

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Estudo sobre moléculas com atividade hemoglobinolítica em *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus cantonensis*

Raquel Rocha Ramos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira

Porto Alegre (RS)

2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Zilá e Juarez, pelo amor, carinho, dedicação e pelo exemplo de vida; aos meus irmãos, Rosane, Ricardo e Renata, pelo amor e apoio; aos meus afilhados, Fabinho e Julinha, por serem o meu Sol e a minha Lua; aos meus cunhados e a toda a minha família, em especial ao tio Quécio, um dos grandes responsáveis por essa conquista.

Ao Marcelo, meu companheiro e parceiro de todas as horas, pelo amor, pela compreensão e pela paciência.

Ao meu orientador Carlos Graeff-Teixeira por sua orientação e dedicação, pelo exemplo profissional e principalmente pessoal a ser seguido e pelas palavras de apoio quando eu mais precisava.

Aos meus colegas do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, pelo carinho e pelos momentos de descontração, ao Juliano Romanzini sempre pronto a ajudar, as colegas Renata Ben e Camila krug pelo apoio e ensinamentos e a minha grande incentivadora Alessandra Morassutti por sua dedicação para a realização desse trabalho, pelo incentivo, pelas idéias e principalmente pelas críticas construtivas.

RESUMO

Angiostrongylus costaricensis e *A. cantonensis* são as principais espécies patogênicas para o homem no gênero *Angiostrongylus*. Esses parasitos tem tropismo tecidual diferentes, *A. cantonensis* é um parasito neurotrópico que causa a angiostrongilíase meningoencefálica e *A. costaricensis* localiza-se no mesentério sendo o agente etiológico da angiostrongilíase abdominal. Os testes imunológicos utilizados ultimamente para o diagnóstico das Angiostrongilíases são limitados pela baixa especificidade. Entretanto, proteínas funcionais especializadas, tais como enzimas, podem ser fontes de reatividade imunológica específica. O objetivo do presente trabalho é identificar atividade hemoglobinolítica nesses parasitos. Tubos digestivos de fêmeas foram homogeneizadas em tampão de lise. As proteínas do extrato (ExAca) foram incubadas com hemoglobina bovina (HbB) em diferentes pHs. Zimografia foi realizado em géis copolimerizados com 0,4% gelatina ou 0,1% BHb. Degradação da hemoglobina foi bem demonstrada em uma ampla faixa de pH, de 3,0 para 7,0. Não foram detectadas bandas de degradação na zimografia com gelatina ou hemoglobina como substrato. Os dados limitados da zimografia e os resultados de atividade hemoglobinolítica, com ou sem a titulação de pH, pode sugerir um complexo de proteases em pequena quantidade. Exploração de diversas estratégias de concentração do extrato protéico, sem perda da atividade da enzima, constitui a perspectiva desse trabalho, visando à identificação, caracterização e produção em larga escala de moléculas com atividade hemoglobinolítica.

ABSTRACT

The two main species in the genus *Angiostrongylus* that cause human disease are *A. cantonensis* and *A. costaricensis*. These parasites have different tissue tropism, *A. cantonensis* is neurotropic and causes eosinophilic meningoencephalitis, *A. costaricensis* is located in the mesentery causing abdominal angiostrongyliasis. Immunological tests currently used for angiostrongyliasis diagnosis are limited by low specificity. Otherwise, specialized functional proteins, such as enzymes, may lead to more specific reactivity. The aim of the present work is to identify hemoglobinolytic activity in *A. cantonensis*. Digestive organs from the female worms were homogenized in lyses buffer. The protein extract (AcPE) was incubated with bovine hemoglobin (BHh) at different pH range. Zymography assay was carried out by copolymerized SDS-PAGE with either 0.4% BHh or 0.1% gelatin. Hemoglobin degradation was well demonstrated at an extensive pH range, from 3.0 to 7.0. No degradation bands were detected by zymography either with gelatin or hemoglobin as substrate. These limited data from zymography and those from pH titration may suggest that AcPE contains not a single component but a low abundance enzyme complex. The identification, characterization and cloning of molecules with hemoglobinolytic activity stays as a priority aim.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Gênero <i>Angiostrongylus</i>	6
1.1.1 <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	6
1.1.2 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12
1.2 Métodos de diagnóstico das angiostrongilíases.....	16
1.3 Hemoglobinasas.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- APMSF** – Phenylmethane sulphonyl fluoride
- BSA** – Albumina do soro bovino
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetracético
- ELISA** – Ensaio imunoenzimático
- ExAca** – Extrato protéico de *Angiostrongylus cantonensis*
- h** – Hora
- HCl** – Ácido clorídrico
- IgG** – Immunoglobulina G
- HbB** – Hemoglobina bovina
- kDa** - Kilodalton
- L1** – Larva de primeiro estágio
- L2** – Larva de segundo estágio
- L3** – Larva de terceiro estágio
- L4** – Larva de quarto estágio
- L5** – Larva de quinto estágio
- Mg** – Miligrama
- mL** – Mililitro
- mM** - Milimolar
- min** – Minuto
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PMSF** – Fluoreto de fenilmetanosulfonila
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- TD** – Tubo digestivo
- TPCK** – Tosilfenilalanil clorometil cetona
- Tris** – Tri (hidroximetil) aminometano
- U/μL** – Unidade por microlitro
- V** - Volts
- x g** – Força gravitacional
- μg** – Micrograma

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Angiostrongylus*

Na superfamília Metastrongyloidea, o gênero *Angiostrongylus*, inclui 20 espécies infectantes para pequenos mamíferos (Bhaibulaya, 1991), dentre as quais *A. costaricensis* e *A. cantonensis* podem ser patogênicas para o homem, quando esse se infecta acidentalmente. Uberlaker (1986) sugeriu que estas duas espécies fossem transferidas para um gênero novo: *Parastrongylus*. Esta sugestão não tem sido adotada na literatura.

1.1.1 *Angiostrongylus costaricensis*

O *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971) é o agente etiológico da angiostrongilíase abdominal. *A. costaricensis* foi caracterizado em 1952, na Costa Rica, por diagnósticos clínicos e histopatológicos. Granulomas e lesões inflamatórias eosinofílicas na região ileocecal eram causadas por um nematódeo intra-arterial (Céspedes *et al.*, 1967). A espécie foi descrita em 1971, por Pedro Morera e Rodolfo Céspedes, a partir do estudo de vermes recuperados de espécimes cirúrgicos de intestinos.

O *A. costaricensis* é um parasito eurixeno, cujo ciclo vital, faz-se através de diversos hospedeiros (figura 1). O hospedeiro definitivo compreende diversos roedores, sendo o rato-de-algodão (*Sigmodon hispidus*), o mais importante deles (Morera, 1973). No sul do Brasil, mais precisamente no Rio Grande do Sul, o roedor *Olygorizomys nigripes* parece ser o principal hospedeiro definitivo do *A. costaricensis*, (Graeff-Teixeira *et al.*, 1990). Os hospedeiros intermediários mais importantes são

moluscos terrestres sem concha, da família Veronicellidae, conhecidos vulgarmente como lesmas, tais como *Phyllocaulis variegatus* e *P. soleiformis* (Moreira, 1973; Graeff-Teixeira *et al.*, 1989; Graeff-Teixeira *et al.*, 1994).

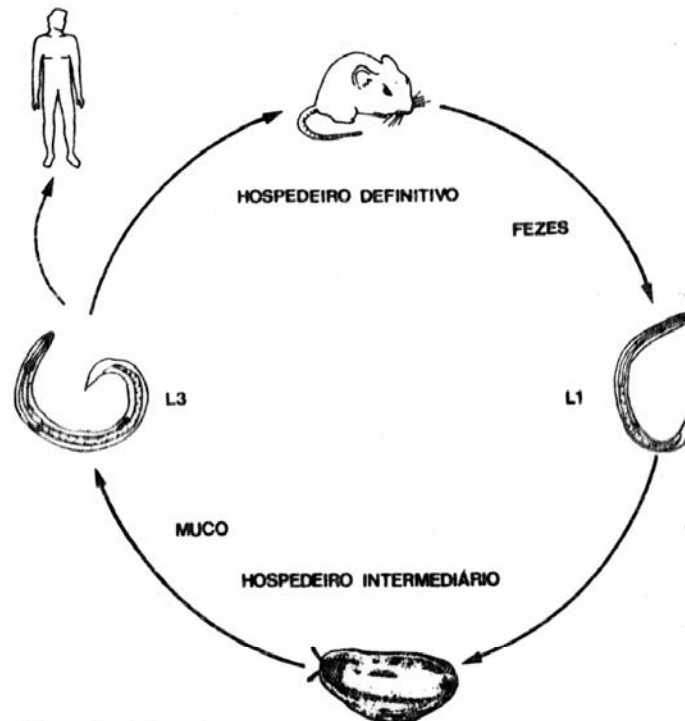


Figura 1 – Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus ssp* (Rey, 2001).

Quanto ao ciclo evolutivo, a interação entre moluscos e roedores se dá quando as larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas com as fezes dos roedores. Os moluscos se alimentam destas fezes contaminadas possibilitando que as larvas L1 cheguem ao tecido fibromuscular, onde elas mudam de L1 para L2 no 4º dia e de L2 para L3 entre o 11º e o 14º dia. Estas larvas, infectantes para os vertebrados, são eliminadas com a secreção mucosa produzida pelo molusco ao se locomover ou ser tocado. A contaminação por água e alimentos (frutas ou verduras), das mãos ou de

instrumentos com a secreção, possibilita a ingestão das larvas L3 que penetram à parede do íleo terminal, migram pelos vasos linfáticos mesentéricos e diferenciam-se em L4 e L5. Após uma semana, aproximadamente, os vermes adultos jovens L5 retornam ao intestino, se alojam nas artérias mesentéricas e, após quatro semanas adquirem maturidade sexual (figura 2).



Figura 2 – Observação da raiz do mesentério e alças intestinais de camundongos experimentalmente infectados com *Angiostrongylus costaricensis*. Por transparência observam-se vermes no interior da artéria mesentérica superior. (Fonte: Camila Krug, Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS).

A angiostrongilíase abdominal tem ampla distribuição geográfica no continente americano, inclui quase todos os países, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Ubelaker e Halln, 1979; Agostini *et al.*, 1984; Demo & Pessat, 1986; Morera *et al.*, 1988). Um caso suspeito foi descrito na África (Baird *et al.*, 1987). No Brasil casos tem sido descritos desde 1975, no Distrito Federal (Barbosa *et al.*, 1980) no Espírito Santo (Pena *et al.*, 1995), em Minas Gerais (Rocha *et al.*, 1991), nos

estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ziliotto *et al.*, 1975; Agostini *et al.*, 1984).

O Rio Grande do Sul é o estado do Brasil que apresenta o maior número de diagnósticos, principalmente no planalto médio do Estado, onde foram registrados 27 casos no período de 1975 a 1984. Os casos costumam ocorrer no final da primavera, verão e início do inverno, mostrando uma sazonalidade (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991 b). As baixas temperaturas possivelmente inibem a evolução das larvas nos moluscos (Ishii, 1984) e, por outro lado, o calor e a umidade da primavera e verão coincidem com a reprodução e maior atividade das lesmas. A sazonalidade de transmissão do *A. costaricensis* no Rio Grande do Sul talvez se deva a estes aspectos ecológicos e da relação parasito-hospedeiro intermediário (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991 b). No sul do Brasil, os pacientes pertencem a todos os grupos etários, contrariando a experiência na América Central, onde a angiostrongilíase parece afetar principalmente as crianças. Isto levou a generalização da idéia errônea da angiostrongilíase como doença pediátrica (Rey, 2001).

A angiostrongilíase abdominal tem como mecanismos patogênicos principais, a ação dos vermes adultos sobre o endotélio das artérias mesentéricas e o desencadeamento de reações inflamatórias locais provocadas pelos ovos, larvas e produtos excretados pelos parasitos. (Morera, 1985)

As lesões causadas por *A. costaricensis* ocorrem principalmente no íleo terminal, apêndice e ceco. São raras as lesões em outros órgãos, tais como o fígado e testículos. Quanto aos tipos de lesões, observa-se inflamação da serosa, espessamento da parede intestinal e zonas de necrose. Há também ulcerações, que podem levar à perfuração do órgão. A patologia é caracterizada por exuberante

eosinofilia de tecido, edema em toda parede intestinal, granulomas com ovos, alguns com desenvolvimento de larvas, presença de macrófagos, alguns linfócitos e abundante eosinofilia (Céspedes *et al.*, 1967; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991 a).

O quadro clínico é muitas vezes agudo com evolução rápida e, podendo em poucos dias exigir intervenção cirúrgica (Rey, 2001). Em razão da localização dos parasitos, a sintomatologia é essencialmente abdominal. Os sintomas mais importantes são as dores abdominais e a febre. Pode também ocorrer anorexia, mal estar, náuseas, vômitos, alteração do hábito intestinal (diarréia ou constipação), sendo também observada a anemia em alguns pacientes infectados (Céspedes *et al.*, 1967; Graeff-Teixeira *et al.*, 1987). Uma das características clínicas mais importantes é a presença de massa dolorosa à palpação, de consistência dura, localizada na fossa ilíaca direita (Morera, 1985).

As manifestações clínicas e a massa palpável no abdômen podem regredir espontaneamente e recidivar em episódios fugazes, durante vários meses. A evolução para quadro de abdômen agudo, às vezes com síndrome de oclusão intestinal, costuma ocorrer em 1 a 14 dias (Graeff-Teixeira, *et al.* 1991 b). Essa patologia pode ser confundida com tumor maligno, enterite regional ou apendicite aguda (Céspedes *et al.*, 1967).

Os quadros mais sérios e de evolução mais rápida são aqueles complicados com obstrução ou ulceração, perfuração, peritonite e sepse (Rey, 2001).

1.1.2 *Angiostrongylus cantonensis*

O *Angiostrongylus cantonensis* é inerentemente neurotrópico, causador da angiostrongilíase meningoencefálica no homem, que pode se manifestar como

meningite (ou meningoencefalite) eosinofílica (Malek & Chen, 1974; Alicata 1991). Esse verme foi recuperado pela primeira vez em Formosa, no ano de 1944, do líquido cérebro-espinhal de um jovem com sintomas de meningite (Nomura & Lin, 1945). O parasito é encontrado principalmente na Ásia e Ilhas do Pacífico e também foi introduzido nas Américas (Caldeira *et al.* 2007, Lindo *et al.* 2002, Campbell & Little 1988, Aguiar *et al.* 1981). Um foco de transmissão autóctone foi detectado pela primeira vez no Brasil, em Cariacica, Espírito Santo, em 2007 (Caldeira *et al.* 2007).

A. cantonensis apresenta como hospedeiros intermediários caramujos como *Bradybaena similares* e *Subulina octona*, além de lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* (Malek & Cheng, 1974). O molusco *Achatina fulica* apresenta suscetibilidade ao parasito e a produção de larvas do nematódeo deste caracol é superior aos demais moluscos, apresentando-se como um importante hospedeiro intermediário (Wang, *et al.* 2008). O primeiro registro de *A. fulica* no Brasil foi no ano de 1997 no estado de São Paulo, em 2001 a presença destes moluscos foi registrada no estado do Rio de Janeiro e hoje pode ser encontrado em inúmeros estados, desde o Amazonas até Santa Catarina (Teles *et al.*, 1997; Vasconcelos & Pile, 2001; Thiengo *et al.*, 2007). Em 2007, Thiengo e colaboradores revisaram a expansão de *A. fulica* no Brasil, o que pode representar um risco de aumento da ocorrência das infecções pelo *A. cantonensis* (Thiengo *et al.* 2007).

Espécies de roedores como o *Rattus rattus* e *R. norvegicus* são os hospedeiros definitivos do parasito conhecido também como “verme do pulmão do rato”, porém outros mamíferos como gatos, macacos, camundongos e o homem podem se infectar (Alicata, 1965).

Os vermes adultos de *A. cantonensis* vivem nos vasos sanguíneos dos pulmões dos roedores (figura 3) onde colocam seus ovos, estes se alojam nos ramos terminais das artérias pulmonares onde eclodem após seis dias, liberando larvas de primeiro estágio (L1) (Weinstein *et al.*, 1963). As larvas L1 infectam os hospedeiros intermediários moluscos, onde evoluem para larvas de terceiro estágio (L3). Os hospedeiros definitivos infectam-se após ingerir as larvas de terceiro estágio. Estas larvas migram do intestino do hospedeiro para o sistema nervoso central (figura 4), onde se tornam adultos jovens após dois estágios de desenvolvimento, que ocorrem em duas ou três semanas. Os adultos migram para o espaço subaracnóideo, entram no sistema venoso e chegam às artérias pulmonares onde atingem a maturidade. As larvas L1 são detectadas nas fezes dos roedores de 40 a 60 dias após infecção.

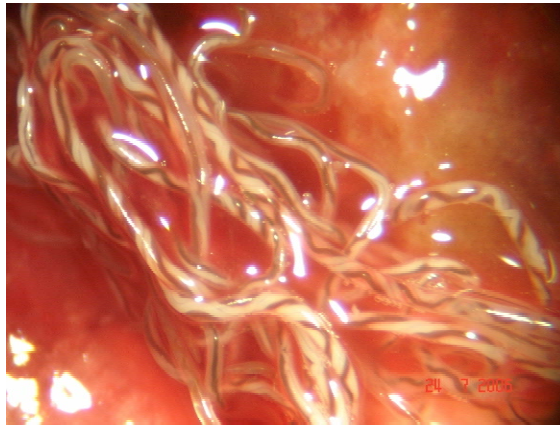


Figura 3 – Espécimes de *Angiostrongylus cantonensis* logo após retirados das artérias pulmonares de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados. Observa-se o aspecto espiralado dos tubos digestivos e reprodutores. Fotografia feita por Camila Krug, Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS.

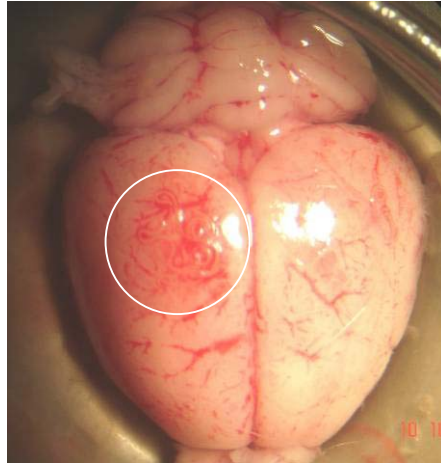


Figura 4 – Larvas de *Angiostrongylus cantonensis* visíveis por transparência no cérebro de ratazana experimentalmente infectada. Fotografia feita por Camila Krug, Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS.

O homem pode adquirir o nematódeo através da ingestão de larvas L3 em alimentos contaminados, água ou os próprios moluscos infectados pelo verme. Como as larvas são encontradas no muco produzido pelo molusco, e eles são ávidos por verduras, legumes e frutas, é provável que o consumo humano destes vegetais seja a maneira mais comum de aquisição do parasito (Morera *et. al.*, 1988).

A meningoencefalite eosinofílica, causada pelo *Angiostrongylus cantonensis*, trata-se de uma infecção que pode desenvolver doença complicada, pois o parasito aloja-se no sistema nervoso central. A gravidade da patogenia depende diretamente dos danos causados pela movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa. Em cortes histológicos, observam-se em torno dos vermes, células inflamatórias (histiócitos, neutrófilos e eosinófilos) (Cross, 1987).

Esta doença apresenta sintomas clínicos variáveis, que podem se manifestar por meses. Podem aparecer os seguintes sintomas: febre, vômito, náuseas,

irritabilidade, ausência de reflexo nos tendões, retenção ou incontinência anal e urinária, rigidez no pescoço, prurido, exantema, dor abdominal, lesões oculares permanentes (Kuberski *et al.* 1979, Punyagupta *et al.* 1975; Wang *et al.*, 2008). A angiostrongilíase raramente é fatal e a mortalidade é maior entre as crianças. A eosinofilia pode ser constatada no sangue periférico e no líquido pela citologia. Algumas infecções secundárias bacterianas também podem ser observadas (Wilson, 1991).

1.2 Métodos de diagnóstico das angiostrongilíases

A confirmação dos casos suspeitos de angiostrongilíase abdominal pode ser feita pelo exame histopatológico de biópsia ou peças cirúrgicas (Rey, 2001). Devido a forte reação inflamatória, as formas larvais não são capazes de alcançar a luz intestinal, não sendo possível, então, um diagnóstico através de exames de fezes (Morera, 1985; Graeff-Teixeira *et al.*, 1997). Os testes imunológicos empregados para o diagnóstico são: a) aglutinação em partículas de látex, empregando antígenos totais de vermes adultos, com baixa especificidade; b) teste imunoenzimático (ELISA) utilizando antígenos brutos provenientes de vermes adultos fêmeas para a detecção de imunoglobulina G (IgG), apresentando especificidade de 83% e sensibilidade de 86% (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997); c) ELISA utilizando antígeno de ovos de *A. costaricensis* com especificidade de 87% e sensibilidade de 90,5% (Mesén-Ramirez *et al.*, 2008). A reatividade cruzada com outros nematódeos tem sido um problema para o desempenho satisfatório de especificidade destes testes (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997; Mesén-Ramirez *et al.*, 2008). A detecção de ácidos nucleicos no soro pela reação em cadeia da polimerase (PCR), não faz parte da

rotina de exames, embora represente uma possibilidade de detecção da infecção em sua fase aguda (Silva *et al.*, 2003).

Na angiostrongilíase cerebral, a análise do líquido demonstra a presença de eosinófilos e muito raramente, das larvas (Punyagupta *et al.*, 1975). O diagnóstico diferencial da meningite eosinofílica é importante visando à exclusão de casos de gnatostomíase, baylisascariíase, cisticercose, toxocaríase e hidatidose, cujas manifestações clínicas são semelhantes (Re III & Gluckman, 2003). Como na angiostrongilíase abdominal, o exame de fezes é inútil, pois nunca foi demonstrada a eliminação de larvas pelo homem.

1.3 Hemoglobinas

A. cantonensis e *A. costaricensis* são vermes que vivem dentro das artérias do hospedeiro, portanto, é provável que eles retirem os nutrientes necessários para a sua sobrevivência a partir do sangue do hospedeiro, degradando a hemoglobina, dentre outras moléculas. Quando observados macroscopicamente ou em pequeno aumento ao microscópio, esses vermes apresentam o tubo digestivo bem marcado, de cor vermelho escuro, cheio de sangue do hospedeiro (figura 5). Dentre as enzimas digestivas desses nematódeos, as que degradam hemoglobina, foram identificadas em *A. cantonensis* com maior atividade no tubo digestivo do que em outros órgãos (Maki *et al.*, 1982, Kasschau, M. R. *et al.*, 1986).



Figura 5 –*Angiostrongylus cantonensis* - Verme adulto com tubo digestivo bem visível de cor vermelho pela presença de sangue do hospedeiro no seu interior. Fotografia feita por Camila Krug, Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS.

Alguns helmintos como *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica*, adquirem a hemoglobina do hospedeiro após ingerir suas hemácias (Lowther *et al.*, 2009, Dalton *et al.*, 1997). Essa hemoglobina vai para o intestino do parasito, onde é degradada em dipeptídeos e aminoácidos livres. Esses aminoácidos são essenciais para o crescimento, desenvolvimento, e reprodução do verme (Brindley *et al.*, 1997 Zussman *et al.*, 1970). Na rota de degradação da hemoglobina são encontradas enzimas com atividades proteolíticas, as hemoglobinasas (Dresden & Deelder, 1979, Brindley *et al.*, 1997, Dalton *et al.*, 2003).

As proteases são enzimas que degradam proteínas, catalisando a clivagem de ligações peptídicas. Elas são divididas em quatro grandes grupos, baseando-se no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico das enzimas: serino, metalo, carboxilo e tiol proteases (Maki *et al.*, 1982, Mckerrow, 1988).

O número de proteases que tem sido descobertas com o papel de degradar hemoglobina em *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica* é grande, e inclui

catepsinas do tipo L, D, C e B. A maior parte é do tipo carboxilo, mas aparece também o tipo tiol (Brindley *et al.*, 1997, Baig *et al.*, 2002, Dalton *et al.*, 2003). A presença dessas hemoglobinas foi demonstrada também em outros parasitos que dependem da degradação da hemoglobina para sua sobrevivência, incluindo *Plasmodium falciparum* (Dahl *et al.*, 2005), *Ancylostoma caninum* (Harrop *et al.*, 1996), *Strontronyloides stercoralis* (Gallego *et al.*, 1998), *Haemonchus contortus* (Longbottom *et al.*, 1997), *Caenorhabditis elegans* (Ray & McKerrow, 1992), *Haplometra cylindracea* (Hawthorne *et al.*, 1994) e *Paragonimus westermani* (Choi *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Estudar hemoglobinas de *Angiostrongylus* spp

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Verificar a presença de atividade hemoglobínica em extratos solúveis de *Angiostrongylus* spp.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

**HEMOGLOBINOLITIC ACTIVITY IN PROTEIN EXTRACTS FROM THE GUT OF
*ANGIOSTRONGYLUS CANTONESIS***

**Raquel Rocha Ramos, Camila Krug, Alessandra L. Morassutti, Carlos Graeff-
Teixeira.**

**Grupo de Parasitologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul - PUCRS**

Corresponding author: Carlos Graeff-Teixeira

Av. Ipiranga, 6681 – prédio 12- CEP 90619900 – Porto Alegre- RS – Brazil

Phone: 55 51 3320-3545 – Fax: 55 51 3320-3312

e-mail: graeteix@pucrs.br

ABSTRACT

The two main species in the genus *Angiostrongylus* that cause human disease are *A. cantonensis* and *A. costaricensis*. These parasites have different tissue tropism, *A. cantonensis* is neurotropic and causes eosinophilic meningoencephalitis, *A. costaricensis* is located in the mesentery causing abdominal angiostrongyliasis. Immunological tests currently used for angiostrongyliasis diagnosis are limited by low specificity. Otherwise, specialized functional proteins, such as enzymes, may lead to more specific reactivity. The aim of the present work is to identify hemoglobinolytic activity in *A. cantonensis*. Digestive organs from the female worms were homogenized in lyses buffer. The protein extract (AcPE) was incubated with bovine hemoglobin (BHh) at different pH range. Zymography assay was carried out by copolymerized SDS-PAGE with either 0.4% BHh or 0.1% gelatin. Hemoglobin degradation was well demonstrated at an extensive pH range, from 3.0 to 7.0. No degradation bands were detected by zymography either with gelatin or hemoglobin as substrate. These limited data from zymography and those from pH titration may suggest that AcPE contains not a single component but a low abundance enzyme complex. The identification, characterization and cloning of molecules with hemoglobinolytic activity stays as a priority aim.

Key words

Angiostrongylus; Hemoglobinases; Proteases

1. Introduction

The two main species in the genus *Angiostrongylus* that cause human disease are *A. cantonensis* and *A. costaricensis*. These parasites have different tissue tropism: *A. cantonensis* is neurotropic and causes eosinophilic meningoencephalitis (Malek & Chen, 1974; Alicata, 1991). *A. costaricensis* is located in the mesentery and it is the etiologic agent of abdominal angiostrongyliasis causing gastrointestinal symptoms such as acute abdominal pain or perforation of the intestinal wall (Graeff-Teixeira et al., 2005).

Several helminthes ingest their hosts' blood and degrade hemoglobin into dipeptides and free amino acids. These amino acids are essential for worm growth, development and reproduction. In the course of hemoglobin degradation route there are some proteolytic enzymes called hemoglobinases (Zussman *et al.* 1970; Dresden & Deelder 1979; Brindle *et al.* 1997; Dalton *et al.* 2003).

Hemoglobin degradation has been studied in several parasites, like *Plasmodium falciparum* (Dahl *et al.* 2005), *Ancylostoma caninum* (Harrop *et al.* 1996), *Strongyloides stercoralis* (Gallego *et al.* 1998), *Haemonchus contortus* (Longbottom *et al.* 1997), *Caenorhabditis elegans* (Ra *et al.* 1992), *Haplometacyclidra* (Hawthorne *et al.* 1994), *Paragonimus westermani* (Choi *et al.* 2006), *Schistosoma mansoni* (Brindley *et al.* 1997) and *Fasciola hepatica* (Dalton *et al.* 2003). From such studies, cathepsins L, D, C and B have been identified (Baig *et al.* 2002). Hemoglobinolytic activities have also been demonstrated in *A. cantonensis* (Maki *et al.* 1982, Kasschau *et al.* 1986). It is reasonable to think that both *A. costaricensis* and *A. cantonensis* have hemoglobinolytic activities since they live inside arteries and may rely on hemoglobin degradation as a nutrient source.

We report here the experiments searching for hemoglobinolytic activities in protein crude extracts from *A. cantonensis*.

2. Materials and Methods:

2.1 Worms:

A. cantonensis was chosen as experimental model since it is easier than *A. costaricensis* to get large numbers of worms. Animal handling was made according to Brazilian rules and the protocol was approved by PUCRS Ethics Committee on Animal Use, number 45/08 08/26.

2.2 *Angiostrongylus cantonensis* Protein Extract (AcPE):

Forty adult female worms had their digestive organ isolated by micro dissection under a stereomicroscope. The procedure was done on the cooler ceramic plate (4 °C) used for electrophoresis (Amersham, EUA). The digestive organs (DO) separated from the worms were homogenized in lyses buffer (50mM Tris, pH 7.4, 0.1% Triton-X100) in liquid nitrogen. Samples were centrifuged twice at 4° C for 30 minutes, 30000×g. The protein content of supernatants was quantified by Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) and stored at -20°C until use.

2.3 Hemoglobinolytic Activity Assay:

In order to assess hemoglobinolytic activity, 0,39µg of AcPE was incubated adding 2µg bovine hemoglobin(BHb) (SIGMA) in Tris-buffer (50mM, pH 5.0) for 18h at 37°C. Samples were then analyzed by 12% SDS-PAGE (Laemmli 1970). BHb only

was used as negative control and BHb plus cathepsin-B as a positive. Proteins were stained by Coomassie Blue R-250.

2.4 pH Titration Assay:

2 μ g BHb was incubated adding 0,39 μ g AcPE in Tris-buffer at different pHs values (3 to 7) for 24 h at 37°C. After that samples were analyzed by 12% SDS-PAGE as describe above.

2.5 Inhibition Assay:

In an attempt to identify proteases classes with hemoglobinolytic activity different inhibitors were incubated with a mixture of the AcPE and the substrate: E-64 (5 μ M); EDTA (5mM); PMSF (1mM); TPCK (1mM); APMSF (100 μ M). Each inhibitor was separately added to sample containing 2 μ g BHb and 0,39 μ g AcPE in Tris-buffer incubated for 18h at 37°C. Samples were analyzed by 12% SDS-PAGE as describe above.

2.6 Zymography

For the zymographic study 12% SDS-PAGE gels were copolymerized with either 0.4% BHb or 0.1% gelatin and before samples were added they were submitted to 150 V for 15 min as previously described (Mehrzaad *et al.* 2005). 15.8 μ g samples of AcPE were separated by application of a 200 V and staining was done with Coomassie Blue R-250, after a washing steps with Triton X-100 2,5% for 30 min and Tris-HCl 50mM pH 5,0 for 15h at 37°C.

3. Results

AcPE when assayed with the Bradford method showed a protein yield of 132 mg/ml. The hemoglobinolytic activity assay showed BHb degradation by AcPE (see fig.1).

Interestingly the pH titration assay showed no significant difference at the range of pH 3 to 7 (see fig.2).

At the inhibition assay a reduction in intensity both of the 64kDa BHb subunit by EDTA (fig. 3) and 32kDa BHb subunit by E64 inhibitor (fig. 4) was detectable. This inhibition was not confirmed in one replica of the experiment. Current shortage of worms in the laboratory prevented further replicates of this experiment in order to confirm the findings. Inhibition was not observed with PMSF, TPCK and APMSF.

No hemoglonolytic activity of AcPE was evident at the zymography gel. (fig. 5).

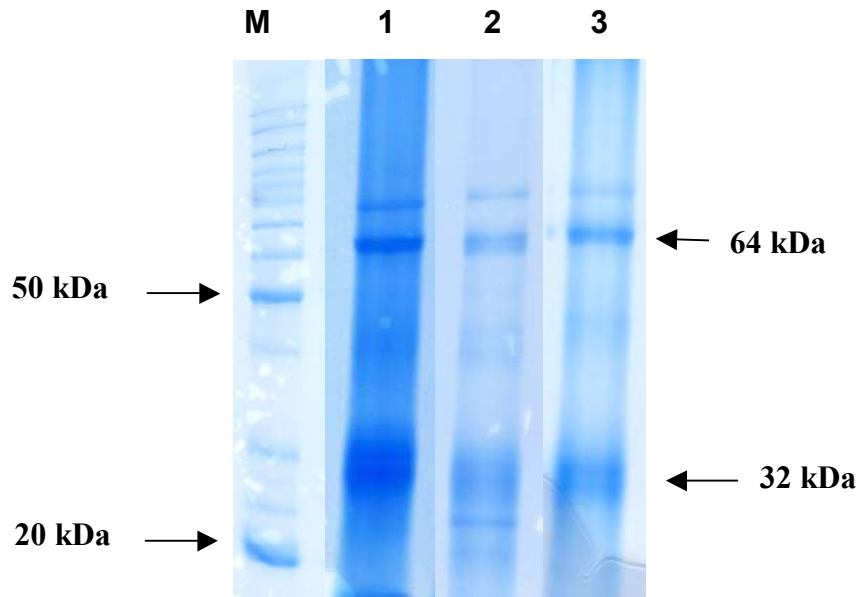


Figure 1 – **Hemoglobinolytic Activity Assay** – SDS-PAGE of hemoglobinolytic activity assay in 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue. The samples were incubated for 18 h at 37°C and analyzed by 12% SDS-PAGE. **M** – Molecular weight markers; **1** – negative control (2 µg HbB); **2** – positive control (2 µg HbB, cathepsin B 0,025 U/µL); **3** – 2 µg HbB and AcPE (0,39 µg).

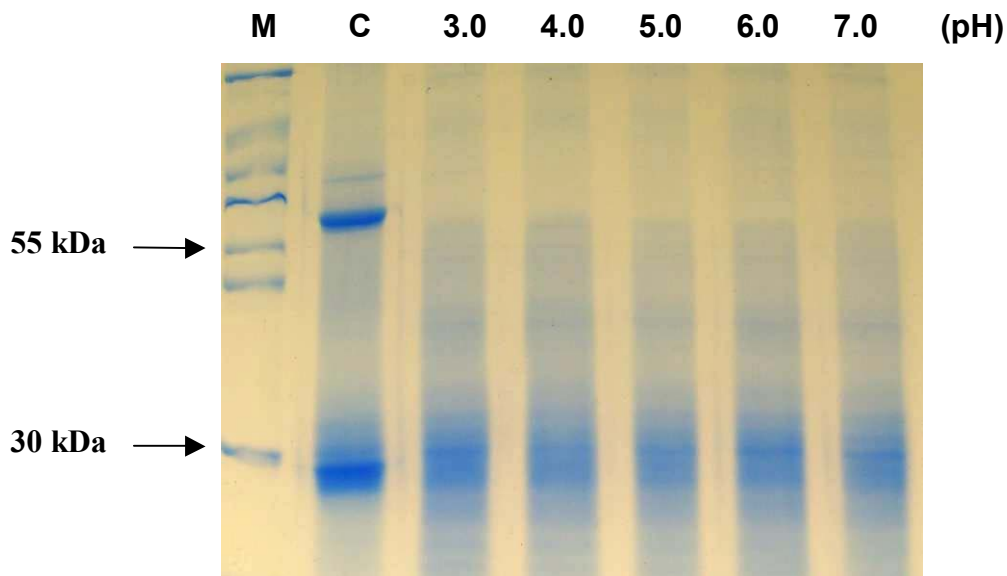


Figure 2 – **pH Titration Assay**. SDS-PAGE of pH titration assay in 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue. The samples (2 µg HbH, 0,39 µg AcPE) were incubated for 24 h at 37°C, in buffer Tris-HCL at different pHs. **M** - Molecular weight markers; the pH range is represented up to gel; **C** - positive control (2 µg HbH).

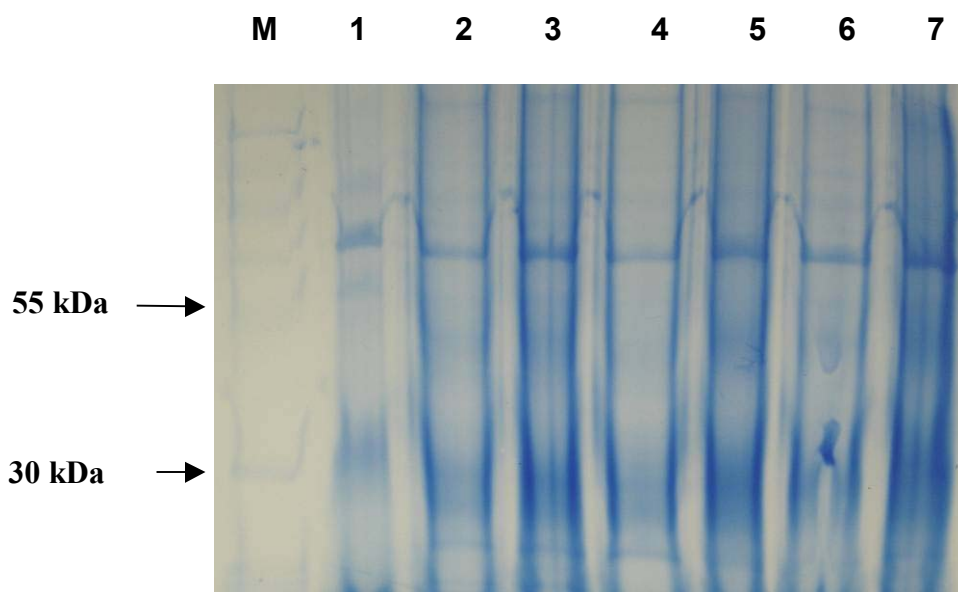


Figure 3 – **Inhibition Assay** – SDS-PAGE of inhibition assay in 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue. **M** – Molecular weight markers; **1** – negative control (HbB, in 50 mM Tris-HCl (pH 5.0)); **2** – positive control (HbB, AcPE in 50 mM Tris-HCl (pH 5.0)); HbB, AcPE in 50 mM Tris-HCl (pH 5.0) adding different inhibitors: **3** - E-64; **4** – EDTA; **5** – PMSF; **6** – TPCK; **7** – APMSF.

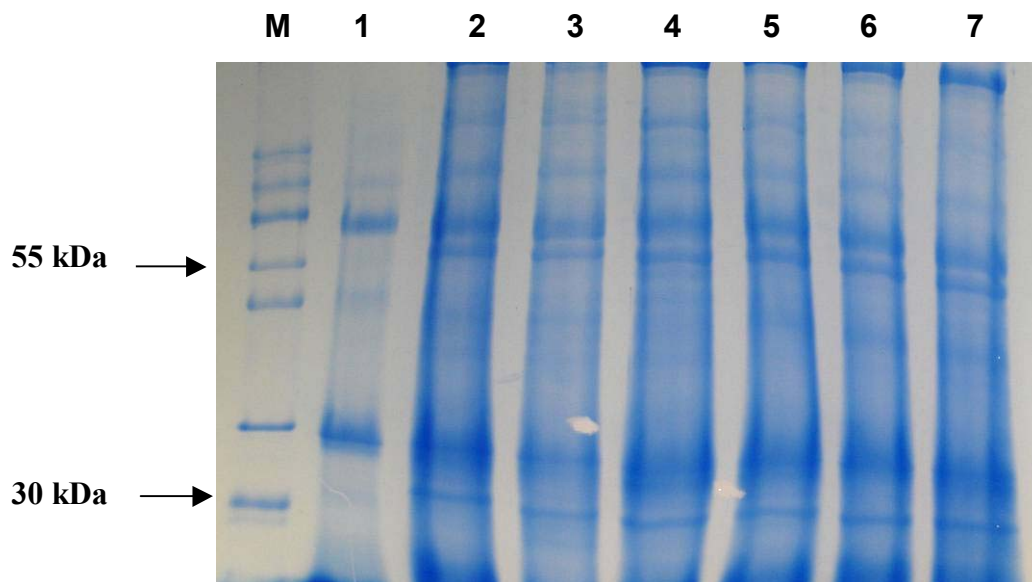


Figure 4 - **Inhibition Assay** –SDS-PAGE of inhibition assay in 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue. **M** –Molecular weight markers; **1** – negative control (HbB, in 50 mM Tris-HCl (pH 5.0)); **2** – positive control (HbB, AcPE in 50 mM Tris-HCl, pH 5.0); HbB, AcPE in 50 mM Tris-HCl (pH 5.0) adding different inhibitors: **3** - E-64; **4** – EDTA; **5** – PMSF; **6** – TPCK; **7** – APMSF.



Figure 5 – **Zymography Assay** – SDS-PAGE of zymography assay in 12% hemoglobin.copolimerized polyacrylamide gel stained with Coomassie blue. **1** – AcPE; **2** – positive control (cathepsin B 0,025 U/μL).

4. Discussion:

Cross reactivity is a problem for immunodiagnosis of helminthiasis. Improvement of serological methods has been a long standing challenge and several strategies have been employed: purifications through chromatography and anatomic extracts such as surface antigen (Harrison *et al.* 2008) or excretion-secretion antigens (Teixeira-Caldeira *et al.* 2008) and selection of stage or phase specific antigens (Pietkiewicz *et al.* 2007), like the 205 kDa *A. cantonensis* 5th stage larvae (Chye *et al.* 1997). Sometimes improvement is possible by selecting antibody-class specific responses, like IgG4 in filariasis (Ottensen *et al.* 1985).

Structural proteins are the most abundant molecules in complex antigen extracts. These proteins are usually phylogenetically conserved and shared among several organisms. Antibody that recognizes those proteins may cause cross reactivity and false-positive results. Otherwise, specialized functional proteins, such as enzymes, may lead to more specific reactivity.

Due to the peculiar location of intravascular worms, enzymes which degrade hemoglobin may be potential targets for specific immune response (Noya *et al.* 2003, Loukas *et al.* 2005). Moreover it may constitute therapeutic targets since inhibition of hemoglobin degradation may impair parasite fitness, as evidenced by Sijwali and coworkers in a *Plasmodium falciparum* gene silencing study (2006).

Parasites that live inside biliary tree and venous mesenteric blood such as *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni* ingest their host's blood and degrade hemoglobin to provide necessary nutrients for worm growth, development and reproduction (Brindley *et al.*, 1997 Zussman *et al.*, 1970). This probably also occurs in Metastrongyloidea superfamily: In *Angyostrongylus cantonensis* hemoglobinolytic

activity have already been identified (Maki *et al.* 1982, Kassachau *et al.* 1986) although not with the same purposes as those in the present investigation.

Among that superfamily there are two main parasites causing human disease that may be considered of public and individual health concern. *Angiostrongylus costaricensis* may cause severe abdominal disease with intestinal obstruction, peritonitis and sepsis (Céspedes *et al.* 1967). *A. cantonensis* it is the causative agent of eosinophilic meningoencephalitis (Beaver & Rosen 1945, Re III & Gluckman 2003; Wang *et al.* 2008). Abdominal angiostrongyliasis was first reported in Costa Rica where it is considered a public health problem (Morera 1980). *A. costaricensis* occurs throughout Americas, from the southern USA to northern Argentina (Morera 1973, Pena *et al.* 1995). Isolated cases were reported in Africa and Europe (Baird *et al.* 1987, Vázquez *et al.* 1993). In southern Brazil abdominal angiostrongyliasis is a more frequent cause for intestinal obstruction and perforation than other intestinal inflammatory diseases like ulcerative colitis and tuberculosis (Agostini *et al.* 2001).

Cases of eosinophilic meningitis have been reported in the southeastern Asia and Pacific basin (Kliks & Palumbo 1992, Uchikawa *et al.* 1984, Wang *et al.* 2008), and several reports describe the spreading of the infection worldwide (Brown *et al.* 1986, Heaton & Gutteridge 1980) including two recently detected active transmission foci in Brazil: Cariacica, Espírito Santo, and Recife, Pernambuco (Caldeira *et al.* 2007; Ana CA Silva, personal communication). A few outbreaks have also been reported (Tsai *et al.* 2001, Kliks *et al.* 1982).

Angiostrongyliasis is transmitted through contaminated food what and alert was raised on food safety in countries like the U.S.A. (Qvarnstrom *et al.* 2007). In non endemic countries without active transmission foci the parasite may be introduced by

food trade. Besides that, increased travel facilities expose a growing number of people outside of well-known endemic areas (Kirsch *et al.* 2008, Vázquez *et al.* 1993).

Parasitological diagnosis can not be performed in both forms of angiostrongyliasis since larvae probably are retained in human tissues by the inflammatory reaction and prevented to reach feces (Alicata 1965, Morera 1985, Graeff-Teixeira *et al.* 1997). Suspected cases may be confirmed by anatomopathological examination of biopsies or surgical specimens (Graeff-Teixeira *et al.* 1991). Besides other outdated methods, like precipitin tests, immunological tests currently used for diagnosis are: a) latex agglutination, employing adult worms crude antigens (Morera 1987); b) immunoglobulin G (IgG) detection by immunoenzymatic assay (ELISA) employing female worms crude extracts, with 83% specificity and 86% sensibility (Graeff-Teixeira *et al.* 1997); c) egg antigen ELISA, with 87% specificity and 90,5% sensibility (Mesén-Ramirez *et al.*, 2008). PCR has been described for detection of nucleic acids at acute phase of infection in serum, although it lacks a more extensive evaluation (Silva *et al.* 2003).

Larvae are seldom identified in cerebrospinal fluid in *A. cantonensis* infection (Punyagupta *et al.* 1975). For the differential diagnosis of eosinophilic meningitis is necessary the consideration of gnathostomiasis, bayliascariasis, cisticercosis, toxocariasis, paragonimiasis, neuroschistosomiasis infections, among other less frequent causes that may produce similar clinical manifestations (Re III & Gluckman 2003).

Besides the need for improved diagnosis, the background justification for the present investigation is the testing of the hypothesis that functional specialized

proteins are better source of antigens for diagnosis. *A. cantonensis* was chosen as experimental model since it is easier than *A.costaricensis* to get large numbers of worms. As long as both species are distinctly located in their hosts, occur in different areas and also manifest distinct clinical manifestations, there is a possibility to use heterologous antigen.

Hemoglobin degradation was well demonstrated in the present results, what may indicate the important role of molecules with these activities for the survival of the parasite as it has been considered with other hematophagous parasites (Dalton *et al.* 1995, Becker *et al.* 1999).

Interestingly the hemoglobinolytic activity was observed in an extensive pH variation suggesting that *A. cantonensis* may have a complex of molecules with different optimums pHs (Fig 2). Several studies have been shown pH effects on enzyme activity (Choi *et al.* 2006, Gluzman *et al.* 1994). At least three different classes of hemoglobin degrading proteases are found in a hematophagous parasite *Plasmodium falciparum* (Willimson *et al.* 2004).

The protease inhibitor E64 showed some effect at the inhibition assay (fig. 4) suggesting that a cysteine protease may be involved in the degradation of hemoglobin as previously shown with other parasites (Choi *et al.* 2006, Dalton *et al.* 1996, Dalton *et al.* 2003). EDTA inhibitory effect was also observed (Skinner-Adams *et al.* 2007) suggesting that metalloproteases may also be present in AcPE. However further replicates of the inhibition assay are necessary to confirm these results. In addition PMSF, TPCK and APMSF inhibitors did not show any effect.

Several zymography assays were made in order to identify hemoglobinolytic compounds without success even when gelatin was employed as a substrate. These

limited data from zymography and those from pH titration may suggest that AcPE contains not a single component but a low abundance enzyme complex. Additional explanation for zymography's results may be that proteins are usually reduced and alkylated during electrophoresis. Approximately 89% of proteins contain cysteine and 17% of their tryptic peptides contain at least one cysteine. Cysteine can also form adducts with free acrylamide monomers during gel electrophoresis (Barret *et al.* 2005). Several trials to perform zymography with native gels were unsuccessful.

Efforts to obtain large masses of worms and to test a number of different strategies for protein purification and concentration without lack of enzyme activity constitute the immediate study perspectives. The identification, characterization and cloning of molecules with hemoglobinolytic activity stay as a priority aim. From these efforts better antibodies detection systems, new targets for therapy and extensive testing of the "especialized functional proteins" hypothesis may arise.

REFERENCES

- Agostini, AA, Rodriguez, R, Mazzuco, R, Borges, J, Stobbe, JC, Becker, L, Graeff-Teixeira, C 2001. Angiostrongilose abdominal: patologia cirúrgica de importância regional / Abdominal angiostrongylosis: surgical pathology of regional importance *J Bras Med* 80: 40-2.
- Alicata, JE 1991. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitol Today* 7: 151-153.
- Alicata, JE 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv Parasitol* 3: 223-248.
- Baig, S, Damian, RT, Peterson, DS 2002. A novel cathepsin B active site motif is shared by helminth bloodfeeders. *Exp Parasitol* 101: 83-89.
- Baird, JK, Neafie, RC, Lanoie, L, Connor, DH 1987. Adult *Mansonella perstans* in the abdominal cavity in nine Africans. *Am J Trop Med Hyg* 37: 578-84.
- Barrett J, Brophy PM, Hamilton JV 2005. Analysing proteomic data. *Int J Parasitol* 35: 543-553.
- Beaver PC, Rosen L 1945. Memorandum on the first report of *Angiostrongylus* in man by Nomura and Lin. *Am J Trop Med* 13: 589-590.
- Brindley, PJ, Kalinna, BM, Dalton, JP, Day, SR, Wong, JYM, Smythe, ML, McManus, DP. 1997 Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol Biochem Parasitol* 89: 1-9.
- Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota ES, Pecora IL, Medeiros AMZ, Caldeira OS 2007. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 887-889.
- Céspedes, R, Salas, J, Mekbel, S, Troper, L, Müllner, F, Morera, P 1967. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). *Acta Med Costarric* 10: 235-255.

- Chye SM, Yen CM, Chen ER 1997. Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of angiostrongyliasis. *Am J Trop Med Hyg* 56:408-412.
- Choi, JH, Lee, JH, Yu, HJ, Kim, J, Hong, YC, Kong, HH, Cheng DI 2006. Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine protease, in *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* 3: 187-196.
- Dahl EL, Rosenthal PJ 2005. Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 139: 205-212.
- Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ 1996. Characterization of the cathepsin-Like cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 64: 1328-34.
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 33: 1173–1181.
- Dresden, MH, Deelder, AM 1979. *Schistosoma mansoni*: Thiol proteinase properties of adult worm “hemoglobinase”. *Exp Parasitol* 48: 190-7.
- Gallego SG, Slade RW, Brindley PJ 1998. A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*. *Acta Trop* 71: 17-26.
- Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE 1994. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest* 93: 1602-8.
- Graeff-Teixeira, C, Goulart, AH, Brum, CO, Laitano, AC, Sievers-Tostes, C, Zanini, GM, Bered, PL, Morassutti, A, Geiger, S, Abrahms-Sandi, E, Oliveira, FTS, Maurer, RL, Aguiar, LF, Garrido, CT, Silva, ACA, Rodriguez, R, Schulz-Key, H, Agostini, AA 2005. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 310-5.

- Graeff-Teixeira, C, Agostini, AA, Camillo-Coura, L, Ferreira da Cruz, F 1997. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop Med Int Health* 3: 254-260.
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL 1991. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77: 606-611.
- Harrison GB, Pulford HD, Doolin EE, Pernthaner A, Shoemaker CB, Hein WR 2008. Antibodies to surface epitopes of the carbohydrate larval antigen CarLA are associated with passive protection in strongyloid nematode challenge infections. *Parasite Immunol* 30: 577-84.
- Harrop SA, Prociv P, Brindley PJ 1996. Acasp, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 294-302.
- Hawthorne SJ, Halton DW, Walker B 1994. Identification and characterization of the cysteine proteinase and serine proteinases of the trematode, *Haplometra cylindracea* and determination of their haemoglobinase activity. *Parasitology* 108: 595-601.
- Heaton DC, Gutteridge BH 1980. Angiostrongyliasis in Australia. *Aust N Z J Med* 10: 255-6.
- Laemmli, UK 1970. Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Longbottom D, Redmond DL, Russell M, Liddell S, Smith WD, Knox DP 1997. Molecular cloning and characterization of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 88: 63-72.
- Loukas, A, Bethony, JM, Mendez, S, Fujiwara, RT, Goud, GN, Ranjit, N, Zhan, B, Jones, K, Bottazi, ME, Hotez, PJ 2005. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *Plos Medicine* 10: 1008-1017.

- Kasschau, MR, Robinson, DC, Dreden, MH 1986. *Schistosoma mansoni*: Activation of hemolytic activity in homogenates from live adult worms. *Exp Parasitol* 62: 442-449.
- Kirsch S, Dekumyoy P, Loescher T, Haberl RL 2008. A case of eosinophilic meningitis in Germany. *J Neurol* 255: 1102-1103.
- Kliks MM, Palumbo NE 1992. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Soc Sci Med* 34: 199-212.
- Maki, J, Furuhashi, A, Yanagisawa T 1982. The activity of acid proteases hydrolysing haemoglobin in parasitic helminthes with special reference to interspecific and intraspecific distribution. *Parasitology* 84: 137-147.
- Malek, EA, Cheng, TC 1974. Medical and economic malacology. *Academic Press*. New York.
- Mehrzaad J, Desrosiers C, Lauzon K, Robitaille G, Zhao X, Lacasse P 2005. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 88: 211-22.
- Mesén-Ramirez, P, Abrahams-Sandí, E, Fernández-Quesada, K, Morera, P 2008. *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *J Helminthol* 82: 251-4.
- Morera P 1985. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitol Today* 1: 173-175.
- Morera P 1973. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & 1668 Céspedes, 1971. *Am J Trop Med Hyg* 22: 613-621.
- Noya, O, Noya, BA, Guzmán, F, Bermúdez, H 2003. Immunogenicity of Sm32 synthetic peptides derived from the *Schistosoma mansoni* adult worm. *Immunol Lett* 88: 211-219.
- Ottensen EA, Skvaril F, Tripathy SP, Poindexter RW, Hussain R 1985. Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol* 134: 2707-2712.

- Pena GPM, Andrade Filho JS, Assis SC 1995. *Angiostrongylus costaricensis*: first 1724 record of its occurrence in the State of Espirito Santo, Brazil, and a review of its geographic 1725 distribution. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 369-374.
- Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Paul M, Stankiewicz M, Myjak P 2007. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol Res* 100: 333-7.
- Punyagupta S, Juttijudata P, Bunnag T 1975. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 24: 921-931.
- Qvarnstrom Y, Sullivan JJ, Bishop HS, Hollingsworth R, Silva AJ 2007. PCR based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. *Appl Environ Microbiol* 73: 1415-1419.
- Re III VL, Gluckman SJ 2003. Eosinophilic meningitis. *Am J Med* 114: 217-223.
- Ray C, McKerrow JH 1992. Gut-specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene. *Mol Biochem Parasitol* 51: 239-249.
- Sijwali PS, Koo J, Singh N, Rosenthal PJ 2006. Gene disruptions demonstrate independent roles for the four falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 150: 96-106.
- Skinner-Adams TS, Lowther J, Teuscher F, Stack CM, Grembecka J, Mucha A, Kafarski P, Trenholme KR, Dalton JP, Gardiner DL 2007. Identification of phosphinate dipeptide analog inhibitors directed against the *Plasmodium falciparum* M17 leucine aminopeptidase as lead antimalarial compounds. *J Med Chem* 50: 6024-31.
- Silva ACA, Graeff-Teixeira C, Zaha A 2003. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 295-297.
- Silvera CT, Ghali VS, Roven S, Heiman J, Gelb A 1989. Angiostrongyliasis: a rare cause of gastrointestinal hemorrhage. *Am J Gastroenterol* 84: 329-332.

- Teixeira-Caldeira A, Fujiwara RT, Stemmy EJ, Olive D, Damsker JM, Loukas A, Corrêa-Oliveira R, Constant SL, Bethony JM 2008. Binding of excreted and/or secreted products of adult hookworms to human NK cells in *Necator americanus*-infected individuals from Brazil. *Infect Immun* 76: 5810-6.
- Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, Tsai TH, Lin WR, Huang CK, Yen MY, Yen CM 2001. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *Am J Med* 111: 109-14.
- Vázquez J, Boils PL, Sola JJ, Carbonell F, Burgueño MJ, Giner V, Berenguer-Lapuerta J 1993. Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology* 105: 1544-1549.
- Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 8: 621-30.
- Williamson AL, Lecchi P, Turk BE, Choe Y, Hotez PJ, McKerrow JH, Cantley LC, Sajid M, Craik CS, Loukas A 2004. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem* 279: 35950-7.
- Zussman, RA, Bauman, PM, Petruska, JC 1970. The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 56: 75-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico das angiostrongilíases apresenta-se como um grande problema, pois devido a uma forte reação inflamatória o homem não elimina larvas nas fezes não sendo possível a sua identificação através do exame de fezes (Alicata 1965, Morera 1985, Graeff-Teixeira *et al.* 1997). Vários são os desafios para o aprimoramento de testes imunológicos. Os métodos de detecção de antígenos tem problemas, pois exatamente as moléculas mais antigênicas, antes de serem detectadas no exame são capturadas *in vivo* e dificilmente circulam incólumes. Os métodos de detecção de anticorpos apresentam uma baixa especificidade, especialmente com organismos complexos como os helmintos, onde abundam proteínas geralmente compartilhadas com outros agentes infecciosos. Testes para detecção de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase, detectam apenas a infecção em sua fase aguda. Muitas vezes o esclarecimento diagnóstico se faz necessário várias semanas após a fase aguda e também permanece a necessidade de métodos de diagnóstico para investigações epidemiológicas, onde a contabilização das infecções passadas também importa. Esses problemas justificam os estudos de novas técnicas de diagnóstico que apresentem uma menor reatividade cruzada para os métodos sorológicos.

Nesse trabalho foi confirmada a presença de moléculas com atividade hemoglobinolítica em *Angiostrongylus cantonensis*. Outro resultado foi à constatação da atividade de degradação em diferentes pHs, sugerindo que o parasito possua proteases de diferentes classes, o que também já foi demonstrado em outros parasitos hematófagos como *Plasmodium falciparum* (Willimson *et al.* 2004). A não

visualização da degradação do substrato na zimografia sugere também um complexo de proteínas em pequena quantidade.

Essas enzimas com atividade de degradação de hemoglobina podem ser alvos potenciais de resposta imune relativamente específica (Noya, *et al.*, 2003, Loukas, *et al.*, 2005). As proteínas estruturais especializadas possivelmente possuam uma detecção de anticorpos mais específica possivelmente apresentando uma reatividade pelo menos grupo-específica. A produção de grande quantidade de vermes e exploração de diversas estratégias de concentração do extrato protéico, sem perda da atividade da enzima, constituem as perspectivas imediatas de trabalho, visando a identificação, caracterização e produção em larga escala de moléculas com atividade hemoglobinolítica. Disto poderá resultar a identificação de antígenos úteis para diagnóstico e contribuir na avaliação da hipótese de que proteínas funcionais especializadas proporcionam sistemas de detecção de anticorpos com maior especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alicata JE. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitol Today*. 1991;7:151-153.
- Alicata JE. Occurrence of *Angiostrongylus cantonensis* in Madagascar, Mauritius, Ceylon, and Sarawak. *J Parasitol*. 1965;51(6):937.
- Agostini AA, Marcolan AAM, Lisot JMC, Lisot JUF. Angiostrongilíase abdominal, estudo anátomo patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79:443-445.
- Aguiar PH, Morera P, Pascual J. First record of *angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30:963-5.
- Baird JK, Leafier RC, Lanoie L, Connor DH. Adult *Mansonella perstans* in the abdominal cavity in nine Africans. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;37:578-84.
- Barbosa H, Raick AN, Magalhães AV, Otero PM. Abdominal angiostrongylosis. *Rev Assoc Med Bras*. 1980;26:178-80.
- Bhaibulaya, M. Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis. In: *Emerging problems in Food-Borne Zoonosis: Impact on Agriculture and Public Health* 1991;22:189-93.
- Brindley PJ, Kalinna BM, Dalton JP, Day SR, Wong JYM, Smythe ML, McManus DP. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997;89:1-9.

- Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota ES, Pecora IL, Medeiros AMZ, Caldeira OS. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:887-889.
- Campbell BG, Little MD. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38(3):568-73.
- Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Müllner F, Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). *Acta Med Costarric*. 1967;10:235-255.
- Choi JH, Lee JH, Yu HJ, Kim J, Hong YC, Kong HH, Cheng DI. Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine protease, in *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol*. 2006;3:187-196.
- Cross JH. Public health importance of *Angiostrongylus cantonensis* and its relatives. *Parasitol Today*. 1987;3:367-9.
- Dahl EL, Rosenthal PJ. Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;139:205-212.
- Dalton JP, Clough AM, Jones MK, Brindley PJ. The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*. 1997;114:105-112.
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moire N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol*. 2003;33:1173–1181.

- Demo OJ, Pessat OAN. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso human encontrado en Argentina. *Prensa Med Argent.* 1986;73:732-738.
- Dresden MH, Deelder AM. *Schistosoma mansoni*: Thiol proteinase properties of adult worm "hemoglobinase". *Exp Parasitol.* 1979;48:190-7.
- Gallego SG, Slade RW, Brindley PJ. A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*. *Acta tropica* 1998;71:17-26.
- Graeff-Teixeira C, Agostini AA, Camillo-Coura L, Ferreira FC. Seroepidemiology of abdominal angiostrongiliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop Med Int Health.* 1997;3:254-260.
- Graeff-Teixeira C, Pinto VM, Busato Jr E, Agostini AA. Natural infection of *Phyllocaulis soleiformis* with larvae morphologically similar to L2 of *Angiostrongylus costaricensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89: 121.
- Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongylidiasis. *Parasitol Res.* 1991 a;77:606-611.
- Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongylidiasis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991 b;33: 373-378.
- Graeff-Teixeira C, Avila-Pires FD, Machado RCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1990;32:147-150.

- Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989;84:65-68.
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Abdominal angiostrongyliasis--an under-diagnosed disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82:353-4.
- Harrop SA, Prociv P, Brindley PJ. Acasp, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227:294-302.
- Hawthorne SJ, Halton DW, Walker B Identification and characterization of the cysteine proteinase and serine proteinases of the trematode, *Haplometra cylindracea* and determination of their haemoglobinase activity. *Parasitology*. 1994;108:595-601.
- Ishii AI. Effects of temperature on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *Z Parasitenkd*. 1984;70:375-9.
- Kasschau MR, Robinson DC, Dreden MH. *Schistosoma mansoni*: Activation of hemolytic activity in homogenates from live adult worms. *Experimental Parasitology*. 1986;62:442-449.
- Kuberski T, Bart RD, Briley JM, Rosen L. Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of a child with eosinophilic meningitis. *J Clin Microbiol* 1979;9:629-631.
- Lindo JF, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard ML, Sullivan JJ, Bishop HS, Robinson DG, Holtz T, Robinson RD. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:324-6

- Longbottom D, Redmond DL, Russell M, Liddell S, Smith WD, Knox DP. Molecular cloning and characterization of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;88:63-72.
- Loukas A, Bethony JM, Mendez S, Fujiwara RT, Goud GN, Ranjit N, Zhan B, Jones K, Bottazi ME, Hotez PJ. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *PLoS Med*. 2005;10:1008-1017.
- Lowther J, Robinson MW, Donnelly SM, Xu W, Stack CM, Matthews JM, Dalton JP. The Importance of pH in Regulating the Function of the *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Cysteine Protease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e369.
- Maki J, Furuhashi A, Yanagisawa T. The activity of acid proteases hydrolysing haemoglobin in parasitic helminthes with special reference to interspecific and intraspecific distribution. *Parasitology*. 1982;84:137-147.
- Malek EA, Cheng TC. Medical and economic malacology. *Academic Press*. 1974;New York.
- McKerrow JH, Doenhoff MJ. Schistosome proteases. *Parasitol Today*. 1988;4:334-340.
- Mesén-Ramirez P, Abrahams-Sandí E, Fernández-Quesada K, Morera P. *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *J Helminthol*. 2008;82:251-4.
- Morera P. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitol Today*. 1985;1:173-175.

- Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). *Am J Trop Med Hyg.* 1973;22:613-621.
- Morera P, Andrews KL, Rueda D. The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. *Rev Biol Trop.* 1988;36:575-576.
- Morera P, Céspedes R. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. *Acta Med Costarric.* 1971;14:159-173.
- Noya O, Noya BA, Guzmán F, Bermúdez H. Immunogenicity of Sm32 synthetic peptides derived from the *Schistosoma mansoni* adult worm. *Immunol Lett.* 2003;88:211-219
- Nomura S, Lin PH. First case report of human infection with *Hamostrongylus ratti yokogawa*. *Taiwan No Ikai.* 1945;3:589-592.
- Pena GPM, Andrade Filho JS & Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37:369-374.
- Punyagupta S, Juttijudata P, Bunnag T. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24:921-931.
- Ray C, McKerrow JH. Gut-specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;51:39-249.
- Re III VL, Gluckman SJ. Eosinophilic meningitis. *Am J Med.* 2003;114:217-223.
- Rey L, Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A; 2001.

- Rocha A, Sobrinho JM, Salomão EC. Abdominal angiostrongyliasis. The first indigenous case reported in Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991;24:265-8.
- Silva ACA, Graeff-Teixeira C, Zaha A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45:295-297.
- Teles HM, Vaz JF, Fontes LR, Domingos M de F. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: intermediate snail host of angiostrongyliasis. *Rev Saude Publica.* 1997;31:310-2.
- Thiengo SC, Fernandez MA, Torres EJ, Coelho PM, Lanfredi RM. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *J Invertebr Pathol.* 2007;98:34-9.
- Ubelaker JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *J Parasitol.* 1986;72:237-44.
- Ubelaker JE, Hall M. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971 in the United States. *J Parasitol.* 1979;65:307.
- Vasconcellos MC, Pile E. Ocorrência de *Achatina fulica* na Vale do Paraíba, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Saude Publica.* 2001;35:582-4.
- Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR, Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:621-30.
- Weinstein PP, Rosen L, Laqueur GL, Sawyer TK. *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats and rhesus monkeys, and observations on the survival of the parasite in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1963;12:358-77.

Williamson AL, Lecchi P, Turk BE, Choe Y, Hotez PJ, McKerrow JH, Cantley LC, Sajid M, Craik CS, Loukas A. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem* 2004;279:35950-7.

Wilson ME, A world guide to infections: diseases, distribution, diagnosis. New York: *Oxford University Press.*; 1991.

Zilliotto AJr Künzle JE, Fernandes LA, Prates-Campos JC, Britto-Costa R. Angiostrongyliasis: report of a probable case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1975;17:312-8.

Zussman RA, Bauman PM, Petruska JC. The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1970;56:75-9.