PCR's protocol are according to Hayes et al. (2009), being carried out at the Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose – Malacologia (LRNEM) at IOC/FIOCRUZ. Purified PCR products were sent to be sequenced at IOC/FIOCRUZ Sequencing Platform.

Results

Serology and histopathological findings

Serology was positive for *Angiostrongylus costaricensis* on ELISA test performed by Biomedical Institute of PUCRS. On gross examination, 85 cm of small bowel was resected, with 7 thickening areas, without perforations. The microscopy showed intense mural infiltration of eosinophils, arterial thrombosis, eosinophilic perivascular granulomas and eggs inside small vessels of submucosa. One worm of *A. costaricensis* were identified inside branches of the mesenteric artery. The liver showed white multiple small nodules and the microscopy showed intense eosinophilic infiltration in these areas.

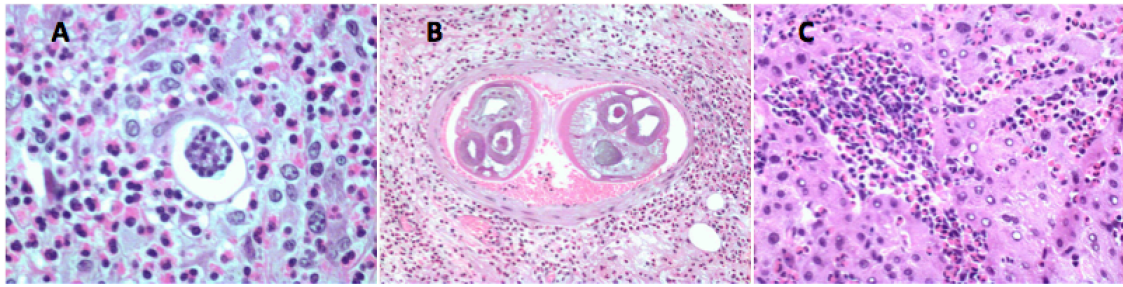


Figure 1: A: eggs inside small vessels, with intense infiltration of eosinophils (HE 400x); B: worm of *A. costaricensis* inside branche of the mesenteric artery (HE 200x); C: intense eosinophilic infiltration in the liver (HE 400x).

Identification of *Meghimatium pictum*

External and internal characteristics match to those described to *M. pictum*. Fixed specimens presented around 4 cm in length and 7,5 mm in width. The body presents a beige background color on the dorsum with two dark brown to black lateral stripes, and one medial stripe, often lighter than the lateral ones. On this background, below the lateral stripes (laterally) and surrounding the central medial stripe (dorsally), scattered dark brown irregular spots or even short lines are seen. The foot occupies all the ventral extension and is cream colored. The penis is claviform, short, thick and has a constriction halfway along its length, having a vas deferens slightly longer than the penis. The bursa copulatrix has a spherical to oval form. Both (penis and bursa copulatrix) opens in a large, barrel-shaped atrium. Also, the 655 base pairs amplified for COI were identical to specimens from South Brazil deposited in GenBank (JQ712572) (Gregoric et al., 2013).

Prevalence of mollusk infection

A total of 245 specimens of *Meghimatium pictum* were collected in two nights over vineyard in the backyard of patient. The slug range of weight was 0,03g to 2,25g and no correlation was observed between weight and infection. Slugs were digested individually for parasitic burden which reveled eleven infected slugs with 2, 3, 4, 8, 28* larvae counting in each positive slug, corresponding to a 4,5% of prevalence (Table 1).

Table 1 - Individual parasitic burden of *Angiostrongylus costaricensis* L3 of *Meghimatium pictum* naturally infected.

PARASITIC BURDEN	INFECTED/TOTAL SLUG
2, 3, 4, 8, 28*	11/245 (4,5%)

- Mean of seven slugs digested in pool yielding 200 L3 in total.

Discussion

The Passo Fundo Institute of Pathology, has accumulated more than twenty years of experience in the diagnosis of angiostrongyliasis. To date about 68 cases were confirmed by histopathology examinations and 50 remain inconclusive, mainly because of the absence of parasitic forms. In this cases, histopathological criteria have been proposed for AA diagnosis, which include: 1) massive infiltration of eosinophils in all layers of the intestinal wall; 2) granulomatous reactions; 3) eosinophilic vasculitis, affecting veins, arteries, lymphatics and capillaries (Graeff-Teixeira et al, 1991). Additional observations are sometimes present as focal flattening of the mucosa, ulceration and perforation of the intestinal wall, the serous layer may be thickened or covered with fibrin deposits (Agostini et al., 1984; Graeff-Teixeria, 1991).

Misinterpretation of those criteria may occur with Crohn disease and appendicitis, which present same symptoms and some particular histological findings (Agostini et al., 1984; Kröner and Argueta, 2015). In the present case, besides of the observation of 4 areas of thickening in small bowel, caused by intense eosinophilic infiltration and perivascular granulomas, definitive diagnosis of AA was achieved by the identification of a worm inside the mesenteric artery (Fig. 1). In addition, serology was positive for *Angiostrongylus*.

Meghimatium pictum is a specie of mollusk native from China which has been found in Brazil (Gomes et al., 2011) and Argentina (Gregoric et al., 2013) causing economic losses on vineyard agriculture (Baronio et al., 2014). They are mainly alien species, which movements worldwide are being facilitated with the expanding global economy, increasing trade volume and international trade agreements (Robinson et al., 1999). They have been considered some of the most significant and intractable threats to sustainable agriculture (Barker, 2002). In China *M. pictum* occurs mainly in Southeastern China (Li et al., 2006) where *M. bilineatum*, which is considered

phylogenetically sister-species of *M. pictum*, was already recorded carrying another specie, *A. cantonensis*, the primary causative agent of eosinophilic meningoencephalitis (EoM) in human (Wang et al., 2008).

In Brazil, the occurrence of EoM due to *A. cantonensis* is recent and have been found in several different species of mollusks in many municipalities of the Brazilian coast, including *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris*, *Sarasinula* spp., *Subulina octona* (Morassutti et al., 2014) but none *M. pictum* was found infected with *Angiostrongylus*. This is the first time that *M. pictum* is been recognized as a host for *A. costaricensis*.

The infective stage for humans may be delivered by the mollusk slime during displacement (Bonetti and Graeff-Teixeira, 1998), this may raise the risk of infection of angiostrongyliasis in vegetable and fruit consuming, especially grape, since it favors the contact of external parts of the fruit with mouth on peel. In addition it may represent high risk of infection for grape harvesters and garden keepers, by contamination of their hands since released L3 from the snails may persist infective in the environmental up to three days (Cheng and Alicata, 1964). Besides the apparent low parasitic burden found here (4.5%) it is in accordance with previous findings, where natural infection of mollusks with *A. costaricensis* present very low parasitic burden (Rambo et al, 1997; Laitano et al., 2001).

Taking together the findings of Li et al. (2006), that *M. bilineatum* may serve as host for *A. cantonensis*, the recent and expanding occurrence of EoM due to *A. cantonensis* in Brazil, the spreading of *M. pictum* occupying vineyards (Baronio et al., 2014) and finally the potential risk of grape consuming by infection with *Angiostrongylus*, represent a high risk of increase both disease abdominal angiostrongyliasis and meningoencephalitis, drawing attention of health and sanitary agencies.

References

- Barker, G.M. (2002). Molluscs as crop pests. Lincoln, Cabi, 400 pp.
- Baronio, C.A., Botton, M., Gomes, S.R. and Robinson, D.G. (2014). First record of qualitative losses caused by *Meghimatium pictum* in vineyards of Southern Brazil and the effects of two molluscicides for its control. *Ciência. Rural* 44, 1715-1720.

- Fernandez, J. (1982). Contribucion al conocimiento de las babosas y sietecueros (Mollusca: Gastropoda) que causan daños a la agricultura em Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 12(3-4): 353-386.
- Folmer, O., Black, M., Hoen, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994; 3: 294–299.
- Gomes, S.R., Picanço, J.B., Colley, E., Agudo-Padrón, A.I., Nakano, E. and Thomé, J.W. A newly introduced and invasive land slug in Brazil: *Meghimatum pictum* (Gastropoda, Philomycidae) from China. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 2011; 161: 1-10.
- Gomes, S.R., Silva, F.B., Mendes, I.L.V., Thomé, J.W. and Bonatto, S.L. (2010). Molecular phylogeny of the South American land slug *Phyllocaulis* (Mollusca, Soleolifera, Veronicellidae). *Zoologica Scripta*. 2010; 39: 177-186.
- Gregoric, D.E.G., Beltramino, A.A., Vogler, R.E., Cuezco, M.G., Núñez, V., Gomes, S.R., Virgillito, M., Miquel, S.E. (2013). First records of four exotic slugs in Argentina. *American Malacological Bulletin*. 2013; 31: 245-256.
- Li, L.S., Zhou, X.N., Lin, J.X., Zhang, Y., Chen, Y.Z., Zhang, R.Y., Fang, Y.Y., Lin, C.X., Chen, B. J. and Li, Y.S. Discovery of six new host species of *Angiostrongylus cantonensis* and investigation of the epidemic foci in Fujian province. *Chinese Journal of Zoonoses*. 2006; 22: 533–537.
- Maurer, R.L., Graeff-Teixeira, C., Thomé, J.W., Chiaradia, L.A., Sugaya, H. and Yoshimura, K. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002; 44(1): 53-54.
- Ohlweiler, F.P., Takahashi, F.Y., Guimarães, M.C.A. Gomes, S.R. and Kawano, T. Gastrópodes límnicos e terrestres do Estado de São Paulo associados às helmintoses. Redes Editora, 2010; Porto Alegre.
- Robinson, D.G. Alien invasions: The effects of the global economy on non-marine gastropod introductions into the United States. *Malacologia*. 1999; 41(2): 413-438.
- Tsai, C.L., Lu, C.C. and Kao, H.W. Morphology and molecular phylogeny of the east and Southeast Asian *Meghimatum* slugs (Gastropoda: Pulmonata: Philomycidae) and description of a new species. *Zootaxa*. 2011; 2890: 1-19.

Waugh, C.A., Shafir, S., Wise, M., Robinson, R.D., Eberhard, M.L., et al. Human *Angiostrongylus cantonensis*, Jamaica. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11: 1977–1978.

CAPÍTULO III

Outros resultados de estudos sobre o parasito e seus hospedeiros

1. Criação de moluscos terrestres

Há muito se tem tentado estabelecer o cultivo *in vitro* de *Angiostrongylus* (Uga & Matsumura, 1982; Hata, 1993; Hata, 1996; da Silva, 2010), porém o rendimento larval apresentou-se muito baixo. Uma ideia inovadora propõe o uso de co-cultivo com células de moluscos, já que as larvas do parasito apresentam melhor desenvolvimento quando hemolinfa e extratos proteicos dos moluscos são adicionados à cultura (da Silva, 2010). Embora uma linhagem de células embrionárias de cultivo de *Biomphalaria glabrata* tenha sido comercializada pela American Type Culture Collection (ATCC CL 1494), atualmente encontra-se descontinuada.

Dessa maneira, o Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS tem como um de seus objetivos de pesquisa desenvolver uma linhagem celular a partir de células de moluscos para o cultivo *in vitro* dos nematódeos *A. cantonensis* e *A. costaricensis*. Por essa razão, são mantidos no laboratório criações de moluscos terrestres, cujas posturas são recolhidas e encaminhadas para realização de experimentos de estabelecimento de linhagem celular.

Uma vez que *Phyllocaulis* sp. e *Limacus flavus* atuam como hospedeiros naturais de *Angiostrongylus*, este trabalho procurou detalhar o processo embrionário desses moluscos com o objetivo futuro de se obter uma cultura de células embrionárias para cultivo *in vitro* do nematódeo.

1.1 Observações do desenvolvimento embriológico dos moluscos terrestres *Limacus flavus* e *Phyllocaulis* sp.

1. Introdução

Os animais do grupo Pulmonata são moluscos da classe Gastropoda, que através do processo evolutivo adaptativo, sofreram uma transição do ambiente aquático para o terrestre. Inúmeras são as mudanças nos caracteres físicos e químicos do ambiente para as linhagens de animais que fizeram o movimento de migração do ambiente aquático ao terrestre (Baur, 1994). Os moluscos terrestres, comparados com os marinhos, especializaram-se na qualidade dos ovos, ao invés da quantidade. A maioria destes invertebrados terrestres produzem, durante toda a sua vida, de 100 a 500 ovos relativamente grandes (Baur, 1994). Além de poucos, numerosos e grandes, os ovos também ganharam a característica de conter mais albúmen que as espécies de moluscos aquáticos (Tompa, 1984).

O ovo possui uma película que o reveste, aparentemente muito lisa a ponto de tornar o ovo escorregadio, está sendo chamada de membrana perivitelínica (South, 1992). Uma grossa estrutura gelatinosa, porém consistente, é visualizada na camada interior a esta película, conhecida como albúmen (Simpson, 1901), e as células embrionárias localizam-se centralmente no interior do ovo.

O processo de desenvolvimento se inicia através da segmentação, onde, após a fertilização, começa a fragmentação das células (Simpson, 1901). O tipo de clivagem do ovo é total e em espiral onde o fuso mitótico é orientado obliquamente em relação ao eixo animal-vegetal, inclinando-se, a cada divisão, para direções opostas (Grunwald, 1985).

Os moluscos apresentam o desenvolvimento do chamado saco anterior (saco visceral, lobo hepático) que contém o saco de albúmen ou a glândula digestiva larval (South, 1992). Após a origem do blastóporo, ocorre a gastrulação onde é formada a endo e a ectoderme. Inicia-se, então, a divisão do embrião em duas partes: a anterior, caracterizada pelo pé; e a posterior, caracterizada por parte do manto (Simpson, 1901). Moluscos pulmonados desenvolveram o podocisto (saco posterior, vesícula do pé), uma estrutura pulsátil que se origina como um alargamento da porção caudal do pé embrionário (Simpson, 1901; Barker, 2001). O podocisto apresenta fortes contrações e contem elementos musculares (Simpson, 1901). Essa estrutura foi descrita como

possuindo funções de circulação, de trocas gasosas entre o embrião e o ambiente, de absorção de substâncias tróficas do albúmen e ainda de remoção de produtos residuais. Essas atividades são assistidas pelos movimentos contrateis (Simpson, 1901; South, 1992). Em *Limax maximus*, o saco cefálico e o podocisto desenvolvem-se mais cedo do que o coração, cuja atividade é contínua com a do saco cefálico e podocisto no embrião (Kuchenmeister et al., 1996 apud Egonmwan, 2007) e ambos contraem-se independentemente (Egonmwan, 2007). O embrião pode mover-se dentro do albúmen possivelmente como resultado de movimentos ciliares (South, 1992). Em gastrópodes terrestres que possuem concha como os Stylommatophora, aqui exemplificados como os limacídeos, nesse estágio já se pode ver a concha embrionária. Na maioria das lesmas mais avançadas evolutivamente, a protoconcha é reduzida para alguns grânulos calcários embutidos no manto que pode se tornar uma fina camada de concha. Nesse momento os tentáculos começam a desenvolver-se e aparecem em formato de disco (Simpson, 1901; Barker, 2001). Os indivíduos jovens utilizam a rádula para romper a membrana perivitelínica (South, 1992) e assim eclodirem do ovo.

Os ovos de moluscos gastrópodes são classificados como oligoléctos e possuem uma grande quantidade de vitelo/albúmen que se apresenta como uma massa compacta no interior do ovo e, o citoplasma restringe-se a uma fina camada ao redor do núcleo (Garcia & Fernández, 2000).

O objetivo deste trabalho foi acompanhar posturas e o desenvolvimento de *Phyllocaulis* sp. e *Limacus flavus*, também conhecidos como veronicelídeos e limacídeos, respectivamente.

2. Materiais e Métodos

Em placas de cultivo com terra ou papel umedecido, os ovos destinados a criação foram deixados dentro do terrário onde pertenciam e eram retirados apenas para observação. Em alguns momentos foi necessária a limpeza dos ovos com o auxílio de papel umedecido para a posterior visualização em estereomicroscópio. Após, a postura era recolocada em seu local original. Imagens amadoras foram captadas com câmera digital Nikon Coolpix S6300, utilizando o zoom quando necessário. Ovos de *Limacus flavus* foram visualizados por estereomicroscópio Modelo SMZ1500 Nikon (Melville, USA) e imagens capturadas pelo software NIS-elements D 3.2 para sistema operacional Windows cedido pelo Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso e

ZebLab da PUCRS. Os ovos foram colocados em formol 10%. As imagens captadas não reproduzem todo o processo em virtude do baixo número de ovos necessário conclusão do desenvolvimento embrionário.

3. Resultados iniciais e Discussão

As primeiras observações foram realizadas a partir do momento inicial onde uma lesma de *Phyllocaulis* sp. estava em formato de “c” já liberando os primeiros ovos (**Fig. 1**). O processo durou cerca de 24 horas e a postura então foi deixada em uma espécie de buraco bem superficial feito na terra pela lesma. Quando encontrada, a postura de *Limacus flavus* já estava totalmente embaixo da terra, consistente com o hábito de muitos caracóis terrestres cobrirem seus ovos com solo rico em cálcio, uma vez que os embriões precisam de mais cálcio do que pode ser fornecido pela albumina dos ovos (Tompa, 1984; Egonmwan, 2007).

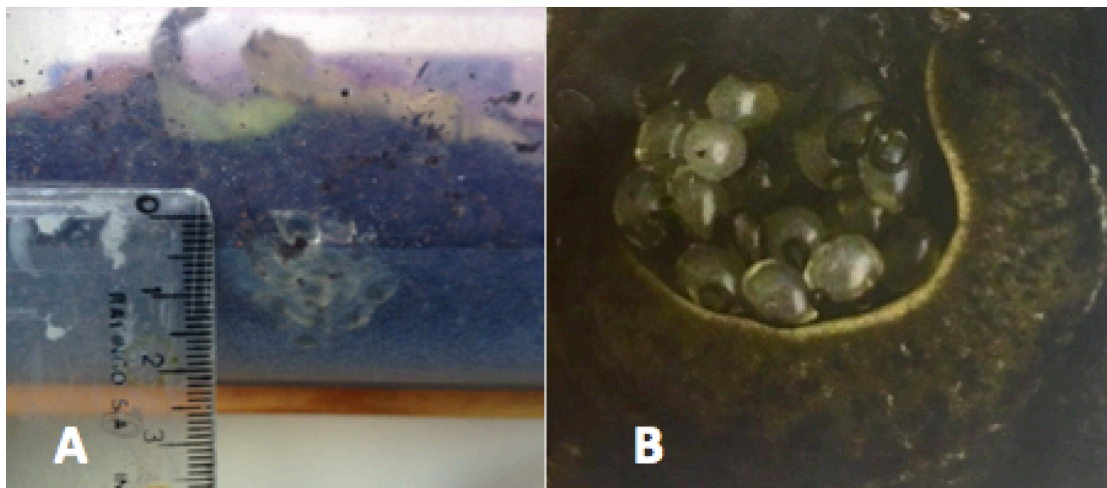


Figura 1: A: Postura de *Limacus flavus* depositada em cavidade na terra; B: Indivíduo de *Phyllocaulis* sp. fazendo a deposição dos ovos. Fonte: elaborado pela própria autora.

O processo de desenvolvimento dos ovos aparentou ocorrer de forma semelhante para ambas as espécies. Tanto *L. flavus* quanto *Phyllocaulis* sp. são hermafroditas, possuindo ambos os sexos mas necessitando de outro indivíduo para reprodução (Okafor, 2009).

Os ovos foram liberados em espiral, ligados por um cordão de muco e circundados com fezes (**Fig. 2**). Esse cordão de muco é composto por uma glicoproteína semelhante à clara de ovo e, juntamente com as fezes, tem como objetivo de manter a umidade da postura (Okafor, 2009). Foi observado que cada lesma produziu em torno de 25 ovos

elipsoidais. Os ovos mediam cerca de 0,5 mm da base até o ápice e tinham uma consistência gelatinosa porém firme, sendo esta o albúmen/vitelo (**Fig. 3**). O tamanho do ovo irá determinar o tamanho dos juvenis e também seu crescimento, sobrevivência e possível sucesso reprodutivo (Zajac and Kramarz, 2017).



Figura 2: Posturas em espiral de *Phyllocaulis* sp. destacando as fezes e muco em torno dos ovos.
Fonte: elaborado pela própria autora.

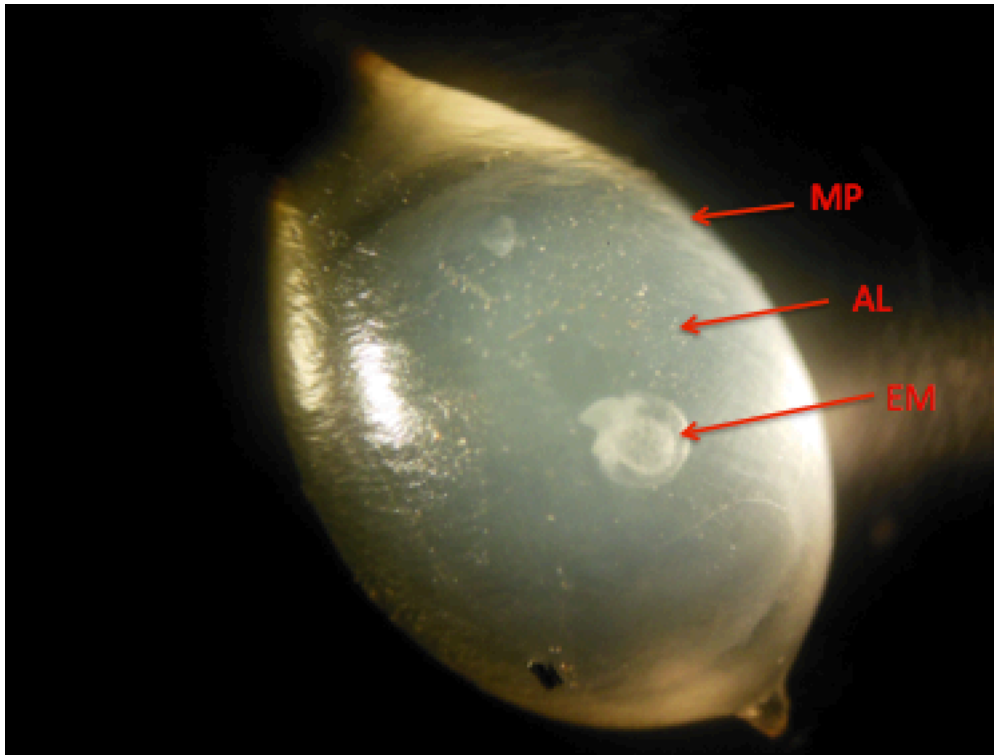


Figura 3: Ovo de *Phyllocaulis* sp. destacando a membrana perivitelinica (MP), o albúmen ou vitelo (AL) e o embrião (EM). Fonte: elaborado pela própria autora.

Os ovos, inicialmente, eram bem esbranquiçados, sendo impossível a visualização de seu interior. Após cerca de dois dias, os ovos começaram a se tornarem translúcidos sendo assim possível a visualização do embrião em desenvolvimento. Após cerca de quatro dias é possível enxergar a diferenciação das células e assim a visualização do saco embrionário em formação. Com cerca de 6 dias de desenvolvimento foi possível identificar o crescimento do podocisto. Depois de cerca de oito dias o embrião já ocupa uma grande parte do ovo e torna-se bem esbranquiçado, dificultando a diferenciação das partes. Em torno de 10 dias, em *L. flavus*, foi observada a diminuição do podocisto e o aparecimento da protoconcha juntamente com o início do desenvolvimento dos tentáculos. Já com cerca de 15 dias, as estruturas anexas do saco anterior e podocisto desaparecem. Aos 18 dias, foi possível enxergar o indivíduo jovem de *Phyllocaulis* sp. completamente formado. Partes do desenvolvimento de *Limax* sp. e *Phyllocaulis* sp. são documentadas na **Figura 4**. Após cerca de 18 dias os indivíduos jovens começam a eclodir dos ovos (**Fig. 5 e 6**).

Como diferenças entre os embriões, conseguimos detectar a presença do pneumostômio após cerca de 15 dias em *L. flavus*, estrutura ausente em *Phyllocaulis* sp.; o formato do corpo sendo longilíneo no limacídeo e mais alargado no veronicelídeo. O

podocisto de *L. flavus* possuía o formato como um “cauda de golfinho” diferentemente da estrutura em *Phyllocaulis* sp. que se assemelhava ao saco anterior (**Fig. 5**).

Alguns ovos não alcançaram o desenvolvimento embrionário e permaneceram esbranquiçados ou translúcidos sendo possível enxergar a célula embrionária sem crescimento.

Os ovos permanecem armazenados para posterior finalização do acompanhamento.

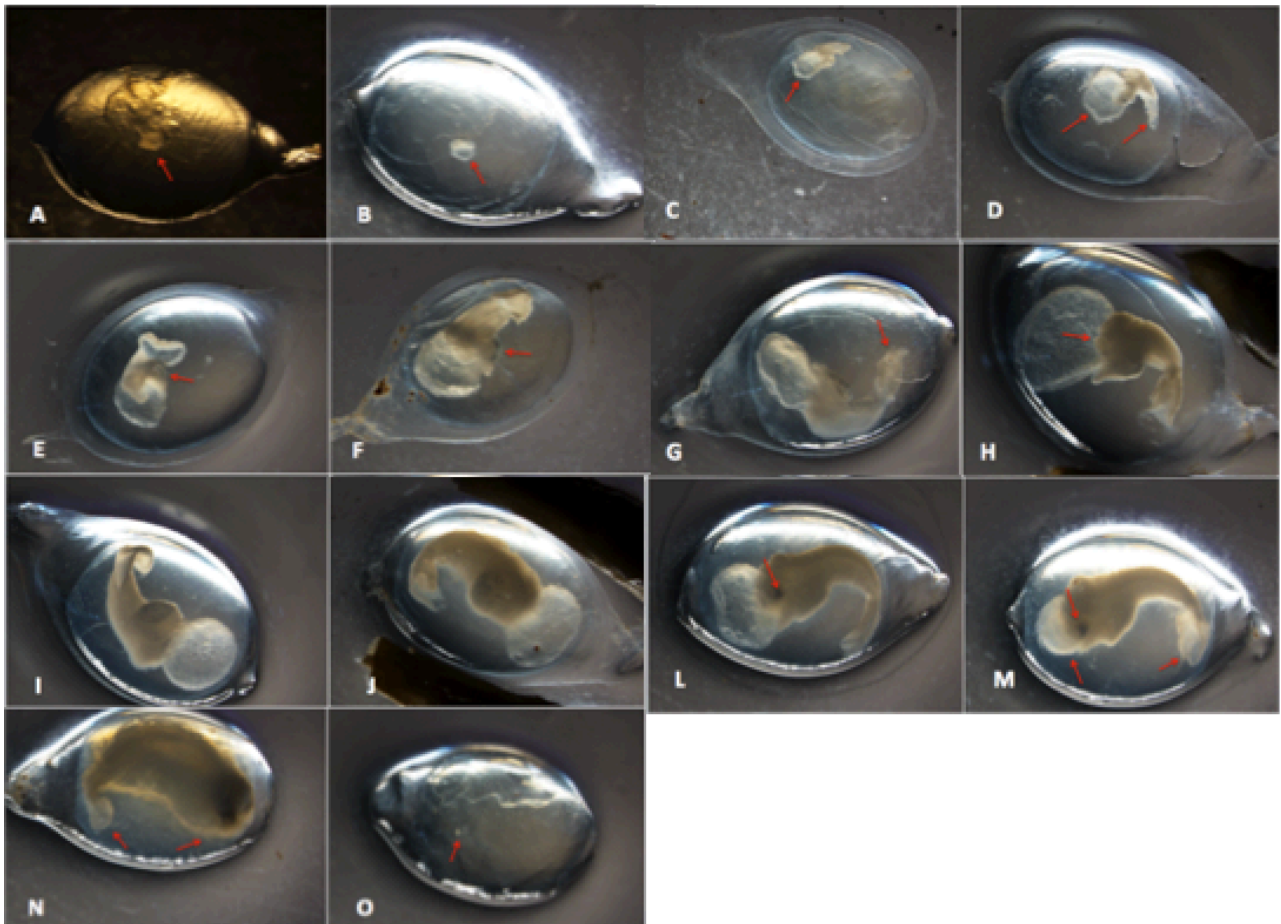


Figura 4: Primeiros dias do desenvolvimento de *Limacus flavus*, após completa liberação da postura (de 24 à 48 horas). A: dia 3, destacando as células embrionárias; B: dia 4 e C: dia 5, destacando o desenvolvimento do saco anterior ou saco visceral; D: dia 6, destacando o aumento do saco anterior e o desenvolvimento do podocisto ou saco posterior; E: dia 7 e F: dia 8, destacando o início da formação da protoconcha; G: dia 9, destacando uma diminuição do podocisto; H: dia 10, destacando a formação de um tentáculo ainda em formato de disco; I, dia 11 e J, dia 12: evidencia o aumento do tamanho do embrião; L, dia 13 e M, dia 14: destacam o pneumostômio, orifício respiratório; M: destacam-se a diminuição tanto do saco anterior quanto do podocisto; N, dia 15: ocorre redução quase total dos saco anterior e podocisto e apresenta a grande proporção do corpo da lesma em relação ao ovo; O: ovo sem desenvolvimento embrionário, destacando o embrião não desenvolvido. Fonte: elaborado pela própria autora.

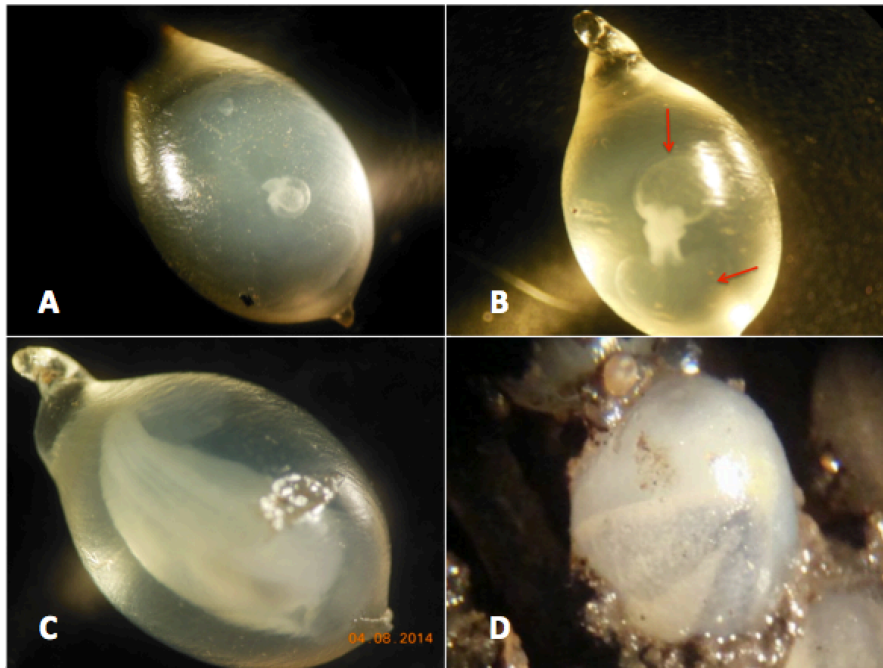


Figura 5: Desenvolvimento de *Phyllocaulis* sp. A: cerca de 5 dias após a postura, observa-se o embrião; B: cerca de 7 dias, destaca-se o saco anterior e podocisto; C: cerca de 15 dias, observa-se o aumento no tamanho do embrião e o quase completo desaparecimento do saco anterior e podocisto; D: cerca de 18 dias, molusco já formado dentro do ovo. Fonte: elaborado pela própria autora.

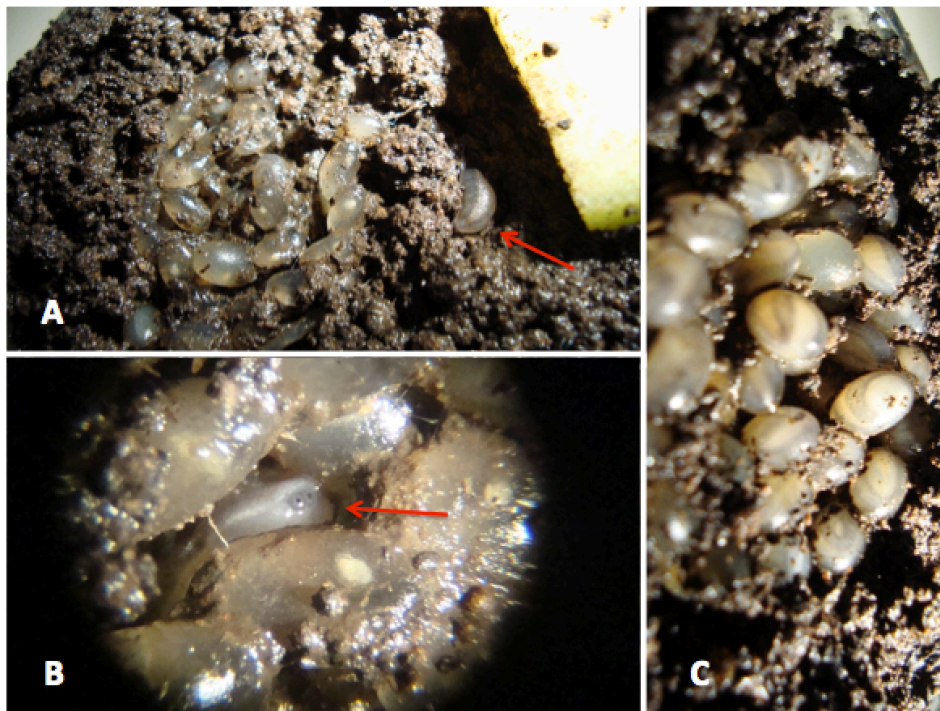


Figura 6: Postura de *Phyllocaulis* sp. após cerca de 18 dias de desenvolvimento. A e B: destacam indivíduos já fora do ovo; C: os indivíduos já formados ainda dentro dos ovos. Fonte: elaborado pela própria autora.

Referências Bibliográficas

- Barker, G.M.** (2001). *The biology of terrestrial molluscs*, CAB International, Oxon, New York. doi: 10.1079/9780851993188.0000.
- Baur, B.** (1994). Reviews parental care in terrestrial gastropods. *Experientia* **50**, 5–14. doi: 10.1007/BF01992042.
- Egonmwan, R.I.** (2007). Light and electron microscopy study of late embryonic development in the land snail *Limicolaria flammea* (Müller) (Pulmonata, Achatinidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **24**(2), 436–441. doi: 10.1590/S0101-81752007000200022.
- Grunwald, G.B.** (1985). The Conceptual and Experimental Foundations of Vertebrate Embryonic Cell Adhesion Research. In *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis* (ed. Gilbert, S.F.), pp. 129-154. Plenum Press, New York and London
- Hata, H.** (1996). In vitro cultivation of *Angiostrongylus costaricensis* eggs to first stage larvae in chemically defined medium. *International Journal for Parasitology* **26**(3), 281–286. doi: 10.1016/0020-7519(95)00128-X.
- Hata, H.** (1993). In vitro cultivation of the third and fourth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, **55**, 345–347.

Okafor, F.C. (2009). The varied roles of snails (Gastropod Molluscs) in the dynamics of human existence. An Inaugural Lecture of the University of Nigeria. *University of Nigeria, Senate Ceremonials Committee*, Nsukka, Nigeria.

da Silva, L.F. (2010). *Exploração de sistemas in vitro para desenvolvimento larval de Angiostrongylus costaricensis e de A. cantonensis (Nematelminthes, Angiostrongylidae)*. PhD theses, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Simpson, G.B. (1901). Anatomy and physiology of *Polygyra albolabris* and *Limax maximus* and embryology of *Limax maximus* **40** (8)., Albany: New York State Museum.

South, A. (1992). *Terrestrial Slugs: biology, ecology and control*, Springer, Netherlands.

Tompa, A.S. (1984). *The Mollusca: Reproduction*. (ed. Wilbur, K.M., Tompa, A. S., Verdonk, N. H. and van den Biggelaar, J. A. M.), 7th edn. Academic Press New York, London.

Uga, S. & Matsumura, T. (1982). *In vitro* cultivation of *Angiostrongylus cantonensis* eggs. *Japanese Journal of Parasitology* **31**(1), 56–66.

Zajac, K. & Kramarz, P. (2017). Terrestrial gastropods - how do they reproduce? *Invertebrate Survival Journal* **14**, 199–209.

1.2 Observações da interação entre ácaros e moluscos terrestres

1. Introdução

Os ácaros pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e subclasse Acarina (ou Acari). Depois dos insetos, correspondem ao segundo maior grupo de artrópodes. Animais diminutos, possuem como características o cefalotórax e o abdômen fundidos e não segmentados, ausência de antenas e asas, quatro pares de patas, e uma carapaça para proteção. São animais cosmopolitas e sugere-se que o tamanho pequeno tenha sido o fator fundamental para explorar pequenos habitats, tendo, assim, mais sucesso que aracnídeos maiores. Possuem maior abundância na fração orgânica superficial do solo. Se alimentam de material vegetal ou animal, fresco ou em putrefação. Apresentam o desenvolvimento de forma indireta, que origina um estágio larval de seis patas. Apesar de os ácaros não terem o corpo segmentado, o divide-se esquematicamente em quatro partes chamadas gnatossoma (onde localizam-se as queliceras transformadas em estiloforo, o par de estiletes e os palpos), prodossoma (onde estão os primeiros dois pares de patas), metapodossoma (com mais outros dois pares de patas) e opistossoma (que corresponde ao abdômen dos insetos). As pernas são constituídas de coxa, trocantes, fêmur, genu, tibia e tarso (Aguiar-Menezes et al., 2007; Moraes and Flechtmann, 2008; Klimov et al., 2016).

A identificação dos grupos taxonômicos pode ser feita através de características como o órgão respiratório chamado estigma, no qual sua localização irá classificar a ordem e subordem. Receptores sensoriais, da mesma maneira, são utilizados para identificação. Esses receptores podem ser químico, mecânico ou fotorreceptores e comumente estão associados com uma estrutura chamada seta. Setas tácticas variam de acordo com formato, número e posição, formando assim, padrões que possibilitam a classificação dos animais (Vacante, 2015).

Animais pertencentes à família Acaridida (Astigmata) não possuem estigma e sistema traqueal, bem como ausência de órgão sensorial no prodossoma. Possuem dois pares de discos genitais ladeando a abertura genital e hábitos alimentares variados: fungívoros, saprófagos, parasitas, fitófagos, incluindo ácaros que atacam raízes e produtos armazenados (Aguiar-Menezes et al., 2007).

Ácaros possuem uma infinidade de associações com outros animais, sendo moluscos um deles. Ácaros aquáticos do gênero *Unionicola* são comumente encontrados em mexilhões adultos, onde permanecem nas guelras, manto e pé usando esses locais para ovipor (Edwards and Vidrine, 2006). Outro exemplo, *Riccardoella limacum* é uma espécie conhecida por ser parasita de lesmas e caracóis terrestres, da qual se alimenta da hemolinfa dos moluscos ao introduzir o tubo alimentar nos tecidos do hospedeiro (Flechtmann and Baggio, 1985; South, 1992).

A partir do interesse por uma melhor compreensão sobre o desenvolvimento dos moluscos utilizados neste trabalho, pode-se também observar a presença de dois tipos de pequenos invertebrados nos ovos e muco das posturas, bem como a presença de hifas de fungos. O tipo de animal em maior quantidade possui características de artrópoda, como a presença de patas e carapaça. O outro animal presente possui corpo filiforme e quase transparente e, por essa razão, foi possível visualizar o conteúdo ingerido, sendo, provavelmente, fezes que acompanham o cordão de muco ao redor dos ovos (**Fig. 1**). Os pequenos artrópodos foram identificados.

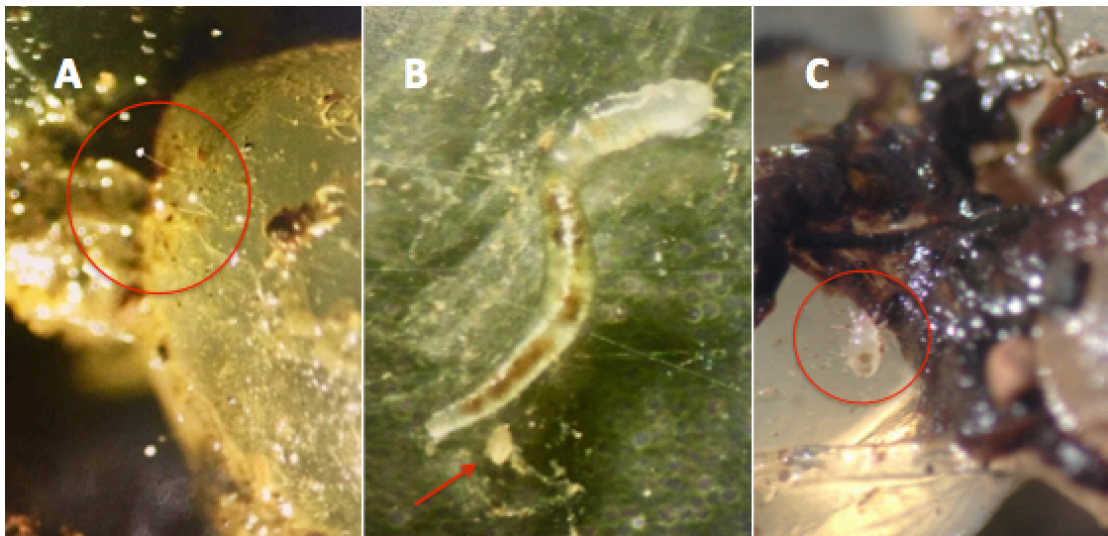


Figura 1: Organismos presentes em postura de *Limacus flavus* e *Phyllocaulis* sp., criados em laboratório. A. mostra hifas ao redor de um dos ovos; B. Invertebrado filiforme não identificado ao lado de um pequeno artrópoda; C: Pequeno artrópoda sob as fezes ao redor de ovo. Fonte: elaborado pela própria autora.

2. Materiais e Métodos

Os animais foram coletados nos meses de março e abril, com o auxílio de um pincel e conservados em álcool 70% para posterior análise pelo biólogo Ms. Guilherme Liberato da Silva (Doutorando em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) do Laboratório de Acarologia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS).

3. Resultado

Foi identificada a espécie *Caloglyphus berlesei* / *Sancassania berlesei* - Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acarina, Superordem Acariformes, Ordem Sarcoptiformes e Família Acaridae. Na literatura, encontramos *Sancassania* como sinônimo sênior de *Caloglyphus* (Samsinak, 1960; Timms et al., 1982). Os espécimes adultos coletados das posturas de *Phyllocaulis* sp., um total de cinco indivíduos, foram identificados morfológicamente através da presença/ausência, localização e formato das setas (**Fig. 2**) de acordo com Hughes (1976), porém o trabalho não pode ser finalizado até o presente momento.

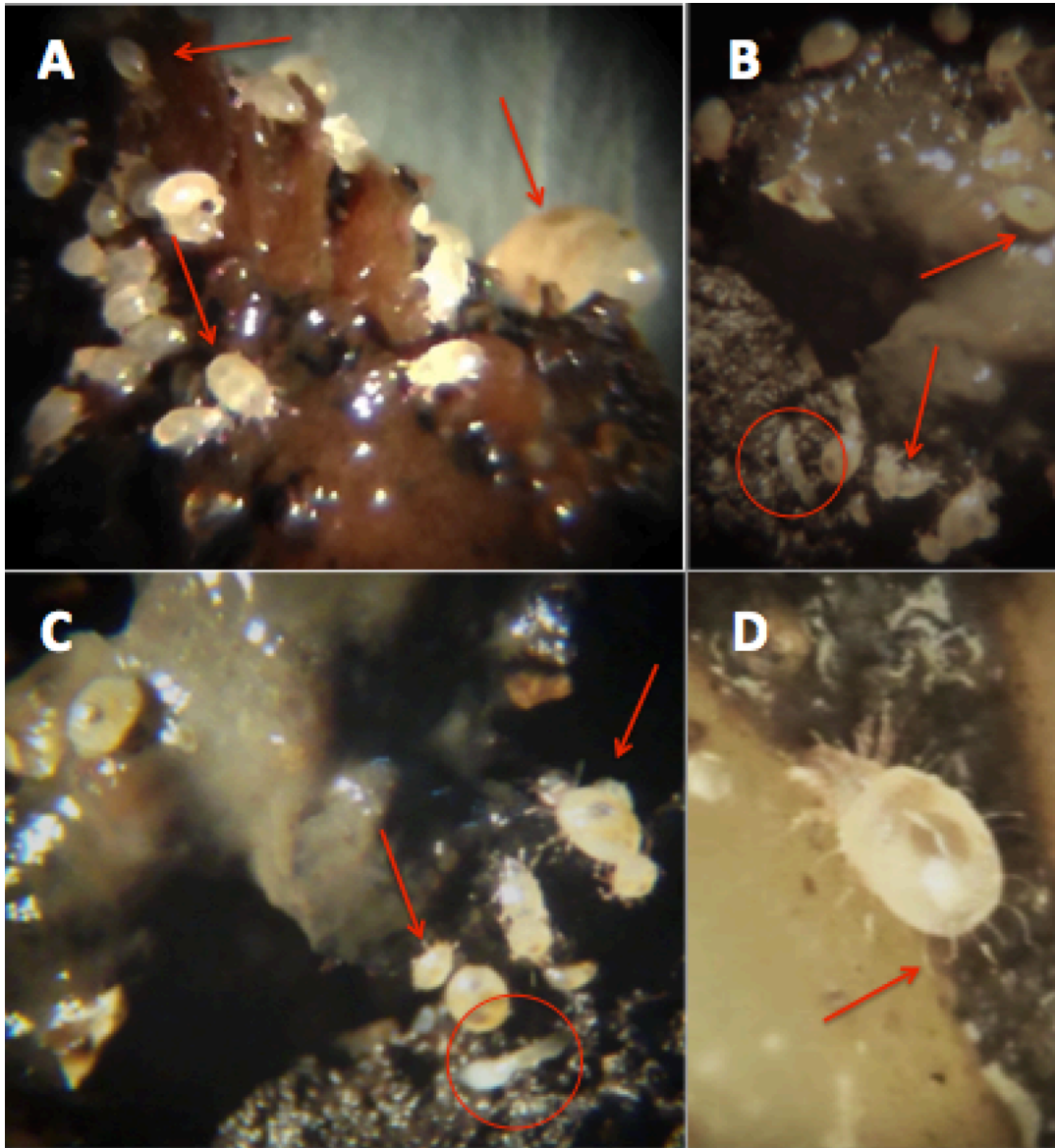


Figura 2: Indivíduos de *Caloglyphus berlesei* em espécime de *Phyllocaulis* sp. em decomposição. A, B, C: flechas destacam as diferentes fases de vida de *C. berlesei*; B,C: círculo destaca a presença do invertebrado nematoide (forma de verme); D: Espécime de *C. berlesei* destacando as setas, estruturas utilizadas na identificação de ácaros. Fonte: elaborado pela própria autora.

4. Discussão

Caloglyphus berlesei caracteriza-se por ser cosmopolita e de vida livre. Habita o solo e já foi encontrada em criações de laboratório de insetos e fungos e possivelmente possui um papel biocontrolador de nematódeos (Abou El-Atta et al., 2014). Ocorre em locais muito úmidos como, por exemplo, lugares com mau acondicionamento de grãos (Timms et al., 1982). Essa espécie já foi relatada infestando a cavidade mastoidea do ouvido de paciente (Paleri and Ruckley, 2001). Com habito alimentar polifágico, beneficia-se qualquer material orgânico em decomposição, como plantas ou outros animais (Timms et al., 1982). Essas características corroboram com a descoberta da colonização de *C. berlesei* no cultivo dos moluscos, uma vez que o ambiente de criação das lesmas terrestres necessita de bastante umidade e presença de material orgânico originário da alimentação vegetal das mesmas. Observamos a numerosa presença desses animais no molusco em decomposição. O fato de ter-se registrado hifas na postura além dos prováveis nematódeos de vida livre, que desenvolvem-se na terra de jardim utilizada nos terrários, pode sugerir mais uma fonte de alimento aos ácaros.

C. berlesei possui um ciclo de vida que consiste em ovo, três estágios ativos imaturos (larva, protoninfa e tritoninfa) e fase adulta (Timms et al., 1982). Foram observadas as fases de ovo, os estágios imaturos e a fase adulta neste experimento (**Fig. 2**). Pode haver um estágio de resistência – deutoninfa – entre as fases de protoninfa e tritoninfa sob circunstâncias não favoráveis, sendo esse estágio ativo e não-alimentar. Antes de cada muda, os indivíduos dessa espécie passam por um período de quiescência (Timms et al., 1982). O macho adulto *C. berlesei* mede 670,2 µm por 300,4 µm e a fêmea adulta mede 832,1 µm por 413,4 µm (Li et al., 2015). Diferentemente de muitos outros ácaros, essa espécie não se reproduz por partenogênese, copulando imediatamente após a última muda (Timms et al., 1982). Até o presente momento pode-se observar a presença de ambos os sexos da espécie bem como os estágios de ovo, adulto.

C. berlesei possui importância econômica e veterinária em virtude de em alguns casos agir como peste em domicílios, armazéns e criações de animais (Principato et al., 2005; Vacante 2015; Li et al. 2015). Sabe-se que a infestação desses ácaros em criação de ovelhas e criação de galos ocasionou lesões dermatológicas (Barton et al., 1988; Principato et al., 2005). Em armazéns de ervas medicinais e armazém ou moinhos de

arroz ocasionou acariase urinária (Li et al., 2003). Neste estudo observamos a ocorrência desses animais apenas uma vez, ao longo de 2 anos de criação desses moluscos e, mesmo na presença de *C. berlesei* não constatamos relação entre a morte dos moluscos e a infestação. Além disso, a colonização de *C. berlesei* nas posturas não pareceu alterar o desenvolvimento dos embriões. Nossa hipótese é que a colonização se deu através da utilização da terra de jardim cedida pela universidade que, por sua vez, estoca os sacos que serão utilizados ao longo do tempo. O local de estocagem é um espaço aberto, com pouca luminosidade e muito material orgânico, plantas e utensílios para a jardinagem do campus.

5. Conclusão

A partir das observações feitas, podemos assumir a hipótese de que a presença desses ácaros não interagiu negativamente com os moluscos. Porém, como não foram encontrados ao longo do tempo de criação das lesmas no Laboratório, não seriam parte natural do microambiente dos terrários. Com isso, sugerimos que a colonização se deu em virtude do uso de material em que os indivíduos de *C. berlesey* já estariam presentes.

Referências Bibliográficas

Abou El-Atta, D.A.E.-M., Ghazy, N.A., Osman, M.A. (2014). Effects of temperature on the life-history traits of *Sancassania (Caloglyphus) berlesei* (Acari: Astigmatina: Acaridae) feeding on root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae). *Experimental and Applied Acarology* **64**(3), 299–307. doi: 10.1007/s10493-014-9826-7.

Aguiar-Menezes, E. de L. et al. (2007). Ácaros: taxonomia, bioecologia e sua importância agrícola. In *Embrapa Agrobiologia - Documentos*, 240. Portal Embrapa, p.28. Extraído de: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/629614>

Barton, N., Stephens, L. & Domrow, R. (1988). Infestation of sheep with the stored product mite *Sancassania berlesei* (Acaridae). *Australian Veterinary Journal* **65**(5), 140–143. doi: 10.1111/j.1751-0813.1988.tb14441.x.

Edwards, D.D. & Vidrine, M.F. (2006). Host specificity among *Unionicola* spp. (Acari: Unionicolidae) parasitizing freshwater mussels. *Journal of Parasitology* **92**(5), 977–983. doi: 10.1645/GE-3565.1.

Flechtmann, C.H.W. & Baggio, D. (1985). Nota sobre a ocorrência do parasito *Riccardoella limacum* (Schrank, 1781) (Acari: Ereyneidae) em criações de escargot (*Helix pomatia* L. e *H. aspersa* L.) no Brasil. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz* **42**(1), 51–54. doi: 10.1590/S0071-12761985000100005.

Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. 2nd edn. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9, iv, London.

Klimov, P.B. et al. (2016). *Sancassania* in Bee Mite ID: Bee-Associated Mite Genera of the World. USDA APHIS Identification Technology Program (ITP).

Li, C. et al. (2015). Morphologic features of *Sancassania berlesei* (Acari: Astigmata: Acaridae), a common mite of stored products in China. *Nutricion Hospitalaria*, 31(4), 1641-1646. doi: 10.3305/nh.2015.31.4.8257.

Li, C.-P. et al. (2003). Acaroid mite, intestinal and urinary acariasis. *World Journal of Gastroenterology* 9(4), 874–877. doi: 10.3748/wjg.v9.i4.874.

Moraes, G.J. de. & Flechtmann, C.H.W. (2008). Manual de acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. 1 edn. Holos. Ribeirão Preto, Brasil.

Paleri, V. & Ruckley, R.W. (2001). Recurrent infestation of the mastoid cavity with *Caloglyphus berlesei*: an occupational hazard. *The Journal of Laryngology and Otology* 115(8), 652–653. doi: 10.1258/0022215011908513

Principato, M. et al. (2005). *Sancassania berlesei* (Michael, 1903): an opportunistic mite infesting litters in poultry farms causing dermatitis in humans and animals. *Italian Journal of Animal Science* 4, 306–309.

Samsinak, K. (1960). Ueber einige myrmekophile Milben aus der Familie Acaridae. *Acta Societatis Entomologicae Cechoslovenicae* **57**, 185–192.

South, A. (1992). *Terrestrial Slugs: biology, ecology and control*, Springer, Netherlands.

Timms, S., Ferro, D.N. & Emberson, R.M. (1982). General biology and nomenclature of *Sancassania berlesei* (Michael). *Acarologia* **22**, 385–390.

Vacante, V. (2015). *The handbook of mites of economic plants : identification, bio-ecology and control*. Mediterranean University, Italy.

Considerações Finais

Capítulo I

Manuscrito 1

“Biomarkers of *Angiostrongylus cantonensis* and *Schistosoma mansoni* infection in intermediate hosts”

1. Conclusões gerais

- Existe modificação do microbioma fecal e do proteoma de muco, em hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus*, experimentalmente infectados com *A. cantonensis*.
- O microbioma fecal de *Biomphalaria glabrata* mostrou maior variação quanto à abundância relativa das bactérias. Foram encontrados 23 possíveis marcadores da infecção.
- Caramujos infectados com *A. cantonensis* apresentaram diminuição do gênero *Vogesella*, enquanto caramujos infectados com *Schistosoma mansoni* apresentaram um aumento nos táxon *Niabella*, Uncl-*Xanthomonadaceae*, Uncl-Sphingobacteriales.
- Caramujos infectados tanto com *A. cantonensis* quanto com *S. mansoni* apresentaram uma grande diminuição de bactérias do gênero *Fluviicula* e um grande aumento nos organismos da família *Weekselaceae*.
- O microbioma fecal de *Phyllocaulis* sp. não apresentou grandes variações de abundancia relativa dos micro-organismos identificados, mostrando que a infecção diminuiu significativamente a abundância do filo Bacteroidetes.
- Encontramos quatro proteínas de *A. cantonensis* no muco de *Phyllocaulis* sp. infectadas com *A. cantonensis*: actina, ATP sintase sub-unidade Beta, família AAA-ATPase e proteína ribossomal com domínio S11.
- 26 proteínas estavam mais expressadas e 15 menos expressadas no muco dos moluscos infectados, destacando proteína da família F-BAR e proteína de fator de alongação Tu de *Mycoplasma* sp., respectivamente.

2. Perspectivas

Com esses resultados podemos sugerir a possibilidade de utilizar tanto o microbioma quanto o proteoma como fonte de diagnóstico da infecção por *A. cantonensis*, através da identificação de biomarcadores como os micro-organismos e as proteínas diferencialmente representados em nossos resultados. Embora neste trabalho, a ênfase tenha sido o microbioma das fezes, pela busca do método menos invasivo possível, a análise do microbioma do muco está entre as possibilidades de futuros estudos. Da mesma maneira, o proteoma do muco de *B. glabrata* será incluído nos próximos experimentos.

Mostramos que há a possibilidade de fazer estudos parasitológicos sem a necessária morte do hospedeiro intermediário, levando em consideração aspectos ecológicos dos grupos de moluscos em questão. A avaliação desta abordagem precisa ser estendida para outros modelos de relação parasito-hospedeiro além de mais estudos para entender a relação dos biomarcadores em potencial com a presença do parasito.

Ainda assim, já se torna possível o ensaio desta metodologia em animais com infecção natural para encaminhar a adequação de novo método capaz de produzir dados em estudos de dinâmica populacional integrada de parasitos e hospedeiros.

Capítulo II

Manuscrito 2

“Infection of *Angiostrongylus costaricensis* associated with the slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) – A new risk of infection involving grape consuming”

Conclusões gerais e Perspectivas

Na busca por moluscos terrestres, foi identificado um novo hospedeiro intermediário de *A. costaricensis*. Espécimes do molusco introduzido *Meghimatium pictum* foram coletados na residência de paciente previamente infectado com *A. costaricensis*. Pela primeira vez foi identificada a presença do nematódeo nessa espécie. Coletas em outros locais de ocorrência do molusco devem ser realizadas para estudos de prevalência de *A. costaricensis*, assim como a infecção experimental com larvas de *A. cantonensis* para identificar se a espécie pode, também, atuar como hospedeira intermediária.

Capítulo III

Outros resultados de estudos sobre o parasito e seus hospedeiros

Conclusões gerais e Perspectivas

1. Observações do desenvolvimento embriológico dos moluscos terrestres *Limacus flavus* e *Phyllocaulis* sp.

A tentativa de manter em laboratório a colônia de moluscos terrestres gerou uma maior compreensão acerca do desenvolvimento embriológico de lesmas, hospedeiras intermediárias de *Angiostrongylus* sp. É necessária a repetição deste experimento para que mais imagens sejam captadas acompanhando todos os dias da embriologia desses animais e, assim, melhor entendidas. Essa contribuição se faz válida para estudos de biologia básica e para o objetivo de implementar o cultivo celular para executar o ciclo de vida de *Angiostrongylus in vitro*.

2. Observações da interação entre ácaros e moluscos terrestres

A partir desse acompanhamento, identificou-se a associação do ácaro *Caloglyphus berlesei* nas posturas e em indivíduos em putrefação, a princípio sem causar danos aos moluscos e ovos. Essa associação não havia sido observada até o momento.

Apêndices

Apêndice 1

Tabelas e gráfico, ao nível família, mostrando a abundancia relativa das comunidades fecais de microrganismos associados aos moluscos estudados.

Table A.

Family relative abundance (%) showing the mean between the samples of each *Biomphalaria glabrata* treatment group and *p*-value group (CG: control group, IGAc: infected group with *A. cantonensis* and IGSm: infected group with *S. mansoni*).

Family	Treatment			<i>p</i> -value
	CG	IGAc	IGSm	
<i>Cryomorphaceae</i> *	47.7±7a	0.69±0.5b	0±0b	3.3E-05
<i>Xanthomonadaceae</i> *	0±0b	0.44±0.2b	3.95±0.6a	1.2E-04
<i>Chitinophagaceae</i> *	0±0c	1.07±0.7b	8.8±1.8a	4.7E-04
<i>Uncl-Sphingobacteriales</i> *	0±0b	0.02±0b	1.42±0.4a	1.9E-03
<i>Weeksellaceae</i> *	0.04±0.02b	28.9±19.4a	58.7±5.2a	0.007
<i>Nitrospiraceae</i> *	1.28±0.4a	0.25±0.09b	0.28±0.1b	0.010
<i>Comamonadaceae</i> *	4.47±0.1a	2.11±1b	2.12±0.5b	0.019
<i>Rhodocyclaceae</i> *	2.82±0.5b	8.87±1.7a	8.72±2.2a	0.019
<i>Mycoplasmataceae</i> *	3.46±1.4a	1.06±0.5a	0.18±0.2b	0.023
<i>Neisseriaceae</i>	0.74±0.2a	0.25±0.06a	0.69±0.1a	0.065
<i>Opitutaceae</i>	0.14±0.04a	0.52±0.2a	0.33±0.06a	0.109
<i>Aeromonadaceae</i>	0.87±0.3a	8.19±6.3a	1.15±0.6a	0.162
<i>Bacteroidaceae</i>	0.09±0.08a	5.5±6a	0.04±0.04a	0.270
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.21±0.07a	1.03±1a	0.07±0.03a	0.315
<i>Uncl-Bacteroidales</i>	0±0a	1.34±1.7a	0±0a	0.380
<i>Rikenellaceae</i>	0±0a	12.6±16.7a	0±0a	0.380
Uncl. Bacteria	4.9±6.3a	7.51±5.2a	1.17±0.7a	0.462
<i>Pseudomonadaceae</i>	2.36±0.1a	2.07±1.5a	1.3±0.1a	0.515
Unclassified *	28.4±3.3a	14.9±5.5ab	9.53±1.4b	0.007
Mean±Standard deviation; α=0.05		*statistically significant a=bigger mean b/c smaller mean		

Table B.

Family relative abundance (%) showing the mean between the samples of each *Phyllocaulis* sp. treatment group and *p*-value group (CG: control group and IGAc: infected group with *A. cantonensis*).

Family	Treatment		<i>p</i> -value
	CG	IGAc	
<i>Alteromonadaceae</i>	5.57±3.7	12.8±3.8	1.243
<i>Sphingobacteriaceae</i>	27.6±5.3	21.2±4.1	1.148
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	2.45±2.2	4.88±1.5	0.911
<i>Moraxellaceae</i>	3.20±0.8	1.98±1.2	0.723
<i>Cyclobacteriaceae</i>	0.23±0.1	1.02±1.0	0.770
<i>Enterobacteriaceae</i>	11.3±7.0	6.00±3.3	0.667
<i>Weeksellaceae</i>	2.20±1.4	1.56±0.4	0.818
<i>Flavobacteriaceae</i>	3.21±1.2	2.55±0.8	0.702
<i>Leptotrichiaceae</i>	0.81±0.7	1.08±0.5	0.807
<i>Comamonadaceae</i>	0.79±0.4	0.92±0.5	0.884
<i>Rhizobiaceae</i>	0.64±0.2	0.72±0.5	0.865
<i>Alcaligenaceae</i>	0.52±0.3	0.52±0.1	0.984
Uncl. Bacteria	15.4±0.3	15.4±0.45	0.992
Unclassified 2	13.5±5.2	19.8±4.8	0.114

Mean±Standard deviation; $\alpha=0.05$

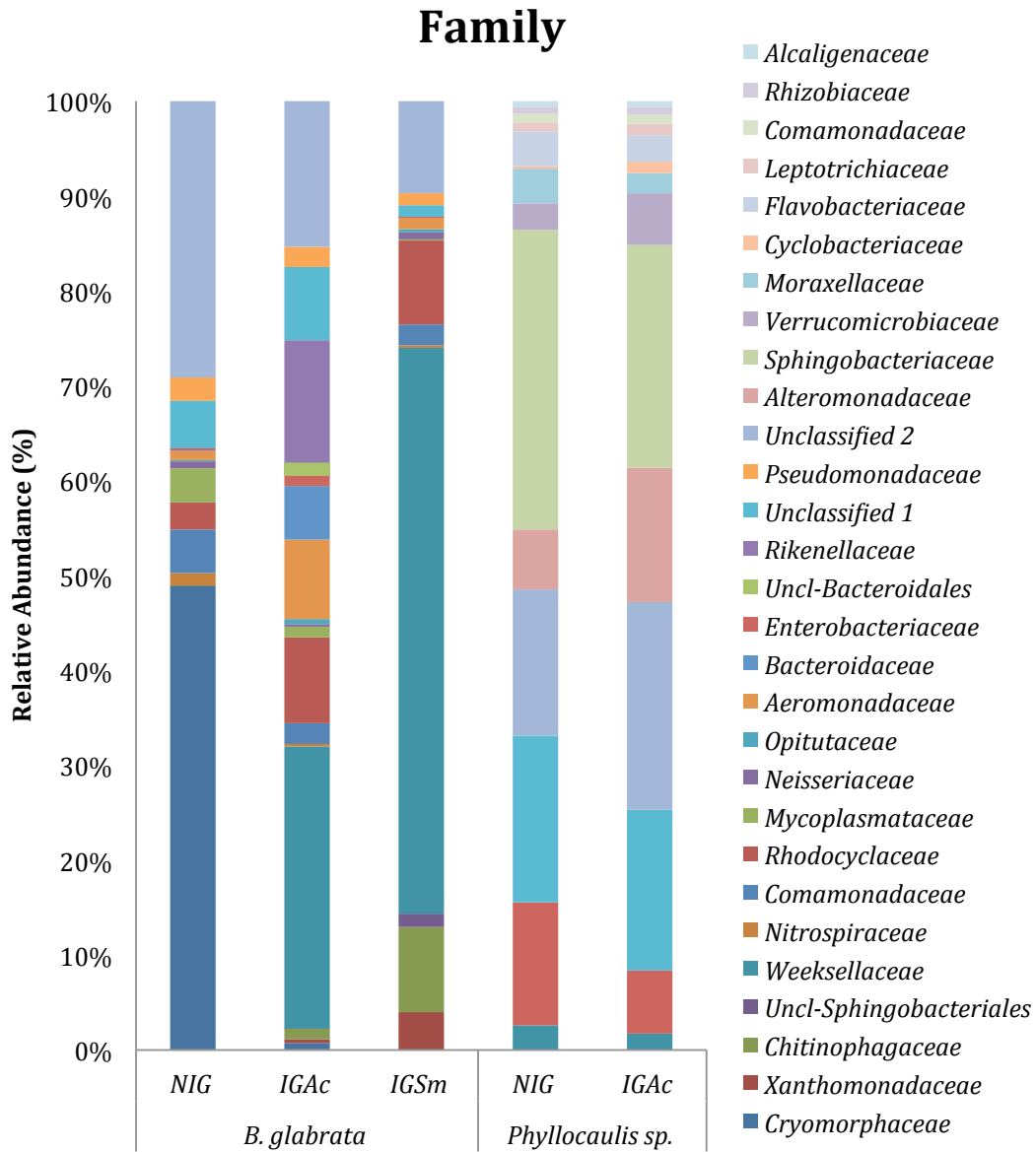


Figure A. Bar plot showing the family relative abundance of each *Biomphalaria glabrata* and *Phyllocaulis sp.* treatment group (CG: control group, IGAc: infected group with *A. cantonensis* and IGSm: infected group with *S. mansoni*).

