

ELIMINAÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTADIO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DIFERENTES CARGAS DE ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS

Caroline Chaves Hermes¹

Elise Benvegnú²

Marcio Machado Costa³

Maria Isabel Botelho Vieira⁴

Rubens Rodriguez⁵

Resumo:

A angiostrongiliase abdominal (AA) é uma doença causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, sendo uma zoonose endêmica da região do Sul do Brasil, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres. O parasito vive na artéria mesentérica superior de roedores, onde as fêmeas põem ovos que percorrem a corrente sanguínea na parede intestinal, gerando a L1, que será eliminada nas fezes. Nos hospedeiros intermediários as larvas sofrem duas mudas, sendo a L3 a forma infectante, a qual é eliminada junto ao muco dos moluscos. Roedores são infectados por alimentarem-se de legumes ou moluscos contaminados por L3. Os seres humanos participam do ciclo acidentalmente pela ingestão de L3 em alimentos, tendo como sintomas dor abdominal e massa tumoral. A relação entre infecções com diferentes cargas de L3 em um modelo experimental e eliminação de larvas L1 ainda não é conhecido, bem como sua relação com a sobrevivência desses animais. O objetivo do estudo foi avaliar a taxa de eliminação de L1 liberada por camundongos Swiss em uma infecção experimental com diferentes cargas parasitárias de *A. costaricensis*. O estudo foi executado no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo e utilizou trinta e dois camundongos Swiss machos (*M. musculus*), infectados com diferentes cargas de L3 de *A. costaricensis*, oriundas do molusco *Biomphalaria glabrata*, pelo método de gavagem. Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais cada e mantidos em gaiolas individuais, da seguinte maneira: grupo 1 infectado com cinco L3, grupo 2 infectado com 15 L3, grupo 3 infectado com 30 L3 e grupo 4 como controle. As fezes foram coletadas diariamente e pesadas individualmente, a partir do vigésimo dia pós-infecção, até o animal vir a óbito, sendo acondicionadas em um funil pelo método de Baermann, permanecendo "over night", examinando o sedimento em microscópio para a contagem de L1. No presente estudo, os grupos 2 e 3 começaram a eliminar L1 a partir do 22 dias pós-infecção (DPI), no entanto, o grupo 1 começou a eliminar L1 a partir do 23 DPI. Os animais do grupo 2 apresentaram mortalidade mais rápida do que os outros grupos, permanecendo vivos

até 38 DPI. O grupo 3 permaneceu eliminando L1 até 60 DPI, enquanto o grupo 1 eliminou L1 até o 65 DPI, sendo que 2 animais permaneceram vivos até o 100 DPI. Notamos que no mesmo grupo os animais demonstraram diferenças quanto a eliminação de L1 em determinados dias. Em conclusão, a infecção experimental com diferentes cargas de L3 de *A. costaricensis* em camundongos Swiss, apresenta eliminação irregular de L1, ressaltando que infecções com 5 L3 apresentam menor mortalidade e eliminação considerável de L1, sendo um possível modelo para manutenção do ciclo de vida do parasito. Estudos que auxiliem para uma melhor elucidação da AA são importantes para a compreensão de sua patogenia e relação entre parasito e hospedeiro, sendo de notável interesse à saúde pública.

Palavras-chave: Angiostrongiliase abdominal, *Mus musculus*, carga parasitária

Modalidade de Participação: Pesquisador

ELIMINAÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTADIO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DIFERENTES CARGAS DE ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS

¹ Aluno de pós-graduação. 122998@upf.br. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. 130560@upf.br. Co-autor

³ Docente. marciocosta@upf.br. Co-autor

⁴ Docente. marisabel@upf.br. Co-autor

⁵ Docente. rubens.rodriques@terra.com.br. Co-orientador



ELIMINAÇÃO DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTADIO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DIFERENTES CARGAS DE *Angiostrongylus costaricensis*

1. INTRODUÇÃO

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma doença causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, descrito pela primeira vez na Costa Rica (MORERA; CÉSPEDES, 1970). Trata-se de uma zoonose, endêmica da região do Sul do Brasil, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989). O parasito adulto vive nos ramos da artéria mesentérica superior de roedores, onde as fêmeas põem ovos que percorrem a corrente sanguínea na parede intestinal, local onde ocorre a larvogênese gerando a L1, que será eliminada junto as fezes. As larvas podem penetrar os hospedeiros intermediários por via oral ou percutânea, onde em sua camada muscular, as larvas sofrem duas mudas (L1 → L2 → L3), sendo a L3 a forma infectante para os hospedeiros definitivos, a qual é eliminada junto ao muco dos moluscos (MORERA; CÉSPEDES, 1970).

Roedores são infectados por alimentarem-se de legumes ou moluscos contaminados por L3. Os seres humanos participam do ciclo de forma acidental, pela ingestão de L3 do parasito em alimentos (MOTA; LENZI, 2005), tendo como sintomas característicos dor abdominal e massa tumoral palpável, podendo ser confundida com apendicites ou tumores (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989).

A enfermidade parasitária é de importância no Rio Grande do Sul, estado onde foi diagnosticado maior parte dos casos, com destaque a região Norte, evidenciando a presença de sazonalidade da doença. O maior número de casos ocorre na primavera, devido à reprodução e aumento da atividade dos moluscos (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1991). Camundongos da espécie *Mus musculus* desenvolvem AA e são utilizados como modelos experimentais à infecção. Canali et al. (1998), quantificaram as formas parasitárias de larvas de primeiro estadio (L1) liberadas por camundongos *M. musculus*, podendo expressar a melhor interação entre parasito e hospedeiro.

A relação entre infecções com diferentes cargas de L3 em um modelo experimental e eliminação de larvas L1 ainda não é conhecido, bem como sua relação com a sobrevivência desses animais. Pesquisas são necessárias para melhor esclarecer a patogênese da infecção, com uma notável importância para a saúde pública, fornecendo assim melhor compreensão da relação parasito e hospedeiro. O objetivo do estudo foi avaliar a taxa de eliminação de L1 liberada por camundongos Swiss em frente a uma infecção experimental com diferentes cargas parasitárias de *A. costaricensis*.

2. METODOLOGIA

O estudo foi executado no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (ICB/UPF), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UPF (CEUA-UPF - Protocolo Nº 034/2016), e utilizou trinta e dois camundongos Swiss machos (*M. musculus*), entre 8 a 10 semanas, infectados com diferentes cargas de L3 de *A. costaricensis*, oriundas do molusco *Biomphalaria*

glabrata, provenientes do laboratório de Parasitologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), pelo método de gavagem.

Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais cada e mantidos em gaiolas individuais, da seguinte maneira: grupo 1 infectado com cinco L3, grupo 2 infectado com 15 L3, grupo 3 infectado com 30 L3 e grupo 4 como controle (não infectado). As fezes foram coletadas diariamente, sempre ao mesmo horário, e pesadas individualmente, a partir do vigésimo dia pós-infecção, até o animal vir a óbito, sendo acondicionadas em um funil pelo método de Baermann, permanecendo *over night*, examinando o sedimento em microscópio para a contagem de L1. Após, 10 ml do sedimento homogeneizado foi centrifugado e separados em 3 amostras de 10 µl, examinadas em microscópio para a contagem de L1. A soma das contagens das amostras foi multiplicada por 100 e dividida por 3 para estimar o número total de L1 em 1 ml de suspensão. A contagem absoluta de L1 na quantidade de fezes foi dividido pelo peso de fezes em grama e expresso em número de L1/g de fezes (AZEVEDO et al., 2010).

Para avaliar a normalidade das variáveis foi realizado o teste de Shapiro Wilk e os grupos comparados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade (P) menor que 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A patogênese da AA ainda permanece pouco estudada, em especial a relação entre parasito e hospedeiro, sendo representada em modelos murinos. No presente estudo, avaliamos a eliminação de L1 em camundongos Swiss experimentalmente infectados com diferentes cargas parasitárias de L3 de *A. costaricensis*.

Os grupos 2 e 3 começaram a eliminar L1 a partir do 22 dias pós-infecção (DPI), no entanto, o grupo 1 começou a eliminar L1 a partir do 23 DPI. Os animais do grupo 2 apresentaram mortalidade mais rápida do que os outros grupos, permanecendo vivos até 38 DPI. O grupo 3 permaneceu eliminando L1 até 60^o DPI, enquanto o grupo 1 eliminou L1 até o 65 DPI, sendo que 2 animais permaneceram vivos até o 100 DPI, sendo eutanasiados com inalação de Isoflurano.

O teste de Shapiro Wilk revelou que as variáveis não apresentam distribuição normal. Os grupos demonstraram diferenças significativas quanto a eliminação de L1 em determinados dias (Tabela 1).

Notamos que no mesmo grupo, os camundongos apresentaram variações na eliminação diária de L1. Anteriormente, Canali et al. (1998), relataram uma eliminação irregular de L1 e variação no número de L1 eliminadas diariamente por camundongos da mesma linhagem. Azevedo et al. (2010), correlacionaram o ritmo circadiano de eliminação de larvas L1 e a quantidade de larvas/g de fezes, com a sobrevivência de camundongos infectados com 10 L3, demonstrando a tolerância do parasito nesses roedores.

Tabela 1: Taxa de eliminação L1 em camundongos Swiss infectados com diferentes cargas de L3 de *A. costaricensis* (* $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, teste de Dunn)

DPI	Grupos experimentais			Significância
	5 L3	15 L3	30 L3	
20 dias	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	—
21 dias	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	—
22 dias	0,00 $\pm$ 0,00	5,33 $\pm$ 11,92	16,65 $\pm$ 33,33	0,73
23 dias	6,67 $\pm$ 18,68	36,01 $\pm$ 55,89	139,58 $\pm$ 231,07	0,08
24 dias	2,22 ^a $\pm$ 5,87	320,82 ^{ab} $\pm$ 354,51	723,70 ^b $\pm$ 629,98	0,02*
25 dias	4,36 ^a $\pm$ 8,46	324,99 ^{ab} $\pm$ 294,03	1074,44 ^b $\pm$ 1085,82	0,01*
26 dias	27,14 ^a $\pm$ 68,91	929,19 ^b $\pm$ 889,87	1293,09 ^b $\pm$ 1189,26	<0,01*
27 dias	37,08 ^a $\pm$ 82,81	489,41 ^{ab} $\pm$ 235,34	1982,37 ^b $\pm$ 13,79,73	0,01*
28 dias	63,96 ^a $\pm$ 75,07	1117,96 ^{ab} $\pm$ 778,20	3014,58 ^b $\pm$ 2241,84	0,02*
29 dias	145,44 $\pm$ 149,09	1092,59 $\pm$ 325,52	1410,36 $\pm$ 1864,34	0,06
30 dias	290,55 $\pm$ 493,08	2550,00 $\pm$ 1979,90	4090,28 $\pm$ 3341,17	0,06
31 dias	422,21 $\pm$ 400,07	3208,33 $\pm$ 3358,76	2916,66 $\pm$ 2500,63	0,09
32 dias	761,10 $\pm$ 852,70	994,44 $\pm$ 259,26	4538,89 $\pm$ 3859,63	0,19
33 dias	269,99 ^a $\pm$ 297,71	2144,44 ^{ab} $\pm$ 345,69	7644,44 ^b $\pm$ 2956,18	0,01*
34 dias	445,55 $\pm$ 431,73	2738,88 $\pm$ 2726,28	4777,77 $\pm$ 4005,39	0,25
35 dias	570,00 ^a $\pm$ 609,23	2375,00 ^{ab} $\pm$ 1025,30	7962,96 ^b $\pm$ 462,59	0,02*
36 dias	420,66 ^a $\pm$ 433,56	3127,77 ^{ab} $\pm$ 2726,28	11388,88 ^b $\pm$ 5513,45	0,02*
37 dias	253,33 $\pm$ 232,85	1424,99 $\pm$ 223,92	3592,59 $\pm$ 4061,77	0,20
38 dias	481,94 ^a $\pm$ 576,6	2533,33	6592,59 ^b $\pm$ 3528,68	0,03*
39 dias	325,00 ^a $\pm$ 344,0	—	5925,92 ^b $\pm$ 2237,68	0,03*
40 dias	255,55 ^a $\pm$ 169,6	—	7833,33 ^b $\pm$ 2088,33	0,03*
41 dias	833,33 ^a $\pm$ 677,0	—	17592,58 ^b $\pm$ 115584	0,03*
42 dias	1554,16 $\pm$ 2160,8	—	6703,70 $\pm$ 3088,38	0,08
43 dias	688,19 ^a $\pm$ 521,97	—	6574,07 ^b $\pm$ 1294,67	0,03*
44 dias	886,10 ^a $\pm$ 810,17	—	5857,40 ^b $\pm$ 2158,50	0,03*
45 dias	648,60 ^a $\pm$ 540,97	—	6651,84 ^b $\pm$ 2741,37	0,03*
46 dias	1477,77 $\pm$ 1677,0	—	7536,10 $\pm$ 5065,86	0,08
47 dias	841,66 ^a $\pm$ 867,30	—	5122,22 ^b $\pm$ 720,79	0,03*
48 dias	1637,50 $\pm$ 1738,8	—	12496,29 $\pm$ 11036,78	0,08
49 dias	1242,36 $\pm$ 844,86	—	6837,03 $\pm$ 6993,70	0,29
50 dias	1229,62 ^a $\pm$ 1030,4	—	9438,89 ^b $\pm$ 4711,16	0,05*
51 dias	518,51 ^a $\pm$ 467,76	—	11133,32 ^b $\pm$ 4375,31	0,05*
52 dias	1968,51 $\pm$ 1891,0	—	8833,33 $\pm$ 4714,07	0,08
53 dias	2041,66 $\pm$ 1713,5	—	7133,33	—
54 dias	1961,10 $\pm$ 2337,4	—	21566,66	—
55 dias	2417,58 $\pm$ 2400,0	—	10777,77	—
56 dias	3445,37 $\pm$ 3038,1	—	6716,66	—
57 dias	877,77 $\pm$ 1103,57	—	6422,22	—
58 dias	1213,89 $\pm$ 1148,9	—	7255,55	—
59 dias	816,66 $\pm$ 714,74	—	7506,66	—
60 dias	1000,92 $\pm$ 1434,6	—	16566,66	—
61 dias	1840,74 $\pm$ 3083,1	—	—	—
62 dias	905,55 $\pm$ 1439,17	—	—	—
63 dias	2508,33 $\pm$ 4322,3	—	—	—
64 dias	3,70 $\pm$ 6,41	—	—	—
65 dias	25,00 $\pm$ 43,30	—	—	—

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a infecção experimental com diferentes cargas de L3 de *A. costaricensis* em camundongos Swiss, apresenta eliminação irregular de L1 nas fezes, ressaltando que infecções com 5 L3 apresentam menor mortalidade e eliminação considerável de L1, sendo um possível modelo para manutenção do ciclo de vida do parasito. Estudos que auxiliem para uma melhor elucidação da AA são importantes para a compreensão de sua patogenia e relação entre parasito e hospedeiro, sendo de notável interesse à saúde pública.

5. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, G. V.; RODRIGUEZ, R.; PORTO, S. M.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; FORNARI, F. Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. *Parasitology Research*, v. 108, p. 537 – 540, 2010.

CANALI, C.; GOULART, A.H.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Study on the elimination of *Angiostrongylus costaricensis* first stage larvae in the experimental infection of Swiss mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 269 – 272, 1998.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOMÉ, J. W.; PINTO, S. C. C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. *Phyllocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 1, p. 65 – 68, 1989.

MORERA, P.; CESPEDES, R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical*, v. 18, p. 173 - 185, 1970.

MOTA, E. M.; LENZI, E. M. M. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 4, p. 407-420, 2005.