

PUCRS

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Estudo das proteínas HSP70, SOD e catalase de
Angiostrongylus cantonensis em hospedeiros habituais e
acidentais**

Thaise Paím da Rosa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 320-3500 - Fax: (051) 339-1564

CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

2014

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

Dissertação de Mestrado

**Estudo das proteínas HSP70, SOD e catalase de *Angiostrongylus*
cantonensis em hospedeiros habituais e acidentais**

Thaise Paím da Rosa
Orientador: Carlos Graeff Teixeira
Co-Orientadora: Alessandra L. Morassutti

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
2014

Sumário

Relação de Figuras	V
Relação de Tabelas	VI
Lista de abreviações	VII
Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	X
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Parasitismo.....	11
1.2 Parasito.....	11
1.2.1 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12
1.2.2 Ciclo de vida.....	14
1.2.3 Angiostrongilíase cerebral.....	15
1.2.4 Distribuição.....	16
1.3 Proteínas de choque térmico.....	18
1.4 Superóxido dismutase (SOD).....	19
1.5 Catalase (CAT).....	20
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Locais de Execução.....	24
4.2 Obtenção de Material Biológico.....	24
4.3 Extração de Proteínas.....	24
4.3.1 Tampão de extração de proteínas para dosar SOD e CAT.....	24
4.3.2 Tampão de extração de proteínas para detectar HSPs.....	24

4.4 Dot Blot.....	25
4.5 Eletroforese Unidimensional.....	25
4.6 Western Blot.....	26
4.7 ELISA.....	26
4.7.1 ELISA com soro de indivíduos positivos para angiostrongilíase.....	26
4.7.2 ELISA para HSP70.....	27
4.8 Dosagem da atividade de superóxido dismutase (SOD).....	27
4.9 Gel de atividade de superóxido dismutase (SOD).....	28
4.10 Dosagem de catalase (CAT).....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Quantificação total de proteínas	29
5.2 Dot blot para HSP70.....	30
5.3 Eletroforese bidimensional com L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	31
5.4 Western blot.....	32
5.5 ELISA.....	33
5.5.1 Quantificação de HSP70 por ELISA indireto.....	33
5.5.2 Quantificação de HSP70 por ELISA sanduiche.....	33
5.5.3 Reconhecimento da ligação antígeno-anticorpo.....	34
5.6 Gel de atividade de superóxido dismutase (SOD).....	34
5.7 Determinação dos níveis de superóxido dismutase (SOD).....	35
5.8 Determinação dos níveis de catalase (CAT).....	36
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

Relação de Figuras

Figura 1- Vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	12
Figura 2- Vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> no pulmão de roedores.....	13
Figura 3- Larvas de quinto (L5) estágio de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	13
Figura 4- Ciclo de vida do <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	15
Figura 5- Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	16
Figura 6- Distribuição de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> no Brasil.....	17
Figura 7- Dot blot utilizando anticorpo anti-HSP70 onde 1- 10µg de proteínas de extrato bruto de L5 de <i>A. cantonensis</i> proveniente de ratos e 2- 10µg de proteínas de extrato bruto L5 de <i>A. cantonensis</i> proveniente de camundongos.....	30
Figura 8- Controle negativo dot blot	30
Figura 9- Gel Bidimensional com L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> provenientes de ratos.....	31
Figura 10- WB utilizando vermes adultos e L5 de <i>A. cantonensis</i> e anticorpo Anti-HSP70 1- 10µg de extrato bruto de vermes de <i>A. cantonensis</i> ; 2- 10µg extrato bruto de L5 de <i>A. cantonensis</i> provenientes de ratos; 3- 10µg extrato bruto L5 de <i>A. cantonensis</i> provenientes de camundongos.....	32
Figura 11- Gel de atividade de SOD utilizando extrato total de vermes e L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> provenientes de diferentes hospedeiros.....	34

Relação de Tabelas

Tabela 1- Concentração de proteínas totais de L5 <i>Angiostrongylus cantonensis</i> provenientes de diferentes hospedeiros.....	29
Tabela 2- Níveis de HSP70 obtidos por ELISA indireto em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> provenientes de diferentes hospedeiros.....	33
Tabela 3- Níveis de HSP70 obtidos por ELISA sanduiche em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> provenientes de diferentes hospedeiros.....	34
Tabela 4- ELISA com soro positivos para angiostrongilíase e L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> de diferentes hospedeiros.....	34
Tabela 5- Níveis de SOD em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> obtidas de camundongos.....	35
Tabela 6- Níveis de SOD em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> obtidas de ratos.....	35
Tabela 7- Níveis de catalase em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> obtidas de ratos...	36
Tabela 8- Níveis de Catalase em L5 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> obtidas de camundongos.....	36

Lista de Abreviações

SOD- Superóxido dismutase

CAT- Catalase

PBS- *Phosphate buffered saline*

ELISA- *Enzyme-linked immunosorbent assay*

SDS- Dodecilsulfato de sódio

APS- Persulfato de amônio

TEMED- Tetrametiletilenodiamina

dH₂O- Água declorada

HCL- Cloreto de hidrogênio

DTT- Ditioneitol

DAB- Diaminobenzidina

PMSF- Fenilmetilsulfonil fluoreto

EDTA- Ácido etilenodiamnotetracético

E64- N-(trans- Epoxisuccinil)- L-leucina 4- guanidinobutilamida

NBT- Azul de nitrotetrazólio

OPD- *Ortho-phenylenediamine*

Cu/ZnSOD- Cobre/zinco superóxido dismutase

FeSOD- Ferro superóxido dismutase

IgG- Imunoglobulina de classe G

HSP- *Heat shock protein*

kDa- Quilo Dalton

Na₂CO₃- Carbonato de sódio

NaHCO₃- Bicarbonato de sódio

Tris- Tris-hidroximetilaminometano

Agradecimentos

Pai, mãe, Lú e Alexandre, agradeço por todo apoio que vocês me deram, obrigada por terem me mostrado que estudar é a coisa mais importante que eu posso conseguir por mérito meu, obrigada por sempre estarem do meu lado, me mostrando que para tudo tem uma solução, e o mais importante, um motivo.

Agradeço ao professor Carlos Teixeira pela oportunidade de ter participado do grupo de biologia parasitária da PUCRS, agradeço a ele também por ter me ensinado a amar a pesquisa, pelo conhecimento intelectual construído com ele e todo o grupo, e principalmente por me ensinar a ter calma diante de situações complicadas.

Alessandra, muito obrigada por toda calma, paciência e dedicação que você teve comigo nos últimos dois anos, sem você nada teria acontecido, e vou sentir falta da tua expressão “acho que não é bem isso Thaíse”.

Ana, Pri e Rafa, muito obrigada por todo apoio que vocês me deram no início do meu estágio e depois no mestrado, aprendi muito com vocês. Ana, em especial queria te agradecer por toda força que você me deu quando meu pai esteve doente, saiba que suas palavras de carinho, seus abraços e principalmente seu exemplo foi muito importante para mim.

Meninas do laboratório, obrigada por todas as conversas e horas de terapia em grupo. Jô, obrigada por me mostrar o lado meigo das coisas, mesmo que eu não utilize esse ensinamento. Bi, obrigada por ter me ensinado as técnicas, tu e Jô são ótimas amigas e confidentes. Carla obrigada por ter me feito rir tantas vezes, e por não me deixar beber sozinha. Vanessa, você foi muito importante no final do meu mestrado, por toda ajuda que me deu, e o mais importante por ter se tornado uma pessoa muito especial para mim. Rê, Carol, Vivian, Nicole, muito obrigada por terem me mostrado que eu não sou a melhor pessoa do mundo e que eu não estou sempre certa, estive muito errada em relação a vocês, e peço desculpas, aprendi o valor de cada uma de vocês, e gostei do que aprendi, entretanto Carol e Rê, não falem tanto, pois nós a três falando não da certo.

Grupo de Fisiologia da Conservação da PUCRS, em especial Profa. Guenda, obrigada pela ajuda com meus experimentos.

Agradeço a CAPES, pelo financiamento da bolsa.

Resumo

Angiostrongylus cantonensis é um nematódeo da família Angiostrongylidae. Em humanos, podem causar meningite eosinofílica. Apesar de o parasito ter sido descrito em 1935, pouco se sabe dos mecanismos de adaptação aos seus hospedeiros. *A. cantonensis* possui moléculas que o auxilia na evasão do sistema imune do hospedeiro, dentre estas estão SOD, catalase e HSP70. O objetivo principal deste trabalho foi estudar o perfil de HSPs 70, SOD e CAT de L5 produzidas em diferentes hospedeiros e analisar o potencial diagnóstico dos extratos. Para a obtenção das larvas de quinto estágio (L5), ratos e camundongos foram infectados com 104 e 50 larvas de terceiro estágio, respectivamente, e eutanasiados após 21 dias. As L5 foram recuperadas do cérebro dos animais e homogeneizadas em diferentes tampões para obtenção dos extratos protéicos. A quantificação de proteínas totais sugere não haver diferenças significativas entre os extratos. Para a identificação de HSP70 foram realizados dot blot e Western blot, mostrando que em ambas as amostras HSP70 estavam presentes. Ensaio de ELISA foram utilizados para a quantificação de HPS70 e para analisar a ligação antígeno anticorpo com soros de indivíduos com diagnóstico confirmado para a angiostrongiliase, sendo que L5 provenientes de hospedeiros habituais apresentam reconhecimento pelos soros com títulos superiores às L5 provenientes de hospedeiros habituais. Os níveis das proteínas de estresse HSP70, SOD (339U versus 0,08U de SOD/mg de proteína) e catalase (184,4 versus 75,6 pmole de CAT mg⁻¹ proteínas) foram superiores $p < 0,05$, em larvas de *A. cantonensis* provenientes de hospedeiros habituais em comparação com as larvas obtidas de hospedeiros acidentais. Estes dados sugerem que os níveis de proteínas de estresse podem estar associados a adaptação do *A. cantonensis* aos hospedeiros habituais.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*, HSP70, catalase, SOD, meningite eosinofílica

Abstract

Study of HSP70, SOD and catalase of *Angiostrongylus cantonensis* in normal and accidental hosts

Angiostrongylus cantonensis is a nematode of the Angiostrongylidae family. In humans, they can cause eosinophilic meningitis. Although the parasite have been described in 1935, little is known about the mechanisms of adaptation to its hosts. *A. cantonensis* owns molecules that help the parasite in the evasion of the host's immune system, among these are SOD, catalase and HSP70. The main goal of this work was to study the profiles of HSP70, SOD and CAT of L5 produced in different hosts and analyze the diagnostic potential of the extracts. For the obtainment of fifth stage larvae (L5), rats and mice were infeceted with 104 and 50 third stage larvae, respectively, and euthanized after 21 days. The L5 were recovered from the brain of the animals and homogenized in different buffers to obtain the protein extracts. The quantification of the total protein suggests no significant difference between extracts. For the identification of HSP70, it was performed dot blot and Western blot, showing that in both samples HSP70 were present. ELISA assays were used for the quantification of HSP70 and analyze antigen-antibody binding with from individuals with confirmed diagnosis for angiostrongyliasis. L5 from usual hosts were recognized by the sera showing superior titles to the L5 from the accidental hosts. Levels of stress proteins HSP70, SOD (339U versus 0.08U of SOD/mg of protein) and catalase (184.4 versus 75.6 pmol of CAT mg-1 proteins) were higher $p < 0.05$, in *A. cantonensis* larvae from usual hosts in comparison to the larvae obtained from accidental hosts. These data suggest that the levels of stress proteins may be associated to the adaptation of *A. cantonensis* to the usual hosts.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*, HSP70, catalase, SOD, eosinophilic meningitis

1. Introdução

1.1 Parasitismo

O parasitismo pode ser definido segundo Rey (1991) como “Toda relação ecológica, desenvolvida entre indivíduos de espécies diferentes em que se observa além de associação íntima e duradoura uma dependência metabólica de grau variável”. Para que o parasito se estabeleça, e evolua no hospedeiro, uma série de condições precisam estar adequadas em ambos os organismos, como, o pH das secreções liberadas, a composição química, a temperatura e a resposta imunológica, não ocorrendo essas condições o processos de adaptação do parasito ao hospedeiro pode ser dificultado ou mesmo não ocorrer. Ocorrendo a interação e posterior adaptação parasito-hospedeiro, os parasitos podem ter uma sobrevivência longa em seus hospedeiros, pois parasitos possuem mecanismos de adaptação ao hospedeiro, e esses mecanismos estão baseados nas regras de adaptação ao meio ambiente, como condições de sobrevivência da espécie, entretanto, os hospedeiros também desenvolvem mecanismos de adaptação ao parasito (Ferreira, 1973).

Como mecanismos de adaptação ao hospedeiro, os parasitos podem liberar moléculas que os auxiliam na defesa do parasito contra o sistema imune do hospedeiro, dentre essas moléculas, estão enzimas antioxidantes, que protegeriam os parasitos de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas pelos hospedeiros (Dzik, 2006). Um estudo recente verificou a presença de moléculas de defesa de *A. cantonensis*, presentes em extratos somáticos (TE) e também em produtos de excreção e secreção (ES) do parasito. Além disso, outras moléculas como inibidores de proteases, glutathione transferases, peptidases, galectinas, HSP70 e HSP90, responsáveis pelo equilíbrio e homeostase também foram identificadas (Morassutti et al., 2010; 2011; 2012). Com base nesses estudos o presente trabalho busca identificar, e quantificar proteínas de estresse presentes nos parasitos obtidos de hospedeiros habituais e acidentais.

1.2 Parasito

A família Angiostrongylidae possui duas espécies de nematódeos, parasitos próprios de roedores, *Angiostrongylus cantonensis* descrito por Chen, 1935 e *Angiostrongylus costaricensis* descritos por Morera e Céspedes, 1971.

1.2.1 *Angiostrongylus cantonensis*

O nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* (Fig.1 e 2), foi descoberto em ratos domésticos provenientes do sul da China, os vermes estavam localizados nas artérias pulmonares dos ratos. O parasito está associado à meningite eosinofílica em hospedeiros acidentais, sendo que, a forma jovem adulta do verme (larvas de quinto estágio L5) (Fig.3), foi recuperada pela primeira vez no líquido cefalorraquidiano (líquor) de um homem com sintomas de meningite eosinofílica, em Taiwan no ano de 1944, (Nomura & Lin, 1945). Vermes machos medem de 14-15 mm de comprimento e, já a fêmeas medem de 24-26 mm de comprimento (Lindo, et al. 2002)

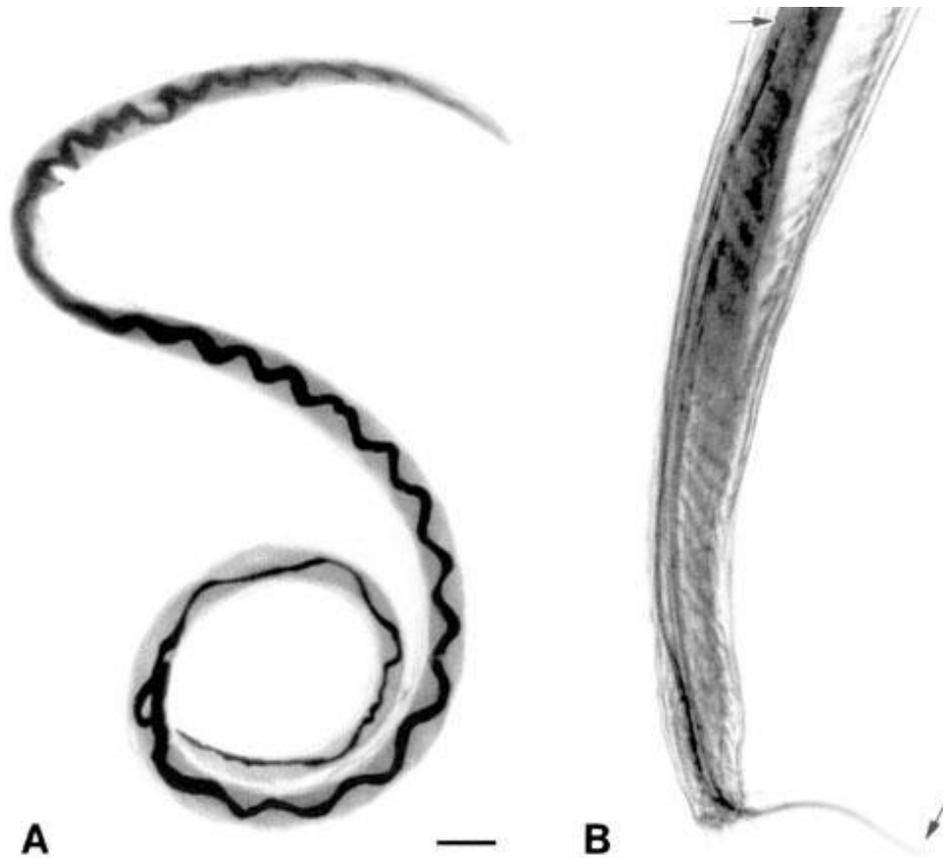


Figura 1 – Verme de *Angiostrongylus cantonensis*. A- verme fêmea com o intestino e tubo reprodutor espiralado, barra de escala 1mm; B- verme macho, mostrando em detalhe o espículo, barra de escala 85µm (Fonte: Lindo, et al. 2002).

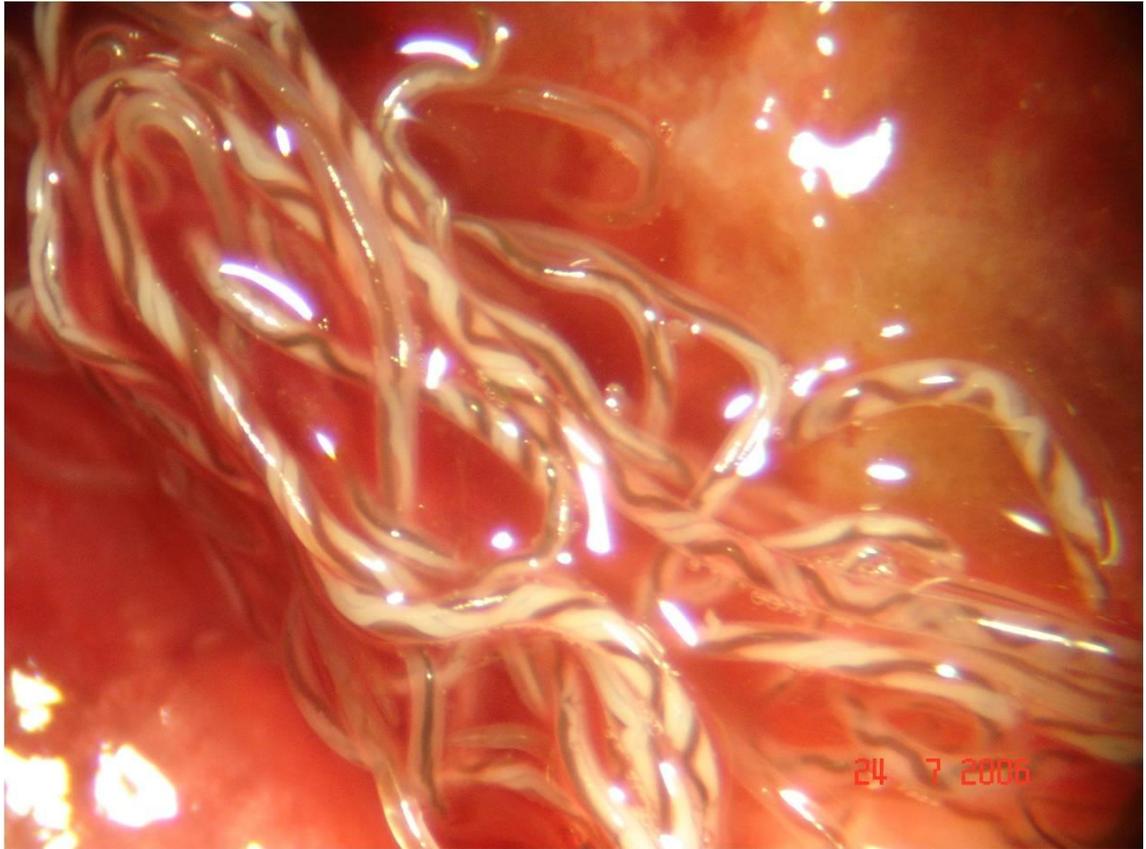


Figura 2- Vermes de *Angiostrongylus cantonensis* no pulmão de roedores, aumento de 10x
(Fonte: Grupo de Biologia Parasitária- PUCRS)

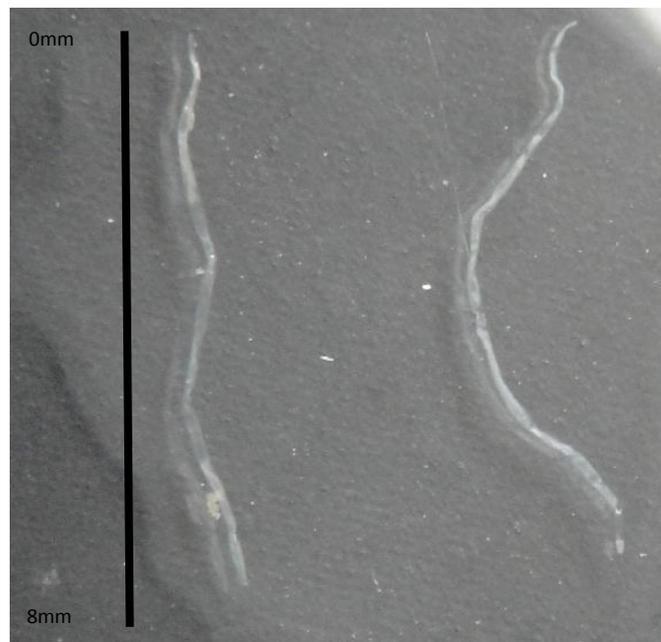


Figura 3- L5 de *Angiostrongylus. Cantonensis* (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária- PUCRS)

1.2.2 Ciclo de vida

Angiostrongylus cantonensis possui ciclo de vida heteroxênico, necessita de moluscos como hospedeiro intermediário, dentre eles caramujos *Bradybaena similares* e lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras*, e como hospedeiros definitivos roedores, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*, são os mais comumente infectados, entretanto já foram encontrados vermes adultos em cabras e porcos (Alicata 1963, 1964). O hospedeiro intermediário ingere as larvas de primeiro estágio (L1), contidas nas fezes do hospedeiro definitivo infectado. Nos moluscos, em 18 dias as larvas passam por duas mudas e tornam-se larvas de terceiro estágio (L3) infectantes ao vertebrado. Os roedores se infectam ao ingerir moluscos infectados, onde as L3 migram para o cérebro, amadurecem e migram para as artérias pulmonares onde se reproduzem liberando ovos larvados. Os ovos eclodem e liberam as L1, estas, penetram na cavidade aérea do pulmão, migram para o trato respiratório, são deglutidas e eliminadas nas fezes do hospedeiro mantendo assim o ciclo de vida do parasito. (Fig. 3).

Em hospedeiros acidentais, tal como acontece com *Mus musculus*, camundongos, o *A. cantonensis* não completa seu ciclo de vida. Ao serem ingeridas, as L3 penetram nos vasos sanguíneos do trato intestinal e são transportadas para as meninges, onde sofrem duas mudas para L4 (larvas de quarto estágio) e L5 (larvas de quinto estágio), causando uma forte reação inflamatória (Alicata, 1965; Yoshimura et al., 1994). (Fig.4).

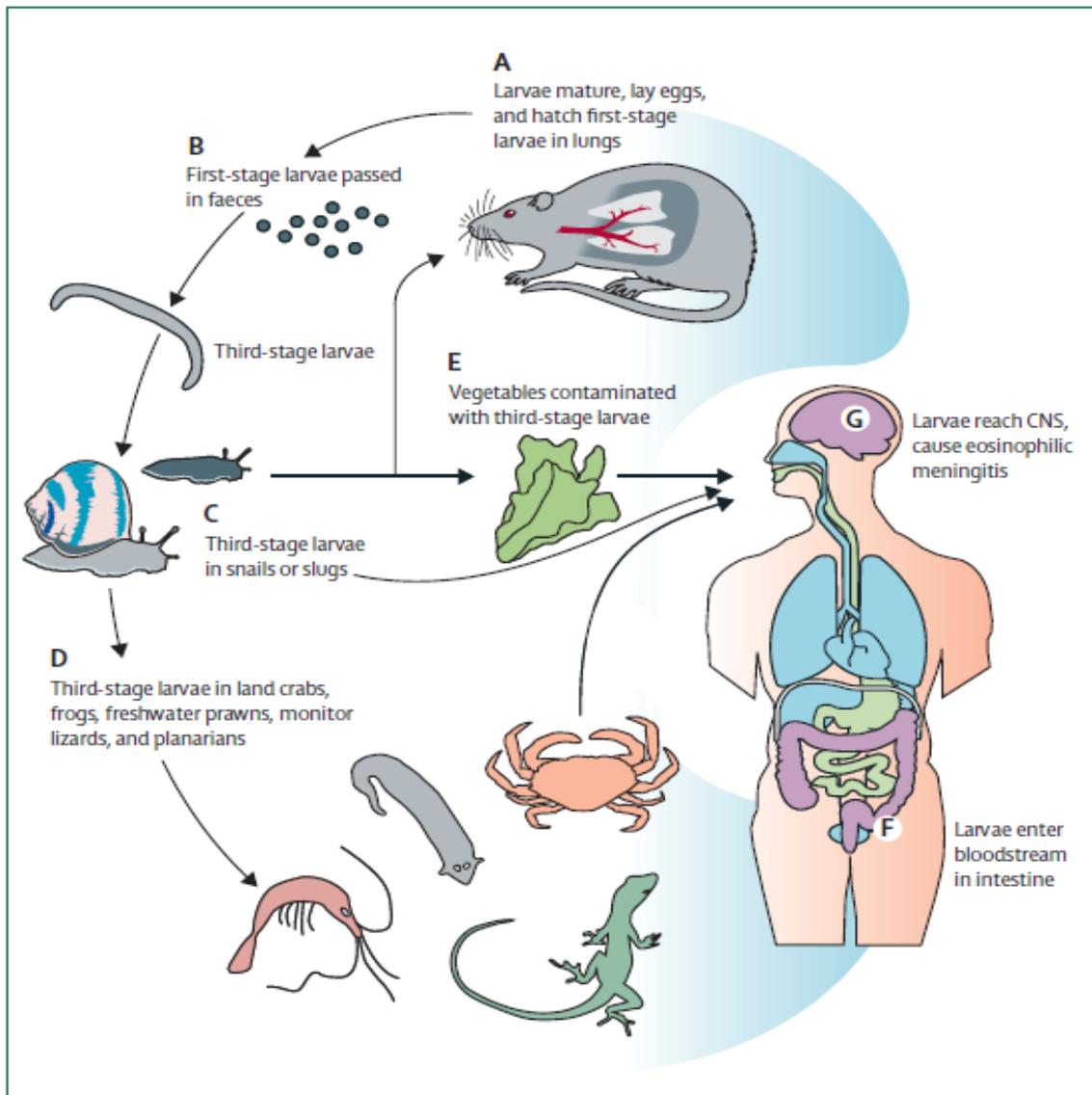


Figura 4- Ciclo de vida do *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang et.al., 2008)

1.2.3 Angiostrongilíase cerebral

Hospedeiros acidentais podem ingerir as L3 por meio de alimentos crus ou mal lavados que contenham as larvas, ou por meio da ingestão do hospedeiro intermediário infectado.

A movimentação das larvas e a reação inflamatória no hospedeiro acidental o grau da patogenia, que tem como principais sintomas: dores de cabeça (95%), rigidez do pescoço (46%), vômito (38%) e náuseas (28%) (Wang et al., 2008). Não existe até o momento tratamento anti-helmíntico específico para a infecção, e a eficácia da morte do verme ainda não foi comprovada.

1.2.4 Distribuição

A distribuição mundial do parasito vem aumentando ao longo do tempo, de acordo com um estudo feito por Wang e colaboradores (2008) mais de 2820 casos já foram relatados em diversos países (Fig.5), dentre esses casos o estudo ressalta infecções humanas descritas na Ásia (Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Hong Kong e Japão), Taiti, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné, Austrália, EUA, Cuba, Índia, Malásia, França, Egito, Sri Lanka, Camboja, Costa Rica, Alemanha, Jamaica, Itália (Wang, 2008). A distribuição mundial do parasito vem crescendo ao passar dos anos, segundo Graeff-Teixeira (2007), hospedeiros intermediários ou definitivos infectados, podem ter vindo de regiões endêmicas, por navios cargueiros, disseminando assim o parasito.

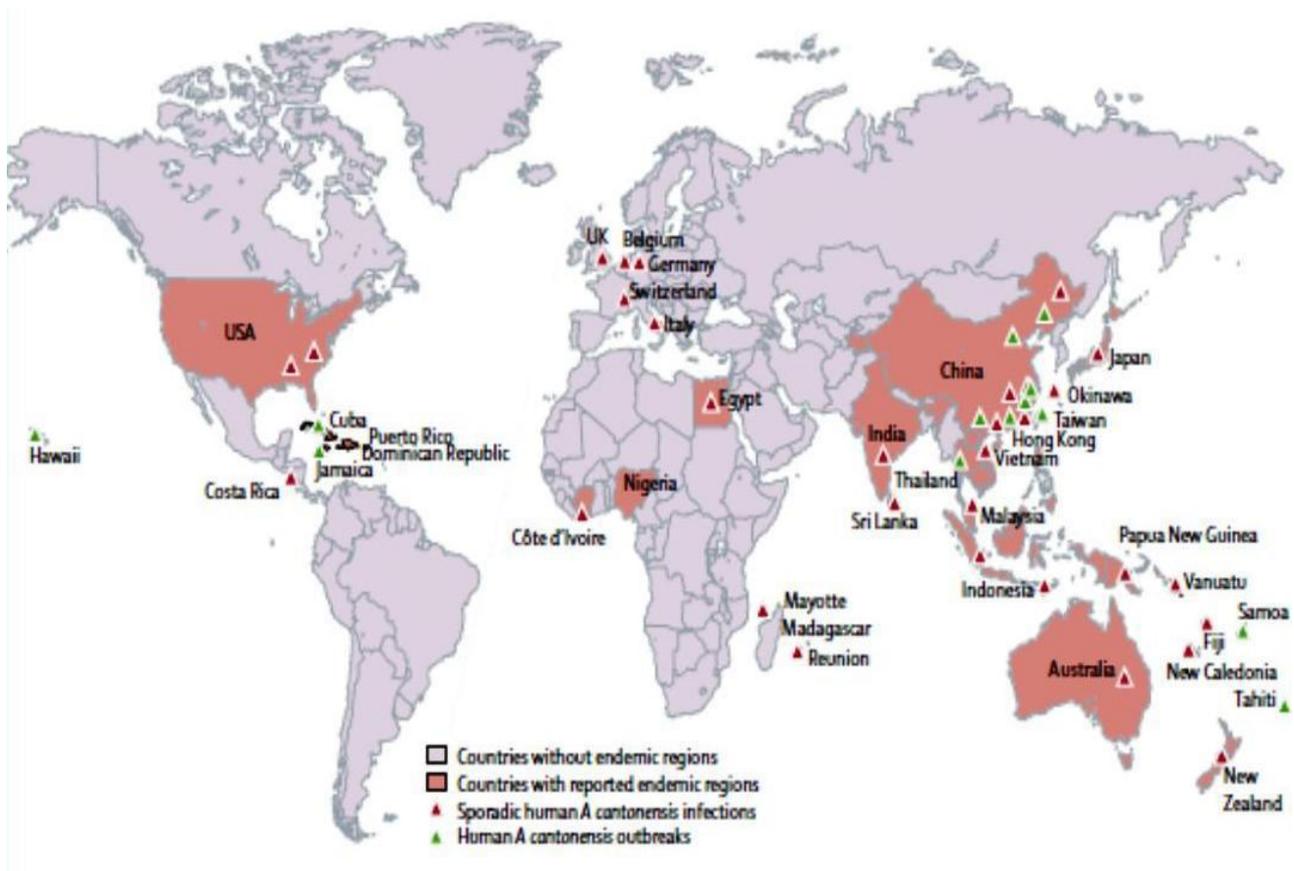


Figura 5: Distribuição mundial de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte:Wang et al., 2008)

No Brasil o primeiro relato de larvas do parasito em hospedeiros intermediários, e em humanos foi no estado do Espírito Santo por Caldeira et al. (2007), seguido de dois casos em Pernambuco (Lima et al., 2009). Diversas formas do parasito incluindo larvas, exemplares adultos e DNA já foram detectados em hospedeiros na costa brasileira (Carvalho et al., 2012), e nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Pará e Rio Grande do Sul. (Teles et al., 1997; Neuhauss et al., 2007; Simões et al., 2011; Maldonado et al., 2010; Moreira et al., 2012; Cognato et al., 2012, Thiengo et al., 2008) (Fig. 6).



Figura 6: Distribuição de *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. Pontos verde - casos de doença humana, pontos rosa- hospedeiros intermediários ou definitivos contendo o parasito. (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, 2012).

1.3 Proteínas de Choque Térmico (*heat shock proteins*- HSPs)

As HSPs foram descritas inicialmente por Ritossa em 1962, quando observou que a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* em resposta ao choque térmico e outros estressores como dinitrofenolou e salicilatos, induzia uma mudança no padrão de expressão genética e posterior síntese de uma classe de proteínas.

A expressão das HSPs é regulada por fatores de transcrição de choque térmico (do inglês *heat shock factor*, HSFs), que agem em resposta a vários estímulos, tais como mudança brusca na temperatura, estresse oxidativo, metais pesados, infecções bacterianas e virais, esses HSFs foram descobertos em vertebrados e plantas em resposta a diferentes estressores (Jäättelä & Wissing, 1992, Welch, 1993).

Em condições estressantes as células de todos os organismos respondem rapidamente através de uma transcrição e tradução de proteínas denominadas proteínas de estresse (Locke et al., 1990), essas proteínas, estão associadas principalmente a processos fundamentais de manutenção celular em diversas condições de estresse e compreendem uma classe de proteínas mais conservadas ao longo da evolução (Peetermans, 1995, Ellis & van der Vies, 1991), como o nível de identidade de aminoácidos observado entre todas as HSP70 de procariotos se aproxima de 50% (Gupta, 1998).

HSPs foram descritas inicialmente como uma classe de proteínas que era expressa apenas em condições estressantes para os organismos, entretanto estudos posteriores mostraram que essas proteínas atuam como chaperonas, auxiliando no dobramento adequado de proteínas recém-sintetizadas, essa associação ajuda a estabilizar a conformação da proteína para sua forma nativa, mantendo assim a homeostase celular (Lindquist & Craig, 1988, Craig 1993).

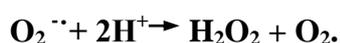
As HSPs estão agrupadas em famílias de acordo seu peso molecular: HSP-20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, E HSP100 (Jäättelä & Wissing, 1992), sendo as de peso molecular 72 kDa, 73 kDa e 90kDa, as que correspondem às classes de proteínas de estresse mais frequentemente expressas pelos organismos (Welch, 1993).

Proteínas da família HSP70 são as mais conservadas filogeneticamente (Gething & Sambrook, 1992), um estudo feito por análises de bioinformática com alinhamentos múltiplos entre aminoácidos dessa proteína em diferentes animais, sugere que existe um alto grau de similaridade entre animais geneticamente diferentes (Silva & Gabriel, 2011).

HSP70 auxiliam em uma gama de processos biológicos, incluindo o dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas, redobramento de proteínas agregadas, translocação de membrana organelar, secreção de proteínas, e no controle da atividade de regulação protéica (Bukau et al., 2000, Mayer & Bukau, 2005). Estudos mostraram que HSP70 auxiliam no redobramento de 10-20 % de todas as proteínas bacterianas (Bukau et al., 2000, Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

1.4 Superóxido Dismutase

A enzima de estresse oxidativo, superóxido dismutase (SOD) foi isolada pela primeira por Mann & Kleilin em 1938, acreditava-se que essa enzima tratava-se de uma proteína armazenadora de cobre. Entretanto em 1969 Mc Cord & Fridovich descobriram a função catalítica dessa enzima, desde então a SOD é conhecida por catalisar a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio:



As SODs foram isoladas em diversos organismos e são agrupadas de acordo com seus grupos prostéticos metálicos: Cu/Zn, Fe, Mn (Fridovich, 1974 e 1975) e cambialísticas, SODs que utilizam tanto ferro como manganês no seu sítio ativo, de acordo com a disponibilidade do metal. (Martin, 1986). Essas enzimas desempenham um papel de defesa antioxidante nos organismos, essa importância foi mostrada em um estudo com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, os dados sugerem que os radicais de oxigênio podem estar envolvidos no mecanismo normal de envelhecimento do parasito e a presença de SOD auxiliaria no retardo do envelhecimento. (Ishii, et al., 1990).

Estudos mostram que a distribuição das diferentes SODs está de acordo com o padrão evolutivo dos organismos e das organelas celulares (Bordo, et al., 1990). Como padrão Cu/Zn SOD está presente apenas em eucariotos, enquanto que a FeSOD está presente apenas em procariotos e a MnSOD, está presente tanto em procariotos quanto em eucariotos (Bannister et al., 1987).

A atividade das SODs nas células está diretamente envolvida na resposta a fatores estressores, estudos mostram que cada uma das SODs atua independentemente e são reguladas de acordo com o grau de estresse oxidativo ao qual o organismo está exposto (Bowler et al., 1992), SODs também podem estar envolvidas na adesão celular e sinalização molecular em plantas (Price, et al., 1994).

1.5 Catalase

A catalase foi uma das primeiras enzimas estudadas, em 1923, Warburg sugeriu que a catalase continha ferro, através de um estudo de observação de um complexo enzima – substrato. Posteriormente descobriu-se que a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto tóxico ao organismo, em água e oxigênio molecular (Boveris & Chance, 1973), além de evitar o acúmulo de metahemoglobina (Gaetani, et al., 1989), essa enzima também pode auxiliar os organismos a lidar com mudanças metabólicas, como a falta de nutrientes, essa hipótese foi proposta em um estudo feito com catalase citosólica de larvas de *Caenorhabditis elegans*. (Taub, et al., 1999)

Ao estudar a relação parasito-hospedeiro, estudos sugerem que a catalase pode desenvolver um papel na defesa do parasita contra o peróxido de hidrogênio produzido pelos fagócitos do hospedeiro, durante a resposta à infecção por nematódeo (Kotze & Mc Clure, 2001). Entretanto nem todos parasitos possuem níveis de catalase detectáveis, como *Trichinella spiralis* (Kazura & Meshnick, 1984), *Hymenolepis diminuta*, *Moniezia expansa* (Paul & Barrett, 1980), nesse estudo os autores propõem que uma peroxidase poderia atuar como substituta a catalase, degradando o peróxido de hidrogênio.

2. Justificativa

As HSPs estão associadas à resposta a diferentes estímulos de estresse em nematódeos. Foi mostrado, por exemplo, um estudo onde as HSP70 e HSP60 podem ter um papel citoprotetor de larvas de primeiro estágio de *Trichinella* spp. quando submetidas a uma mudança de temperatura brusca de 37 para 4°C (Martinez, et al., 2001). Além disso, em planárias *Dugesia japonica*, quando a ação de HSP 90 foi suprimida por RNA de interferência, ocasionou a diminuição de massa corporal e morte do invertebrado quando submetido a diferentes condições de estresse (Conte et al., 2011).

Um estudo demonstrou que em caracóis suscetíveis e não-suscetíveis ao helminto *Schistosoma mansoni* o estresse em resposta ao choque térmico, acarreta uma indução de HSP 70 e isso estaria associado a infecção pelo parasito *Schistosoma mansoni* (Ittiprasert, et al., 2009).

As razões pelas quais os vermes do gênero *Angiostrongylus* se desenvolvem e evoluem a vermes adultos nos hospedeiros adaptados e não atingem a fase adulta em hospedeiros não adaptados não está clara. Geiger e colaboradores, (2001) mostraram diferenças em relação à morbidade e mortalidade entre duas linhagens de animais de experimentação evidenciando divergência de respostas imunes e no padrão de citocinas em cada linhagem em animais não suscetíveis a parasitose houve um aumento de Th1 (IL-2, IFN), o que pode contribuir para patogênese e o aumento da morbidade evidenciando diferenças na suscetibilidade e resposta de cada hospedeiro. Em outro estudo foi mostrado que as microglias, células do SNC que podem regular o sistema imune cerebral, de ratos e camundongos, respondem de maneira diferente a exposição de antígenos de larvas de quarto estágio de *A. cantonensis*. Sendo que em camundongos as microglias produzem mais citocinas pró- inflamatórias que as microglias de ratos após a exposição (Wie J. et al., 2013).

Estudos sobre a relação parasito-hospedeiro mostraram que os parasitos precisam ter ao menos uma enzima antioxidante, que serve como defesa contra o metabolismo dos hospedeiros (Callahan et al., 1988). No nematódeo parasito do intestino de roedores *Heligmosomoides polygyrus*, a CAT, e a SOD, desempenham um papel protetor contra a resposta imune do hospedeiro (Ben-Smith et al., 2002).

Com base nos dados apresentados é possível inferir que, uma diferenciação entre o perfil de expressão de HSP70, SOD e CAT de *A. cantonensis* em hospedeiros adaptados e não adaptados à parasitose poderia ter um papel no desenvolvimento e

manutenção do parasito no hospedeiro habitual, *R. rattus*, e no acidental, *M. musculus*, já que estas moléculas exercerem um possível papel na proteção dos parasitos em favor de seu desenvolvimento, evadindo o sistema imune do hospedeiro. O presente estudo utilizou L5, pois este é o último estágio evolutivo presente em ambos os hospedeiros.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar proteínas relacionadas aos processos adaptativos envolvidos na relação parasito-hospedeiro em *Rattus rattus*, hospedeiro habitual, e *Mus musculus*, hospedeiro acidental.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar as HSPs 70, 90, SOD e CAT em extrato bruto de larvas de quinto estágio de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de *Rattus rattus* e em *Mus musculus*, hospedeiros habitual e acidental;
- Analisar o reconhecimento por soros de indivíduos infectados, com extratos brutos de larvas de quinto estágio de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes *Rattus rattus* e em *Mus musculus*, hospedeiros habitual e acidental;
- Analisar o perfil protéico de larvas de quinto estágio de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes *Rattus rattus* e em *Mus musculus*, hospedeiros habitual e acidental.

4. Materiais e Métodos

4.1 Local de execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS e no Laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS.

4.2 Obtenção de material biológico

A manutenção do ciclo de vida de *Angiostongylus cantonensis* no laboratório já está estabelecida. Como hospedeiros experimentais, quatro ratos machos jovens e quatro camundongos machos jovens foram infectados por gavagem com 104 L3 (ratazanas) e 50 L3 (camundongos) obtidas dos hospedeiros intermediários, *Biomphalaria glabrata*., infectados com *A. cantonensis*, os moluscos foram macerados manualmente com a ajuda de pistilo e digeridos em pepsina 0,7% e HCL 0,3%, para que ocorra a liberação das L3. O número de animais para a produção de L5 está baseado em cálculos de rendimento de extração protéica total necessários para os testes de 2D e Western blot, previamente estabelecidos por Morassutti et al., 2011; 2012. Uma vez que as L5 se localizam na região cerebral dos roedores, foi necessário realizar eutanásia para a obtenção das mesmas. Para tanto, os animais foram anestesiados por inalação com Isoflurano 5% por 2min, e eutanasiados em câmara de CO₂ com fluxo contínuo por 5min aos 21 dias após a infecção. Os animais foram mantidos de acordo com as normas brasileiras, lei 11794 de 08/10/2008, decreto 6899 de 15/07/2009, com as recomendações seguidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONEA), e com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS, resolução n° 07/2006.

4.3 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada pela maceração de L5 com nitrogênio líquido e sonicção de 3 pulsos de 15segundos com 20 de amplitude. O macerado foi homogeneizado em diferentes tampões:

4.3.1 Tampão de extração para dosagem de SOD e CAT- PBS 500µl, Triton-X100 0,05%, PMSF 5%, E64 5% e EDTA 7,5%, pH 7,4, centrifugação por 40min a 12.800xg em centrifuga refrigerada a 4°C.

4.3.2 Tampão de extração para detecção de HSPs- Uréia 7M, Tiuréia 2M, Chaps 4%, DTT 66mM/ 10mL H₂O, centrifugação por 15min a 12.800xg em temperatura ambiente.

As proteínas foram quantificadas pelo Qubit - Invitrogen, um fluorômetro que gera dados de concentração com base na relação entre três padrões utilizados na calibração.

4.4 Dot Blot

O extrato proteico de L5 de *A. cantonensis* de diferentes hospedeiros 5µg, foi aplicado diretamente sobre a membrana de nitrocelulose, este procedimento foi feito duas vezes, após a membrana foi bloqueada por 2h com PBS- Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5% em agitação. A membrana foi lavada 5x por 1min com PBS- Tween 0,05%, o anticorpo primario anti- HSP70, na concentração de 1:2000 diluído em PBS- Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5% , foi incubados sobre a membrana por 1h a temperatura ambiente sob agitação. Após a membrana foi lavada 5x por 1min, o anticorpo secundário foi aplicado, na concentração de 1:10000, sobre a membrana por 1h a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada 5x por 1 min, em seguida acrescentou-se a solução reveladora contendo Diaminobenzidina 0,5%, PBS1x 30mL e H₂O₂ 0,015%. Como controle positivo foi utilizado extrato total de vermes de *A. cantonensis*, e como controle negativo não foi adicionado amostra na membrana apenas os anticorpos.

4.5 Eletroforese Bidimensional

As amostras de L5 de *A. cantonensis* obtidas de diferentes hospedeiros na concentração de 155µg foram aplicadas à tiras de 7 cm de pH imobilizado (IPG, GE Healthcare, Piscataway, NJ) com intervalo de pH 3-10. A focalização isoeétrica foi feita com a utilização do equipamento Multiphor II (GE, USA) nas condições de 60V por 30min, 340V por 60min, 1200V por 90min e 3500V por 45min segundo Morassutti et al. ,2012.

As tiras foram equilibradas com tampão contendo glicerol 30 %, uréia 6 M, DTT 1 % e SDS 20 %, por 10 minutos a temperatura ambiente e depois com o mesmo tampão com a adição de 4 % de iodacetamida por 10 minutos para a eletroforese. Após o equilíbrio das tiras as proteínas foram separadas por eletroforese de acordo com suas massas moleculares, utilizando um gel 12% de poliacrilamida e um gel de empacotamento 5%. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (Tris base 15%,

Glicina 94%, SDS20% e dH₂O), a 75volts nos primeiros 30min e após 100 volts. Ao final da corrida, o gel foi corado com azul de Comassie onde permaneceu em banho-maria a 37 °C por 30min, após o corante foi desprezado e foi aplicada uma solução descorante (Metanol 25%, Ácido acético 7%, dH₂O)

4.6 Western Blot

As proteínas já separadas por eletroforese uni e/ou bidimensional foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência (0,25M de TRIS, 1,91M de glicina e metanol 20%), por 1h e 45min, a 100v e 40Ma.

A membrana foi bloqueada *overnight* em PBS- Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5% . Posteriormente foram repetidos os procedimentos do Dot Blot.

Soros de pacientes infectados por *A. cantonensis* foram utilizados como controles positivo e como fator de calibração.

4.7 ELISA

O método de ELISA foi realizado para detectar a concentração de proteínas HSP70 nas amostras com L5 de *A. cantonensis*, e para comparar o reconhecimento da ligação antígeno-anticorpo utilizando soros de paciente positivos para a angiostrongiliase cerebral.

4.7.1 ELISA com soro de indivíduos positivos para angiostrongiliase

As amostras contendo 1µg de extrato de L5 de *A. cantonensis* obtidas de ratos e 1µg de extrato de L5 de *A. cantonensis* obtidas de camundongos foram incubadas em tampão de revestimento (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,34%, dH₂O, pH 9,6) nos poços em duplicata *overnight* a 4°C. A placa foi lavada 3x com PBS Tween 0,05%. Soro de indivíduos positivos para a angiostrongiliase foram utilizados na titulação 1:200 utilizado no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS, em leite em pó desnatado 5%, foram incubados por 2h. Novamente a placa foi lavada 3x com PBS Tween 0,05%, e o anticorpo 2° anti-igG humano e leite em pó desnatado 5% 1:2000 foi incubado por 2h. A membrana foi lavada 3x com PBS Tween 0,05%, em seguida a solução reveladora com OPD (1mg OPD, 25mL de tampão citrato pH 5, 100µl Peróxido de Hidrogênio) foi adicionada nos poços da placa, por 15min, após a reação foi parada com HCL 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA a 492nm.

4.7.2 ELISA para dosar HSP70

O anticorpo 1° anti HSP70 e leite em pó desnatado 5% 1:2000 foi incubado com tampão de extração de proteínas específico para HSP70 *overnight* a 4°C. Após a placa foi bloqueada por 3h com a solução contendo PBS- Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5%, em seguida a placa foi lavada 3x com com PBS Tween 0,05%. As amostras contendo 5µg de extrato de L5 de *A. cantonensis* obtidas de ratos e 5µg de extrato de L5 de *A. cantonensis* obtidas de camundongos foram incubadas nos poços em triplicata por 1h a temperatura ambiente.

O anticorpo 1° anti HSP70 foi incubado por duas horas, em seguida a placa foi lavada 3x com com PBS Tween 0,05%, após o anticorpo 2° foi incubado por mais duas horas, e após a placa foi lavada 3x com com PBS Tween 0,05%, após a solução reveladora com OPD (1mg OPD, 25mL de tampão citrato pH 5, 100µl peróxido de hidrogênio) foi adicionada nos poços da placa, por 15min, após a reação foi parada com HCL 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA a 492nm.

Como controle positivo e fator de calibração foi utilizado apenas a ligação o anticorpo 1°- anticorpo 2°.

4.8 Dosagem de atividade de Superóxido Dismutase

As dosagens de SOD total foram feitas em colaboração com o Laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS, esta técnica está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina, quando ocorre a oxidação da adrenalina, um adrenocromo é formado, e este é detectado pelo espectrofotômetro em 480nm com tempo total de 35seg e intervalo de tempo de 7seg. Uma unidade de SOD equivale a quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de oxidação da adrenalina (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Após a calibração do equipamento, em uma cubeta de quartzo foi acrescentado 500 µl de tampão glicina (Glicina 1M, dH₂O 1L, pH 10), o aparelho foi zerado e foi acrescentado 8,5µl adrenalina 1mM. Para primeira leitura, foi inserido 475µl de tampão glicina + 25 µl de amostra, esta contendo 2µg de proteína, após 10seg foi adicionado 8,5µl de adrenalina 1mM. Para a segunda leitura foi inserido 487,5µl de tampão glicina + 12,5µl de amostra, esta contendo 1µg de proteína, após 10seg foi adicionado 8,5µl de adrenalina 1mM. Para a terceira leitura foi inserido 495µl de tampão glicina + 5µl de amostra, esta contendo 0,5µg de proteína, após 10seg foi adicionado 8,5µl de adrenalina 1mM. Os experimentos foram feitos em duplicata.

4.9 Gel de Atividade de Superóxido Dismutase

Os géis de atividade de SOD foram feitos utilizando 30µg totais de proteínas de L5 de *A. cantonensis*, obtidas de diferentes hospedeiros, 30µg totais de proteínas de verme adulto de *A. cantonensis* e como controle positivo foi utilizado 3µL de SOD total.

Para a observação da atividade de SOD, as amostras foram misturadas com tampão de amostra (0,25vol sacarose 80% e 0,1 vol. azul de bromofenol 0,5%), após foram aplicadas em gel empacotamento (acrilamida 2,5%, bis-acrilamida 0,625%, TEMED 7mM, Tris HCL 56mM, APS 0,5% e pH 6,8), seguido do gel separador (acrilamida 8,5%, bis-acrilamida 0,226%, TEMED 7mM, Tris HCL 235 mM, APS 0,3% e pH, 8,8) a eletroforese foi realizada a 120V, utilizando tampão de corrida contendo glicina 3,53%, Tris 0,47%, dH₂O e pH 8,5.

Ao término da eletroforese os géis foram corados, com solução de NBT 2,45 mM, por 20min sem exposição a luz, em seguida os géis foram embebidos em solução reveladora contendo K₂HPO₄ 36mM, riboflavina 5,6µM, TEMED 28mM e pH 8,0, expostos a luz incandescente, para que ocorra o aparecimento de regiões acromáticas (Beauchamp & Fridovich, 1971).

4.10 Dosagem da Catalase

As dosagens de CAT total foram feitas em colaboração com o Laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS, a técnica utilizada para a dosagem de CAT, está baseada no consumo de H₂O₂, a reação é detectada pelo espectrofotômetro em 240nm com tempo total de 56seg e intervalo de tempo de 7seg. Uma unidade de CAT decompõe 1 µmol de H₂O₂ por mg de proteína em 1 minuto. (Maehl & Chance, 1954).

Após a calibração do equipamento, foi colocado em uma cubeta de quartzo 1mL de tampão fosfato 25°C, após o aparelho foi zerado, e o tampão descartado. Em seguida 955µl de tampão fosfato foi adicionado na cubeta com 10µl da amostra, na concentração de 0,8µg/µl, após 10seg o aparelho foi zerado e o valor dado foi utilizado como basal. Após foi adicionado 35µl de H₂O₂ para iniciar a curva de leitura. Os experimentos foram feitos em duplicata.

5. Resultados

5.1 Quantificação total de proteínas

Após 21 dias de infecção os animais foram eutanasiados e as larvas L5 foram coletadas. As proteínas totais foram extraídas e o rendimento comparado entre os dois grupos. A média do rendimento de proteínas totais das L5 de *A. cantonensis* provenientes de ratos foi de 0,34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ provenientes de camundongos, a comparação das médias da concentração total de proteínas, mostrou não haver diferenças significativas ($p>0,05$). (Tab.1).

Tabela 1: Concentração de proteínas totais de L5 *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes hospedeiros

Ratos		Camundongos	
Nº L5 <i>A.cantonensis</i>	[] Total de Proteínas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Nº L5 <i>A.cantonensis</i>	[] Total de Proteínas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	0,20	1	0,21
1	0,21	1	0,26
1	0,57	1	0,89
1	0,36	1	0,36
1	0,25	1	0,30
1	0,44	1	0,56
Média da [] total de proteínas	0,34		0,43

Teste T para igualdade de médias $p>0,05$

5.2 Dot Blot para HSP70

O ensaio imunológico de dot blot utilizando 15µg de proteínas totais de extrato bruto de L5 de *A. cantonensis* proveniente de diferentes hospedeiros, mostrou haver o reconhecimento de HSP70 pelo anticorpo específico (Fig.7), 15µg de proteínas totais extrato bruto de vermes de *A. cantonensis* foram utilizados como controle positivo, e como controle negativo, foram utilizados apenas o anticorpo anti-HSP70 e o anticorpo 2º específico (Fig. 8).



Figura 7: Dot blot utilizando anticorpo anti-HSP70 onde 1- 10µg de proteínas de extrato bruto de L5 de *A. cantonensis* proveniente de ratos e 2- 10µg de proteínas de extrato bruto L5 de *A. cantonensis* proveniente de camundongos

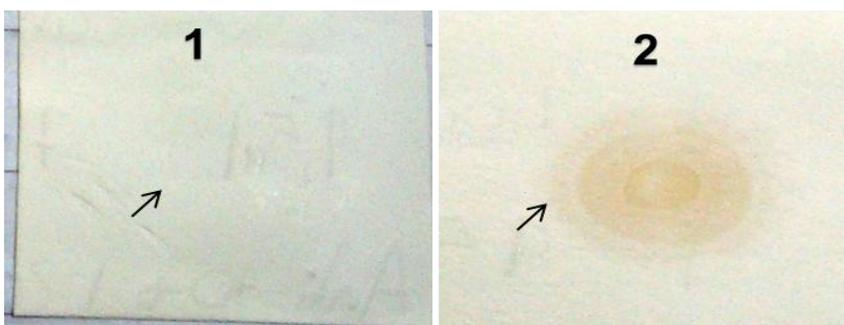


Figura 8: 1- Controle negativo, anticorpo anti-HSP70 e anticorpo 2º específico, 2- Controle positivo, extrato bruto de vermes de *A. cantonensis*

5.3 Eletroforese Bidimensional com L5 de *A. cantonensis*

A eletroforese bidimensional com 150 μ g de proteínas totais de L5 de *A. cantonensis* obtidas de ratos em tiras de pH (3-10) com voltagem total de 35.300Vh mostrou haver 14 “spots” de proteínas (Fig.9), entretanto o ensaio não pode ser realizado com L5 de *A. cantonensis* obtidas de camundongos, por falta de amostras.

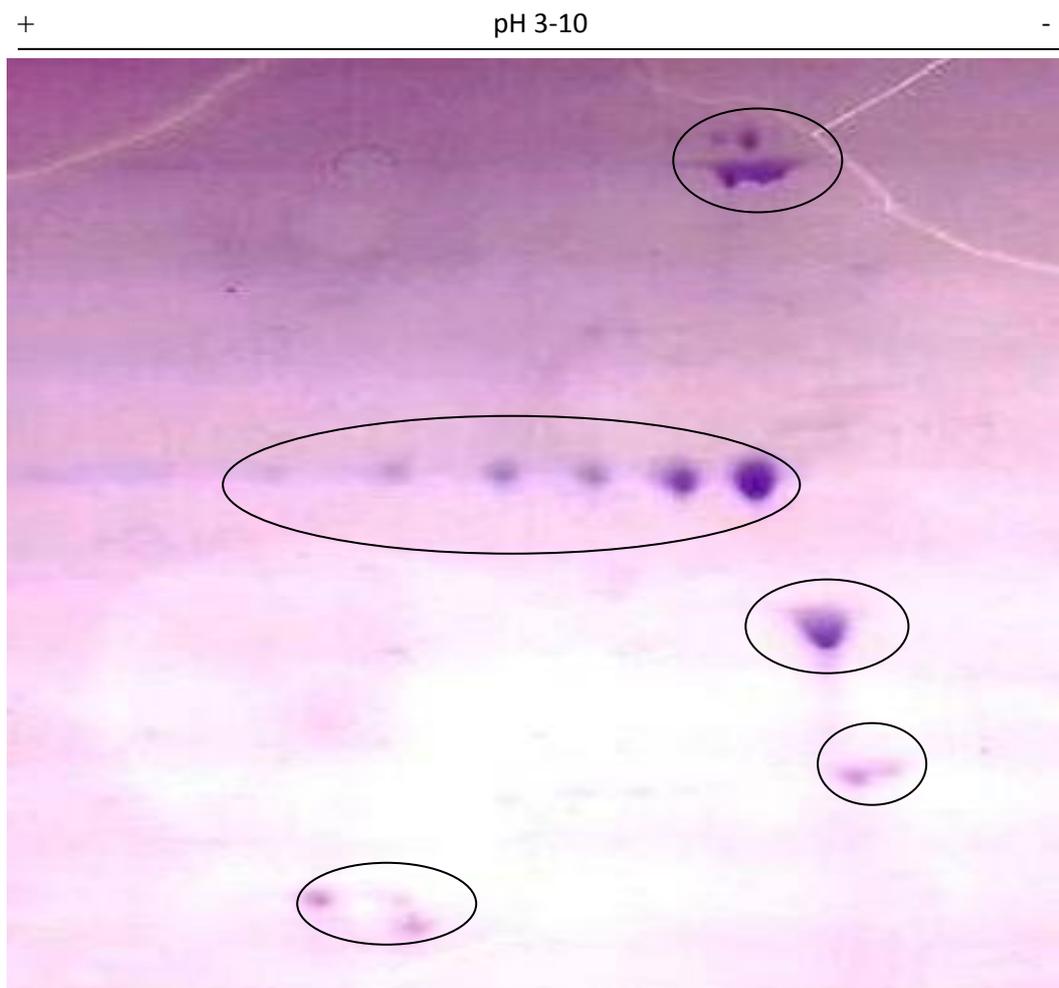


Figura 9: Gel Bidimensional com L5 de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de ratos utilizando 150 μ g de proteínas.

5.4 Western blot

Os ensaios de Western blot, utilizando o anticorpo anti- HSP70, proteínas com peso molecular de aproximadamente 70kDa. O método foi realizado com 10 μ g de proteínas totais vermes de *A. cantonensis* provenientes de diferentes hospedeiros. Como controle positivo foi utilizado 10 μ de proteínas totais de extrato de verme de *A. cantonensis*. (Fig.10)

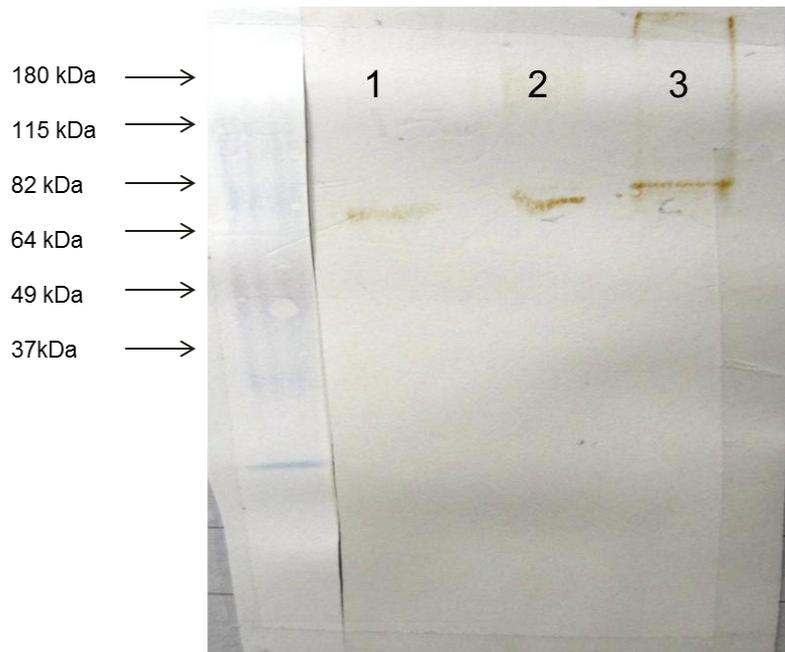


Figura 10: WB utilizando vermes adultos e L5 de *A. cantonensis* e anticorpo Anti- HSP70

1- 10 μ g de extrato bruto de vermes de *A. cantonensis*; 2- 10 μ g extrato bruto de L5 de *A. cantonensis* provenientes de ratos;

3- 10 μ g extrato bruto L5 de *A. cantonensis* provenientes de camundongos

5.5 ELISA

5.5.1 Quantificação de HSP70 por ELISA indireto

Os testes de ELISA direto utilizando 5µg, 10µg e 20µg por poço da placa, para quantificação de HSP70, não se mostraram eficazes, os valores de absorbância não puderam ser considerados, pois estavam muito próximos do controle negativo. (Tab.2).

Como controle negativo apenas o anticorpo anti-HSP70 e anticorpo 2° específico, foram utilizados.

Tabela 2: Níveis de HSP70 obtidos por ELISA indireto em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes

	5 µg/µl de proteínas	10µg/µl de proteínas	20µg/µl de proteínas
L5 <i>A.cantonensis</i> Ratos Abs	0,014	0,013	0,014
	0,011	0,015	0,01
Média das absorbâncias	0,0125	0,014	0,012
L5 <i>A.cantonensis</i> Camundongos			
Abs	0,009	0,011	0,014
	0,007	0,01	0,01
Média das absorbâncias	0,008	0,0105	0,012
Controle – 0,010			

5.5.2 Quantificação de HSP70 por ELISA sanduiche

Já que nos ensaios de ELISA direto não foi possível dosar as HSP70, foi utilizada a estratégia de ELISA sanduiche, para aumentar a sensibilidade do teste. Uma placa de ELISA previamente sensibilizada com anticorpo anti-HSP70 foi incubada com 5µg por poço de proteína total de L5 de *A.cantonensis* proveniente de ratos e camundongos. Neste ensaio foi possível verificar diferença significativa entre os níveis de HSP70, em L5 provenientes dos dois diferentes hospedeiros, sendo que nas amostras provenientes de ratos os níveis estavam aumentados quando comparadas com L5 provenientes de camundongos ($p < 0,05$). (Tab.3).

Tabela 3: Níveis de HSP70 obtidos por ELISA sanduiche em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* provenientes de diferentes hospedeiros

	L5 <i>A. cantonensis</i> (Ratos)	L5 <i>A. cantonensis</i> (Camundongos)
Abs	0,135	0,051
Abs	0,125	0,039
Abs	0,138	0,041
Média das absorbâncias	0,133	0,044
Controle - 0,030		

Teste T para igualdade de médias $p < 0,05$

5.5.3 Reconhecimento da ligação antígeno-anticorpo

Os testes de ELISA indireto com soros de indivíduos com angiostrongilíase confirmada utilizando 1 μ g por poço de proteína total de L5 *A. cantonensis* proveniente de ratos e camundongos, mostrou haver diferença significativa entre as amostras, sendo que as amostras de L5 provenientes de ratos apresentaram reconhecimento pelos soros com títulos superiores às L5 provenientes de camundongos. (Tab.4).

Tabela 4: ELISA com soro de indivíduos com angiostrongilíase confirmada e L5 de *Angiostrongylus cantonensis* de diferentes hospedeiros

	L5 de <i>A. cantonensis</i> (Ratos)	L5 de <i>A. cantonensis</i> (Camundongos)
Soro positivo	0,139	0,024
	0,12	0,026
Média das absorbâncias	0,1295	0,025

Teste t para igualdades de médias $p < 0,05$

5.6 Gel de atividade de Superóxido Dismutase

O gel de atividade de SOD foi realizado com 30 μ g de proteínas totais de *A. cantonensis* obtidas de diferentes hospedeiros, 30 μ g de extrato total de verme de *A. cantonense*, e como controle 3 μ L de SOD total utilizado. Não foi possível ver a atividade de SOD das L5 de *A. cantonensis* dos diferentes hospedeiros, entretanto foi possível observar a atividade da enzima no extrato de verme. (Fig.11).



Figura 11: Gel de atividade de SOD. 1- 30µg de proteína de *A. cantonensis*; 2- 3µL SOD; 3- 30µg de L5 de *A. cantonensis* obtidas de camundongos; 4- 30µg de L5 de *A. cantonensis* obtidas de ratos

5.7 Determinação dos níveis de Superóxido Dismutase

Aplicando uma fórmula que leva em consideração a inclinação da reta formada com os valores de absorbância, o ponto de intersecção e a quantidade de proteína, e posteriormente um teste de correlação entre as diferentes médias em tempos distintos de dosagem de SOD nos diferentes hospedeiros, foi observada uma diferença significativa entre as amostras, onde L5 de *A. cantonensis* provenientes de ratos apresentaram níveis de SOD elevados (339U de SOD/mg de proteína) (Tab.5), em comparação ao que foi mensurado em L5 de *A. cantonensis* provenientes camundongos (0,08U de SOD/mg de proteína) (Tab.6), onde $p < 0,05$.

Tabela 5: Níveis de SOD em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* obtidas de camundongos em diferentes tempos

	7 seg	14 seg	21 seg	28 seg	35 seg
25µl	0,002	0,001	0,002	0,003	0,002
25µl	0,000	0,001	0,001	0,002	0,002
Média Abs	0,001	0,001	0,002	0,003	0,002
12,5µl	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000
12,5µl	0,007	0,006	0,007	0,007	0,006
Média Abs	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003
6,25µl	0,003	0,002	0,002	0,001	0,002
6,25µl	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
Média Abs	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002

Tabela 6: Níveis de SOD em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* obtidas de ratos em diferentes tempos

	7 seg	14 seg	21 seg	28 seg	35 seg
25µl	0,001	0,003	0,004	0,005	0,006
25µl	0,001	0,001	0,003	0,004	0,004
Média Abs	0,001	0,002	0,004	0,005	0,005
12,5µl	0,008	0,013	0,017	0,020	0,022
12,5µl	0,006	0,006	0,008	0,010	0,011
Média Abs	0,007	0,010	0,013	0,015	0,017
6,25 µl	0,001	0,003	0,003	0,005	0,006
6,25µl	0,002	0,002	0,004	0,007	0,008
Média Abs	0,002	0,003	0,004	0,006	0,007

5.8 Determinação dos níveis de Catalase

Aplicando uma fórmula que leva em consideração a inclinação da reta formada com os valores de absorbância, o ponto de intersecção e a quantidade de proteína, e posteriormente um teste de correlação entre as diferentes médias em tempos distintos de dosagem de um teste de correlação entre as diferentes médias em tempos distintos de dosagem de CAT nos diferentes hospedeiros, foi observada uma diferença significativa entre as amostras, onde L5 de *A. cantonensis* provenientes de ratos apresentaram níveis de CAT elevados (184,4pmole de CAT mg⁻¹ proteínas) (Tab.7) em comparação à L5 de *A. cantonensis* provenientes de camundongos (75,6pmole de CAT mg⁻¹ proteínas)(Tab. 8), onde p<0,05.

Tabela 7: Níveis de Catalase em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* obtidas de ratos em diferentes tempos

	7 seg	14 seg	21 seg	28 seg	35 seg	42 seg	49 seg	56 seg
	0,289	0,276	0,275	0,275	0,276	0,276	0,277	0,277
	0,28	0,28	0,278	0,278	0,278	0,277	0,277	0,278
	0,259	0,254	0,25	0,247	0,247	0,244	0,243	0,242
Média Abs	0,276	0,27	0,268	0,267	0,267	0,266	0,266	0,266

Tabela 8: Níveis de Catalase em L5 de *Angiostrongylus cantonensis* obtidas de camundongos em diferentes tempos

	7 seg	14 seg	21 seg	28 seg	35 seg	42 seg	49 seg	56 seg
	0,238	0,236	0,235	0,234	0,233	0,232	0,232	0,231
	0,263	0,262	0,261	0,261	0,261	0,26	0,26	0,26
	0,262	0,262	0,262	0,263	0,262	0,262	0,262	0,263
Média Abs	0,254	0,253	0,252	0,253	0,252	0,251	0,251	0,251

6. Discussão

A interação parasito hospedeiro envolvem muitas moléculas de defesa presentes em os ambos organismos. Estudar essas moléculas, e em especial proteínas de estresse, que podem estar potencialmente envolvidas nessa interação, pode auxiliar na compreensão do grau de adaptação do parasito a diferentes hospedeiros.

Segundo Dzik (2006) para que ocorra o parasitismo é preciso que o parasito consiga subverter o sistema imune do hospedeiro, para isso os parasitos liberam moléculas, que os auxiliam na defesa a resposta imune do hospedeiro, dentre essas moléculas estão enzimas antioxidantes (Bailey, et al., 1962, Mc Kerrow, 1989, Lo Verde, 1998, Dzik, 2006). Não se sabe o porquê a relação parasito-hospedeiro é diferente em hospedeiros próximos evolutivamente, entretanto estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de entender essa relação. Um estudo com o parasito *Angiostrongylus costaricensis*, mostrou que a infecção do verme em roedores de estirpes consangüíneas, apresentaram diferenças marcantes na mortalidade e na carga de vermes encontrados. (Ishii & Sano, 1989).

O *Angiostrongylus cantonensis*, é um parasito natural de *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*, entretanto em *Mus musculus*, roedores da mesma ordem, Rodentia, o parasito não completa seu ciclo de vida, larvas de quinto estágio são a última forma do parasito encontradas em hospedeiros acidentais. Essas larvas apresentam diferenças morfológicas e funcionais quando produzidas em diferentes hospedeiros, L5 obtidas de hospedeiros acidentais, por exemplo, apresentam tamanho corporal reduzido em comparação às L5 obtidas de hospedeiros habituais (Yang, et al., 2012). No entanto, isso parece não acarretar em perda de massa protéica, como o observado neste trabalho, onde não houve diferenças na concentração de proteínas entre as amostras (Tab.1). Além disso, também já foram observadas diferenças na resposta à infecção quando diferentes hospedeiros foram testados, como no perfil de citocinas (Geiger et al., 2001) e no dano inflamatório (Yang, et al., 2012). Porém os padrões de desenvolvimento diferentes, não são completamente entendidos.

Em hospedeiro habitual, *A. cantonensis* libera inibidores de proteases, glutathione transferases, peptidases, galectinas, HSP70 e HSP90, (Morassutti et al., 2010; 2011; 2012). Neste trabalho identificamos que em hospedeiros acidentais HSP70, SOD e CAT apresentam níveis mais baixos.

A quantificação de HSP70 por ELISA só foi possível quando agentes desnaturantes foram utilizados (Tab. 3). Esse fato pode ter ocorrido, pois, as HSP70 sendo chaperonas, poderiam estar ligadas a outras proteínas, o que acarretaria em insolubilidade (Lindquist & Craig, 1988, Craig 1993, van Eden & Young, 1996). Um novo tampão foi, portanto utilizado, a escolha desse tampão se deve ao fato de que a uréia lineariza as proteínas (Krebs & Henseleit, 1932, Luck, 1933), promovendo a separação das HSP70 das proteínas as quais estavam ligadas.

O papel protetor das HSPs ao choque térmico, em parasitos, vem sendo documentado por muitos autores. Zhang e colaboradores (2012) e Siamba, et al. (2012) mostraram aumento nos níveis de HSP70 após a exposição de *Haemonchus contortus* ao calor. Essas proteínas podem desenvolver no parasito um papel protetor, semelhante ao que desenvolvem em *Caenorhabditis elegans*, onde as HSPs são apontadas como uma estratégia molecular importante para a regulação da longevidade e a capacidade das células para detectar e responder ao estresse (Morley & Morimoto, 2004).

Devaney, e colaboradores (2005), evidenciaram o papel protetor de HSP90 em microfilárias de *Brugia pahangi*, uma vez que quando inibida sua expressão, diminuiu dramaticamente a sobrevivência dos nematódeos. Na relação parasito hospedeiro essas proteínas podem auxiliar o parasito na evasão do sistema imune, como mostrado em *Toxoplasma gondii*, onde a expressão de HSP70 foi diminuída em duas linhagens virulentas do parasito. Houve em média uma redução de 35% na recuperação dos protozoários nos camundongos, evidenciando deficiência na modulação dos fatores de resposta ao sistema imunológico (Dobbin, et al., 2002). Com base nesses estudos, e nos dados obtidos no presente trabalho é possível inferir que um aumento nos níveis de HSP70 de *A. cantonensis* em L5 produzidas em hospedeiros habituais (Tab.3) poderia estar associado na proteção do parasito à resposta imune do hospedeiro, pois as larvas conseguem evoluir a vermes adultos, o que não ocorre em hospedeiros acidentais.

Hospedeiros não adaptados a infecção por *Angiostrongylus cantonensis* podem desenvolver angiostrongilíase (Wang et al., 2008), o método de detecção dessa doença, em humanos é o teste de ELISA (Eamsobhana et al., 1997, 2009), que utiliza extratos de vermes adultos fêmeas, produzidos em ratos, o que não condiz com a infecção humana. Com intuito de aproximar o que acontece na infecção humana, antígenos provenientes de L5 produzidas em camundongos foram testados em ELISA contra soros de indivíduos infectados. Chuan-Min & Eng-Rin (1991), mostraram que ao realizar o teste de ELISA, com antígenos de vermes adultos e de L5 não houve diferenças significativas

no reconhecimento com o soro de pacientes positivos para angiostrongiliase. No presente estudo foi mostrado que a reatividade encontrada com soros de pacientes infectados com angiostrongiliase, foi superior em L5 provenientes de ratos em comparação com L5 obtidas de camundongos (Tab.4).

A dosagem das enzimas antioxidantes SOD e catalase em L5 de *A. cantonensis* obtidas de hospedeiros habituais e acidentais mostrou haver um aumento no nível de ambas enzimas em L5 de hospedeiros habituais (Tab.5,6,7 e 8). Esse aumento pode estar associado ao fato de que essas enzimas podem atuar como moléculas de adaptação do parasito ao hospedeiro, como mostrado em um estudo com o nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, onde o aumento nos níveis de SOD, catalase e glutathione peroxidase está correlacionada com a permanência do parasito no hospedeiro (Smith & Bryant, 1989).

O papel fundamental da catalase é na defesa do parasito contra o peróxido de hidrogênio produzido pelo hospedeiro durante a sua resposta à infecção (Kotze & McClure, 2001; Dzik, 2004). Smith & Bryant (1986) ao comparar a interação parasito hospedeiro em vermes *Nippostrongylus brasiliensis* que são expelidos naturalmente pelo hospedeiro, e *Nematospiroides dubius* que permanecem em seus hospedeiros, mostraram que possivelmente os radicais livres gerados pela resposta imune do hospedeiro estão envolvidos na expulsão do parasito. *Nippostrongylus brasiliensis* foi mais suscetível à danos dos radicais livres do que *Nematospiroides dubius*, os autores propõem que essa diferença pode estar relacionada a proteção enzimática contra os radicais livres de oxigênio, já que *Nematospiroides dubius* apresentou níveis superiores de catalase e SOD em comparação com *Nippostrongylus brasiliensis*. Além disso, a catalase pode representar um mecanismo geral que auxilia o organismo a lidar com as alterações metabólicas durante o estresse causado pela falta de nutrientes, como observado em *Caenorhabditis elegans* (Taub, et al., 1999).

Neste trabalho, foram observados níveis de CAT e SOD aumentados em hospedeiros habituais, evidenciando que estas enzimas devem auxiliar na evasão de radicais livres produzidos pelo hospedeiro.

7- Conclusão

Com base nos dados discutidos, e os resultados obtidos no presente trabalho é possível inferir que o aumento nos níveis de SOD, catalase e HSP70 em L5 produzidas em hospedeiros habituais, ocorre pois o *A. cantonensis* é capaz de responder às defesas imune do hospedeiro adaptado e o mesmo não ocorre no hospedeiro não adaptado. Essas moléculas podem estar envolvidos na relação parasito hospedeiro, entretanto mais estudos são necessários para a compreensão da relação do parasito *Angiostrongylus cantonensis* com seus hospedeiros.

8.Referências

- Alicata, J. E. Incompatibility of Vertebrates to Serve as Paratenic Host for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J.Parasitol.* 1963; 49 (5, sect. 2), 48.
- Alicata, J. E. Pigs and Calves as Carrier Hosts for the Infective Larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J. Parasitol.* 1964; 50 (3, sect. 2), 39.
- Alicata, J. E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv Parasitol.* 1965; 3: 223-248.
- Agostini, A., et al. Angiostrongiliase abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1984; 79 (4): 443-445.
- Bailey, V.A, Nicholson, A.J., Williams, E.J, Interaction between hosts and parasites when some host individuals are more difficult to find than others. *Journal of Theoretical Biology.* 1962; v. 3, 1–18.
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., & Rotilio, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 1987; 22(2), 111-180.
- Barrett, J., Brophy, P. M. & Hamilton, J. V. Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology* 2005; 35, 543-553.
- Ben-Smith, A. Lammas, D. A. & Behnke, J.M. Effect of oxygen radicals and differential expression of catalase and superoxide dismutase in adult *Heligmosomoides polygyrus* during primary infections in mice with differing response phenotypes. *Parasite immunology.* 2002; 119-129.
- Bordo, D., Djinovic, K., & Bolognesi, M. Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *Journal of molecular biology.* 1994; 238(3), 366-386.
- Boveris, A., & Chance, B.. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*, 134. 1973; 707-716.
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology.* 1992; 43(1), 83-116.
- Bukau, B. et al. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 2000; 101: 119–122.
- 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; v. 102, n. 7, p. 887-889.
- Callahan, H. L., R. K. Crouch. & James, E. R. Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitol. Today.* 1988; 218-225.

Carvalho, O.S. et al. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2012;. v. 107, n. 6.

Chuan-Min, Y., & Eng-Rin, C. Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid of patients with eosinophilic meningitis. *International journal for parasitology*. 1991; 21(1), 17-21.

Cognato, B. B., et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46.5 2013; 664-665.

Conte, M., et al. Expression of hsp90 mediates cytoprotective effects in the gastrodermis of planarians. *Cell Stress and Chaperones* 2011; 16:33–39. doi: 10.1007/s12192-010-0218-6.

Craig, E. A. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science*. 1993; 260:1902–1903.

Dekumyoy, P., et al. Angiostrongyliasis: analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. 2000; 31 Suppl 1:48-53.

Devaney, E. et al. Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. *International Journal for Parasitology*. 2005; v. 35, p. 627–636 doi:10.1016/j.ijpara.2005.01.007

Dobbin, C. A., Smith, N. C., & Johnson, A. M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-κB and nitric oxide. *The Journal of Immunology*. 2002; 169(2), 958-965.

Dzik J. M. Molecules released by helminth parasites involved in host 319 colonization. *Acta. Biochim*. 2006; 53, 33-64.

Eamsobhana, P. Mak, J.W., Yong, H.S. Identification of *Parastrongylus cantonensis* specific antigens for use in immunodiagnosis. *Int Med Res J*. 1997; 1: 1-5.

Eamsobhana, P. Yong, HS. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Int JI of Inf Dis*. 2009; 13: 425-431.

Ellis, R. J., & Van der Vies, S. M. Molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*. 1991; 60(1), 321-347.

Feder, M.E., Hofmann, G.E. Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol*. 1999; 61: 243–82.

- Ferdushy, T. et al. The effect of temperature and host age on the infectivity and development of *Angiostrongylus vasorum* in the slug *Arion lusitanicus*. *Parasitol. Res.* 2010; 107:147–151.
- Ferreira, L.F. O fenômeno parasitismo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4, 1973; 261-27.
- Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Advances in Enzimolog.* 1974; 41:35-91.
- Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Annu Rev. Biochem.* 1975; 44:147-159.
- Gaetani, G.F., et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 1989; v.73, p. 334-339.
- Geiger, S., et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Tropica* 2001; 80 59–68.
- Gething, M. J., & Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 1992; p.33 – 45, doi:10.1038/355033a0
- Graeff-Teixeira, C. Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil Rio de Janeiro. 1986; 137p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H. L. Angiostrongilíase abdominal – Nova Parasitose no Sul do Brasil. *Rev. AMRIGS.* 1991; 35 (2): 91-98.
- Graeff-Teixeira, C. Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2007; 101(8), 743-744.
- Gupta, R. S. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998; 62(4), 1435-1491.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002; 295: 1852–1858.
- Ittiprasert, W. et al. *Schistosoma mansoni* infection of juvenile *Biomphalaria glabrata* induces a differential stress response between resistant and susceptible snails. *Experimental Parasitology* 2009; 123 203–211.
- Ishii, A. I., & Sano, M. . Strain-dependent differences in susceptibility of mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *J Helminthol* 63.4 1989; 302-6.
- Ishii, N., et al. A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Research/DNAging* 237.3 1990; 165-171.
- Jäättelä, M. & Wissing, D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann. Med.* 1992; 24:249-58.

- Kazura, J. W., & Meshnick, S. R. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage in *Trichinella spiralis*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1984; 10(1), 1-10.
- Kotze, A. C., & McClure, S. J. *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. *International journal for parasitology*. 2001; 31(14), 1563-1571.
- Krebs, H. A. & Henseleit, K. Studies on urea formation in the animal organism. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1932; 210:33-66, 1932.
- Li, Shuting, et al. "Eosinophil chemotactic chemokine profilings of the brain from permissive and non-permissive hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*." *Parasitology research* 2013; 1-9.
- Lima, A.R.M. et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2009; v. 67, n. 4, p. 1093-1096.
- Lindo, J. F. et al. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerging infectious diseases*, 2002; 8(3).
- Lindquist, S. & Craig, E.A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1988; 22:631-77
- Locke, M., Noble E. G., Atkinson B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology*. 1990; v. 258, n. C723-C729.
- Lo Verde, P.T. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? *Parasitology Today*. 1998; v. 14, p. 284–289
- Luck, J.M. The metabolism of proteins and amino acids. *Annu. Rev. Biochem.* 1933; 1933.2:165-186.
- Maehly, Y.A.C. & Chance, B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal.* 1954; 1: 357-424.
- Maldonado, A.J et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 938-941.
- Mann, T., & Kleilin, D. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc R. Soc London* 1938; B 126:303-315.
- Martin, M. E., et al. A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261(20), 9361-9367.

- Martinez, J., et al. Stress Response to Cold in *Trichinella* Species. *Cryobiology*. 43.4 2001; 293-302.
- Mayer, M. P. & Bukau, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62 670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
- Mc Cord, J.M., Fridovich, I. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244:6049-6055
- Mc Kampotter, J.H., Parasite proteases. *Experimental Parasitology*. 1989; v. 68, 111–115.
- Meyer T. N., Silva A. L.. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1999; v.45 n.2.
- Misra, H.P.; Fridovich, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem*. 1972; 247: 6960-2.
- Morley, J. F. & Morimoto, R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular biology of the cell* 15.2. 2004; 657-664.
- Morassutti, A. et al. Detection of anti-oxidant enzymatic activities and purification of glutathione transferases from *Angiostrongylus cantonensis*. *Experimental Parasitology*. 2011; v. 127, n. 2, p. 365–369.
- Morassutti, A. et al. Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as potential diagnostic targets. *Experimental Parasitology*. 2012; v. 130, n. 1, p. 26–31.
- Morassutti, A & Graeff-Teixeira, C. Interface molecules of *Angiostrongylus cantonensis*: Their role in parasite survival and modulation of host defenses. *International Journal of Inflammation*. 2012; doi: 10.1155/2012/512097.
- Moreira, V. L. C., et al. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus* and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta tropica*. 2012;
- Neuhauss, E. et al. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (2007). 102: 49-52.
- Nomura, S. Lin, H. First Clinical Case of *Hemostrongylus ratti*. *J. Trop. Med. Hyg.* 1945; 13: 589-590.
- OuYang, L., et al. "Differences of larval development and pathological changes in permissive and nonpermissive rodent hosts for *Angiostrongylus cantonensis* infection." *Parasitology Research*. 2012; 1547-1557.

- Paul, J. M., & Barrett, J. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *International Journal for Parasitology*. 1980; 10(2), 121-124.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactive ation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1993; 27:437-496.
- Peetermans, W.E. Heat shock proteins in medicine. *Acta Clin Belg.* 1995; 50:131-6.
- Price, A. H., et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *The Plant Cell Online*. 1994; 1301-1310.
- Rey, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A. 1991; 955.
- Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962; 18,571-573.
- Selim, M. et al. The protection role of heat shock protein 70 (HSP70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation*. 2012; 8(1): 58–64.
- Shinder, et al. Mutant Cu/Zn-Superoxide Dismutase Proteins Have Altered Solubility and Interact with Heat Shock/Stress Proteins in Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:12791-12796. doi: 10.1074/jbc.M010759200
- Siamba, D. N. et al. Stress Response in Infective Larvae (L3) of the Parasitic Nematode *Haemonchus Contortus* is Accompanied by Enhanced Expression of Heat Shock Proteins (HSP 70). *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 2012; 4(4): 345-349.
- Silva, M. D. A. & Gabriel, J. E. Alinhamentos múltiplos de aminoácidos da proteína de choque térmico Hsp70 entre espécies animais por análises de bioinformática. *Estudos de Biologia* 2011; *UCP.* , v. 32/33, p. 87-91.
- Simões, R.O. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. (2011); 17: 1331-1333.
- Smith, N. C., & Bryant, C. The role of host generated free radicals in helminth infections: *Nippostrongylus brasiliensis* and *Nematospiroides dubius* compared. *International journal for parasitology*. 1986; 16(6), 617-622.
- Smith, N. C., & Bryant, C. The effect of antioxidants on the rejection of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite immunology*. 1989; 11(2), 161-167.
- Song, Z. et al. Differential proteomics analysis of female and male adults of *Angiostrongylus cantonensis*. *Experimental Parasitology* 131. 2012; 169–174.
- Taub, J. et al. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants. *Nature*. 1999; 399.6732 162-166.

Teles, H.M.S. et al. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Ver Saúde Pública*. 1997; 31: 310-312.

Wang, P. Q. et al. Human angiostrongyliasis. *The Lancet infectious diseases*. 2008; 8(10), 621-630.

Warburg, O., & Minami, S. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Journal of Molecular Medicine*. 1923; 2(17), 776-777.

Wei, J. et al. Differences in microglia activation between rats-derived cell and mice-derived cell after stimulating by soluble antigen of IV larva from *Angiostrongylus cantonensis* in vitro. *Parasitol Res*. 2013; 112:207–214 doi: 10.1007/s00436-012-3127-z.

Welch, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*. 1992; 72:1.063.81.

Yoshimura, K., Sugaya, H., & Ishida, K.. The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitology Today*. 1994; 10(6), 231-233.

Yousif, F. & Lämmler, G. The effect of some biological and physical factors on infection of *Biomphalaria glabrata* with *Angiostrongylus cantonensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1975; v. 47, n. 3, 191.

Zhang, H., et al. Characterization of heat shock protein 70 gene from *Haemonchus contortus* and its expression and promoter analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology*. 2013; p. 1 of 12. doi:10.1017/S0031182012002168