

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

AUSÊNCIA DO ENDOSIMBIONTE *Wolbachia* SP. EM DOIS
METASTRONGILÍDEOS: *Angiostrongylus costaricensis* E *Angiostrongylus*
cantonensis

Renata Ben

Orientador: Dr Carlos Graeff-Teixeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS – BRASIL
2007

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Revisão Bibliográfica	7
1.1.1. <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	7
1.1.2. <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	10
1.1.3. <i>Wolbachia</i> sp.	11
1.2. Objetivo	14
1.2.1. Objetivo Geral.....	14
1.2.2. Objetivos Específicos	14
1.3. Justificativa	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1. <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	16
2.2. <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	16
2.3. Extração de DNA	16
2.4. Reação de PCR	17
2.5. Eletroforese em Gel de Agarose	17
2.6. Quantificação de DNA	18
2.7. Preparação de antígeno	18
2.8. Cultivo de bactérias da microbiota dos vermes	18
2.9. Preparação de antígeno de bactéria	19
2.10. Eletroforese unidimensional	19
2.11. Western Blot	19
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Gel de agarose evidenciando o resultado do PCR	20
Figura 2: Imunoeletrotransferência de antígenos de <i>E.coli</i> , <i>A. costaricensis</i> e <i>A. cantonensis</i>	21
Figura 3: Bactéria gram-positiva isolada da microbiota do verme adulto de <i>A. cantonensis</i> (Gram, x1000).....	22

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Instituto de Patologia pela compreensão.

Aos amigos da PUCRS, principalmente, Ana Cristina, Rafael e Juliano pela amizade, exemplo e por toda a ajuda.

Aos técnicos do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS pelo auxílio nas horas necessárias.

A minha família pelo apoio, suporte e tolerância em todas as horas. E principalmente a minha mãe por sempre me incentivar, acreditando na minha capacidade.

Ao meu esposo, Diego, por toda a dedicação, auxílio, paciência e amor.

Ao meu orientador pelos ensinamentos, apoio, confiança, incentivo e amizade.

RESUMO

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo *Angiostrongylus costaricensis*, um nematódeo intra-arterial, que vive na região íleo-cecal de roedores silvestres. Esta parasitose tem sido registrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O homem é hospedeiro acidental e se infecta ingerindo as larvas de terceiro estágio (L3) presentes no muco do hospedeiro intermediário (veronicelídeos). Outra espécie, que também é parasita do homem, é *Angiostrongylus cantonensis*, um verme pulmonar de ratos, causador da meningite eosinofílica, que ocorre na Ásia e ilhas do Pacífico. Parasitas de parasitas são atualmente alvo de estudos não somente para abrir novas possibilidades terapêuticas, bem como para aprimorar técnicas diagnósticas. O interesse pela *Wolbachia* sp, uma bactéria gram-negativa endossimbionte, aumentou no momento em que descobriram sua característica mutualística em relação à filária. Estas considerações levaram a novas idéias para o tratamento destas parasitoses através da utilização de drogas antibacterianas. O objetivo principal deste trabalho é verificar a presença de *Wolbachia* em *A. costaricensis* e em *A. cantonensis*, e estudar a sua contribuição para a resposta imune humoral do hospedeiro vertebrado. O primeiro passo foi buscar evidências da presença de ácidos nucléicos de *Wolbachia*, através da técnica de PCR. Em alguns experimentos foram obtidos produtos de amplificação, o que poderia ser um indício da presença da bactéria, mas esses dados devem ser confirmados por microscopia eletrônica e por imunohistologia. Diante das dificuldades para se obter antígeno de *Wolbachia* sp alternativamente amostras de soro de indivíduos com angiostrongilíase foram testados contra antígenos de *Escherichia coli* por ser uma bactéria comum na microbiota de vertebrados e que eventualmente poderia colonizar o verme. Através da análise por imunoeletrotransferência ficou claramente demonstrada uma reatividade não relacionada exclusivamente aos indivíduos infectados por *A. costaricensis*. Além disso, fragmentos de vermes foram semeados em meio de cultura a fim de estudar a microbiota do verme adulto de *Angiostrongylus*. O fato de só ser encontrada um bacilo gram positivo nesse experimento parece confirmar a hipótese de que, por ser o ambiente intravascular pouco tolerante à presença de bactérias, a microbiota do verme deve ser pouco numerosa e diversa. Permanece aberta para futuras investigações a contribuição de outras bactérias ou outros simbiontes em helmintos, para reconhecimento antigênico pelo hospedeiro vertebrado, com possíveis implicações para diagnóstico, patogenia e tratamento.

ABSTRACT

Abdominal angiostrongyliasis is caused by *Angiostrongylus costaricensis*, an intra-arterial nematode, that lives in the ileocecal region in wild rodents. This parasite has been detected from southern United States to northern Argentina. Man is an accidental host and is infected ingesting third stage larvae (L3) that are eliminated with mucous secretions by the intermediate host (veronicelid slugs). Another species, that also may infect man is *Angiostrongylus cantonensis*, a rat pulmonary worm, responsible for eosinophilic meningitis, in Asia and Pacific islands. Parasites of parasites are currently being studied not only to open new therapeutic possibilities, but also in order to improve diagnostic techniques. The interest for *Wolbachia*, a gram-negative endosymbiont bacterium, increased when the mutualistic character of its association with filarias was described. These considerations led to new ideas for treatment of these parasitosis through the use of antibacterial drugs. The main objective of this work is to verify the *Wolbachia* sp presence in *A. costaricensis* and *A. cantonensis*, and study its contribution for the humoral immune response of the vertebrate host. The first step was to look for evidences in favor of the presence of *Wolbachia* sp. Nucleic acids, through the PCR technique. In some experiments amplification products were obtained, what could be an indication of the presence of the bacterium, but these data must be confirmed by electronic microscopy and immunohistology. Because of the difficulties to get *Wolbachia* sp. antigen, alternatively serum samples from individuals with abdominal angiostrongyliasis were tested against *Escherichia coli* antigen, because it is a common bacterium species in vertebrates' microbiota that could eventually colonize the worm. Through a western-blot analysis it was clearly demonstrated a reactivity not exclusively associated to *A. costaricensis*' infected individuals. Moreover, fragments of worms were introduced in bacterial culture medium in order to study the microbiota of the *Angiostrongylus* adult worm. The fact of being found only one species of a gram-positive bacillum in this experiment seems to confirm the hypothesis that in intravascular environment, with a low tolerance for bacteria, the worm's microbiota is reduced in number and diversity. From the experiments we were not able to identify the presence of *Wolbachia* sp neither in *A. costaricensis* nor in *A. cantonensis*. It remains open to further investigations the contribution of other bacteria or symbionts of helminthes, for antigenic recognition by the vertebrate host, with potential implications for diagnosis, pathogenesis and treatment.

1. INTRODUÇÃO

Revisão Bibliográfica

O gênero *Angiostrongylus* foi proposto por Kamensky em 1905. Apesar de muitas espécies deste gênero serem consideradas zoonóticas, somente duas espécies - *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) e *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971) - são importantes parasitos de seres humanos, sendo geralmente transmitidos por interações molusco-homem inusitadas (Stewart et al., 1985, Bhaibulaya, 1991).

Angiostrongylus costaricensis

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo *A. costaricensis*, um nematódeo intra-arterial próprio de roedores silvestres. A espécie foi descrita na Costa Rica, por Pedro Morera e Rodolfo Céspedes em 1971 posteriormente ao trabalho de Céspedes et al. em 1967 descrever, em pacientes da Costa Rica, quadros clínicos com granulomas entéricos e linfáticos com intensa eosinofilia.

Esta parasitose tem sido registrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, descreveram-se casos no Distrito Federal (Barbosa et al., 1980), no Espírito Santo (Pena, Andrade-Filho & Assis, 1995), em Minas Gerais (Rocha, Moscardini-Sobrinho & Salomão, 1991), no sul do estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ziliotto et al., 1975; Ayala, 1982; Agostini et al., 1984).

O Rio Grande do Sul, principalmente na sua metade norte, é o estado do Brasil onde foi registrado e diagnosticado o maior número de casos (Graeff-Teixeira et al., 1991). Estes costumam ocorrer no final da primavera, verão e início do inverno, mostrando uma aparente sazonalidade. As baixas temperaturas provavelmente inibem a evolução das larvas nos moluscos (Ishii, 1984) e, além disso, o calor e a umidade da primavera e verão coincidem com a reprodução e maior atividade das lesmas.

O *A. costaricensis* é um nematódeo que vive nas arteríolas mesentéricas da região íleo-cecal de roedores silvestres, tais como *Sigmondon hispidus*, na América Central, e *Oryzomys ratticeps* e *Oryzomys nigripes*, no sul do Brasil (Morera, 1970, Tesh et al., 1973, Monge e al., 1978, Santos, 1985, Graeff-Teixeira et al., 1990).

Tem como hospedeiro intermediário veronicelídeos como *Sarasinula plebeia* na América Central e norte da América do Sul (Morera & Ash, 1970, Morera et al., 1983, Kaminsky et al., 1987; Morera et al., 1988, Duarte et al., 1992) e *Phyllocaulis variegatus* no sul do Brasil (Morera, 1987, Graeff-Teixeira et al., 1989, Rambo et al., 1997). Maurer et al. (2002) registraram pela primeira vez, moluscos da espécie *Deroceras laeve* naturalmente infectados com larvas do metastrongilídeo.

Outras espécies de moluscos, testadas experimentalmente, mostraram-se susceptíveis à infecção (Lima et al., 1992), demonstrando que, espécies como *B. glabrata*, podem ser utilizadas para a manutenção do ciclo do parasito em laboratório (Ubelaker et al., 1980).

As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas com as fezes do roedor. Nas lesmas, que se alimentam das fezes contaminadas, estas larvas chegam ao tecido fibromuscular, evoluem sofrendo duas mudas e originando as larvas de terceiro estágio (L3). As L3, infectantes para os vertebrados, são eliminadas com o muco do molusco e, depois de ingeridas, penetram na parede do intestino e originam os vermes adultos. Estes são filiformes, apresentando a extremidade anterior arredondada e provida de três pequenos lábios. A fêmea mede em torno de 32 mm de comprimento e o macho 20 mm (Morera, 1973). A fêmea inicia a oviposição a partir do décimo oitavo dia e os ovos são levados pela corrente sanguínea arterial até a parede intestinal, de onde as larvas são eliminadas nas fezes.

O homem é hospedeiro acidental e se infecta pela ingestão de alimentos contaminados com o muco das lesmas contendo larvas infectantes, ou até mesmo ingerindo as lesmas contaminadas (Morera, 1986). No homem não ocorre a eliminação de L1 nas fezes devido à intensa reação inflamatória da camada muscular da parede intestinal, causada pela presença de ovos e larvas, que ficam retidas no tecido (Graeff-Teixeira et al., 1991). Não existe, até o momento, relato da presença de ovos ou larvas desse nematódeo ao exame parasitológico de fezes (Mojon, 1994, Pena et al., 1995). Mota e Lenzi (1995) propuseram um ciclo que

difere do anteriormente descrito, pela existência de uma via pulmonar para a passagem da circulação linfática venosa para o sistema arterial e de uma via venosa portal.

Ubelaker et al. (1981) e Morera (1986) testaram a eficiência de outras vias de infecção como intraperitoneal, subcutânea, pele lesada e pele íntegra, confirmando a via oral como sendo a principal na manutenção do ciclo natural em roedores.

No homem, o parasito causa uma doença abdominal de variada gravidade que compromete a região da válvula íleo-cecal, apêndice (Céspedes et al., 1967, Loria-Cortes & Lobo-Sanahuja, 1980) e intestino delgado (Graeff-Teixeira, 1986). A doença pode evoluir para a oclusão intestinal com agravamento da dor, distensão abdominal, ruídos hipercinéticos e parada na eliminação de fezes.

A administração de fármacos anti-helmínticos deve ser evitada, pois podem induzir migração errática dos vermes e agravamento das lesões (Morera & Bontempo, 1985). Recentes estudos utilizando Lovastatina e Fenantrolina em roedores, mostraram que não houve migração errática ou agravamento das lesões nos modelos experimentais (Mentz & Graeff-Teixeira, 2003, Mentz et al., 2007).

O tratamento da doença, nos casos de abdome agudo ou obstrutivo, é cirúrgico, ressectando-se o segmento abdominal ou o apêndice cecal, seguido de reconstituição do trânsito intestinal (Lobo-Sanahuja et al., 1987, Hirschfels, 1993).

O diagnóstico pode ser feito por avaliações sorológicas. Na Costa Rica é empregado um teste de aglutinação em látex (Lobo-Sanahuja et al., 1987) e no Brasil está disponível um teste de ELISA, com sensibilidade de 76% e especificidade de 98%, para detecção da fase aguda da infecção (Graeff-Teixeira et al., 1997). Silva et al. (2003) padronizaram uma PCR e a amplificação ocorreu até a terceira semana pós-infecção, negativando a partir deste momento. Bender et al. (2003) empregaram o método de imunofluorescência indireta e observaram que a fluorescência foi mais intensa na superfície dos ovos inteiros e nos fragmentos de L1, utilizando soros de fase aguda.

O diagnóstico definitivo é feito nos cortes histológicos de biópsia ou peças cirúrgicas (Graeff-Teixeira et al., 1991) evidenciando nematódeos ou ovos intra-arteriais.

As medidas profiláticas assumem uma grande importância, pois o homem geralmente adquire a infecção pela ingestão de frutas e verduras contaminadas com

o muco do molusco infectado. Portanto, lavar as verduras e as mãos após trabalhos de jardinagem e evitar manipular e consumir moluscos são cuidados necessários (Demo e Pessat, 1986). Outra medida proposta foi o resfriamento de verduras (Morera, 1986), posteriormente inviabilizado por Richinitti et al. (1999) que, através de seus experimentos aliados a um modelo matemático, concluiu que o tempo necessário para reduzir a probabilidade da infecção seria de 80 dias. Zanini e Graeff-Teixeira (1995), incubando larvas infectantes à 5°C por 12 horas em hipoclorito de sódio 1,5%, solução saturada de cloreto de sódio e vinagre, mostraram que essas substâncias podem ser úteis na descontaminação de alimentos visando a profilaxia da angiostrongilíase abdominal.

Angiostrongylus cantonensis

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) é um verme pulmonar de ratos, originalmente descritos em *Rattus Norvegicus*, porém outros mamíferos como gatos, macacos e camundongos estão envolvidos na manutenção da parasitose (Alicata, 1964a). Este parasito está associado à meningite eosinofílica no homem, tendo sido recuperado pela primeira vez em Formosa no ano de 1944, do líquido cérebro espinhal de um homem jovem com sintomas de meningite (Nomura & Lin, 1945).

Infecções humanas já foram descritas na Ásia (Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Hong Kong e Japão), Tahiti, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné e Austrália. Na África foi encontrado em Madagascar (Wilson, 1991).

A. cantonensis é um nematódeo heteroxênico que utiliza uma variedade de moluscos como hospedeiros intermediários, entre eles, caramujos como *Bradybaena similis*, lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras*. A suscetibilidade de *Achatina fulica* é superior aos demais hospedeiros (Wallace & Rosen, 1969). Como hospedeiros definitivos encontramos *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. Porcos e cabras também foram relatados com o parasito (Alicata 1963, 1964b).

As L1, que são eliminadas com as fezes dos roedores, evoluem para L3 em muitas espécies de lesmas e caramujos. As L3, infectantes para os vertebrados, são neurotrópicas e, no hospedeiro natural, migram para o cérebro onde crescem e maturam para adultos jovens produzindo uma intensa reação inflamatória. Os vermes adultos migram para a artéria pulmonar onde produzem ovos que

desenvolvem as larvas de primeiro estágio. Estas larvas penetram na cavidade aérea do pulmão, migram para o trato respiratório e são eliminadas nas fezes do hospedeiro.

O homem adquire o nematódeo através da ingestão de alimentos crus contendo as larvas infectantes ou por ingestão dos hospedeiros intermediários. Outra via de infecção não completamente esclarecida é através de água contaminada com as larvas que evadem-se de moluscos mortos. A penetração de larvas presentes no solo através da pele lesada, também é considerada possível via de entrada (Alicata & Brown, 1962).

A meningite eosinofílica é doença grave, pois o parasito aloja-se no sistema nervoso central. A patogenia depende diretamente dos danos causados pela movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa da pessoa infectada. Os sintomas relacionados à doença são dor de cabeça (região occipital e temporal), náuseas, vômitos, febre, rigidez do pescoço, prurido, exantema, dor abdominal, e também podem ser observadas lesões oculares permanentes (Wilson, 1991; Alicata, 1964).

Em cortes histológicos observam-se em torno dos vermes, células inflamatórias, congestão vascular, hemorragia subdural e subaracnóide, necrose focal e hemorragia cerebral (Cross, 1987).

A resposta de anticorpos contra *A. cantonensis* tem sido examinada em hospedeiros permissivos e não permissivos e testada por várias técnicas.

Wolbachia sp.

Wolbachia são Alphaproteobacteria - bactérias gram-negativas membros das Anaplasmataceae que vivem intracelularmente em artrópodes e nematódeos (Fenn e Blaxter, 2004; Werren, 1997). Esta bactéria foi primeiramente descrita por Hertig e Wolbach em 1924 como um organismo semelhante à *Rickettsia*, no tecido reprodutivo de *Culex pipiens*. Posteriormente, o gênero *Wolbachia* e a espécie *Wolbachia pipientis* foram estabelecidos por Hertig (1936) em homenagem ao seu companheiro.

A bactéria é encontrada em diversos grupos de artrópodes, incluindo insetos, crustáceos e aranhas. Nos artrópodes provocam uma série de manipulações reprodutivas, incluindo incompatibilidade citoplasmática (Yen e Barr, 1973), indução da partenogênese (Stouthamer et al., 1993), feminilização e até mesmo morte dos machos (Rousset et al., 1992; Werren, 1997; Stouthamer et al. 1999, O'Neill et al., 1997, Min e Benzer, 1997). A transmissão é vertical das fêmeas adultas para a prole (Stouthamer et al., 1999) e a bactéria pode ser detectada nos tecidos ovarianos, oogônia, oocistos e embriões (Kozek, 1977; Taylor et al., 1999). Em artrópodes a endobactéria pode ser experimentalmente transmitida de modo horizontal dos indivíduos infectados para os não infectados e inclusive entre espécies. Há evidências evolutivas de que a transferência horizontal já ocorreu naturalmente (Heath et al., 1999; Vavre et al., 1999).

O tratamento com antibiótico dos insetos infectados resulta em cura sem efeitos adversos para o hospedeiro artrópode. Isso leva a considerar a *Wolbachia* de artrópodes como um parasito (Fenn e Blaxter, 2004; Werren, 1997).

Na década de 70, com o advento da microscopia eletrônica, foi descoberta a bactéria intracelular na filária (McLaren et al., 1975; Vincent et al., 1975; Kozek, 1977; Kozek e Figueroa, 1977). O fascinante simbiote foi ignorado por muitos parasitologistas até a aplicação de técnicas de genética molecular, que permitiram a Sironi et al. (1995) identificar a bactéria em vermes encontrados no coração de cachorros, *Dirofilaria immitis*, como relativamente próxima a *Wolbachia*. Desde então, *Wolbachia* está sendo reportada na maioria das espécies de filária analisadas, incluindo os principais parasitos do homem: *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus* e *Brugia malayi* (Sironi, 1995; Bandi et al., 1998; Henkle-Dührsen et al., 1998, Casiraghi et al., 2001). As exceções, que foram comprovadas por PCR e imunohistologia, são a filária de roedores *Acanthocheilonema viteae* (Bandi et al., 1998) e o parasito de cervo *Onchocerca flexuosa* (Henkle-Dührsen et al., 1998, Plenge-Bönig et al., 1995). A bactéria pode ser encontrada em todos os estágios de desenvolvimento e pode ser bastante abundante em vermes adultos. Elas são encontradas na hipoderme e tecidos reprodutivos das fêmeas, o que sugere um modo de transmissão vertical (Kozek, 1997). Numa secção de tecido a bactéria pode estar presente individualmente, em pequenos ou grandes grupos, podendo inclusive preencher quase todo o ambiente celular (Taylor e Hoerauf, 1999).

Análise por PCR de 50 machos e 50 fêmeas de *B. malayi*, utilizando primers específicos para *Wolbachia*, mostrou que todas as fêmeas continham a bactéria, mas apenas 25% dos machos apareciam infectados (Taylor et al., 1999). Análises posteriores utilizando nested-PCR, revelaram que todos os machos estavam infectados, embora não tanto quanto as fêmeas (M. J. Taylor e H. Cross, não publicado).

Análise filogenética comparando as seqüências 16S rDNA e *ftsZ* mostrou que as *Wolbachia* de filária são proximamente relacionadas e, em geral, formam um grupo separado das *Wolbachia* de artrópodes (Sironi et al., 1995; Bandi et al., 1998; Taylor et al., 1999).

Em algumas espécies de *Brugia* o tratamento com antibióticos afeta o crescimento, desenvolvimento, motilidade e viabilidade das larvas e dos vermes adultos (Bosshardt et al., 1993; Bandi et al., 1999; Smith e Rajan, 2000; Townson et al., 2000; Casiraghi et al., 2002; Rao e Weil, 2002). Além disso, tratamento com tetraciclina não tem efeito no desenvolvimento e fertilidade de *A. viteae*, que é livre de *Wolbachia* (McCall et al., 1999). Isso sugere que nematódeos são dependentes da bactéria em diversos níveis dos processos biológicos. As evidências para o mutualismo são suportadas por estudos filogenéticos que mostram uma longa e congruente evolução da bactéria e do nematódeo (Bandi et al., 1998; Casiraghi et al., 2001). Tratamento de nematódeos infectados com agentes antibacterianos não só danifica a *Wolbachia* como também afeta o hospedeiro (Hoerauf et al., 2000; Bandi et al., 1999), sugerindo mutualismo (Fenn e Blaxter, 2004).

Modelos murinos e bovinos de oncocercose e filariose têm sido tratados com sucesso utilizando-se tetraciclina (Bosshardt et al., 1993; Genchi et al., 1998; Bandi et al., 1999; Hoerauf et al., 1999; McCall et al., 1999). Estudos preliminares têm mostrado que o DNA de *Wolbachia* de *B. Malayi* pode ser detectado em amostras de plasma de indivíduos infectados (M. J. Taylor e M. Yazdanbakhsh, não publicado). Atualmente, a bactéria tem sido visualizada por imunohistologia utilizando anticorpo contra a bactéria e hsp60 (Henkle-Dührsen et al., 1998; Hoerauf et al., 1999; A. Koszarski, dissertação, 1999).

O hospedeiro definitivo pode estar continuamente exposto a *Wolbachia* durante a infecção e desenvolver uma resposta por anticorpos contra *Wolbachia* e seus produtos, por exemplo, antígeno da proteína de superfície da *Wolbachia* como

descrito em gatos (Bazzocchi et al., 2000) e em humanos como na dirofilariose pulmonar (Simon et al., 2003). O pulmão, o rim, o fígado e o baço são os locais preferenciais para a localização de antígenos de *Wolbachia* e para a formação de lesão (Wieslaw, 2005).

A lista de espécies que carregam *Wolbachia* está aumentando e é possível que *A. costaricensis* também seja hospedeiro.

Objetivo

Objetivo Geral

Estudar a interação entre *Wolbachia* sp e dois metastrongilídeos: *A. costaricensis* e *A. cantonensis*.

Objetivos Específicos

Verificar a presença de *Wolbachia* sp infectando *A. costaricensis* e *A. cantonensis*.

Comparar perfil de antígenos de *Wolbachia* sp e dos metastrongilídeos, que são reconhecidos por hospedeiros vertebrados: homem, camundongo e rato.

Testar a hipótese: “parte da reatividade humoral dos hospedeiros vertebrados é devida à presença de *Wolbachia* sp”.

Justificativa

O estudo de parasitos de parasitos é uma área em expansão que vem permitindo compreender a complexidade do conjunto de interações em que o parasitismo se insere. Além disto, estes conhecimentos têm criado perspectivas de aplicação prática, tal como no tratamento da filariose bancroftiana. A descrição detalhada dos componentes antigênicos pode ser útil para uso em diagnóstico

imunológico especialmente em parasitoses como as angiostrongilíases, onde outras metodologias não têm desempenho adequado.

Durante o XI Congresso Mundial de Parasitologia, Dr. Wei June Chen da University Chang Gung, de Taiwan informou que havia conseguido demonstrar a presença de *Wolbachia* em *A. cantonensis* e propôs que o mesmo fosse buscado em *A. costaricensis*. Disso surgiu a idéia da presente dissertação, buscando verificar a presença da *Wolbachia* e estudar a sua contribuição para a resposta humoral do hospedeiro vertebrado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Angiostrongylus costaricensis

O ciclo de *A. costaricensis* é mantido no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Biociências da PUCRS utilizando como hospedeiro intermediário, moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, e como hospedeiros definitivos o roedor silvestre *Olygorizomys nigripes*.

Angiostrongylus cantonensis

O ciclo de *A. cantonensis* é mantido no mesmo laboratório utilizando-se *Biomphalaria* como hospedeiro intermediário e *Rattus norvegicus* como hospedeiro definitivo.

Extração de DNA

Para extrair o DNA de *A. costaricensis* foram utilizados 38 vermes fêmeas e para *A. cantonensis* foram utilizados 20 vermes fêmeas. Os vermes foram homogeneizados em nitrogênio líquido e ressuspensos em 0,5 mL de tampão de lise (10 mM TRIS-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 100 mM NaCl) e 40 µL de Proteinase K (20 mg/mL). O material foi incubado a 60 °C por 1 hora e, após, foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 3 M e um volume de fenol-clorofórmio. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada 30 minutos a 14000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de clorofórmio, misturou-se por inversão e centrifugou-se 20 minutos a 14000 rpm. Acrescentou-se 100µL de acetato de amônio 3M e um volume de isopropanol gelado ao sobrenadante. Após 24 horas a 20°C, centrifugou-se 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de Etanol 70%. Centrifugou-se 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 55°C. O material foi ressuspensionado em 50µL de água de injeção autoclavada e incubado em banho de água a 55°C por 24 horas.

Reação de PCR

O DNA extraído foi amplificado pela PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos FD1 (5´ - agagtttgatcctggctcag - 3´) e Rp2 (5´ - acggctaccttggtacgactt - 3´). Para a reação utilizamos 1U *Taq* DNA polimerase, 2µL de dNTP (10mM), 5µL de PCR Buffer 10X, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada primer (20 pmol/µL) e 1µL do DNA extraído para uma reação em 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador Amplicon-thermolyne (Dubuque, Iowa) nas seguintes condições: inicialmente uma temperatura de 94°C por 2 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA seguido de uma seqüência de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 40 segundos para anelamento de oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para atividade extensora da polimerase. Essa seqüência foi repetida 45 vezes, e, finalmente uma extensão final para a polimerase de 72°C por 10 minutos.

Em outra reação os oligonucleotídeos utilizados foram wsp691R (5´ - aaaaattaaacgctactcca - 3´) e wsp81F (5´ - tggccaataagtgatgaaagaaac - 3´). A reação foi realizada com 1U *Taq* DNA polimerase, 1µL de dNTP (10mM), 5µL de PCR Buffer 10X, 2,5µL de MgCl₂ (50mM), 2µL de cada primer (20 pmol/µL) e 5µL do DNA extraído também para uma reação em 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: um ciclo (1 minuto 94 °C, 1 minuto 55°C, 3 minutos 72°C), 35 ciclos (15 segundos 94°C, 1 minuto 55°C, 3 minutos 72°C) e finalmente um ciclo (15 segundos 94°C, 1 minuto 55°C e 10 minutos 72°C).

Eletroforese em Gel de Agarose

Para avaliar o resultado da extração de DNA e a amplificação do gene por PCR, foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose. Para visualizar o DNA extraído foi utilizado gel de agarose (Invitrogen) 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-base 54 g/L, ácido bórico 27,5 g/L e EDTA 1M pH 8,0). A eletroforese foi realizada também em tampão TBE 1X a 100 Volts por aproximadamente 30 minutos, e a coloração realizada com brometo de etídio (0,025 g/mL) adicionado na preparação do gel. O gel foi submetido ao transluminador (FBTI-88–Fisher Scientific radiação UV-B) para a análise do resultado.

Quantificação de DNA

Para a análise espectrofotométrica foram utilizadas cubetas de quartzo (Sigma). A leitura realizada no comprimento de onda de 260 nm na região do visível com uma diluição de 1:60 de cada preparação de DNA em volume de 300 µL por leitura, utilizando espectrofotômetro Spectronic Genesys 2 (Rochester, NY). O cálculo da concentração do DNA foi obtido utilizando-se a proporção padronizada em que 1 UA (unidade de absorbância) de uma solução de ácidos nucleicos a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por microlitro de solução (Sambrook, 1989).

Preparação de antígeno

Para a preparação de antígenos de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* os vermes foram destruídos mecanicamente em homogeneizador de vidro, imersos em nitrogênio líquido até transformarem-se em pó. Utilizou-se tampão TRIS NaCl 20mM com inibidores de proteases (TLCK, EDTA, PMSF) como o tampão de extração. Esta solução foi sonicada 3x por 2 minutos e posteriormente centrifugada 2x de 20 minutos à 4° C e 12000 xg. Utilizamos o sobrenadante. Para estimar a concentração protéica utilizou-se o kit Bradford Biorad.

Cultivo de bactérias da microbiota dos vermes

A fim de avaliar a presença de bactérias no trato digestivo dos parasitos estudados, foi sacrificado um *R. norvegicus*, em ambiente asséptico, para retirada de vermes de *A. cantonensis*. Os 10 vermes encontrados foram destruídos com bastão de vidro em 10 mL de água peptonada 0,1% autoclavada. Após 2 horas a 37° C, 1mL dessa preparação foi adicionada a 10mL de meio TSB 30 g/L e 100uL foi semeado em placa TSA 40 g/L. A água peptonada e os meios de cultura foram mantidos a 37°C por 24 horas e após, analisados. 100uL de água peptonada (24h após adição dos vermes) foi novamente semeado em TSA e, em outra placa, 100uL de TSB também foi semeado. O resultado foi avaliado após 24 horas. O experimento

foi realizado em duplicata. Amostras de bactérias das colônias foram visualizadas em lâmina corada pelo método de Gram.

Preparação de antígeno de bactéria

Para preparar o antígeno das bactérias. As colônias foram coletadas e adicionadas a 1mL de meio de cultura TSB. Após 48 horas esse material foi lavado 2 vezes com adição de água de injeção autoclavada e centrifugado 2x de 20 minutos a 14000rpm. Adicionou-se 400uL de água de injeção autoclavada e o material foi sonificado 4x de 2 minutos. Centrifugou-se 2x de 20 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi armazenado.

Eletroforese unidimensional

Para a eletroforese unidimensional preparamos gel de poliacrilamida 12%. As amostras foram aplicadas e a corrida feita verticalmente, iniciando em 100V e, após entrada no gel de resolução, em 200V. O gel foi corado com Comassie ou transferido para membrana de nitrocelulose para o método de imunoeletrotransferência (Western blot).

Western Blot

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham) que foi bloqueada ON à 4°C com PBS Tween 20 0,05% e leite desnatado 5%. A membrana foi lavada 6x por 5 minutos com PBS Tween 20 (PBST) 0,05% à temperatura ambiente. Incubou-se por 1 hora à 37°C com o anticorpo primário diluído 1/100 em PBST 0,01% milk 5%. Após, a membrana foi lavada 6x por 5 minutos com PBST 0,05% à temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (Sigma Immuno Chemicals) foi adicionado diluído 1/1000 em PBST 0,01% milk 5% e a incubação feita por 1 hora, à 37°C. Após novas lavagens da membrana, revelou-se com DAB (3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride – Sigma) ou por quimioluminescência (ECL plus Western Blotting Detection System – Amersham Biosciences).

3. RESULTADOS

As primeiras tentativas para a amplificação do fragmento desejado para a *Wolbachia*, a partir de DNA de *A. costaricensis* e *A. cantonensis*, foram negativas com ambos os pares de primers utilizados (FD1 e Rp2, wsp691R e wsp81F). Novos experimentos foram realizados e juntamente com um DNA de *A. cantonensis* cedido pelo Dr. Chen, foi obtida amplificação de acordo com a Figura 1.

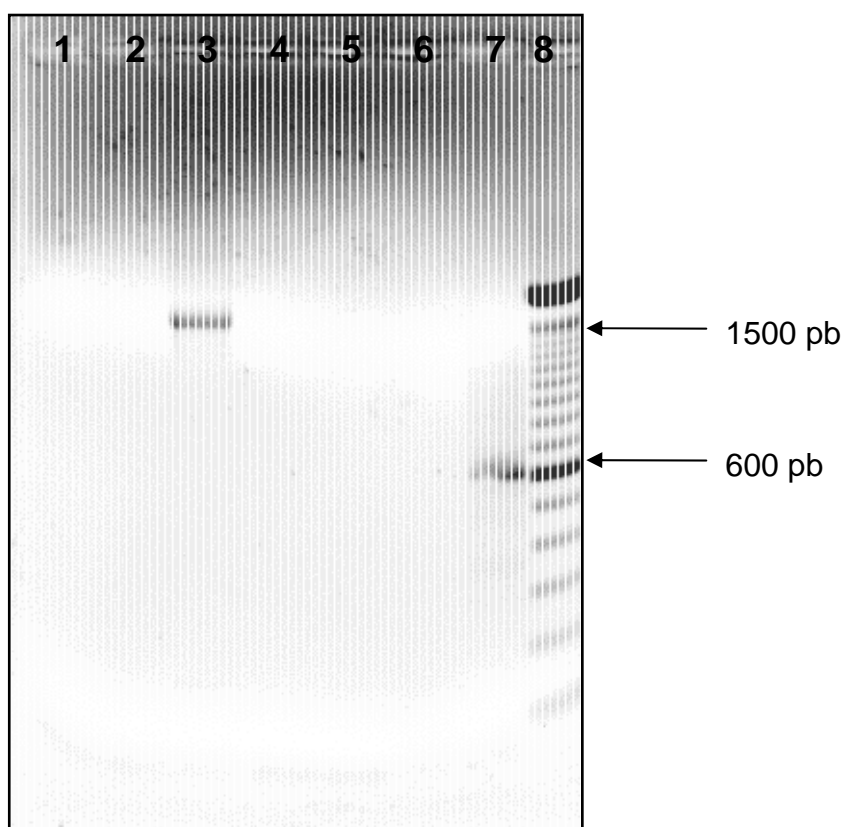


Figura 1: Gel de agarose 1,5%. 1-3: FD1 e Rp2 (1: água, 2: DNA *A. costaricensis*, 3: DNA *A. cantonensis*). 4-7: wsp691R e wsp81F (4: água, 5: DNA *A. costaricensis*, 6: DNA *A. cantonensis*, 7: DNA *A. cantonensis* cedido pelo Dr. Chen).
8 – Marcador de 100pb.

Alguns vermes adultos de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* foram enviados para Dr. Chen, a fim de testar a reprodutibilidade dos resultados desde a extração do DNA, e para Dr. Taylor (Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool,

Inglaterra) para a realização de imunohistologia. Ambos obtiveram resultados negativos até agora.

Devido à dificuldade de obter antígeno de *Wolbachia*, foi extraído antígeno de *Escherichia coli* e testado contra soros de indivíduos com angiostrongilíase (CP), negativos para parasitoses (CN) e negativo para angiostrongilíase, mas positivo para outra parasitose (CE) (Figura 2).

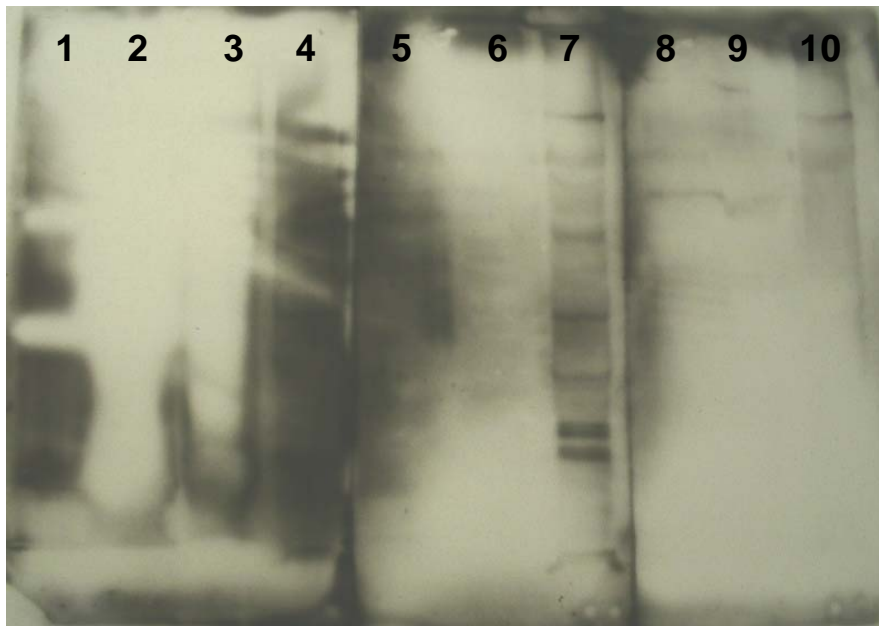


Figura 2: Imunoeletrotransferência. 1-4: CP (1: Marcador E-PAGE MagicMark (Invitrogen), 2: antígeno de *A. costaricensis*, 3: antígeno de *A. cantonensis*, 4: antígeno de *E. coli*). 5-7: CN (5: antígeno de *A. costaricensis*, 6: antígeno de *A. cantonensis*, 7: antígeno de *E. coli*). 8-10: CE (8: antígeno de *A. costaricensis*, 9: antígeno de *A. cantonensis*, 10: antígeno de *E. coli*).

Na tentativa de estudar a microbiota do verme adulto de *Angiostrongylus*, apenas uma bactéria foi encontrada nas condições do experimento. Analisando a lâmina pelo método de Gram, a bactéria foi identificada como bacilo Gram-positivo (Figura 3).

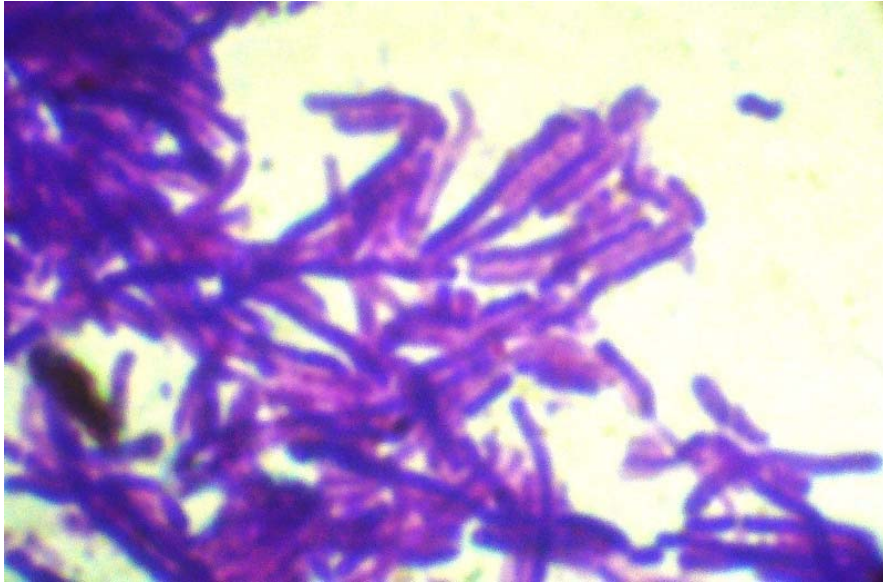


Figura 3: Bactéria gram-positiva isolada da microbiota do verme adulto de *A. cantonensis* (Coloração de Gram)

4. DISCUSSÃO

Bem estudada como endosimbionte em insetos, *Wolbachia* sp e sua interação com nematódeos, especialmente com filárias como *Wuchereria bancrofti*, atingiu grande repercussão a partir do momento em surgiu a hipótese de relação mutualística entre a bactéria e o helminto. A hipótese logo recebeu grande atenção, estabelecendo que o uso de antibióticos que eliminassem *Wolbachia* poderia matar o hospedeiro dela dependente, a filária adulta.

No caso de *A. costaricensis*, a questão relacionada a verificar a presença de *Wolbachia* sp não era quanto a possibilidade de tratamento, pois a idéia de matar os vermes adultos traz consigo a preocupação do agravamento das lesões, numa situação em que os helmintos estão localizados dentro das artérias com risco do desencadeamento de trombose. Alguns autores apresentam inclusive resultados de experimentos sugerindo que tratamento medicamentoso pode induzir a migração errática dos vermes, como outra causa de agravamento das lesões (Morera & Bontempo, 1985)

No caso de *Angiostrongylus* a idéia é verificar a possibilidade das proteínas do simbiote, presentes nos antígenos brutos usados nos testes imunoenzimáticos, serem reconhecidas pelo hospedeiro e fazer parte do repertório que origina a resposta imune humoral.

O conjunto de experimentos não demonstrou evidências consistentes da presença de *Wolbachia* em *A. costaricensis* nem em *A. cantonensis*. Além disso, na literatura não existem dados publicados mostrando essa associação nem mesmo os dados oralmente comunicados pelo Dr. Chen. A obtenção de um produto de amplificação em alguns dos experimentos poderia ser indício da presença de *Wolbachia*, porém precisam ser resolvidos os detalhes da extração e/ou do PCR para reprodutibilidade da técnica. Mesmo com a confirmação da amplificação satisfatória de um produto esperado, a certificação da presença de *Wolbachia* depende de sua visualização por imunohistologia, como foi sugerido e testado por M. Taylor, sem sucesso até o momento (experimentos em andamento, em Liverpool).

Paralelamente a pesquisa de *Wolbachia* nos vermes, a idéia era produzir antígeno desta bactéria para testar soros de pacientes com angiostrongilíase. Esta etapa não foi realizada, pois tanto na revisão da literatura quanto nos contatos com Dr. Didier Raoult (Faculté de Médecine, Marseille, France) e Dr. Chen as informações indicavam grande dificuldade de se obter antígeno por ser a *Wolbachia* um organismo intracelular exigindo co-cultivo em outras linhagens celulares. Dentre os poucos grupos que dispõe de proteínas de *Wolbachia* sp está o Grupo do Dr. Mark Taylor (Liverpool) que as tem em quantidades diminutas, não havendo possibilidade de usá-las sem antes obter dados preliminares positivos através de métodos de detecção de ácidos nucléicos.

Diante das dificuldades de fazer a identificação de *Wolbachia*, pensou-se em descrever e estudar a microbiota do verme que não deve ser muito numerosa nem muito diversa, pois o ambiente intravascular do hospedeiro deve ser pouco tolerante para a presença de bactérias. O fato de ter sido isolada apenas uma bactéria parece confirmar essa impressão.

Por ser a bactéria mais comum ao tubo digestivo de vertebrados, com alguma possibilidade de eventualmente circular no sangue mesentérico e colonizar o tubo digestivo do verme, produziu-se antígeno de *Escherichia coli*. Através de imunoeletrotransferência, verificou-se haver reatividade não associada à condição da angiostrongilíase, já que estava presente tanto em soros de indivíduos com a parasitose quanto em soros de indivíduos normais. Os pacientes que desenvolvem lesões graves como, por exemplo, aquelas decorrentes de isquemia podem apresentar quebra das defesas da barreira mucosa, infecção bacteriana secundária que pode evoluir até à sepse. Apenas as pequenas lesões isquêmicas com contaminação por E.coli já justificariam uma reatividade exacerbada nestes pacientes como foi demonstrado no experimento ilustrado na Figura 2.

De longa data, existe a recomendação que se abandonem os extratos antigênicos brutos, para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sorológico, especialmente com organismos complexos como os helmintos (Parkhouse, 1989). Por outro lado, a busca de antígenos purificados para imunodiagnóstico de helmintos é um esforço de trabalho intenso e prolongado. Por métodos cromatográficos, uma imensa carga de trabalho pode resultar em diminutas massas de antígeno purificado (Suzuki et al., 1975). Por métodos de clonagem molecular, o

rendimento do intenso esforço que necessita partir de um número grande de clones, também pode ter baixo rendimento, diante do grande número de transfecções que falham, de transfectos que não expressam adequadamente a proteína, da ausência de modificações pos-transcrição que não são possíveis em clonagem utilizando organismos procariontes (Silva A. C. A., comunicação pessoal). Desta forma, os ensaios com extratos brutos ou apenas fracionados, tais como as frações de excreção-secreção, ainda são uma opção, até que os avanços metodológicos tragam métodos de purificação de maior rendimento, como possivelmente possa ocorrer com clonagem a partir de análises proteômicas (Lynch et al., 1988; Biron et al., 2005).

A presença de parasitos em parasitos pode ser fator determinante de variabilidade de resultados em sistemas de diagnóstico molecular, tanto aqueles baseados em reação antígeno-anticorpo quanto naqueles baseados na detecção de ácidos nucléicos. No primeiro caso, objeto principal deste trabalho, a presença de endosimbiontes que sejam comuns a várias espécies de vermes pode significar a participação de um conjunto de proteínas que vão ter origem de reatividade cruzada nos testes de detecção de anticorpos. Isto seria uma segunda possibilidade ainda pouco explorada, além da clássica noção de que a reatividade cruzada em sorologia dever-se às moléculas dos vermes que são conservadas e compartilhadas por grupos taxonômicos diferentes, especialmente as moléculas estruturais (Rodero et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

1. Não foram encontradas evidências da presença de *Wolbachia* sp em *A. costaricensis* e *A. cantonensis*.
2. Foi isolado apenas um bacilo gram positivo a partir de vermes adultos de *A.cantonensis*
3. Ficou demonstrada a reatividade cruzada dos soros de indivíduos com angiostrongiliase com os antígenos de *E.coli*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini, A. A., Marcolan, A. M., Lisot, J. M. C. & Lisot, J. U. F. (1984). Angiostrongilíase abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 79 (4): 443-445.
- Alicata, J. E. & Brown, R. W. (1962). Observation on the Method of Human Infeccion with *Angiostrongylus cantonensis* in Tahiti. Canad. J. Zoo, 40: 755-760.
- Alicata, J. E. (1963). Incapability of Vertebrates to Serve as Paratenic Host for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. J.Parasitol.: 49 (5, sect. 2), 48.
- Alicata, J. E. (1964). Biology and Distibution of Rat Lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its Relationship to Eosinophilic Meningoencephalitis and Other Neurological Disorders of Man and Animals. Advances in Parasitology. 3: 223-248.
- Alicata, J. E. (1964a). Land Crabs as Prbable Paratenic Hosts for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. J. Parasitol., 50 (3, sect. 2), 39.
- Alicata, J. E. (1964b). Pigs and Calves as Carrier Hosts for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. J. Parasitol.: 50 (3, sect. 2), 39.
- Ayala, M. A. R. (1982). Angiostrongiloidíase Abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 77:189-193.
- Barbosa, H., Raick, A. N., Magalhães, A. V. & Otero, P. M. F. (1980). Angiostrongilose Abdominal. Rev. Ass. Med. Bras., 26:178-180.
- Bandi, C., Anderson T. J. C., Genchi, C., Blaxter, M. L. (1998). Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc. R. Soc. London Ser. B 265: 2407-2413.
- Bandi, C. et al. (1999). Effects of tetracycline n the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int. J. Parasitol. 29: 357-364.
- Bazzocchi, C., Ceciliani, C., McCall, J. W., Ricci, I., Genchi, C., Bandi, C.,(2000). Antigenic role of the endosymbionts of filárial nematodes: IgG response against *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilária immitis*. Proc. R. Soc. London B: Biol. Sci. 267: 2511-2517.
- Bender, A. L., Maurer, R. L., M. C. da, Ben R., Terraciano, P. B., Silva, A. C. da & Graeff-Teixeira, C. (2003) Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensively recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36 (4): 449-454.

- Bhaibulaya, M. (1991) Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis. In: Emerging problems in Food-Borne Zoonosis: Impact on agriculture and Public Health 22: 189-193.
- Biron D. G., Moura H., Marché L., Hughes A. L., Thomas F. (2005). Towards a new conceptual approach to 'parasitoproteomics'. Trends in Parasitol. 21: 162-168.
- Bosshardt, S. C. et al. (1993). Prophylactic activity of tetracycline against *Brugia pahangi* infection in jirds (*Meriones unguiculatus*). J. Parasitol. 79: 775-777.
- Casiraghi, M., Anderson, T. J. C., Bandi, C., Bazzochi, C., Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. Parasitology 122: 93-103.
- Casiraghi, M., McCall, J. W., Simoncini, L. et al. (2002). Tetracycline treatment and sex-ratio distortion: a role for *Wolbachia* in the moulting of filarial nematodes? Int. J. Parasitol. 32: 1457-1468.
- Cespedes, R., Salas, J., Mekbel, S., Troper, L., Müllner, F. & Morera, P. (1967) Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). Acta Méd. Costaric. 10 (3): 235-255.
- Chen, H. T. (1935). Un Nouveau Nematode Pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g.n.sp., des Rats de Canton. Ann. Parasitol, 13: 312-317.
- Cross, J. H. (1987). Public Health Importance of *Angiostrongylus cantonensis* it Relatives. Parasitol. Today, 3: 367-369.
- Demo, O. J. & Pessat, O. A. N. (1986) Angiostrongilosis abdominal. Primer caso human encontrado en Argentina. Prensa Médica Argentina 73: 732-738.
- Duarte, Z. Morera, P., Davila, P. Gantier J. C. (1992) *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. Ann. Parasitol Hum Comp 67: 94-96.
- Fenn, K., Blaxter, M. (2004). Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? Trends in Ecology and Evolution 19(4): 163-166.
- Genchi, C. et al. (1998). Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria (*Wolbachia*) of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. Parasitologia 40: 247-249.
- Graeff-Teixeira, C. (1986) Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil Rio de Janeiro. 137p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Graeff-Teixeira, C., Thomé, J. W, Pinto, S. C. C, Camillo-Coura L. & Lenzi, H. L. (1989) *Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84: 65-68.

Graeff-Teixeira, C., Avila-Pires, F. D., Machado, R. C. C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1990) Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. Revista do Inst. Med. Trop. São Paulo 32: 147-150.

Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1991). Angiostrongilíase abdominal – Nova Parasitose no Sul do Brasil. Rev. AMRIGS, 35 (2): 91-98.

Graeff-Teixeira, C., Agostini, A. A. , Camillo-Coura, L. & Ferreira da Cruz, F. (1997) Seroepidemiology of abdominal angiostrongiliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. Trop. Med. Int. Health 2 (3): 254-260.

Heath, B. D. et al. (1999). Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. Curr. Biol. 9: 313-316.

Henkle-Dührsen, K. et al. (1998). Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. Mol. Biochem. Parasitol. 96: 69-81.

Hertig, M., Wolbach, S. B. (1924). Studies on the rickettsia-like microorganisms in insects. J. Med. Res. 44, 329-374.

Hertig, M. (1936). The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. Parasitology 28, 453-486.

Hirschfeld, M. P. M. (1993) Angiostrongilíase abdominal. Laes / Haes. Ed. Mc Will Editores Incorporados Ltda. Ano XIV, Junho / Julho. n° 83.

Hoerauf, A. et al. (2000). Targeting of *Wolbachia* endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloranphenicol, macrolides and ciprofloxacin. Trop. Med. Int. Health 5: 275-279.

Ishii, A. L. (1984) Effects of temperature on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. Parasit. Res. 70: 375-379.

Kaminsky, R. G., Andrews, K. & Mor, N. R. (1987) *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Estudio preliminar. Rev. Méd. Honduras 55: 4-8.

Kozek, W. J. (1977). Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. J. Parasitol. 63: 992-1000.

- Kozek, W. J. & Figueroa, M. (1977). Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 663-678.
- Lima, L. K., Massara, C. L., Souza, D. E. C. P., Vidigal, T. D., Lenzi, H. Carvalho, O. S. (1992) Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 34 (5): 399-402.
- Lobo-Sanahuja, F., Loria-Cortes, R. e Gonzalez, G. (1987) Angiostrongilosis abdominal. Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de literatura. Bol. Méd. Hosp. Inf. 44: 4-9.
- Loria-Cortes, R. & Lobo-Sanahuja, J. F. (1980) Clinical abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 538-544.
- Lynch N. R., Wilkes L. K., Hodgen A. N., Turner K. J. (1988). Specificity of Toxocara ELISA in tropical populations. Parasite Immunology 10: 323-337.
- Maurer, R. L., Graeff-Teixeira, C., Thomé J. W., Chiaradia, L. A., Yoshimura, K. (2002) Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca; gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 44 (1): 53-54.
- McCall, J. W., Jun, J. J., Bandi, C. (1999). *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. Ital. J. Zool. 66: 7-10.
- McLaren, D. J., et al. (1975). Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69: 509-514.
- Mentz, M. B. & Graeff-Teixeira, C. (2003) Drug Trials for Tratamento of Human Angiostrongyliasis. Rev. Inst. Trop. S. Paulo 45 (4): 179-184.
- Mentz, M. B., Agostini, A. A. & Graeff-Teixeira, C. (2007) Phenantroline, lovastatin and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*. Parasitology Res. 100: 379-382.
- Min, K-T & Benzer, S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10792-10796.
- Mojon, M. (1994) Angiostrongylose humaine à *Angiostrongylus costaricensis*. Bull. Acad. Matle. Méd. 178: 645-633.
- Monge, E., Arroyo, R. & Solano, E. (1978) A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. J. Parasit. 64: 34.

Morera, P. (1970) Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. Bol. Chil. Parasit. 25: 133 –134.

Morera, P. & Ash, L. R. (1970) Investigación del huésped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). Bol. Chileno Parasit. 25: 135.

Morera, P. & Cespedes, R. (1971). Angiostrongilosis Abdominal – una nueva parasitosis humana. Acta Med. Cost. 14(3): 159- 173.

Morera, P. (1973) Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). Am. J. Trop. Med. Hyg. 22 (5): 613-621.

Morera, P., Lazo, R. Urquiza J. & Laguno, M. (1983) First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 14: 931-976.

Morera, P. & Bontempo, I. (1985). Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. Rev. Med. Hosp. Nac. Niños Costa Rica, 20 (2):165-174.

Morera, P. (1986). Angiostrongyliasis abdominal: transmisión y observaciones sobre su posible control. Control y erradicación de enfermedades infecciosas. In: Resúmenes del Simposio Internacional OMS/OPS, Séries de copublicaciones de la OPS, 1.

Morera, P. (1987) Abdominal Angiostrongyliasis. In: Baillier's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. Intestinal Helminthic Infections 2 (3): 744-753.

Morera, P., Andrews, K. L. & Rueda, D. (1988) The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. Rev. Biol. Trop. 36: 575-576.

Mota, E. M. & Lenzi, H. L. (1995) *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90 (6): 707-709.

Malek, E. A. & Cheng, T. C. (1974). Medical and economic malacology. New York, Academic Press.

Nomura, S., Lin, H. (1945). First Clinical Case of *Hemostrongylus ratti*. J. Trop. Med. Hyg., 13: 589-590.

O'Neill, S. L. et al (1997). Influential Passenger. Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction, Oxford University Press.

Parkhouse R. M. E., Harrison L. J. S. (1989). Antigens of parasitic helminthes in diagnosis, protection and pathology. Parasitology 99: S5-S19.

Pena, J. P. M., Andrade-Filho, J. S., Assis, S. C. (1995). *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. São Paulo, 37: 369-374.

Plenge-Bönig, A. et al. (1995). Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions. Parasitol. Res. 81: 66-73.

Rambo R. P., Agostini, A. A. & Graeff-Teixeira, C. (1997) Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate host from eighteen endemic foci. Mem. Ins. Oswaldo Cruz 92: 9-14.

Rao R. & Weil, G. J. (2002). In vitro effects of antibiotics on *Brugia malayi* worm survival and reproduction. J. Parasitol. 88: 605-611.

Richinitti, L. M. Z., Fonseca, N. A. & Graeff-Teixeira, C. (1999) The effect of temperature on mobility of *Angiostrongylus costaricensis* third stage larvae. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 41 (40): 225-228.

Rocha, A., Moscardini-Sobrinho, J. & Salomão, E. C. (1991). Angiostrongilíase Abdominal. Primeiro Relato de Caso Autóctone de Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 24: 265-268.

Rodero M., Chivato T., Muro A., Cuellar C. (2005). Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100: 292-301.

Rousset, R., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., Solignac, M. (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proc. R. Soc. London Ser. B 250: 91-98.

Santos, C. P. (1985) Redescricao de *Angiostrongylus (Paranstrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre *Proechimys* sp. na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongylidae), Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80: 82-83.

Silva, A. C. da, Graeff-Teixeira, C. & Zaha, A. A. (2003) Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. Rev. Inst Med Trop. São Paulo, 45 (5): 295-297.

Simon, F., Prieto, R., Morchon, R., Bazzocchi, C., Bandi, C., Genchi, C. (2003). Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariasis. Clin. Diag. Lab. Immunol. 10: 180-181.

Sironi, M. et al. (1995). Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74: 223-227.

Smith, H. L., Rajan, T. V. (2000). Tetracycline inhibits development of the infective stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Exp. Parasitol.* 95: 265-270.

Stewart, G. L, Ubelaker, J. E. & Curtis, D. (1985) Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 152-157.

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Luck, R. F., Werren, J. H. (1993). Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.

Stouthamer, R. et al. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 71-102.

Suzuki T., Sato Y., Yamashita T., Sekikawa H., Otsuru M. (1975). *Angiostrongylus cantonensis*: preparation of a specific antigen using immunoadsorbent columns. *Exp. Parasitol.* 38: 191-201.

Taylor, M. J., Bilo, K., Cross, H. F., Archer, J. P., Underwood, A. P. (1999). 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. *Exp. Parasitol.* 1: 356-361.

Taylor, M. J. & Hoerauf, A. (1999). *Wolbachia* Bacteria of Filarial Nematodes. *Parasitology Today* 15 (11): 437-443.

Tesh, R. B., Ackerman, L. J., Dietz, W. H. & Williams, J. A. (1973) *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 348-356.

Townson, S., Hutton, D., Siemienka, J. et al. (2000). Antibiotics and *Wolbachia* in filarial nematodes: antifilarial activity of rifampicin, oxytetracycline and chloramphenicol against *Onchocerca gutturosa*, *Onchocerca lienalis* and *Brugia pahangi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 801-816.

Ubelaker, J. E, Bullick, G. R. & Caruso, J. (1980). Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasit.* 66 (5): 856-857.

Ubelaker, J. E., Caruso, J. & Peña, A. (1981) Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis*. *J. Parasitol.* 67 (2): 219-221.

Vavre, F. et al. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1711-1723.

Vicent, A. L., Portaro, J. K. and Ash, L. R. (1975). A comparison of the body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *Brugia malayi*. J. Parasitol. 63: 567-570.

Wallace, G. D., Rosen L. (1969). Techniques for Recovering and Identifying Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. Malacologia 7: 427-438.

Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. Annu. Rev. Entomol. 42, 587-609.

Wieslaw, J. K. (2005). What is new in the Wolbachia/Dirofilária interaction? Vet. Parasitol., In press, available online.

Wilson, M. E. (1991). A World Guide to Infections: diseases, distribution, diagnosis. New York: Oxford University Press.

Yen, J. H., Barr, A. R. (1973). The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. J. Invert. Pathol. 22: 242-250.

Zanini, M. G. & Graeff-Teixeira, C. (1995) Angistrongilose abdominal: profilaxia pela destruição das larvas infectantes em alimentos tratados com sal, vinagre e hipoclorito de sódio. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 28: 389-392.

Ziliotto, J. A., Kunzle, J. E., Fernandes, L. A. R., Prates-Campos, J. C., Brito-Costa, R. (1975). Angistrongilíase: apresentação de provável caso. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 17:312-318.