

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

CAMILA KRUG DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE A MATURAÇÃO
SEXUAL DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* EM INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE *RATTUS NORVEGICUS***

PORTO ALEGRE

2012

CAMILA KRUG DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE A MATURAÇÃO
SEXUAL DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* EM INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE *RATTUS NORVEGICUS***

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

PORTO ALEGRE

2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira e a minha co-orientadora Alessandra Morassutti, pois sem a ajuda deles eu não teria conseguido cumprir com o prazo de entrega deste trabalho.

Agradeço com muito carinho meus pais Edézio Webber de Oliveira e Ana Maria Krug de Oliveira pela paciência, amor e grande ajuda que me deram durante este período “conturbado” da minha vida. Além disso, tenho que agradecer a eles por terem bancado todo o meu mestrado! E ainda mais, por acreditarem em mim!

Agradeço ao meu namorado Pedro Flesch Cervantes pela amizade, carinho e amor. Agradeço por me compreender e me apoiar sempre, mesmo nos momentos em que pensei em desistir! Pela imensa paciência durante meus dias de mau humor e durante os dias em que eu tive que estudar e ficar sozinha para me concentrar. E além de tudo, por saber do que eu estava falando quando o assunto era *Angiostrongylus cantonensis*!

A minha grande amiga e colega Silvana Lunardini Alves, a qual sempre me auxiliou nos experimentos repetidamente e sem nunca reclamar. Além disso, agradeço pela companhia nos bons e maus momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os principais parasitos do gênero *Angiostrongylus* que causam doença nos seres humanos são *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus cantonensis*. Eles têm distintos órgãos alvos: *A. costaricensis* está localizado no mesentério e causa ileocolite eosinofílica, enquanto que *A. cantonensis* é um parasita neurotrópico responsável pela meningoencefalite eosinofílica. Com base em várias evidências de que a maturação sexual está associada ao aumento da patogênese em vermes deste gênero, uma análise proteômica foi realizada em vermes de *A. cantonensis* para descrever a expressão diferencial de proteínas entre 21 e 42 dias após a infecção. Eletroforese bidimensional em triplicata foi submetida à análise e 11 proteínas foram encontradas exclusivamente expressas após a maturação sexual. A acetato quinase foi a única proteína identificada por espectrometria de massa (LC-MS/MS). O acetato é um importante produto final do metabolismo energético de muitos parasitos, mas não de seus hospedeiros mamíferos. Sendo assim, é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas anti-parasitárias. Além do mais, o estudo das adaptações no metabolismo do parasito pode resultar em uma maior compreensão da relação parasito-hospedeiro. Este trabalho abre oportunidades para intervenções de controle e novas estratégias de diagnóstico molecular.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis*, proteômica, maturação sexual.

ABSTRACT

The two parasites in the genus *Angionstrongylus* that cause disease in humans are *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus cantonensis*. They have different target organs: *A. costaricensis* is located in the mesentery and causes eosinophilic ileocolitis, whereas *A. cantonensis* is a neurotropic parasite responsible for eosinophilic meningoencephalitis. Based on several indications that the sexual maturation is associated with increased pathogenesis in angiostrongylid worms, proteomic analysis was performed on *A. cantonensis* protein samples, to describe differential protein expression between 21 and 42 days post infection. Triplicated bidimensional electrophoresis was submitted to analysis and 11 proteins were found to be exclusively expressed after sexual maturation. Acetate kinase was the only protein that could be identified after mass spectrometry (LC-MS/MS). Since acetate is an important end-product of the energy metabolism among many parasites but not among their mammalian hosts, acetate formation is an attractive target for the development of new anti-parasitic drugs. Furthermore, studying the adaptations in parasite metabolisms can result in an increased understanding of the host-parasite interaction. This data open opportunities for control interventions and new strategies for molecular diagnosis.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis*, proteomics, sexual maturation

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS</i>	9
1.2 <i>ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS</i>	14
1.3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS POR PROTEÔMICA	
1.4 MODELO DIFERENCIAL DE <i>A. CANTONENSIS</i>	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 ARTIGO CIENTÍFICO	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Abdominal Angiostrongyliasis

BSA - Albumina do soro bovino dpi – days post-infection

DTT - Ditioneitol

E – 64 - trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA - Enzyme Linked Immune Sorbent Assay

h - Hora

HCl - Ácido clorídrico

IEF - Focalização isoeletrica

IPG - Immobilized pH gradient

kDa - kilodalton

LC-MS/MS – Liquid chromatography tandem mass spectrometry

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

mA - Miliampere

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

min - Minuto

Mr – molecular mass

PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

pH - Pontencial de hidrogênio

pI - Ponto isoelétrico

PM - Peso molecular

PMSF - Fluoreto de fenilmetanosulfonila

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

V - Volts

W - Watt

x g - Força gravitacional

µg - Micrograma

2DE - Eletroforese bidimensional

1 INTRODUÇÃO

1.1 *ANGIOSTRONGYLUS COSTARICENSIS*

A angiostrongilíase abdominal (AA) é causada pelo nematódeo intra-arterial *A. costaricensis* próprio de roedores silvestres (Cespedes, 1967). Foi descrito pela primeira vez em 1971, na Costa Rica (Morera e Cespedes, 1971). A maturação sexual é um passo crítico no desenvolvimento organismo parasita e também na interação com o seu hospedeiro definitivo. A maioria dos parasitas tem um ciclo de vida complexo, que pode incluir as fases de vida livre, bem como as fases distintas que habitam um ou mais organismos hospedeiros. Portanto, os parasitas encontram muitos ambientes diferentes, em que as quantidades de nutrientes disponíveis e / ou oxigênio pode ser limitada, selecionando os parasitas capazes de adaptar o seu metabolismo para estas diferentes condições. Adaptações metabólicas normalmente requerem diferentes enzimas que não estão presentes em organismos hospedeiros. Particularmente adaptações em processos catabólicos, ou metabolismo energético, muitas vezes tornaram-se essenciais em parasitas, uma vez que o metabolismo de energia envolve a produção de ATP, que ao contrário de muitos metabólitos, não pode ser facilmente levado do anfitrião. A formação de acetato a partir de acetil-CoA como um produto final metabólica é uma adaptação metabólica, que está presente em muitos parasitos. Além disso, a produção de acetato está também presente em muitos não parasitários eucariotas, tais como plantas com flores, fungos e invertebrados marinhos, mas está ausente em mamíferos [48].

A formação de acetato a partir de acetil-CoA através acetilfosfato ocorre através de duas reações catalisadas por enzimas distintas. Acetil-CoA é primeiro convertido em acetilfosfato por fosfato acetiltransferase. Subsequentemente fosfato-

acetil é posteriormente metabolizado em acetato de acetato de quinase, uma reação na qual o ADP é convertido em ATP concomitantemente. Quinase acetato encontra-se predominantemente em microrganismos e facilita a produção de acetil-CoA por fosforilação de acetato na presença de ATP e um cátion bivalente [48]. A enzima é importante no processo de glicólise. Desde acetato é um importante produto final do metabolismo da energia entre muitos parasitas, mas não entre os seus hospedeiros mamíferos, a formação de acetato é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas anti-parasitárias [49]. Além disso, estudar as adaptações no metabolismo do parasita pode resultar em uma maior compreensão de interações parasita-hospedeiro [48].

A. costaricensis é um parasito eurixeno, cujo ciclo vital (Figura 1) faz-se através de diversos hospedeiros. O hospedeiro definitivo compreende diversos roedores silvestres, tais como *Sigmodon hispidus* na América Central e *Oligoryzomys ratticeps* e *Oligoryzomys nigripes*, no sul do Brasil (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a). Os hospedeiros intermediários com maior importância são moluscos terrestres sem concha. Estes são originários da família *Veronicellidae*, conhecidos como lesmas, tais como *Phyllocaulis variegatus* e *P. soleformis* (Morera, 1973, Graeff-Teixeira *et al.*, 1989; Graeff-Teixeira *et al.*, 1994). Outras espécies de moluscos testadas experimentalmente mostraram-se suscetíveis à infecção (Lima, 1992), demonstrando que espécies como *Biomphalaria glabrata* podem ser utilizadas para a manutenção do ciclo do parasito em laboratório (Ubelaker, 1980).

As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas com as fezes do roedor. Os moluscos se alimentam destas fezes contaminadas possibilitando que as L1 cheguem ao tecido fibromuscular (Thiengo, 1996; Mendonça, 1999). Nos moluscos estas larvas evoluem, sofrendo duas mudas e originando as larvas de terceiro

estágio (L3). Tais larvas, infectantes para os vertebrados, são eliminadas com o muco do molusco. Depois de ingeridas, penetram a parede do íleo terminal, migram pelos vasos linfáticos mesentéricos e diferenciam-se em L4 e L5. Aproximadamente após uma semana, os vermes adultos jovens (L5) retornam ao intestino, alojam-se nas artérias mesentéricas e adquirem a maturidade sexual.

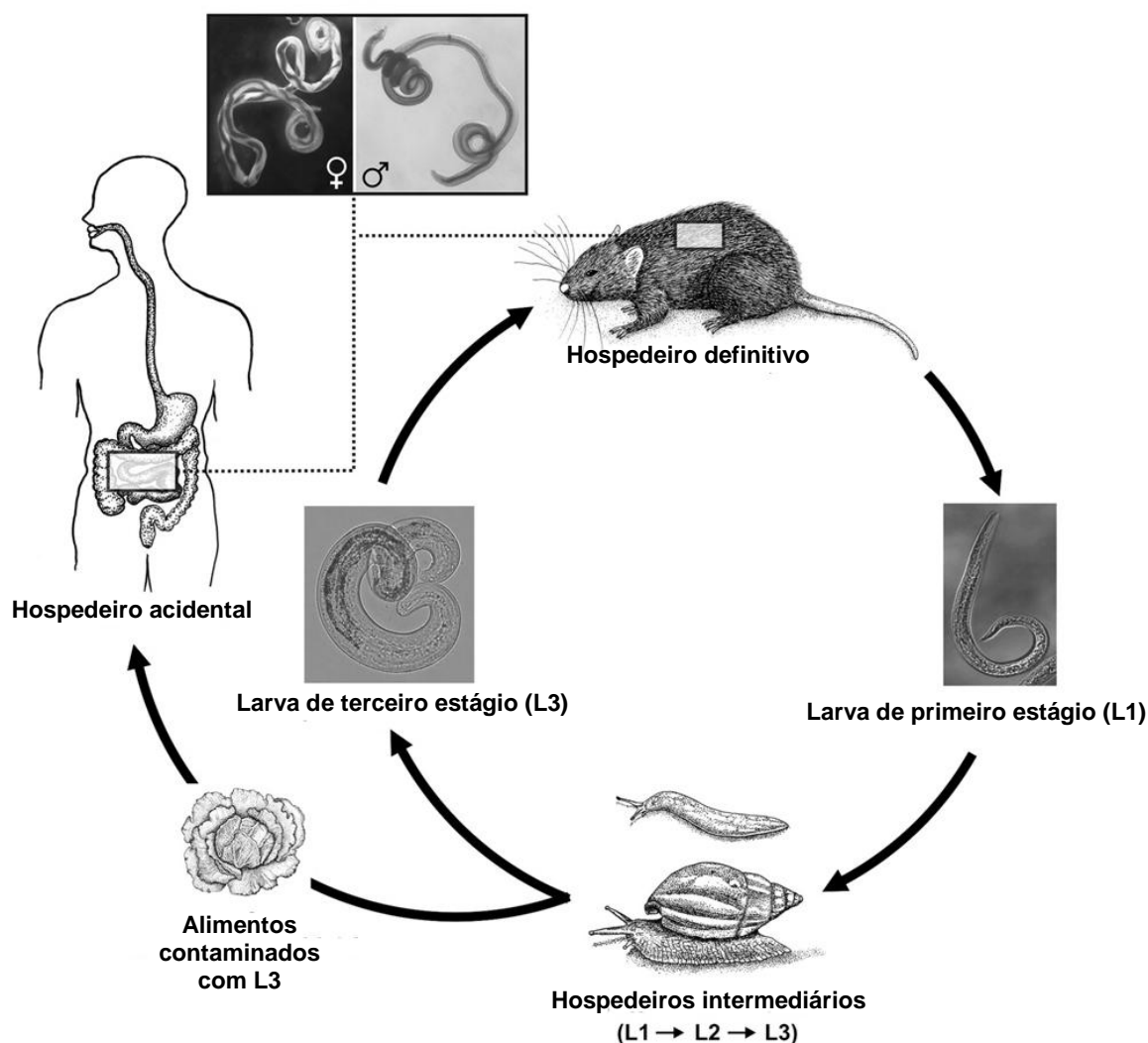


Figura 1: Ciclo de *Angionstrongylus costaricensis* (Rabello *et al.*, 2011)

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 Hallin, 1979; Agostini, 1984; Demo e Pessat, 1986; Morera, 1988). No Brasil, foram descritos casos no Distrito Federal (Barbosa, 1980), no Espírito Santo (Pena, 1991), em Minas Gerais (Rocha, 1991), no sul do Estado de São Paulo, no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Zileotto, 1975; Ayala, 1982; Agostini, 1984). O Rio Grande do Sul, principalmente na metade norte, é o estado brasileiro onde foi registrado o maior número de casos da doença (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a).

A angiostrongilíase abdominal tem como mecanismo patogênico principal 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 pelo parasito (Morera, 1985).

O homem é hospedeiro acidental desta parasitose e se infecta pela ingestão do molusco ou de alimentos contaminados com L3 ou mesmo ingerindo os hospedeiros paratênicos infectados. No homem não ocorre eliminação de L1 nas fezes. Isto é devido à intensa reação inflamatória no intestino, causada pela presença de ovos e larvas, as quais ficam retidas no tecido. Desta forma, não é possível o diagnóstico através de exames coprológicos (Morera, 1985; Graeff-Teixeira *et al.*, 1997; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991b). Este é feito pelo encontro dos vermes, larvas ou ovos em cortes histológicos provenientes de biópsias (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a).

Vários testes imunológicos têm sido empregados para o diagnóstico. Aglutinação em partículas de látex, empregando antígenos totais de vermes adultos, é utilizada na Costa Rica há muitos anos, porém sem padronização de desempenho (Kramer *et al.*, 1998). Teste imunoenzimático (ELISA), utilizando antígenos brutos de vermes fêmeas para a detecção de imunoglobulina de classe G (IgG), apresentou

especificidade de 83% e sensibilidade de 86% (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997). Outro teste de ELISA, utilizando antígenos de ovos de *A. costaricensis*, também demonstrou especificidade de 87% e sensibilidade de 90,5% (Mesén-Ramirez, 2008). A reatividade cruzada com outros nematódeos tem sido um problema para o desempenho satisfatório e especificidade destes testes (Graeff-Teixeira *et al.*, 1997; Mesén-Ramirez, 2008).

Silva *et al.* (2003) pesquisou a possibilidade de detecção de ácidos nucleicos no soro de pacientes infectados. e a amplificação ocorreu até a terceira semana pós-infecção, negando a partir deste momento. Fez uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), o que representa um recurso adicional na detecção da infecção em sua fase aguda (Silva, 2003).

A administração de drogas anti-helmínticas deve ser evitada, pois podem induzir migração errática dos vermes e agravamento das lesões (Morera e Bontempo, 1985). O uso de substâncias anti-helmínticas é ainda controverso na angiostrongilíase abdominal. A alegação inicial de Morera e Bontempo (1985) de que ocorre migração errática dos vermes e agravamento das lesões, embora não possa ser definitivamente refutada, não foi confirmada em estudos feitos por Mentz *et al.*, (2003). Tal fato demonstrou que o uso de mebendazol não está associado à migração errática. A maioria das substâncias hoje disponíveis é capaz de eliminar as formas larvais dos helmintos, não havendo especificidade a formas adultas. Isso teria uma implicação direta no caso da AA que apresenta manifestações clínicas geralmente tardiamente após a infecção. Consequentes observações estão associadas principalmente ao estágio de maturação dos vermes e aparecimento de ovos e larvas (Mentz e Graeff-Teixeira, 2003).

1.2 ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS

O nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* foi descoberto em 1935 por Chen durante a dissecação de ratos domésticos na cidade de Canton, na China. (Chen, 1935). O autor observou que este parasito habitava as artérias pulmonares e a cavidade cardíaca destes roedores. As larvas desta espécie são inerentemente neurotrópicas, podendo causar angiostrongilíase cerebral no homem. Tal pode se manifestar como meningite ou meningoencefalite eosinofílica, resultado da presença das larvas de quinto estágio (L5) nas meninges (Malek e Cheng, 1976; Alicata, 1991; Wang, 2008). Este nematódeo foi isolado em humanos pela primeira vez em Formosa, Taiwan, no ano de 1944, no líquido cefalorraquidiano (LCR) de um jovem com sintomas de meningite (Nomura e Lin, 1945). Somente após os anos 60 é que a angiostrongilíase cerebral foi reconhecida como importante problema de saúde pública nos Estados Unidos (Diaz, 2008). Desde então, mais de 2800 casos foram relatados em vários países como Filipinas, Indonésia, Malásia, Japão, Austrália, em regiões da África. Recentemente foram encontrados casos isolados no continente americano (Caldeira, 2007; Lindo, 2002; Campbel & Little, 1988; Aguiar, 1981). Focos de transmissão autóctone foram detectados no Brasil em Cariacica, Espírito Santo em 2007, e em Pernambuco em 2009 (Caldeira, 2007; Lima *et al.*, 2009).

As áreas consideradas endêmicas localizam-se no sul da Ásia, ilhas do Pacífico, Austrália e ilhas do Caribe (Wang, 2008). Nos últimos anos, os surtos desta parasitose ocorreram na China e Taiwan. Os números registrados fora das regiões endêmicas vêm crescendo através de viajantes que se infectam nestas áreas e retornam a seus países de origem.

Espécies de roedores como *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* são hospedeiros definitivos de *A. cantonensis*. Porém, outros mamíferos como gatos,

macacos, camundongos e o homem podem também se infectar (Alicata, 1965). Como hospedeiros intermediários naturais citam-se algumas espécies de caramujos como *Bradybaena similares* e *Sublina octona*, lesmas do gênero *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* (Malek e Cheng, 1974). O molusco *Achatina fulica* apresenta suscetibilidade ao parasito. A produção de larvas do nematódeo neste caracol é superior aos demais moluscos, apresentando-se como um importante hospedeiro intermediário (Wang, 2008). O primeiro registro de *A. fulica* no Brasil foi no ano de 1997 no estado de São Paulo. Em 2001 foi registrada a presença destes moluscos no Rio de Janeiro. Atualmente pode ser encontrado em inúmeros estados, desde Amazonas até Santa Catarina (Teles, 1997; Vasconcelos e Pile, 2001; Thiengo, 2007). Em 2007, Thiengo e colaboradores revisaram a expansão de *A. fulica* no Brasil, o que pode representar um risco de aumento das infecções pelo *A. cantonensis* (Thiengo, 2007).

Para completar seu ciclo de vida, o *A. cantonensis* precisa necessariamente de dois hospedeiros: um intermediário e um definitivo. Os hospedeiros definitivos se infectam com o nematódeo ao ingerirem a forma infectante, as larvas de terceiro estágio (L3). Ao serem ingeridas, as larvas penetram na mucosa intestinal e migram por via sanguínea até o sistema nervoso central (SNC) e depois para os pulmões onde atingem a maturidade sexual. O verme adulto vive nas artérias pulmonares dos roedores, onde a fêmea realiza a oviposição. Os ovos eclodem liberando as larvas de primeiro estágio (L1) que migram pela faringe e são deglutidas e eliminadas junto às fezes do hospedeiro. Ao entrar em contato com os moluscos, seus hospedeiros intermediários, as L1 penetram em sua musculatura e, após alguns dias, desenvolvem a forma infectante (L3). A infecção do hospedeiro definitivo ocorre por

ingestão das L3 que também podem infectar hospedeiros paratênicos, como lagartos, planárias, camarões e caranguejos terrestres (Wang *et al.*, 2008).

O ser humano é um hospedeiro acidental e pode adquirir o parasito através da ingestão de alimentos contaminados, água, hospedeiros paratênicos ou os próprios moluscos infectados pelo nematódeo (Morera, 1988). As L3, ao penetrarem a parede intestinal, caem na circulação sanguínea e migram até o SNC. Devido a uma forte reação, as larvas ficam retidas e morrem nas meninges, causando uma intensa inflamação (Dorta-Contreras, 2007; Sawanywesuth, 2008; Sinawat, 2008). Essa desencadeia uma resposta imune humoral e uma resposta celular com a presença de basófilos, macrófagos e principalmente eosinófilos. A morte por angiostrongilíase cerebral se dá não pela parasitose em si, mas pela resposta imune exacerbada (Wang, 2008).

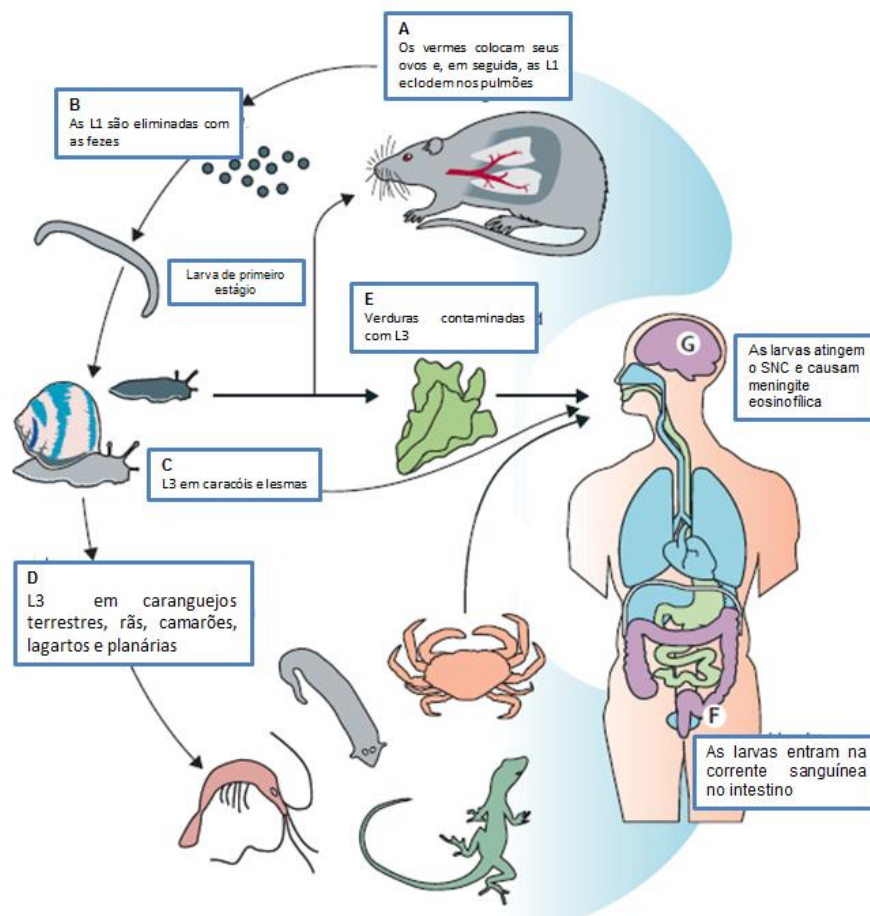


Figura 2: Ciclo de *Angionstrongylus cantonensis* (Wang *et al.*, 2005).

A confirmação da angiostrongilíase cerebral se dá a partir da recuperação de larvas de *A. cantonensis* no LCR ou no globo ocular (quando ocorrer a manifestação da doença na cavidade ocular). Entretanto, como o volume de líquido coletado e examinado é pequeno, o encontro das formas parasitárias raramente ocorre através desse método. O diagnóstico, então, depende de testes sorológicos (Wang *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, vários testes imunológicos utilizando antígenos totais ou parcialmente purificados de larvas, vermes adultos ou produtos de excreção-secreção foram desenvolvidos para dar suporte ao diagnóstico clínico desta patologia. O método de ELISA tem sido o mais frequentemente empregado pela sua

alta sensibilidade, servindo como padrão para comparação de desempenho de novos métodos (Eamsobhana *et al.*, 2009).

Existem relatos de ensaios com várias formulações de antígenos e procedimento de detecção dos anticorpos na angiostrongilíase cerebral. Testes de detecção de antígenos, como ELFA, têm sensibilidade de 88% no soro e de 100% no fluido cérebro-espinhal. O ELISA, utilizando antígeno bruto de vermes fêmeas, tem uma sensibilidade de 100% e especificidade de 67% quando o alvo protéico está entre 29 kDa e 31 kDa. A detecção de antígenos utilizando ELISA-PCR tem uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. As detecções de antígenos com 15 kDa por ELISA têm sensibilidade de 87% e especificidade de 100%. Os antígenos com 32 kDa oferecem sensibilidade alta e especificidade de 100%. Testes realizados com o objetivo de detectar anticorpos com peso molecular de 29 kDa, como o WB em soro e fluido cérebro-espinhal, WB para IgG4 em soro e a combinação entre WB em soro e ELISA em fluido cérebro-espinhal, têm sensibilidade de 56%, 75% e 80% respectivamente. Pesquisas de anticorpos com 31 kDa ou 100 kDa, utilizando o método de *Dot-blot*, têm sensibilidade de 100% para ambos e especificidade de 100% para o anticorpo com 31 kDa e de 86% para o anticorpo com 100 kDa (Sawanyawesuth e Sawanyawesuth, 2008; Eamsobhana *et al.*, 2009; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

A produção de enzimas proteolíticas e sua liberação na forma de produtos de excreção e secreção já foram relatadas em diversos helmintos, podendo desempenhar um papel diagnóstico no futuro quando bem caracterizadas. Metaloproteases já foram encontradas em secreções de larvas de terceiro estágio do *A. cantonensis* com componentes de pesos moleculares de 50 kDa e 30 kDa. Tal fato pode representar um papel importante na penetração do parasito na parede dos

intestinos. Essas mesmas enzimas também foram encontradas no líquido cefalorraquidiano de ratos infectados (Lai *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Além das metaloproteases, outras enzimas foram descritas como enzimas antioxidantes. Elas desempenham um papel central para facilitar a sobrevivência dos parasitos quando em seus hospedeiros. As glutatona transferases (GSTs) são responsáveis por desintoxicar uma ampla gama de compostos endógenos ou exógenos, incluindo espécies reativas ao oxigênio. As GSTs vêm sendo estudadas como candidatas a vacinas, marcadores para imunodiagnósticos e como alvos para tratamento. Essas enzimas foram encontradas em extrato total de *A. cantonensis*, podendo estar associadas à regulação imune do hospedeiro (Morassutti *et al.*, 2011).

Já para os estudos proteômicos, pouca informação está disponível. Foi realizada uma comparação entre proteínas antigênicas de vermes adultos machos e fêmeas de *A. costaricensis*. Neste estudo, verificou-se um perfil similar na imunorreatividade de proteínas entre os dois grupos (Rabello *et al.*, 2011). Em outro estudo, comparando também o perfil protéico de machos e fêmeas (porém de *A. cantonensis*), foram identificadas 28 proteínas com diferenças significativas entre as amostras (Song *et al.*, 2012).

1.3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS POR PROTEÔMICA

O ciclo de vida das espécies de *Angiostrongylus* possui vários estágios de desenvolvimento, devendo passar pela adaptação a diferentes hospedeiros e condições fisiológicas. Nas fases de vida destes organismos, as diferenças morfológicas e a capacidade adaptativa se deve à regulação da expressão de proteínas funcionais características de cada fase específica. Assim, a expressão

diferencial de proteínas ao longo do desenvolvimento do parasito está intimamente relacionada à fase de infecção de seus hospedeiros.

A proteômica é o estudo sistemático de um proteoma, ou seja, um conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um determinado momento ou condição celular (Wasinger, 1995). Esta abordagem permite avaliações qualitativas e quantitativas destas proteínas e permite inferências de atuação no metabolismo celular em cada condição (Park, 2004; Chen e Harmon, 2006).

É notório que o conhecimento do genoma por si só, assim como os mecanismos de expressão, não elucidam todos os processos que controlam a expressão gênica. Não esclarece os processos biológicos de desenvolvimento de organismos parasitos e, tampouco, os mecanismos usados para a infecção e interação com o hospedeiro. Desta forma, a investigação do proteoma dos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito pode fornecer informações complementares, tais como modificações pós-traducionais. Há possibilidade dessas modificações desempenharem um papel crucial na modulação de função de uma dada proteína. Além disso, os referidos estudos podem proporcionar a melhor compreensão da complexa interação parasito-hospedeiro. E ainda podem trazer importantes contribuições para o entendimento dos mecanismos envolvendo a patogenicidade da infecção. Como exemplo descreve-se a análise proteômica de diferentes estágios do ciclo de vida de organismos como *Plasmodium falciparum* (Lasonder, 2002; Florens, 2002), *Leshmania donovani* (Thiel e Bruchhauss, 2001; Benti, 2003), *L. panamensis* (Gongora, 2003) e *Trypanosoma cruzi* (Atwood, 2005).

Dentre as diversas abordagens, a proteômica comparativa é uma eficiente estratégia para o estudo da expressão proteica ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento. Possibilita-se, desta forma, a identificação de proteínas estágio-

específicas, cuja expressão possa ser utilizada como marcadores do desenvolvimento (Chen & Harmon, 2006).

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE *A.CANTONENSIS*

A produção em massa de vermes de *A.costaricensis* depende da infecção de roedores silvestres, cuja manutenção em laboratório é complicada. Por outro lado, o fato de dispormos de um hospedeiro muito bem adaptado ao *A.cantonensis*, dentre os roedores usuais de laboratório, o *Rattus norvegicus*, torna a produção em massa deste nematódeo muito mais simples.

A. costaricensis habita as artérias mesentéricas e causa ileocolite eosinofílica, enquanto que *A. cantonensis* é um parasita neurotrópico responsável pela meningoencefalite eosinofílica. Portanto, o uso de antígenos compartilhados se justifica na identificação de alvos para tratamento e diagnóstico das infecções.

Por esta razão, o *A.cantonensis* foi adotado como modelo experimental neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão diferencial de proteínas de *Angiostrongylus cantonensis* durante seu desenvolvimento no hospedeiro definitivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as proteínas diferencialmente expressas durante a maturação do parasito através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Comparar os mapas proteômicos dos vermes recuperados de 21 e 42 dias após a infecção.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

RESEARCH ARTICLE

Differential expression of proteins during sexual maturation of *Angiostrongylus cantonensis* in experimental infection of *Rattus norvegicus*

Camila Krug de Oliveira^{1,2}, Alessandra Morassutti^{1,2}, Silvana Lunardini Alves², Paulo Marcos Pinto³, Henrique Bunselmeyer Ferreira³, Carlos Graeff-Teixeira^{1,2}

¹ Laboratory of Parasitic Biology, Faculty of Biosciences, PUCRS

² Laboratory of Molecular Parasitology, Institute of Biomedical Research, PUCRS

³ Biotechnology Center, UFRGS

Correspondence: Carlos Graeff-Teixeira. Institute of Biomedical Research, Laboratory of Molecular Parasitology, São Lucas Hospital, 6690 Ipiranga Avenue, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail: graeff.teixeira@gmail.com

Abbreviations: DPI, days post infection;

Keywords: Proteins, *Angiostrongylus* spp, reproduction.

Abstract

Angiostrongylus cantonensis is a nematode of rats that may accidentally infect humans, causing eosinophilic meningitis. Based on several indications that the

sexual maturation is associated with increased pathogenesis in angiostrongylid worms, proteomic analysis was performed to describe differential protein expression between 21 and 42 days post infection. Triplicated bidimensional electrophoresis was submitted to analysis and 11 proteins were found to be exclusively or predominantly expressed after sexual maturation. Acetate kinase was the only protein that could be identified after mass spectrometry (LC-MS/MS). Independently of full identification, accomplished by the lack of a sequenced genome or transcriptome, it can results in the identification of new targets for development of new anti-parasitic drugs and better understanding of the host-parasite interaction.

1. Introduction

The two parasites in the genus *Angionstrongylus* that cause disease in humans are *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus cantonensis*. *A. costaricensis* is located in the mesentery and causes eosinophilic ileocolitis, also called abdominal angiostrongyliasis (AA) whereas *A. cantonensis* is a neurotropic parasite responsible for eosinophilic meningoencephalitis also called cerebral angiostrongyliasis. [1, 2]

Abdominal angiostrongyliasis was first described by Morera and Céspedes in 1970 [3]. The parasite lives inside the mesenteric arteries of rodents, having slugs as intermediate hosts [4, 5]. *A. costaricensis* may be found in the stool of rodents as first stage larvae (L1) and in the mucus of slugs as third stage larvae (L3). This later stage may infect humans after ingestion or contaminated food, particularly vegetables [3]. AA is manifested mainly by an infarct or pseudo tumor-like lesions in the ileum-cecum segment of the bowel [6]. This disease has been detected in many countries of Central and South America, like southern Brazil [7, 8] and Ecuador [9].

Probably imported cases were also detected in North America [10] and also in Europe [11].

Cerebral angiostrongyliasis is characterized by an intense inflammatory reaction of the meninges [12]. This zoonosis is endemic in Southeast Asia and the Pacific Islands, but an increased number of cases have been reported in Africa, Australia and United States [13, 14, 15]. In South America, the first cases were reported in Brazil, two in Cariacica in the state of Espírito Santo and two in the state of Pernambuco [16, 17]. Humans are accidental hosts, occasionally infected by eating raw or improperly cooked freshwater snails and slugs or paratenic hosts infected with the third stage larvae (L3) of the parasite [18]. These larvae migrate to the brain, spinal cord, and nerve roots, causing eosinophilia in both spinal fluid and peripheral blood and consequently inflammation of the meninges.

Confirmed diagnosis of either cerebral or abdominal angiostrongyliasis is seldom made because larvae are usually retained in infected tissues as a result of host inflammatory responses [19, 1, 20].

Both diseases are characterized by eosinophil infiltrates which aims eliminate the worms residing in the host [21, 22]. In the particular case of abdominal angiostrongyliasis the worm maturation is being considered as central role in pathogenesis mainly because of eggs trapped in the intestinal tissue by the intense inflammatory reaction [23].

In this study, we evaluated the differentially expressed proteins of *A. cantonensis* through bidimensional electrophoresis and mass spectrometry. We compared the proteomic maps of worms recovered at 21st and 42nd days post-infection (dpi). This interval spans the whole process of sexual maturation of *A. cantonensis*.

2 Materials and methods

2.1 Sample collection

Twenty five Wistar rats were raised and maintained in an air-conditioned animal facility (22 ± 2 °C and $50 \pm 10\%$ relative humidity) divided in five groups. Third-stage larvae (L3) of *A. cantonensis* were collected from infected *Biomphalaria glabrata* after digestion with 0.6% pepsin-HCl (pH 2-3) for two hours and were incubated in water bath at 37 °C for 72 hours. Host cellular debris was removed from the digest by centrifugation at 14000 **xg** for 10 minutes. The larvae in the sediment material were observed under the microscope. The rats were orally infected with 100 L3 and then the worms recovered every 7 days (21, 28, 35 and 42) post infection. The present report deals exclusively with the comparative analysis of protein extracts between worms collected at 21 and 42 dpi, according to the software analysis.

2.2 Two-dimensional electrophoresis

The nematodes were washed with a solution buffer and preserved at -80 °C. Subsequently, the worms were grinded using the PlusOne Sample Grinding Kit (GE Healthcare) to a fine powder and dissolved in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 5 mM DTT, 1% Triton X-114 and 1% Pharmalyte pH 3 -10), containing with a commercial mix of proteases inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail for general use (Sigma-Aldrich), 2 mM AEBSF, 0.3 μ M Aprotinin, 130 μ M Bestatin, 1 mM EDTA, 14 μ M E-64, 1 μ M Leupeptin). The lysate was centrifuged at 15,000 **xg** at 4 °C for 1 hour, keeping the supernatant [24]. The total protein concentration was measured by Bradford's assay using BSA as standard [25].

For each gel, about 10 μ g of protein were diluted in 100 μ L rehydration buffer (7 M urea, 1% CHAPS, 50 mM DTT and 1% Pharmalyte pH 3 – 10) and used to

rehydrate 7 cm IPG strips, pH 3 – 10 NL. After 12 hours of rehydration the IPG strips containing samples were isoelectrically focused on Multiphor II electrophoresis unit and EPS 3500 XL power supply (Amersham Biosciences). IEF was performed at constant power (10 μ A/IPG strip) at 40 V for 2 h, 150 V for 1 h and 3500 V for 4h. After that, the strips were equilibrated in 50 mM Tris/HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 10 mM DTT. After 20 min the equilibration solution was changed to the same buffer except that DTT were replaced by 4% iodoacetamide for another 20 min [24, 26]. The second-dimensional separation was carried out on 12% SDS-PAGE vertical mini-gel (Hoefer SE 250, EUA) at 100 V, 20 mA, 50 W for 3 hours [27, 28]. Proteins were visualized by Coomassie blue staining.

2.3 Image acquisition and data analysis

Triplicate gels were scanned using a GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) and digitized images were analysed by PDQuest software (Bio-Rad, v.7.1) for comparative analysis of spot intensities. Background was subtracted and protein spot density peaks were detected and counted. Because total spot counts and the total absorbance are directly related to the total protein concentration, individual protein quantities were thus expressed as parts per million of the total integrated absorbance, after normalization against total valid spot intensity. GE Healthcare software was used to determine protein molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI). Gels representative of each condition were compared to evaluate differential protein expression. Qualitative differences between samples: to consider a protein exclusively expressed in a stage of development, the criteria used was the presence or absence of proteins on the gel.

When an optical device is used to transform a biological signal into a digital computer signal, they form an image composed of tiny individual pixel. Each pixel has an X coordinate and Y (horizontal and vertical) position in the picture, and a Z value that represents the strength of the signal. For a given spot of a given area to be seen and measured, the intensity of its pixels must be greater than the intensity of the pixels at the surrounding background. The intensity of a spot is the sum of the intensities of all pixels. The mean intensity is the total intensity divided by the number of pixels of the spot. The signal produced by the intensity of each spot is the optical density.

With the values of intensity for each spot, the software applies PDQuest quantitative, qualitative and statistics analysis in order to compare the groups. It was selected the option to have the software automatically choosing the image to be treated as the "master gel", based on the best quality of spots detected. Then, the original digital image is filtered and smoothed in order to highlight the spots. From these highlights, synthetic image was composed, removing any kind of groove, reflections, artifacts that may affect the spots present in the original image, allowing the process of quantification. In this case, spots were considered valid only when they were present in at least three gels of each group (21:42 dpi).

The group 21 days post-infection was compared with the group 42 days post-infection, and for quantitative analysis, spots were selected to increase or decrease expression of 1.5 times, or increased expression greater than 50% and decreased expression greater than 33%. Statistical analysis used the Student T test ($p < 0.05$), to compare the mean values of the intensities of a spot between the two groups. Inter-sample differences does not invalidate its use in analysis of protein profiles,

because the two stages of maturation were clearly identified in the three experiments, there is therefore a biological triplicate, required for proteomic analysis.

3.4 In gel digestion and mass spectrometry analysis

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was made in an ESI-Q-TOF ultima API mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) coupled to a nanoACQUITY UltraPerformance LC[®] (UPLC[®], Waters, Milford). A nanoflow ESI source was used with a lockspray source for lockmass measurement during all the chromatographic runs [29, 30]. Spots of interest were carefully excised from 2-DE gels and digested with trypsin (Promega) as described previously [31]. Briefly, the gel pieces were treated with 50 mM ammonium bicarbonate and 30% AcN for 20 min at room temperature because disulfide bond-containing proteins were already reduced and alkylated after IEF. Gel pieces were then dried for 30 min in a Hetovac vacuum centrifuge (HETO, Allerod, Denmark). Dried pieces of gel were rehydrated for 45 min at 4°C in 5–20 µL of a solution of 50 mM ammonium bicarbonate containing trypsin at 6.25 ng/µL and digestion was allowed to proceed overnight, at 37 °C. Afterward, gel pieces were dried in high vacuum centrifuge before being rehydrated by the addition of 20 µL of H₂O and finally dried again. The resulting peptide mixture was desalted using a ZipTip[®] column (Milipore). After that, the peptides were separated in a Nanoease C18 (75-µm ID) capillary column by elution with a water/acetonitrile 0.1% formic acid gradient. Data were acquired in data-dependent mode (DDA), and multiple charged peptide ions (+2 and +3) were automatically mass selected and dissociated in MS/MS experiments. Typical LC and ESI conditions were flow of 600 nl/min, nanoflow capillary voltage of 3.3 kV, block temperature of 100°C, and cone voltage of 100 V. Each sample was analyzed three

times to demonstrate the reproducibility and consistency of the technique. The MS/MS spectra were processed using Proteinlynx 2.0 software (Waters, Milford) and the generated PKL file was used to perform database search using the Mascot software using the NCBI nr platform (Matrix Science, London, UK). Search parameters allowed a maximum of one missed cleavage, the modification of cysteine, the possible oxidation of methionine, peptide tolerance of 100ppm and MS/MS tolerance of 0.1 Da. The significance threshold was set at $p < 0.05$, and identification required that each protein contained at least one peptide with an e value < 0.05 .

4. Results

4.1 Two-dimensional electrophoresis of *A. cantonensis* at different stages of development

Total proteins of each sample (21 dpi, 28 dpi, 35 dpi and 42 dpi) were separated by 2D-electrophoresis at pH 3-10 (Figure 1). PDQuest analyses detected in each gel images of 206 well-defined spots were validated and normalized. In this study we compared the protein maps from groups 21 dpi and 42 dpi (Figure 1 – A and D), once the groups of 28 and 35 dpi showed no significant differences, based on the analysis of PDQuest.

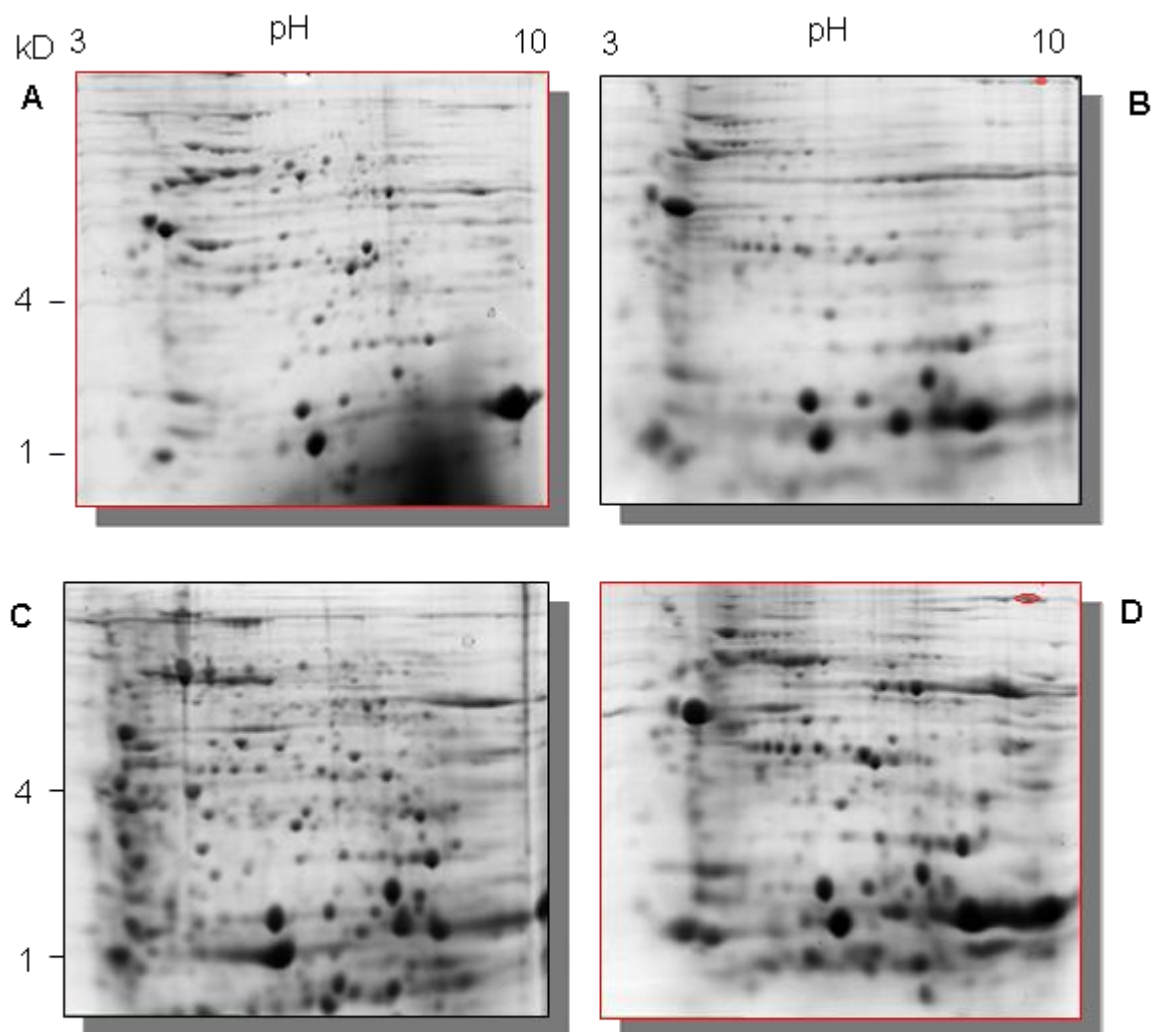


Figure 1: **Two-dimensional electrophoresis of *A. cantonensis* worms at different stages of development.**

(A) 21 dpi; (B) 28 dpi; (C) 35 pdi; (D) 42 dpi. Samples were subjected to 2D-electrophoresis separately. Protein (10 μ g) was separated by IEF using 7 cm IPG strips (pH 3 – 10), followed by 12% SDS-PAGE and coomassie blue staining. In red boxes: comparison between 21 dpi and 42

4.2 Differential analysis of spots

Qualitative analyses determine the spots detected in a given sample and not found in another sample. In the spots analyzed, 11 were exclusively present at 42 days post-infection (Figure 2) and only one was present only at 21 days post-infection and

For quantitative analysis, five spots detected from proteomic maps of the comparison of the 21 dpi and 42 dpi groups, presented intensity variations above 1.5x. Analyzing the 42 dpi maps, three spots exhibited abundance greater than 50% and two other spots showed reduction of expression in 33% (Figure 3).

However, to selected only spots with significant differences, we employed the Student T test, with significance of 95%. The values of the intensities of these spots are described in Table 1, where column SSP is the spot number assigned by the software, columns dpi '21 'and '42 dpi' spots correspond to averages of the respective groups, the column "ratio 42 / 21 'indicates the variations in mean values of intensities of spots in the group '42 dpi' to the '21 dpi 'and finally the superscript letters indicate: "d", spots with decreased abundance greater than 33%, "u "spots with increased abundance above 50%. In the table, the value displayed by the column "Reason 42/21" was calculated by the software. Thus, when applied to statistical analysis, 25 spots among the 206 validated were selected ($p < 0.05$). All the 25 spots were digested with trypsin and analyzed by Tandem Mass Spectrometry.

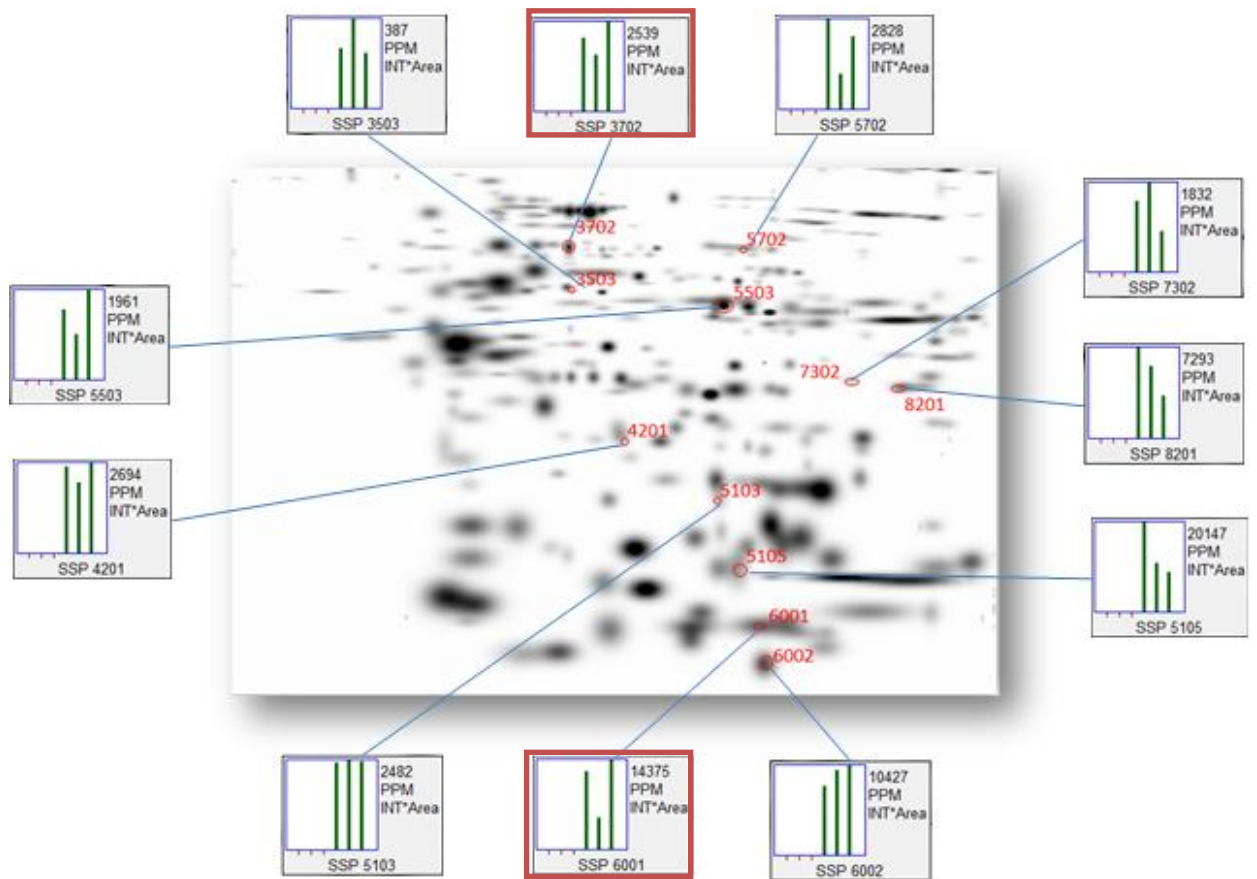


Figure 2: Representation of the spots identified only 42 days after infection. Proteomic maps of comparison between 21 and 42 dpi samples. Boxes represent the spots only expressed in 42 dpi. In red boxes - two proteins were identified using mass spectrometry. Spot 6001 represents the acetate kinase

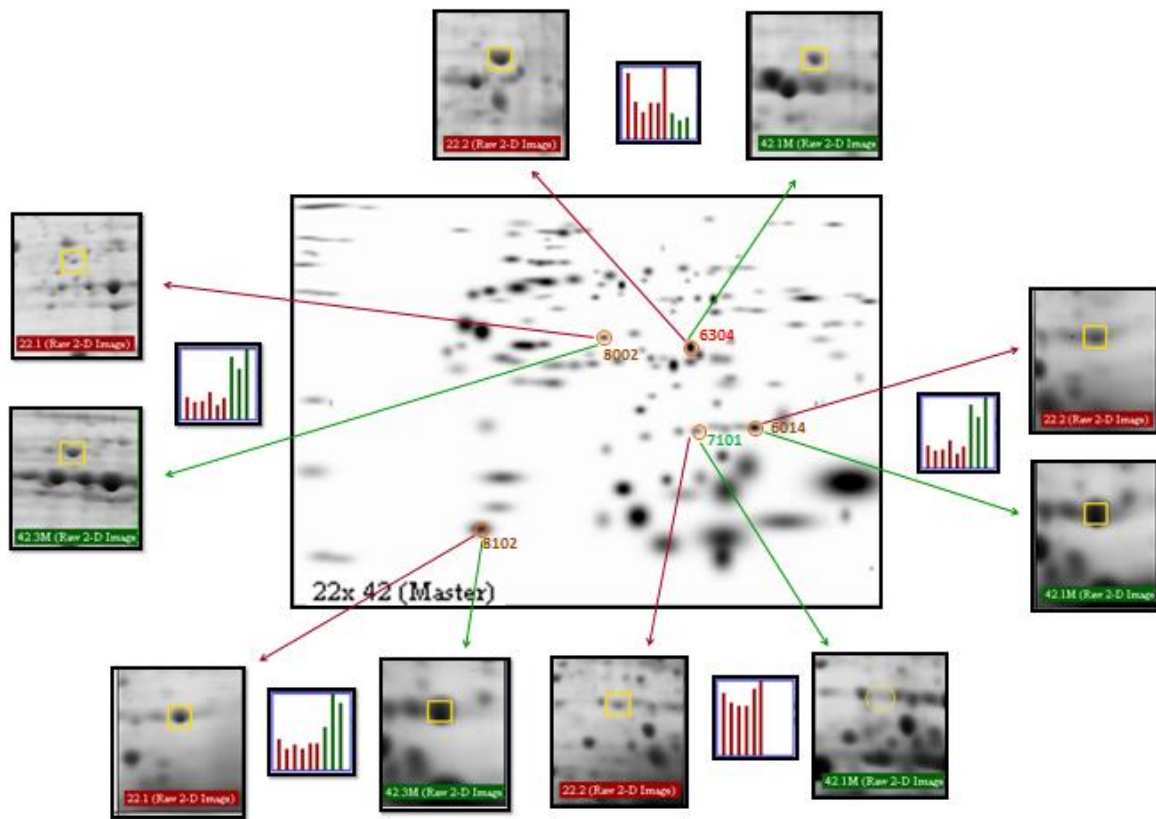


Figure 3: Representation of the spots that showed differences in expression. Proteomic maps of comparison between 21 and 42 dpi samples. The boxes represent spots identified with significant differences. Spot 7101, only expressed in 21 dpi, spot 6304 was more intense in 21 dpi, spots 8002, 8102 and 6014 more intense in 42 dpi.

SSP	21 dpi	42 dpi	Reason 42/21
3503	-	2465780,8	-
3702	-	3859408,7	-
4201	-	9654739,9	-
4401	2547525,0	2157513,5	0,85
5102	2130621,3	1629797,9	0,76
5103	-	3682193,4	-
5105	-	7824139,5	-
5503	-	9340928,8	-
5702	-	8274590,1	-
6001	-	8685982,3	-
6002	-	8398732,8	-
6101	3934286,3	2943414,8	0,75
6302	1556125,5	2053982,9	1,32
6304 ^d	6219019,0	4092114,8	0,66
6503	1163806,0	798318,8	0,69
6014 ^u	3281670,8	20175172,0	6,15
7101	5643870,9	-	-
7105	1556125,5	2053982,9	1,32
7302	4678601,0	2216771,3	0,71
7501	1453758,5	914900,9	0,63
8002 ^u	8924183,0	15600867,0	1,75
8102 ^u	525000,3	927846,8	1,77
8201	-	956741,9	-

Table 1: Intensity average of spots

SSP is the spot number assigned by the software, columns dpi '21 'and '42 dpi' spots correspond to averages of the respective groups, the column "ratio 42 / 21 'indicates the variations in mean values of intensities of spots in the group '42 dpi' to the '21 dpi 'and finally the superscript letters indicate: "d", spots with decreased abundance greater than 33%, "u" spots with increased abundance above 50%.

4.3 Protein identification

Identified 25 target proteins were excised from gels, digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry experiments. Two proteins were identified using the Mascot program (Table 2). Since there was limited information regarding the *A. cantonensis* gene sequences, identification of the respective proteins identified was based on matches to homologous proteins from related organisms, e.g., *Caenorhabditis briggsae*, *Ascaris suum*, *Haemonchus contortus*, *Caenorhabditis elegans* and non-related organisms such as *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Tribolium castaneumensis*

Acetate kinase and one protein similar to conserved hypothetical protein were identified correspondent to the spots 6001 and 3702 respectively (Figure 2).

Peptide	Sequence	Organism matched	Identity	GeneBank Assess
Acetate kinase	MSKIIAVNAGSSTLK	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	86%	gi 29336934
similar to conserved hypothetical protein	DAGQIAGLN VLR	<i>Tribolium castaneum</i>	92%	gi 29336934

Table 2: The obtained peptides from the proteins were searched for amino acid similarity on BLASTp public platform.

4 Discussion

Since the sequence of angiostronylid genomes and transcriptomes are not available, except for a few sequences from *A. cantonensis* [32], identification of proteins from peptide analysis by mass spectrometry is not reliable [33]. The main objective of the present analysis was to give a general description of the differential

expression of proteins associated with development of angiostrongylid worms, considering their putative role in pathogenesis [23].

One main interest of our group is to find useful antigens for immunodiagnosis of angiostrongyliasis and for this application, identification of a sensitive and specific humoral reactivity is more important than the identification and functional description of the proteins

Previous studies of excretion and secretion products (ES) have identified many proteins released by the parasite with the potential role on *Angiostrongylus* survival promoting tissue penetration, nutrient acquisition and also immune system and oxidative stress evasion [34] making those proteins targets for disease treatment. In particular Glutathione transferases (GSTs) may play a role on parasite detoxification against host defenses making those proteins targets for disease treatment [35].

There are only a few published proteomic analyses on nematodes. *Caenorhabditis elegans* is the most extensively studied nematode, including proteomic analysis. They are free living organisms and besides the productive extrapolation of the function and genomic data from other nematodes it is not always applicable [36]. *A.cantonensis* is easier maintained and produced in large quantities than the other angiostrongylid worm causing disease in humans, *A.costaricensis*. For that reason *A.cantonensis* has been used as an experimental model to study pathogenesis and immunogenicity of *A costaricensis*, the infection where egg plays a pivotal role in pathogenesis.

Differential expression of proteins has been analyzed according to several variables, like temperature [36, 37], and oxidative stress [38]. Differences in protein profile after exposure to toxic organophosphorus pesticides [39] or drugs like

piperazine [40]. Other studies have investigated resistant phenotypes, like in *Trichinella spiralis* [41, 42] or protective antigens as promising target vaccine, like in *Dictyocaulus viviparus* [43]. Proteomic analysis on *Angiostrongylus costaricensis* has also been done as a large scale identification and description of the diversity of molecules, like in *Meloidogyne* spp and *C.elegans* in adult stages or during embryogenesis [44, 45, 46]. General description of differential expression has also been explored as part of the tools for taxonomic distinction of much closed related sympatric species [47].

In many comparative proteomic analysis of protein expression only a few spots are usually identified as exclusive for a given condition, like the 38 proteins expressed only at atherosclerotic myocardium [45] or the 6 proteins expressed in mutant *C.elegans* worms under heat stress [37]. In the present analysis, 11 spots were exclusively (11) expressed after sexual maturation. This set of proteins may include promising knowledge on physiology of reproduction and potential novel targets for therapeutics. Sexual maturation is a critical step in parasitic organism development and also in the interaction with its definitive host. Most parasites have a complex lifecycle, which may include free-living stages as well as distinct stages inhabiting one or more host organisms. Therefore, parasites encounter many different environments, in which the amounts of available nutrients and/or oxygen can be limited, selecting parasites able to adapt their metabolism to these different conditions. Metabolic adaptations normally require different enzymes, which are not present in host organisms. Particularly adaptations in catabolic processes, or energy metabolism, often became essential in parasites, since energy metabolism involves the production of ATP, which unlike many metabolites, cannot easily be taken from the host. The formation of acetate from acetyl-CoA as a metabolic end product is a

metabolic adaptation that is present in many parasites, especially in those encountering hypoxic or anoxic habitats. Furthermore, acetate production is also present in many non-parasitic eukaryotes, such as flowering plants, fungi and marine invertebrates, but it is absent in mammals [48].

The formation of acetate from acetyl-CoA via acetylphosphate occurs via two reactions catalyzed by separate enzymes. Acetyl-CoA is first converted into acetylphosphate by phosphate acetyltransferase. Subsequently acetyl-phosphate is further metabolized to acetate by acetate kinase, a reaction in which ADP is concomitantly converted to ATP. Acetate kinase is predominantly found in microorganisms and facilitates the production of acetyl-CoA by phosphorylating acetate in the presence of ATP and a divalent cation [48]. Here this enzyme was found at 42 dpi. The enzyme is important in the process of glycolysis. Since acetate is an important end-product of the energy metabolism among many parasites but not among their mammalian hosts, acetate formation is an attractive target for the development of new anti-parasitic drugs [49]. Furthermore, studying the adaptations in parasite metabolisms can result in an increased understanding of host-parasite interactions [48].

References

- [1] Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L., Lenzi, H. L., Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1991, 33, 373–378.
- [2] Wang, Q. P., Lai, D. H., Zhu, X. Q., Chen, X. G., Lun, Z. R., Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis.* 2008, 8, 621-630.
- [3] Morera, P., Cespedes, R., *Angiostrongylus costaricensis* sp. (Nematoda: *Metastrongyloidea*), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1970, 18,173–185.
- [4] Morera, P., Studies of the definitive host of *Angiostrongylus costaricensis*. (Morera and Cespedes, 1971). *Bol Chil Parasitol*, 1975, 25,133–134.
- [5] Morera, P., Ash, L. R., Studies on the intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Cespedes, 1971). *Bol Chil Parasitol*, 25,135.
- [6] Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L., Lenzi, H. L., Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 1991, 77,606–611.
- [7] Agostini, A. A., Marcolan, A. M., Lisot, J. M., Lisot, J. U., Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984, 79, 443–445.
- [8] Graeff-Teixeira, C., Goulart, A. H., de Brum, C. O., Laitano, A. C., Sievers-Tostes, C., Zanini, G. M., Bered, P. L., Morassutti, A., Geiger, S., Brahms-Sandi, E., Oliveira, F. T., Maurer, R. L., Aguiar, L. F., Garrido, C. T., da Silva, A. C., Rodriguez, R., Schulz-Key, H. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, 38, 310–315.

- [9] Morera, P., Lazo, R., Urquizo, J., Llaguno, M., First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 1983, 32, 1460–1461.
- [10] Ubelaker, J. E., Hall, N. M., First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 in the United States. *J Parasitol* 1979, 35, 307.
- [11] Vazquez, J. J., Boils, P. L., Sola, J. J., Carbonell, F., de Juan, B. M., Giner, V., Berenguer-Lapuerta, J., Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology* 1993, 105, 1544–1549.
- [12] Graeff-Teixeira, C., Silva, A. C. A., Yoshimura, K., Update on eosinophili meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* 2009, 22, 322–348.
- [13] Alicata, J. E., *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Metastrongylidae*) as acausative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. *Canadian Journal Zoology* 1962, 40, 5–8.
- [14] Slom, T. J., *et al.*, An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *The New England Journal Medicine* 2002, 346, 668–675.
- [15] Diaz, J. H., Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. *The Journal of the Louisiana State Medical Society* 2008, 160, 333–342.
- [16] Caldeira, R. L., *et al.*, First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: *Metastrongylidae*) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007, 102, 887–889.
- [17] Maldonado, A., *et al.*, First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Metastrongylidae*) in *Achatina fulica* (Mollusca: *Gastropoda*) from Southeast and South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2010, 105, 1–4.

- [18] He, H. J., Lv, Z. Y., Li, Z. Y., *et al.*, Efficacy of combined treatment with albendazole and baicalein against eosinophilic meningitis induced by *Angiostrongylus cantonensis* in mice. *J. Helminthol.* 2011, 85, 92–99.
- [19] 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 Médica Costarricense* 1967, 10, 235–255.
- [20] Punyagupta, S., Juttijudata, P., Bunnag, T., Eosinophilic meningitis in Thailand – Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975, 24, 921–931.
- [21] Ben, R., Rodrigues, R., Agostini, A. A., Graeff-Teixeira, C., Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010, 105, 914–917.
- [22] Yoshimura, K., Uchida, K., Sato, K., Oya, H. Ultrastructural evidence for eosinophil-mediated destruction of *Angiostrongylus cantonensis* transferred into the pulmonary artery of non-permissive hosts. *Parasite Immunol.* 1984, 2, 105–18.
- [23] Bender, A. L., Maurer, R. L., Silva, M. C., Ben, R., Terraciano, P. B., Silva, A. C. A., Graeff-Teixeira, C., Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensely recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, 36, 449–454.
- [24] Righetti, P. G., Gianazza, E., Isoelectric-focusing in immobilized pH gradients—Theory and newer methodology. *Methods Biochem Analysis* 1987, 32, 215–278.
- [25] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1977, 72, 248–254.

- [26] O'Farrell, P. H., High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007-4021.
- [27] Laemmli, U. K., Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [28] Fujimoto, S. Et al., Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of the *Campylobacter fetus* S layer. *Infection and Immunity* 1991, 59, 2017-2022.
- [29] Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q., Cheng, G., Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 2005, 35, 211–222.
- [30] Kenneth, B., Tomer, M., Arthur, Moseley., Leesa, J., Deterding, Carol., E. Parker., Capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 1994, 13, 431-457.
- [31] Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K. et al., Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 2002, 13, 4100-4109.
- [32] Joshua, G. W., Perler, F. B., Wang, C. C., Orphon spliced-leader sequences form part of a repetitive element in *Angiostrongylus cantonensis*. *Nucleic Acids Res* 1995, 23, 1030-1035.
- [33] León, I. R., Neves-Ferreira, A. G., Valente, R. H., Mota, E. M., Lenzi, H. L., Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with unknown genome. *J Mass Spectrom.* 2007, 42, 1363-1374.
- [34] Morassutti, A. L., Levert, K., Pinto, P. M., da Silva, A. J., Wilkins, P., Graeff-Teixeira, C.. Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as 382 potential diagnostic targets. *Exp Parasitol.* 2011, 381.

- [35] Morassutt, A. L., Pinto, P. M., Dutra, B. K., Oliveira, G. T., Ferreira, H. B., Graeff-Teixeira, C., Detection of anti-oxidant enzymatic activities and purification of glutathione 385 transferases from *Angiostrongylus cantonensis*. *Exp. Parasitol*, 2010, 127, 365-369.
- [36] Jeong, P. Y., Na, K., Jeong, M. J., Chitwood, D., Shim, Y. H. *Et al.*, Proteomic analysis of *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Molecular Biology* 2009, 519, 145-169.
- [37] Bantscheff, M., Ringel, B., Madi, A., Schnabel, R., Glocker, M. O., Differential proteome analysis and mass spectrometric characterization of germ line development-related proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* 2004, 4, 2283-2295.
- [38] Islam, M. K., Miyoshi, T., Yokomizo, Y., Tsuji, N., The proteome expression patterns in adult *Ascaris suum* under exposure to aerobic/anaerobic environments analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Parasitol Res.* 2004, 93, 96-101.
- [39] Lewis, J. A., Szilagyi, M., Gehman, E., Dennis, W. E., Jackson, D. A., Distinct patterns of gene and protein expression elicited by organophosphorus pesticides in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* 2009, 10, 202-224.
- [40] Islam, M. K., Miyoshi, T., Yamada, M., Alim, M. A., Huang, X. *Et a.l*, Effect of piperazine (diethylenediamine) on the moulting, proteome expression and pyrophosphatase activity of *Ascaris suum* lung-stage larvae. *Acta Trop.* 2006, 99, 208-217.
- [41] Pemberton, A. D., Knight, P. A., Gamble, J., Colledge, W. H., Lee, J. K. *Et al.*, Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*: inducible expression of a novel goblet cell lectin, interlectin-2, and its natural deletion in C57BL/10 mice. *J Immunol* 2004, 173, 1894-1901.

- [42] Gare, D., Boyd, J., Connolly, B., Developmental regulation and secretion of nematode-specific cysteine-glycine domain proteins in *Trichinella spiralis*. *Mol Bioch Parasitol* 2002, 134, 257-266.
- [43] Matthews, J. B., Davidson, A. J., Beynon, R. J., The application of mass spectrometry to identify immunogenic components of excretory/secretory products from adult *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology* 2004, 128, S43-S47.
- [44] Rebello, K. M., S., Mota E. M., Carvalho, P. C., Perales, J., Lenzi H. L., Neves-Ferreira, A. G., Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis*, a human parasitic nematode. *J Proteomics*. 2011, 24;74(9):1545-59,
- [45] Mawuenyega, K. G., Kaji, H., Yamuchi, Y., Shinkawa, T., Saito, H. *Et al.*, Large-scale identification of *Caenorhabditis elegans* proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2003, 2, 23-35.
- [46] Navas, A., López, J. A., Espárrago, G., Camafeita, E., Albar, J. P., Protein variability in *Meloidogyne spp.* (Nematoda:Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2002, 1, 421-427.
- [47] Biron, D. G., Joly, C., Marché, L., Galéotti, N., Calcagno, V. *Et al.*, First analysis of the proteome in two nematomorph species *Paragordius tricuspidatus* (Chordodidae) and *Spinochordodes tellinii* (Spinochordodidae). *Infect Genet Evol*. 2005, 2, 167-75.
- [48] Aloysius, G. M., *et al.*; Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists *International Journal for Parasitology*. 2010, 40, 387–397.
- [49] Cheryl Ingram-Smith, Stephen R. Martin, Kerry S. Smith Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends in Microbiol*. 2006, 14, 249-253.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma análise proteica comparativa global foi realizada ao longo do desenvolvimento sexual de *A. cantonensis*. Compararam-se as diferenças de expressão proteica entre extratos de vermes fêmeas de 21, 28, 35 e 42 dpi. Neste estudo, evidenciaram-se as diferenças significativas entre os grupos 21 e 42 dpi, correspondendo ao período de maturidade sexual e oviposição dos vermes. A maturação e a produção de ovos parecem ser eventos centrais na patogenicidade das angiostrongilíases.

Na comparação 21 e 42 dpi, 25 *spots* foram selecionados através da análise de diferença significativa pelo teste T de *Student*. Dos *spots* válidos, um foi expresso somente em 21 dpi (spot 7101). Outro com sua expressão aumentada em 21 dpi (spot 6304), 3 mais expressos em 42 dpi (*spots* 8002, 8102, 6014). Nesta última comparação conseguiu-se identificar, através de espectrometria de massas, uma proteína similar à proteína hipotética de *Tribolium castaneum* e outra similar à acetato quinase de *Lactobacillus sanfrancensis*.

Atualmente há pouca informação molecular sobre *Angiostrongylus* spp. Existem somente 31 genes, 800 sequências nucleotídicas e 685 proteínas depositadas no Genbank (revisado em maio de 2012). Como consequência, a identificação de proteínas por espectrometria de massas fica limitada. Este fato também gera dificuldades para uma melhor compreensão da gama de proteínas expressas pelo proteoma num determinado tempo celular. Sendo assim, a maioria dos estudos de identificação de proteínas de organismos sem genoma sequenciado, como *A. cantonensis*, utiliza sequências de organismos ortólogos relacionados para a comparação da massa peptídica (Morassutti *et al.*, 2011; Rebello *et al.*, 2011). Em última análise, essa falta de dados genômicos e transcriptômicos das espécies do

gênero *Angiostrongylus* spp dificulta a identificação de proteínas após separação por eletroforese bidimensional.

Embora recentemente tenha sido publicado o sequenciamento do genoma mitocondrial de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, a escassez de dados de sequenciamento do genoma destes parasitos é um crítico empecilho para a identificação de proteínas (Shan *et al.*, 2011). Esta situação deve mudar em futuro próximo, com projetos em andamento do sequenciamento genômico e a descrição do transcriptoma, tanto de *A. cantonensis* quanto de *A. costaricensis*.

A enzima identificada neste estudo participa do metabolismo de glicólise, ou seja, da produção de ATP no organismo do parasito. A formação de acetato a partir de acetil-CoA através acetilfosfato ocorre através de duas reações catalisadas por enzimas distintas. Acetil-CoA é primeiro convertido em acetilfosfato por fosfato acetiltransferase. Subseqüentemente fosfato-acetilo é posteriormente metabolizado em acetato de acetato de quinase, uma reação na qual o ADP é convertido em ATP concomitantemente. Acetato quinase encontra-se predominantemente em microrganismos e facilita a produção de acetil-CoA por fosforilação de acetato na presença de ATP e um cátion bivalente. Neste estudo, esta enzima foi encontrada em 42 dpi. Como essa enzima tem sido encontrada em vários nematódeos e não detectada em mamíferos, ela se torna um potencial alvo para tratamento da doença (Barret e Simpkin, 1978; Ingram-Smith *et al.*, 2006; Köhler, 1985; Tielens, 1994).

Os métodos de imunodiagnóstico atualmente disponíveis para angiostrongilíase, em geral, empregam antígenos brutos, precisando ser aprimorados para melhorar seu desempenho. Como em qualquer outra infecção, a chave para o diagnóstico específico é o uso de antígenos apropriados. Com antígeno bruto ou apenas parcialmente purificado de vermes adultos, um

considerável número de reações falso-positivas com outras parasitoses pode ocorrer (Eamsobhana & Yong, 2009; Parkhouse and Harrison, 1989).

A complexidade de antígenos brutos dificulta a visualização de proteínas específicas, uma vez que as mais abundantes podem facilmente mascarar as proteínas de interesse. Por outro lado, a deleção de certas proteínas, na tentativa de facilitar a visualização de proteínas pouco abundantes, pode acabar resultando em perda desses potenciais biomarcadores (Silberring & Ciborowski, 2010).

A produção de antígenos de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* só é possível nos dias de hoje com a manutenção do ciclo em laboratório. Porém, há dificuldades de manutenção dos hospedeiros vivos e há também um contínuo esforço pela redução do uso de animais. A estratégia de utilizar antígenos heterólogos se justifica pela maior facilidade de obtenção de vermes e larvas de *A. cantonensis*. Esta estratégia contribui para o atendimento da demanda de exames sorológicos para angiostrongilíases no laboratório, garantindo a aplicabilidade desta técnica na investigação e manejo dos pacientes (Ben, 2010). Esta abordagem permitiu também a investigação dos primeiros casos autóctones de angiostrongilíase cerebral por *A. cantonensis* no país em Espírito Santo e Pernambuco (Caldeira *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009).

Estudos anteriores com modelos animais apontam o órgão reprodutor e a superfície dos ovos inteiros de *Angiostrongylus costaricensis* como as frações mais imunogênicas (Bender *et al.*, 2003) e associam o aumento na resposta humoral com a maturidade dos vermes e início da oviposição pelas fêmeas (Geiger *et al.*, 1999; Abrahams-Sandí *et al.*, 2004). As análises proteômicas direcionadas a buscar alvos para diagnóstico ou tratamento possivelmente têm maior chance de sucesso ao obedecer alguma estratégia, tal como esta de considerar a importância da

expressão proteica associada com a maturação sexual e larvipostura. Para alvos diagnósticos, as frações de excreção-secreção são uma escolha lógica, devido à exposição permanente que estas moléculas tem ao hospedeiro (Morassutti *et al.*, 2011).

Neste trabalho se tentou realizar testes imunorreativos das amostras de 21 e 42 dias através da técnica de *Western blotting* visando identificar os *spots* selecionados pelo programa PDQuest. Porém, pela dificuldade da própria técnica, desde a obtenção de antígenos, reprodutibilidade na produção de géis bidimensionais e principalmente na correta excisão do *spot* no gel respectivo ao identificado pelo *software* a tentativa foi frustrada.

A experiência com análise proteômica vem confirmando a necessidade de abordagens com estratégias direcionadas para frações ou sub-frações do proteoma, em vez de amplo mapeamento, como se pensava no início da “era proteômica”. A escassez de determinados componentes em *spots* promissores limita as análises de imunoreatividade, vislumbrando-se a obtenção de proteínas recombinantes como uma alternativa necessária. Os estudos de caracterização das proteases em diferentes condições de extração são também importantes, diante da necessidade de ajustar as combinações de inibidores de proteases, além de servirem para descrever importantes funcionalidades destas enzimas no ciclo de vida dos parasitos.

Na linha de orientação das análises proteômicas por frações, há muito o que explorar no futuro imediato, a partir dos experimentos acompanhando a evolução dos vermes adultos e formas larvares e a expressão diferencial de proteínas. Além da necessária aplicação no aprimoramento diagnóstico das angiostrongilíases, sempre resulta algum avanço na compreensão de vários aspectos da interação

Angiostrongylus-hospedeiros. De forma recorrente, esta melhor compreensão pode encurtar o caminho para testes diagnósticos mais eficientes e tratamento mais adequado na doença humana.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. H.; MOREIRA, P.; PASCUAL, J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v. 30, p.963-965, 1981.

AGOSTINI, A. A.; MARCOLAN, A. M.; LISOT, J. M.; LISOT, J. U. Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 443-445, 1984.

ALICATA, J. E. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitol Today*, v. 6, p. 151-153, 1991.

ALICATA, J. E. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Metastrongylidae*) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. *Canadian Journal Zoology*, v. 40, p. 5-8, 1965.

ALOYSIUS, G. M. *et al.* Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists *International Journal for Parasitology*, v. 40, p. 38–397, 2010.

ANTHONY, R. S.; SPECTOR, L. B. Exchange reactions catalyzed by acetate kinase. *J. Biol. Chem*, v. 246, p. 6129-6135, 1971.

BARBOSA, H.; RAICK, A. N.; MAGALHÃES, A. V.; OTERO, P. M. F. Angiostrongilose Abdominal. *Rev Ass Med Bras*, v. 26, p. 178-180, 1980.

BARRETT, J., COLES, G.C., SIMPKIN, K.G. Pathways of acetate and propionate production in adult *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol*, v. 8, p. 117-123, 1978.

BEN, R.; RODRIGUES, R.; AGOSTINI, A. A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 914-917, 2010.

BIRON, D. G. *et al.* First analysis of the proteome in two nematomorph species *Paragordius tricuspidatus* (Chordodidae) and *Spinochordodes tellinii* (Spinochordodidae) *Infect Genet Evol.* 2, 167-75, 2005

CAMPBELL, B. G.; LITTLE M. D. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 38 p. 568-573, 1988.

CÉSPEDES, R.; SALAS, J.; MEKBEL, S.; TROPER, L.; MÚLLNER, F.; MORERA, P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). *Acta Médica Costarricense*, v.10, p. 235-255, 1967.

CHEN, H. T. Un Nouveau Nematode Pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g.n.sp., des Rats de Canton. *Ann. Parasitol*, v. 13, p. 312-317, 1935.

CALDEIRA, R. L., *et al.* First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: *Metastrongylidae*) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 887-889, 2007.

DORTA-CONTRERAS, A. J., *et al.* Peculiarities of meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in America. *Rev Neurol*, v. 45, n. 12, p. 755-763, 2007.

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

DIAZ, J. H. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. *The Journal of the Louisiana State Medical Society*, v. 160, p.333-342, 2008.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop*, v. 33, p. 373-378, 1991a.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasit Res*, v. 77, p. 606-611, 1991b.

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. *Mem Ins. Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 65-68, 1989.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AVILA-PIRES, F. D.; MACHADO, R. C. C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H. L. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Revista do Inst Med Trop*, v. 32, p. 147-150, 1994.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AGOSTINI, A. A.; CAMILLO-COURA, L.; FERREIRA DA CRUZ, F. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop Med Int Health*, v. 2, n. 3, p. 254-260, 1997.

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

GRAEFF-TEIXEIRA, C. *et al.* Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38, p. 310–315, 2005.

HE, H. J. *et al.* Efficacy of combined treatment with albendazole and baicalin against eosinophilic meningitis induced by *Angiostrongylus cantonensis* in mice. *J. Helminthol*, v. 85, p. 92–99, 2001

INGRAM-SMITH, C., MARTIN, S.R., SMITH, K.S. Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends Microbiol*, v. 14, p. 249-253, 2006.

KRAMER, M. H. *et al.* First reported outbreak of abdominal angiostrongyliasis. *Clin. Infect*, v. 26, p. 365-372, 1998.

KÖHLER, P. The strategies of energy conservation in helminths. *Mol. Biochem. Parasitol*, v. 17, p. 1-18, 1985.

LEE, E. G. *et al.* Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, v. 99, p. 919-926, 2005.

LI, H. *et al.* Antigen analysis of *Angiostrongylus cantonensis* in different developmental stages. *Chin. J. Parasitol. Parasitic Dis*, v. 23, p. 36-39, 2005.

LIMA, L. K. *et al.* Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE). *Rev Inst Med Trop*, v. 34, n. 5, p. 399-402, 1992.

LIMA, A. R. M. C. *et al.* Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 64, n. 4, p. 1093-1096, 2009.

MALDONADO, A., *et al.* First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: *Metastrongylidae*) in *Achatina fulica* (Mollusca: *Gastropoda*) from Southeast and South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 1–4, 2010.

MALEK, E. A.; CHENG, T. C. Medical and Economic Malacology. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, p. 203-204, 1976.

MORERA, P. Studies of the definitive host of *Angiostrongylus costaricensis*. (Morera and Cespedes, 1971). *Bol Chil Parasitol*, v. 25, p. 133–134, 1971.

MENDONÇA, C. L. G. F. *et al.* Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host (*Sarasinula marginata*). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 549-556, 1999.

MENTZ, M. B.; TEIXEIRA, C. G.; (2003). Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 45, n. 4, p. 179-84, 2003.

MENTZ, M. B.; TEIXEIRA, C. G.; GARRIDO; C. T. Treatment with mebendazole is not associated with distal migration of adult *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 46, n. 2, p. 73-75, 2004.

MESÉN-RAMÍREZ, P.; ABRAHAMS-SANDÍ, P. E.; FERNÁNDEZ-QUESADA, K.; MORERA, P. *Angiostrongylus costaricensis* egg antigen for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Journal of Helminthology*, v. 82, p. 251-254, 2008.

MORERA, P.; CESPEDES, R. *Angiostrongylus costaricensis* sp. (Nematoda: *Metastrongyloidea*), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop*, v. 18, p. 173-185, 1970.

MORASSUTTI, A. L.; LEVERT, K.; PINTO, P. M.; DA SILVA, A. J.; WILKINS, P.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as 382 potential diagnostic targets. *Exp Parasitol.*, v. 381, 2011.

MORERA, P.; ASH, L. R. Studies on the intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Cespedes, 1971). *Bol Chil Parasitol*, v. 25, p. 135, 1973.

MORERA, P.; ANDREWS, K. L.; RUEDA, D. The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. *Rev. Biol. Trop*, v. 36, p. 575-576, 1988.

MORERA, P.; BONTEMPO, I. Accion de algunos antihelminticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Med Hosp Nac Niños Costa Rica*, v. 20, n. 2, p. 165-174, 1985.

MORERA, P.; LAZO, R.; URQUIZO, J.; LLAGUNO, M. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, v. 32, p. 1460–1461, 1983.

NOMURA, S.; LIN, H. First clinical case of *Hemostrongylus ratti*. *J. Trop. Med. Hyg*, v. 13, p. 589-590, 1945.

PENA, J. P. M.; ANDRADE-FILHO, J. S.; ASSIS, S. C. *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*, v. 37, p. 369-374, 1991.

PUNYAGUPTA, S.; JUTTIJUDATA, P.; BUNNAG, T. Eosinophilic meningitis in Thailand – Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v. 24, p. 921–931, 1975.

REBELLO KM, BARROS JS, MOTA EM, CARVALHO PC, PERALES J, LENZI HL, NEVES-FERREIRA AG. Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis*, a human parasitic nematode. *J Proteomics*. 24;74(9):1545-59, 2011

ROCHA, A.; MOSCARDINI-SOBRINHO, J.; SALOMÃO, E. C. Angiostrongilíase Abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 24, p. 265-268, 1991.

SAWANYAWISUTH, K.; SAWANYAWISUTH, K. Treatment of angiostrongyliasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 10, p.990-996, 2008.

SHAN LV, YI ZHANG, PETER STEINMANN, XIAO-NONG ZHOU, JÜRIG UTZINGER Helminth Infections of the Central Nervous System Occurring in Southeast Asia and the Far East. *Advances in Parasitology*, v 72, p 351-408, 2011.

SILVA, A. C. A. da; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ZAHA, A. A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev. Inst Med Trop*, v. 45, n. 5, p. 295-297, 2003.

SINAWAT, S. *et al.* Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases. *Eye (Lond)*, v. 22, n. 11, p. 1446-1448, 2008.

SLOM, T. J., *et al.* An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, p. 668–675, 2002.

THIENGO, S. C. Mode of infection *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 277-278, 1996.

TIELENS, A.G.M. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today*, v. 10, p. 346-352, 1994.

UBELAKER, J. E.; HALL, N. M. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 in the United States. *J Parasitol*, v. 35, p. 307, 1980.

VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. Occurrence of *Achatina fulica* in the Vale do Paraíba, Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Saude Publica*, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001.

VAZQUEZ, J. J. *et al.* Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology*, v. 105, p. 1544–1549, 1993.

ZILIOOTTO, J. A. *et al.* Angiostrongilíase: apresentação de provável caso. *Rev. Inst. Med. Trop*, v. 17, p. 312-318, 1975.

WANG, Q. P.; LAI, D. H.; ZHU, X. Q.; CHEN, X. G.; LUN, Z. R. Human aniostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis*, v. 8, p. 621-630, 2008a.

WANG, L. C.; AND Y. L. WAN. Alteration of antibodies against the fifth-stage larvae and changes in brain magnetic resonance images in experimentally infected rabbits with *Angiostrongylus cantonensis*. *J. Parasitol*, v. 90, p. 1193-1196, 2004.