

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HEMATOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Echinostoma*
paraensei (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)**

JUBERLAN SILVA GARCIA

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HEMATOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Echinostoma
paraensei* (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)**

JUBERLAN SILVA GARCIA

Sob a Orientação do Professor

Dr. Jairo Pinheiro da Silva

Co-orientação

Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

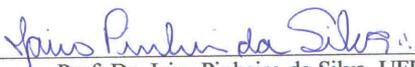
Seropédica, RJ
Dezembro, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

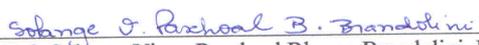
JUBERLAN SILVA GARCIA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia VETERINÁRIA, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/12/2010.



Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva, UFRRJ
(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Sólange Viana Paschoal Blanco Brandolini, UFRRJ



Prof. Dr. Luciano Antunes Barros, UFF

Aos meus pais com muita gratidão e saudade.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Jairo Pinheiro, Área de Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ, por ter aceitado me orientar e propiciado a oportunidade de subir mais um degrau na minha vida acadêmica e compartilhar seu vasto conhecimento científico. Sinto muito orgulho de telo como amigo.

-Ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ, pela motivação, orientação, apoio, conselhos, paciência nos momentos de estresse, grande amizade, disponibilidade para explicar e por estarmos juntos nessa caminhada.

- Dr. Paulo Sérgio D'Andrea, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ, pelo suporte e apoio que colaborou para concretização desse mestrado.

- A Raquel Simões pela amizade, ralação na hora da confecção dos artigos, apoio e incentivo nos momentos difíceis.

- Ao amigo André Campos Santana pelo apoio técnico nos experimentos e sua amizade.

- Ao primo Carlos Douglas por participar ativamente dos experimentos.

- A amiga Juliana Ferraz pela boa vontade e empenho durante o experimento.

- Ao amigo Sócrates por compartilhar e sempre estar pronto para os trabalhos de campo.

- A amiga Joice Gonçalves pela ajuda durante a preparação da dissertação.

- Ao amigo Rodrigo Mechas por estar sempre pronto a ajudar nos momentos difíceis.
- Ao amigo Cleber Hooper do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Unidade técnica de apoio da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo papel imprescindível na hora de realização dos testes e pelo fornecimento de parte da literatura.

- Ao amigo Danilo Lustrino por estar sempre pronto a ajudar nos momentos em que precisei.

- Aos irmãos Victor e Vínicius Tunholi pelas orientações, dicas e conclusões inteligentes sobre os dados experimentais.

- Ao Prof. Dr. Marcos Antônio José dos Santos, Área de Histologia e Embriologia, Departamento de Biologia Animal (DBA), IB, UFRRJ pelas análises histopatológicas.

- A todos os integrantes do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ, pois também de alguma forma me ajudaram, tornando menos árduas as horas difíceis, obrigado.

BIOGRAFIA

Juberlan Silva Garcia nasceu em 17 de junho de 1967, na cidade de Duque de Caxias no Estado do Rio de Janeiro, cursou o ensino médio no Instituto Nossa Senhora da Glória com término em 1985, ingressou na Marinha do Brasil em 1986 tendo permanecido até 1992. Em 1989 ingressou na Universidade para cursar de licenciatura em Ciências Biológicas finalizando em 1992, em 1993 iniciou o curso de Bacharel em Ciências Biológicas (UERJ) com ênfase em Parasitologia iniciando também estágio no Laboratório de Biologia e Controle da Esquistossomose (IOC-FIOCRUZ) desenvolvendo um trabalho de levantamento parasitológico em uma área rural do Rio de Janeiro, sendo orientado pelos Professores: Dr. Luís Rey e Dr. José Roberto Machado e Silva. Em 1995 ingressou através de concurso nas prefeituras dos municípios do Rio de Janeiro e de Belford Roxo como professor de Ciências para o ensino fundamental. No ano de 2006 ingressou na Fundação Oswaldo Cruz através de concurso público para o cargo de Tecnologista em Saúde Pública e em 2007 realizou o curso de Especialização em Malacologia de Vetores (FIOCRUZ). Atualmente, possui quatro artigos publicados em revistas indexadas, um aceito e um submetido.

Sim Senhor, tudo o que queira, mas são as palavras as que cantam as que sobem e baixam... Prosterno-me diante delas... Amo-as, uno-me a elas, persigo-as, mordo-as, derreto-as... Amo tanto as palavras... As inesperadas... As que avidamente a gente espera, espreita até que de repente caem... Vocábulo amado... Brilham como pedras coloridas, saltam como peixes de prata, são espumas, fio, metal, orvalho... Persigo algumas palavras... São tão belas que quero colocá-las todas em meu poema... Agarro-as no vôo, quando vão zumbindo, e capturo-as, limpo-as, aparo-as, preparo-me diante do prato, sinto-as cristalinas, vibrantes, ebúrneas, vegetais, oleosas, como frutas, como algas, como ágatas, como azeitonas... E então as revolvo, agito-as, bebo-as, sugo-as, trituro-as, adorno-as, liberto-as... Deixo-as como estalactites em meu poema; como pedacinhos de madeira polida, como carvão, como restos de naufrágio, presentes da onda... Tudo está na palavra... Uma idéia inteira muda porque uma palavra mudou de lugar ou porque outra se sentou como uma rainha dentro de uma frase que não a esperava e que a obedeceu... Tem sombra, transparência, peso, plumas, pêlos, têm tudo o que, se lhes foi agregando de tanto vagar pelo rio, de tanto transmigrar de pátria, de tanto ser raízes... São antiqüíssimas e recentíssimas. Vivem no féretro escondido e na flor apenas desabrochada... Que bom idioma o meu, que boa língua herdamos dos conquistadores torvos... Estes andavam a passos largos pelas tremendas cordilheiras, pelas. Américas encrespadas, buscando batatas, feijõezinhos, tabaco negro, ouro, milho, ovos fritos, com aquele apetite voraz que nunca mais, se viu no mundo... Tragavam tudo: religiões, pirâmides, tribos, idolatrias iguais às que eles traziam em suas grandes bolsas... Por onde passavam a terra ficava arrasada... Mas caíam das botas dos bárbaros, das barbas, dos elmos, das ferraduras. Como pedrinhas, as palavras luminosas que permaneceram aqui resplandecentes... O idioma. Saímos perdendo... Saímos ganhando... Levaram o ouro e nos deixaram o ouro... Levaram tudo e nos deixaram tudo... Deixaram-nos as palavras.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. As trematodíases de origem alimentar..... | 1 |
| 1.2. Equinostomíase..... | 2 |
| 1.2.1. <i>Echinostoma paraensei</i> | 2 |
| 1.3. O roedor <i>Nectomys squamipes</i> | 3 |
| 2. O Filo Platyhelminthes..... | 4 |
| 3. Ciclo de vida geral dos trematódeos digenéticos..... | 7 |
| 3.1. Ciclo biológico do <i>Echinostoma paraensei</i> | 7 |
| 3.1.2. Hospedeiros intermediários..... | 9 |
| 3.1.3. Hospedeiro definitivo..... | 9 |
| 4. Equinóstomas como modelo de estudo..... | 11 |
| 5. Parasitismo..... | 13 |
| 6. Alterações bioquímicas na relação helminto-hospedeiro definitivo (vertebrado)..... | 14 |
| 6.1. Extravazamento das enzimas das células..... | 15 |
| 6.2. Produção enzimática alterada..... | 15 |
| 6.3. Depuração das enzimas..... | 16 |
| 6.4. Enzimas de maior significado no diagnóstico das hepatopatias..... | 16 |
| 7. Alterações nos níveis de substratos séricos em hepatopatias..... | 17 |
| 7.1. Proteínas totais e frações..... | 18 |
| 7.2. Bilirrubina | 19 |
| 7.2.1. Os tipos de bilirrubina..... | 20 |
| 7.2.2. Significado diagnóstico..... | 20 |
| 8. Hematologia..... | 20 |
| 8.1. Anemia..... | 21 |
| 8.1.1. Sinais clínicos da anemia..... | 21 |
| 8.1.2. Diagnóstico laboratorial da anemia..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 8.1.3. Classificação das anemias..... | 22 |
| 8.1.3.1. Anemias regenerativas..... | 22 |
| 8.1.3.2. Anemias regenerativas hemorrágicas..... | 23 |
| 8.1.3.3. Anemias regenerativas hemolíticas..... | 23 |
| 8.1.3.4. Anemias não regenerativas..... | 24 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 25 |
| | |
| 3. CAPÍTULO I - Alterações hepáticas e histopatológicas em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) experimentalmente infectados com <i>Echinostoma paraensei</i> (Trematoda: Echinostomatidae)..... | 26 |
| RESUMO..... | 27 |
| ABSTRACT..... | 28 |
| 1. Introdução..... | 29 |
| 2. Material e métodos..... | 30 |
| 2.1. Obtenção dos parasitos e infecção experimental..... | 30 |
| 2.2. Delineamento experimental..... | 31 |
| 2.2.1. Determinação bioquímica..... | 31 |
| 2.2.2. Histopatologia..... | 32 |
| 2.3. Análise estatística..... | 32 |
| 3. Resultados..... | 33 |
| 4. Discussão..... | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |
| | |
| 4. CAPÍTULO II - Anemia na infecção aguda provocada por <i>Echinostoma paraensei</i> (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE) em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)..... | 49 |
| RESUMO..... | 50 |
| ABSTRACT..... | 51 |
| 1. Introdução..... | 52 |
| 2. Material e métodos..... | 53 |
| 2.1. Obtenção dos parasitos e infecção experimental..... | 53 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2.2. Delineamento experimental..... | 54 |
| 2.3. Análises hematológica..... | 54 |
| 2.4. Análise estatística..... | 54 |
| 3. Resultados..... | 55 |
| 4. Discussão..... | 59 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 65 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |

ANEXO I - BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL RESPONSES OF *Rattus norvegicus* (WISTAR) INFECTED BY *Echinostoma paraensei* (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)

| | |
|---|----|
| J.S. Garcia, C.S. Hooper, R.O. Simões, M.A.J. dos Santos, A. Maldonado Jr, J. Pinheiro..... | 73 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espécimes de *Nectomys squamipes*, hospedeiro definitivo natural do *Echinostoma paraensei*. Fonte: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ (LBPMR)..... 3
- Figura 2. Espécime de *Nectomys squamipes* dentro de uma armadilha do tipo tomahawk. LBPMR, IOC, FIOCRUZ..... 4
- Figura 3. Classificação dos trematódeos digenéticos, segundo Roberts e Janovy Jr. (1996)..... 6
- Figura 4. Esquema do ciclo biológico do *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967. Fonte: Maldonado Jr, Lanfredi (2009)..... 8
- Figura. 5. *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967, verme adulto corado com carmim de Best. Fonte: Maldonado Jr et al. (2001a)..... 10
- Figura 6. Alterações histológicas no fígado de *Rattus norvegicus* infectados com *Echinostoma paraensei*. A e B - Espaço porta com infiltrado mononuclear periportal, hepatócitos com discreta infiltração por polimorfonucleares nos sinusóides ligeiramente expandido. C e D - Espaço porta com estase venosa, células inflamatórias na luz do vaso. E e F - Hepatócitos com citoplasma vacuolizados, tumefeitos, núcleos picnóticos e infiltrado mononuclear perivascular, cariorrexia e cariólise. Coloração: HE. A, E e F - Barra de escala = 50µm; B e D - barra de escala = 30µm, C - barra de escala = 10µm..... 34
- Figura 7. Média dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) ao longo de 5

| | |
|--|----|
| semanas de infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)..... | 35 |
| Figura 9. Média dos níveis séricos de Fosfatase alcalina (ALKP) ao longo de 5 semanas de infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)..... | 37 |
| Figura 10. Média dos níveis séricos de Gama-glutamilttransferase (GGT) ao longo de 5 semanas de infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)..... | 38 |
| Figura 11. Média dos níveis séricos de Bilirrubina ao longo de 5 semanas de infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)..... | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Média e desvio padrão de vermes adultos (<i>Echinostoma paraensei</i>) recuperados de <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) durante cinco semanas de infecção..... | 33 |
| Tabela 2. Média e desvio padrão e variação de proteínas totais (PROT), albumina (ALB), globulina (GLOB), glicogênio (GLIC) e glicose (GLU) no soro de <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) experimentalmente infectado com <i>Echinostoma paraensei</i> | 40 |
| Tabela 3. Análises hematológicas (eritrócitos e plaquetas) – Média e desvio-padrão, de <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) experimentalmente infectados com <i>Echinostoma paraensei</i> | 56 |
| Tabela 4. Análises hematológicas (WBC) em <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) experimentalmente infectados com <i>Echinostoma paraensei</i> | 58 |

RESUMO

GARCIA, Juberlan Silva. Avaliação bioquímica, hematológica e histopatológica de ratos wistar (*Rattus norvegicus*) Infectados Experimentalmente Por *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). 2010. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2010.

O trematódeo *Echinostoma paraensei* é um parasito de intestino delgado de roedores, sendo seu hospedeiro definitivo natural *Nectomys squamipes*. No presente estudo, foram utilizadas 50 fêmeas adultas de *Rattus norvegicus* (Wistar), 35 animais infectados individualmente com 150 metacercárias de *E. paraensei* (linhagem Sumidouro) e 15 animais não infectados (controle). Semanalmente, sete animais infectados e três animais controle foram submetidos à eutanásia com CO₂. O sangue foi coletado para análise hematológica, e o soro obtido por centrifugação, para as determinações de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gamaglutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), bilirrubina, glicose, proteínas totais e frações. Fragmentos de fígado foram coletados para a determinação de glicogênio e para a análise histopatológica. Vermes adultos foram recuperados até a terceira semana de infecção, sendo o maior número de vermes recuperados na primeira semana. Os hepatócitos apresentavam-se com bordos arredondados e alguns sinais de comprometimento nuclear, infiltração por polimorfonucleares nos sinusóides, vacuolização, discreta infiltração linfoplasmocitária perivascular e periportal com poucas células mononucleares presentes na luz do ducto biliar, alguns hepatócitos estavam hipotrofiados. As análises hematológicas revelaram o desenvolvimento de uma anemia normocítica normocrômica, com anisocitose. Não foram observadas alterações significativas na série branca, havendo apenas uma leucopenia na terceira semana de infecção. Os resultados obtidos são discutidos.

Palavras chaves: *Echinostoma paraensei*, *Rattus norvegicus*, hematologia, bioquímica

ABSTRACT

GARCIA, Juberlan Silva. Biochemical, haematological and histopathological evaluation of rats (*Rattus norvegicus*) experimentally infected with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). 2010. 118p. Dissertation (Máster Degree, Veterinary Science), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2010.

The trematode *Echinostoma paraensei* parasitizes the small intestine of rodents, being its natural definitive host *Nectomys squamipes*. In spite of the great importance of echinostomatids, there are few studies on morphology, biology and physiology of *E. paraensei* and its interaction with their intermediate and definitive hosts. In the present study 50 *Rattus norvegicus* (Wistar), adult females were used, 35 were individually infected with 150 *E. paraensei* metacercariae (Sumidouro strain) and 15 were maintained uninfected, as control group. Weekly, seven infected and three uninfected rodents were euthanized using CO₂. The blood was collected to hematological analysis, and serum obtained by centrifugation and used to aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), gamma-glutamyl transferase (GGT), bilirubin, glucose, total proteins and fractions determinations. Fragments of liver were collected to glycogen determination and histopathological analysis. Adult worms were loaded until third week of infection, being the higher number of worms loaded at first week of infection. The hepatocytes had rounded edges, with signs of impaired nuclear, mild infiltration of polymorphonuclear and sinusoids slightly expanded. The hepatocytes were vacuolated with discrete perivascular and periportal lymphocytic infiltration. The serum biochemical parameters analyzed were increased at the first week of infection, varying onward. Hematological analysis revealed the development of normocytic and normochromic anaemia with anisocytic alteration. In the white blood cells, only a leukopenia was observed at the third week of infection. The present results are discussed.

Key words: *Echinostoma paraensei*, *Rattus norvegicus*, hematological, biochemical

1. INTRODUÇÃO

1.1. As trematodíases de origem alimentar

As doenças adquiridas por infecção passiva com trematódeos, através da ingestão de alimentos, têm sido relatadas em vários países do mundo e causam um complexo de diferentes patologias influenciando a economia das populações locais e constituindo-se em um problema de saúde pública. No passado essas doenças estavam restritas a populações bem definidas e determinadas por hábitos e costumes locais. Recentemente, os limites geográficos das populações em risco estão se expandindo e mudando em associação com a degradação ambiental e o aumento das rotas de comércio internacional, aumento dos deslocamentos das populações decorrentes do turismo ou comércio. A incorporação de hábitos alimentares provenientes de áreas endêmicas. Consequentemente essas infecções colocam em risco as populações de áreas urbanas em todas as classes sociais (FRIED et al., 2004).

Aproximadamente, 50 milhões de pessoas no mundo estão expostas a infecção por trematódeos (ABDUSSALAM et al., 1995). As trematodíases são endêmicas em várias partes do mundo principalmente no sudoeste da Ásia e alguns países da América Central e do Sul (DIXON; FLOHR, 1997). Cerca de 10% da população mundial está exposta ao risco de contrair uma dessas parasitoses (ABDUSSALAM et al., 1995).

Vários fatores estão ligados à transmissão dessas parasitoses (helmintoses), variáveis ecológicas e ambientais determina sua ocorrência, sendo fortemente influenciadas pela ausência de educação pública, as condições de pobreza, crescimento populacional e ineficiência de serviços de saúde pública (DIXON; FLOHR, 1997). Entretanto, existem indicações que o número de infecções esteja aumentando nos últimos anos, principalmente, pelo aumento da produção de peixes e crustáceos em locais com condições de higiene precárias e o aumento do consumo de carne crua ou mal cozida em vários locais do mundo nos últimos anos (ABDUSSALAM et al., 1995). Adicionalmente com o aumento das viagens internacionais faz com que se torne importante o conhecimento, o diagnóstico e o tratamento das trematodíases é importante em áreas que a infecção é comum (SLIKFO et al., 2000).

Aproximadamente 70 espécies de trematódeos intestinais foram relatados infectando o homem no mundo (YU; MOTT, 1994). Quase a metade dessas espécies são das famílias Heterophyidae e Echinostomatidae.

1.2. Equinostomíase

A equinostomíase humana tem sido relacionada à no mínimo 16 espécies de trematódeos intestinais. Entre os países em que o parasitismo é endêmico estão a China, Índia, Coreia, Malásia, Filipinas e Indonésia. Nas áreas endêmicas, a transmissão do parasito ocorre de forma focal e está associada a determinadas práticas sócio-econômicas e culturais. A infecção ocorre através da ingestão de moluscos, peixes, crustáceos e anfíbios crus ou mal cozidos nos quais as metacercárias se encontram encistadas (GRACZYK; FRIED, 1998). Ainda que não

tenha sido relatado nenhum caso de infecção humana, no Brasil o parasito apresenta potencial zoonótico (MALDONADO JR; LANFREDI, 2008).

1.2.1. *Echinostoma paraensei*

Echinostoma paraensei Lie & Basch, 1967 é uma espécie brasileira de echinostoma descrita através do ciclo experimental, após o encontro de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) naturalmente infectada, sendo o roedor silvestre *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) posteriormente assinalado como seu hospedeiro definitivo natural (MALDONADO JR et al., 2001a). O verme adulto, localiza-se no trato gastrointestinal (duodeno) do hospedeiro definitivo onde atinge a maturidade sexual (NOLLEN, 1996) e, eventualmente, é capaz de migrar para o ducto biliar (MALDONADO et al., 2005).

Echinostoma paraensei tem sido usado como modelo experimental, tendo como abordagem a relação parasito-hospedeiro (MALDONADO et al., 2001b). Apesar do avanço do conhecimento na área da patologia produzida pela infecção experimental (TOLEDO; FRIED, 2005), pouco é conhecido sobre as alterações bioquímicas, histopatológicas e hematológicas resultantes da infecção.

1.3. O roedor *Nectomys squamipes*

Nectomys squamipes (Figs. 1 e 2) é uma espécie de roedor pertencente à ordem *Rodentia*, subfamília Sigmodontinae. *N. squamipes* está presente nas bacias hidrográficas da Mata Atlântica, na bacia hidrográfica do Rio São Francisco e Paraná, e nas pequenas bacias independentes do Leste do Brasil, ao Sul de São Lourenço da Mata (PE), o que abrange os estados do Sul, Sudeste e parte do Nordeste (da Bahia até Pernambuco) (BONVICINO et al., 2002).

Esta espécie de roedor mede quando adulto, em média 25cm de comprimento (cabeça e corpo), e pesa entre 140 e 400g (D'ANDREA et al., 2000). É um roedor de hábitos crepusculares e semi-aquáticos, é solitário, vive próximo a rios, riachos, corpos d'água, reservatórios de água ou áreas brejosas, margens úmidas e encharcadas (EMMONS; FEERS, 1997), onde constroem seus ninhos em troncos de árvores e vegetações próximas da água (ERNEST; MARES, 1986; D'ANDREA; LAGAMBA, 1987). Como adaptação ao nado, possui membranas interdigitais desenvolvidas nas patas traseiras, além de uma espécie de “quilha” na porção ventral da cauda, formadas por pelos (ERNEST, 1986). Esta espécie é onívora, alimentando-se de frutos, sementes, artrópodes, fungos, moluscos, larvas, insetos e pequenos vertebrados (ERNEST; MARES, 1986). Devido a seus hábitos alimentares, torna-se altamente exposto à infecção.



Figura 1. Espécimes de *Nectomys squamipes*, hospedeiro definitivo natural do *Echinostoma paraensei*. Fonte: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ (LBPMR).



Figura 2. Espécime de *Nectomys squamipes* dentro de uma armadilha do tipo *tomahawk*. LBPMR, IOC, FIOCRUZ

2. O Filo Platyhelminthes

Os helmintos compõem um grupo muito heterogêneo de parasitos metazoários, incluindo três filós: Platyhelminthes, Acanthocephala e Nematoda.

Os platelmintos são caracterizados por apresentarem corpo achatado dorsoventralmente, simetria bilateral e aparelho digestório incompleto, quando presente. A superfície corporal é revestida por um tegumento de organização sincicial. Estes organismos não apresentam celoma, tendo um corpo maciço, sem cavidades e preenchido por um parênquima, por isso, as trocas gasosas e a circulação são feitas por difusão, estando estes aparelhos ausentes. A excreção destes organismos é feita por protonefrídios com células-flama e o sistema nervoso é ganglionar.

A maioria dos platelmintos é monóica, contudo existem espécies dióicas.

De acordo com Roberts e Janovy Jr. (1996), o Phylum Platyhelminthes está subdividido conforme pode ser observado na Figura 3. Porém, Gibson (2002) em sua classificação dos platelmintos elevaram a sub-classe Trematoda ao *status* de classe.

Segundo Gibson (2002), uma das classes pertencentes ao Filo Platyhelminthes é a Classe Trematoda Rudolphi, 1808. Nesta, encontram-se organismos que são parasitos de órgãos internos, primariamente de moluscos, onde se desenvolvem estádios larvais assexuados e ocasionalmente, estágios adultos sexuados, e vertebrados que albergam estágios adultos sexuados. Os adultos apresentam dois órgãos de fixação, apresentando tegumento de natureza sincicial, onde encontram-se especializações, tais como, espinhos e papilas. Aparelho digestório presente, com uma abertura oral, normalmente localizada no interior de um órgão de fixação, pré-faringe, faringe muscular e intestino composto por cecos bifurcados, os quais, geralmente, terminam em fundo cego. São hermafroditas, com raras exceções.

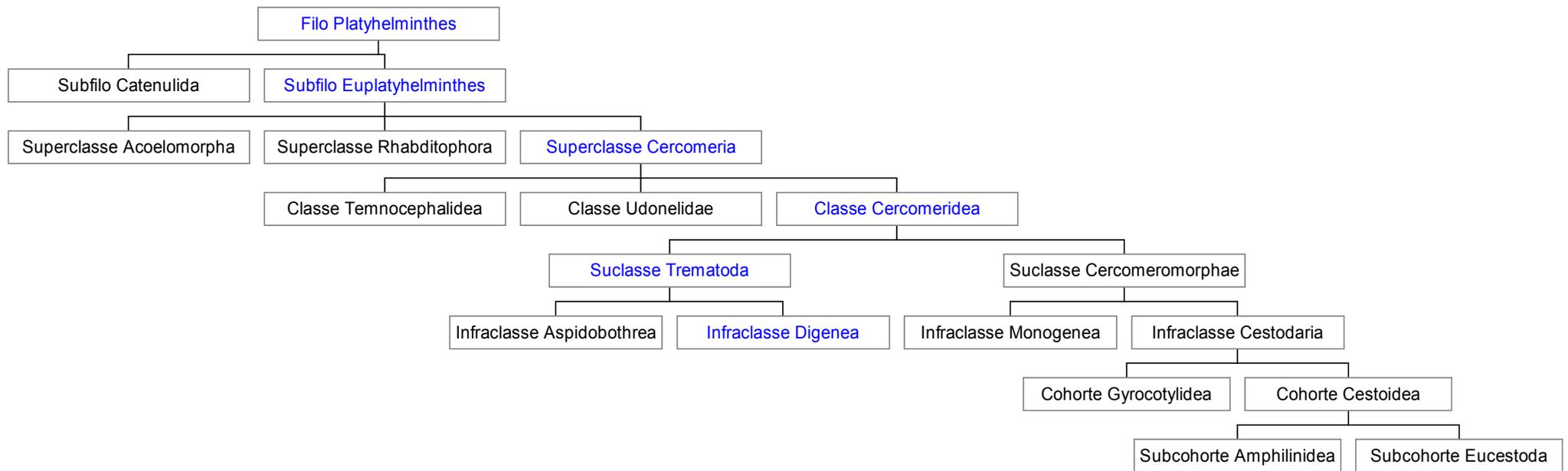


Figura 3. Classificação dos trematódeos digenéticos, segundo Roberts e Janovy Jr. (1996).

3. Ciclo de vida geral dos trematódeos digenéticos.

Os trematódeos digenéticos estão entre os vermes parasitos mais comuns e abundantes, seguindo os nematóides. Eles são parasitos de todas as classes de vertebrados e, quando adultos, podem se localizar em vários órgãos do corpo do hospedeiro vertebrado. Este grupo de helmintos é caracterizado por ter seu desenvolvimento ocorrendo em, ao menos, dois hospedeiros.

No interior do ovo do helminto desenha-se uma larva ciliada, denominada miracídio, a qual pode eclodir, e através de um padrão de transmissão ativa, deixando o ovo e nadando livremente em busca de seu primeiro hospedeiro intermediário, no qual deve penetrar para dar prosseguimento ao seu desenvolvimento, ou pode permanecer dentro do ovo, através de um processo de infecção passiva, sendo ingerido pelo hospedeiro, da mesma forma evoluindo à infecção.

O primeiro hospedeiro, ou hospedeiro intermediário, é um molusco e algumas espécies possuem um segundo, ou até mesmo um terceiro, hospedeiro intermediário em seu ciclo de vida. Neste primeiro hospedeiro, ocorrem as fases de reprodução assexuada do parasito, com a ocorrência dos estágios larvais: esporocisto, rédia e cercária. A perda de um destes estágios larvais pode ser observada em determinadas espécies de trematódeos, como o *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1908) e *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 que não apresentam rédias em seu desenvolvimento larval intramolusco.

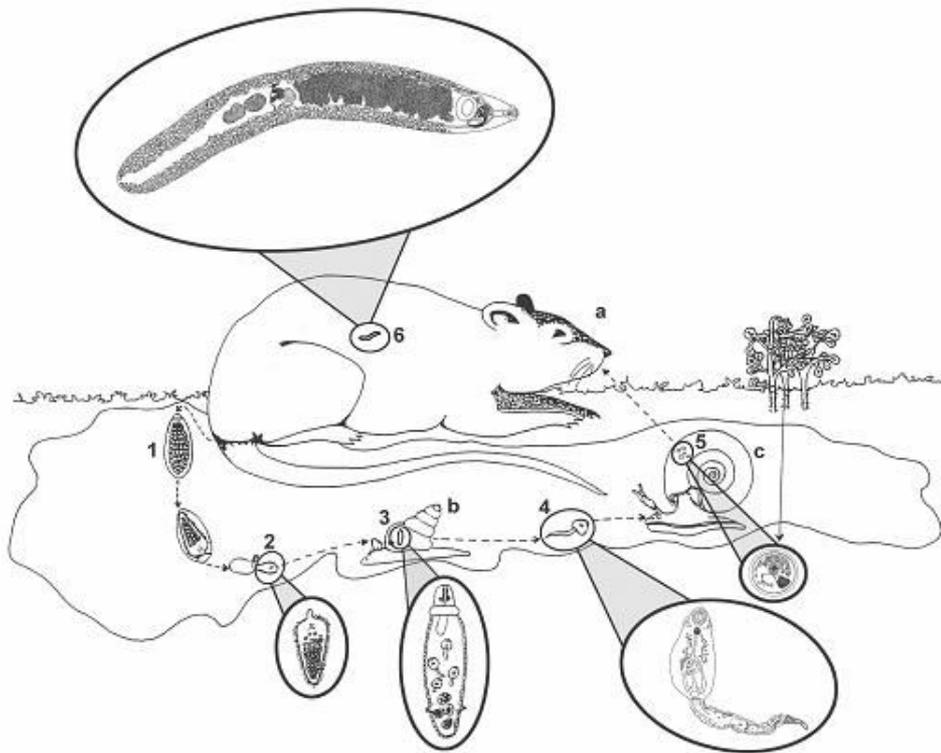
Observa-se em algumas espécies de trematódeos digenéticos, a formação de uma forma cística denominada metacercária, onde as cercárias deixam o molusco hospedeiro e encistam sobre um substrato, como rocha e vegetação, ou penetram em outro hospedeiro, que pode ser um molusco, peixe, larva de inseto.

A penetração da cercária em seu hospedeiro vertebrado, também chamado hospedeiro definitivo, ou a ingestão da metacercária pelo mesmo, permite o término do desenvolvimento do trematódeo, o qual atinge o estágio adulto, iniciando a oviposição e dando continuidade ao seu ciclo de vida.

3.1. Ciclo biológico do *Echinostoma paraensei*

O ciclo biológico natural do *Echinostoma paraensei* foi inteiramente descrito recentemente (Fig. 4). Sabe-se que *Biomphalaria glabrata* representa tanto seu primeiro como o segundo hospedeiro invertebrado, uma vez que o helminto foi isolado e descrito a partir dessa espécie naturalmente infectada. No laboratório, Lie e Basch (1967) utilizaram como hospedeiros definitivos rato, camundongo, hamster. Porém, foram Maldonado Jr et al., (2001a) que descreveram o *Nectomys squamipes* como o hospedeiro definitivo natural do *E. paraensei* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Os ovos do parasito podem ser encontrados nas fezes de hamster e de camundongo a partir de 11 dias após a ingestão das metacercárias infectantes e 14 dias em ratos (LIE; BASCH, 1967).



- 1) Ovo operculado;
- 2) Miracídio;
- 3) Rédia;
- 4) Cercária;
- 5) Metacercária;
- 6) Verme adulto.

- a) *Nectomys squamipes*;
- b) *Lymnaea columella*;
Physa marmorata;
- c) *Biomphalaria glabrata*.

Figura 4. Esquema do ciclo biológico do *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967. Fonte: Maldonado Jr, Lanfredi (2008).

3.1.2. Hospedeiros intermediários

Os ovos mantidos em água não clorada à 28°C começam a eclodir decorridos 11 dias de incubados. A eclosão ocorre preferencialmente estimulada pela luz. Os miracídios possuem fototropismo positivo e penetram ativamente nas partes moles do molusco. A penetração completa ocorre em cerca de 30 minutos.

O desenvolvimento até esporocisto geralmente ocorre dentro da cavidade pericárdica, podendo também ocorrer ao redor da aorta ou nos tecidos circunvizinhos à cavidade pulmonar. As primeiras rédias são observadas a partir do sexto dia de infecção, sendo liberadas do interior dos esporocistos, migram para vários tecidos do molusco, tendo preferência pelo ovoteste e glândula digestiva (LIE; BASCH, 1967).

As cercárias emergem do interior das rédias a partir do 25º dia de infecção e apresentam fototropismo negativo, nadam ativamente e apresentam uma expectativa de vida em torno de seis horas até encontrarem o segundo hospedeiro intermediário (outros moluscos ou anfíbios). A cercária atinge a cavidade pericárdica do molusco através do ureter, rins, (ducto ciliado renopericárdico). Seu encistamento pode ocorrer em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Physa marmorata* (Guilding, 1828) (MALDONADO Jr et al., 2001b).

3.1.3. Hospedeiro definitivo

Com a ingestão dos moluscos infectados, contendo as metacercárias, pelo hospedeiro vertebrado (um mamífero), as larvas são liberadas dos tecidos do molusco, no estômago do animal, o ambiente ácido confere o estímulo necessário para o excistamento. Após passarem pelo estômago, as metacercárias alcançam o intestino delgado, onde se alojam e alcançam a maturidade sexual, atingindo o estágio adulto (Fig. 5). Os adultos podem viver mais de cinco meses e a infecção com elevado número de metacercárias causa elevada mortalidade do animal (MALDONADO JR; LANFREDI, 2008).

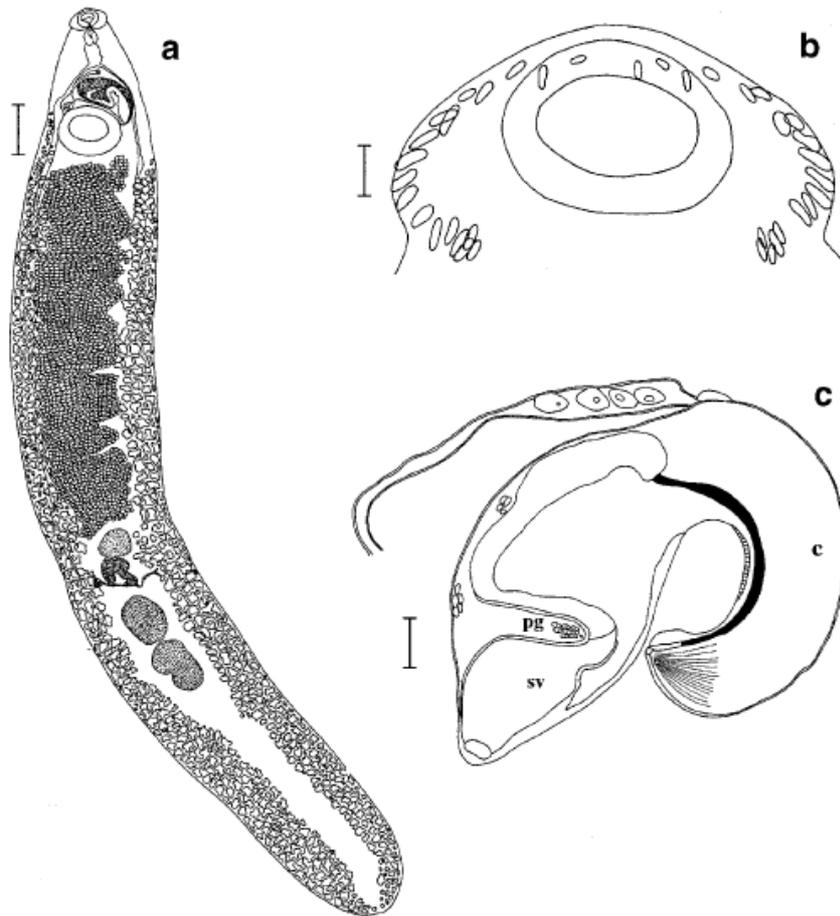


Figura. 5 - *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967, isolado do Rio de Janeiro (Barra de escala=100µm exceto para o adulto, cuja barra é igual a 1mm) a - verme adulto com 28 dias; b – colar de espinhos; c – bolsa do cirro (c) com a superfície sem espinhos, vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos. Fonte: Maldonado *et al.* (2001). Parasitol. Res. 87:840-848.

4. Equinóstomas como modelo de estudo

Os equinostomatídeos possuem extensa distribuição geográfica, infectam grande número de animais silvestres e domésticos, inclusive o homem, portanto, apresentam importância médica e veterinária (MALDONADO Jr; LANFREDI, 2008). As espécies de *Echinostoma* são fáceis de serem mantidas em condições experimentais, requer poucos equipamentos, o que resulta em custo reduzido e tem sido utilizado nos estudos da relação parasito-hospedeiro com pesquisas na área da biologia, fisiologia, bioquímica, imunologia, patologia, e estudos de biologia molecular. Além disso, a utilização desse modelo experimental pode facilitar o entendimento acerca da resistência dos hospedeiros com relação aos helmintos intestinais (TOLEDO; FRIED, 2005).

No Brasil os equinostomatídeos têm sido encontrados parasitando animais de interesse comercial tais como: porco doméstico, galinha, pato e animais de companhia (cão), além da sua ocorrência em roedores silvestres, *Nectomys squamipes* (MALDONADO JR et al., 2006) e *Akodon montensis* encontrados na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro (MALDONADO JR; LANFREDI, 2008). A ocorrência de animais silvestres, particularmente pequenos mamíferos, naturalmente infectados em áreas endêmicas, apresenta-se como um fator complicador no controle das zoonoses (NIELSEN, 1995).

Camundongos infectados com *E. caproni*, demonstraram uma elevada suscetibilidade à infecção permanecendo infectados por um período de até vinte e nove semanas (ODAIBO et al., 1989). Os camundongos infectados apresentaram atrofia nas vilosidades intestinais, erosão do tecido intestinal, hiperplasia das criptas intestinais e uma redução da atividade da fosfatase alcalina (WEINSTEIN; FRIED, 1991; FUJINO; FRIED, 1993).

Hamsters infectados com *Echinostoma caproni*, apresentaram um elevado grau de compatibilidade permanecendo infectados até vinte semanas, neste modelo se observou lesões no tecido intestinal com erosão nas vilosidades intestinais e hemorragia (ISAACSON et al., 1989).

Ratos infectados com *E. caproni* apresentaram baixa suscetibilidade à infecção e os helmintos foram expelidos até dez semanas após a infecção, onde se observou nos animais infectados eosinofilia (HANSEN et al., 1991).

Vários parâmetros imunológicos são dependentes e específicos da espécie hospedeira. Hamsters infectados com *E. caproni* apresentaram sorologia positiva entre 14 e 21 dias após a infecção, isto pode ser explicado porque os vermes adultos secretam antígenos que podem atravessar a mucosa intestinal e chegar ao sistema circulatório causando uma forte resposta inflamatória no local da infecção. Em contraste em ratos infectados também com *E. caproni* apresentaram baixos níveis séricos de antígenos (TOLEDO et al., 2004a).

Os efeitos patológicos da infecção por *E. caproni* em ratos continuam sendo estudados, mas as diferenças entre os níveis séricos de antígenos encontrados nos hamsters e nos ratos, sugerem refletir sobre a influência direta nas reações inflamatórias locais e na determinação da infecção crônica no hamster e aguda nos ratos (TOLEDO et al., 2004a).

A absorção intestinal dos antígenos de *E. caproni* poderia induzir a resposta imunológica por anticorpos devido aos estímulos das células B, resultando na resposta

humoral em hamster. Todos esses fatores tornam evidente o desenvolvimento de respostas diferentes para uma mesma espécie de parasito em relação à suscetibilidade dos hospedeiros (TOLEDO et al., 2004b).

Huffman et al (1988a) observaram em hamsters infectados com *E. revolutum* a presença de helmintos na vesícula biliar, no fígado e no ducto pancreático, aumento na concentração de bilirrubina, lesões secundárias provocadas por bactérias no fígado com presença de granuloma, fibrose e necrose biliar.

Em estudo realizado onde investigou a co-infecção por *E. revolutum* e *E. liei* em hamsters foi verificado após a infecção o aumento nas concentrações de hemoglobina e no volume corpuscular médio (VCM), (HUFFMAN et al., 1988b).

No Brasil, ovos de *Echinostoma* sp. foram encontrados em fezes obtidas de corpo humano parcialmente mumificados datadas entre 600 e 1200 anos passados (SIANTO et al., 2005). Entretanto, nenhum caso de infecção humana foi assinalado recentemente, apesar de terem sido encontrados parasitando animais de interesse comercial tais como: porco doméstico, galinha, pato e animais de companhia (cão), além de aves (LUTZ, 1924) e roedores silvestres, indicando grande potencial zoonótico (MALDONADO Jr et al., 2006; MALDONADO Jr; LANFREDI., 2008).

5. Parasitismo

O grande número e a enorme diversidade de seres vivos existentes em nosso mundo proporcionam a existência de uma infinita variedade de formas de interações entre estes seres vivos e destes com o ambiente onde se inserem. Uma das formas de interação entre os seres vivos é o **parasitismo**, cuja definição é complexa e amplamente discutida. Segundo Markell et al. (1992), “se uma definição é útil na compreensão de um processo biológico, ela é valiosa, mas ela nunca deve canalizar ou limitar as ideias de alguém”.

Thomas et al. (2000) em sua revisão sobre os prós e contras de ser parasitado, torna ainda mais polêmico e difícil definir as relações parasitárias. Segundo estes autores, a forma pela qual os parasitos reduzem a capacidade de sobrevivência de seus hospedeiros, indicando claramente que os parasitos podem ser considerados como agentes diretos de seleção. Além disso, os parasitos podem ser prejudiciais ao hospedeiro em um ambiente, entretanto benéficos em outros e sendo o parasitismo, ainda, de considerável importância para a compreensão da dinâmica de co-evolução de populações estruturadas geograficamente e que se desenvolvem sob pressões ecológicas distintas.

Segundo Graczyk e Fried (2001), o parasitismo, como uma interação entre dois organismos, hospedeiro e parasito, é exclusivamente dependente do grau de integração fisiológica entre estes organismos e a sincronia fisiológica de seus ciclos biológicos. Assim, a definição de parasitismo de Olsen (1977) nos parece adequada ao enfoque dado à relação parasitária abordada no presente trabalho. Segundo este autor, o parasitismo é aquela relação na qual o parasito é fisiologicamente dependente do hospedeiro.

Entre a infinidade de organismos parasitos em nosso mundo, os helmintos possuem adaptações fisiológicas únicas como resultado de seu hábito de vida parasitário, consequência direta de muito tempo de co-evolução com os seus hospedeiros. Trail (1980) citou uma série de formas de interações comportamentais entre parasitos e hospedeiros, onde os parasitos são capazes de induzir mudanças no comportamento do hospedeiro que resultem em economia de energia. O hospedeiro pode ser induzido a gastar menos energia nos padrões de comportamento agressivo, de corte e de reprodução, poupando esta energia

de forma que esta possa ser disponibilizada para garantir o desenvolvimento do parasito (MINCHELLA, 1980).

6. Alterações bioquímicas na relação helminto-hospedeiro definitivo (vertebrado)

O fígado desempenha várias funções vitais tais como: síntese protéica, captação, metabolismo, armazenamento e distribuição de nutrientes, transformação e excreção de metabolitos endócrinos, drogas e poluentes. Várias enzimas intracelulares são responsáveis por grande parte da atividade bioquímica em situações patológicas (lesão celular e/ou alteração na permeabilidade da membrana plasmática) quando então estas enzimas transvazam para o plasma. A enzimologia clínica (estudo das alterações na atividade sérica de enzimas clinicamente relevantes) contribui para o diagnóstico, estadiamento e acompanhamento da evolução de doenças (ANDRIOLO; BORGES, 1989).

Todas as centenas de diferentes enzimas presentes no organismo humano são biossintetizadas dentro de células, e a maioria delas executa suas funções nas próprias células onde são formadas. Contudo certas enzimas são secretadas numa forma inativa, e após um processo de ativação, exercem ação nos líquidos extracelulares. Os exemplos mais comuns desse processo são as proteases e outras hidrolases secretadas no tubo digestório, algumas das quais (por exemplo, a amilase pancreática) podem adentrar na corrente sanguínea. Outros exemplos de enzimas secretadas são as que participam do mecanismo da coagulação sanguínea e do sistema do complemento, e as relacionadas com o processo de fibrinólise, que se tornam funcionalmente ativas no plasma; estas são chamadas de enzimas específicas do plasma.

A bioquímica clínica interessa-se principalmente das alterações nos níveis plasmáticos ou soro, das enzimas normalmente presentes no compartimento intracelular e que normalmente estão presentes, somente em níveis baixos. As alterações na atividade dessas enzimas podem levar a conclusões sobre a localização e a natureza das alterações patológicas teciduais. Portanto sendo necessário compreender os fatores que modificam a taxa de liberação de uma determinada enzima a partir de suas células de origem e a taxa pela qual são depuradas da circulação, para que as alterações patológicas possam ser corretamente interpretadas.

Os níveis de uma enzima no sangue são o resultado do equilíbrio entre a taxa de liberação da enzima é liberada na circulação a partir das células de origem e a taxa de inativação ou remoção deste meio. Os fatores mais importantes que afetam os níveis enzimáticos no soro ou plasma são aqueles que influenciam a taxa pela qual a enzima entra na circulação a partir das células. Estes fatores podem ser divididos em duas principais categorias: os que afetam as taxas nas quais as enzimas saem das células secretoras, e os que refletem as alterações na taxa de produção enzimática, devido a um aumento da síntese de uma dada enzima por tipos celulares individuais, ou em decorrência da proliferação de um tipo particular de célula produtora da enzima (TIETZ, 1995; LEHNINGER, 2000).

6.1. Extravazamento das enzimas das células

As enzimas são retiradas de dentro de suas células de origem, sendo transportadas pela membrana citoplasmática que circunda a célula. Esta membrana é uma parte metabolicamente ativa da célula. Qualquer processo que reduza a eficiência da produção de energia, por privar a célula de substratos oxidáveis ou restringir o acesso do oxigênio

necessário à produção de energia, promoverá a degeneração da membrana da célula. A membrana terá sua permeabilidade aumentada e, se a lesão celular for irreversível, a célula morrerá. As moléculas pequenas são as que primeiro saem das células lesadas ou mortas, seguidas de moléculas maiores, tais como as enzimas, e, por último, os demais conteúdos das células necróticas são extravasados.

A agressão direta das membranas celulares por agentes tais como vírus ou substâncias orgânicas, é uma causa óbvia de liberação de enzimas, principalmente em nível hepático (MOSS; HENDERSON, 1994).

6.2. Produção enzimática alterada

As pequenas quantidades de enzimas intracelulares, presentes no plasma, podem ser consideradas como resultado de reciclagem das células ou como fluxo aumentado de enzimas de células sadias. Esta contribuição de enzimas para o sangue circulante pode diminuir em decorrência de uma deficiência genética na produção enzimática é deprimida em virtude de uma doença. Contudo, os casos nos quais a produção enzimática está aumentada são de maior interesse na enzimologia diagnóstica (MOSS; HENDERSON, 1994).

6.3. Depuração das enzimas

Há atualmente algumas evidências disponíveis acerca do modo pelo qual as enzimas são depuradas da circulação. Pouquíssimas moléculas de enzimas são bastante pequenas para atravessar o glomérulo renal sadio, por isso a excreção urinária não é a principal via da eliminação das enzimas da circulação. Uma exceção é a amilase. Níveis aumentados desta enzima no sangue são acompanhados de excreção urinária elevada. Evidências atuais sugerem que a inativação das enzimas começa no plasma, e que as enzimas inativadas são rapidamente removidas, provavelmente pelo sistema reticuloendotelial. O mecanismo parece ser a endocitose por receptor.

A existência de inibidores ou ativadores enzimáticos tem pouco efeito nos níveis medidos em laboratório. Como estes inibidores são de natureza reversível, as diluições relativamente altas usadas no soro, na maioria das determinações enzimáticas modernas, são suficientes para eliminar quaisquer efeitos possíveis desta causa (MOSS; HENDERSON, 1994).

6.4. Enzimas de maior significado no diagnóstico das hepatopatias

No Brasil, as hepatopatias, em sua grande maioria, são causadas por vírus (principalmente os vírus A, B e NANB das hepatites), alcoolismo, parasitose (*S. mansoni* e malária) e drogas de uso terapêutico. Na rotina clínico-laboratorial as enzimas úteis para avaliar estas hepatopatias são: as aminotransferases (ALT e AST), a fosfatase alcalina (ALKP) e a gama-glutamil transferase (GGT). De um modo geral as aminotransferases informam sobre lesão hepatocelular e a ALKP e GGT sobre colestase ou indução enzimática, estes testes laboratoriais são muito sensíveis (detectam lesões mínimas), mas pouco específicos (não definem etiologia).

Na hepatite por vírus e outras formas de doença hepática associada à necrose hepática, os níveis de AST e ALT no soro mostram-se elevados mesmo antes de surgirem

os sinais e sintomas clínicos da doença, níveis moderadamente elevados da atividade podem ser observados na colestase extra-hepática (ANDRIOLO; BORGES, 1989).

As determinações das isoenzimas da ALKP no soro são de particular interesse na investigação da doença hepatobiliar e doença óssea associada a uma atividade osteoblástica aumentada, a elevação tende a ser mais marcante na obstrução extra-hepática do que à obstrução intra-hepática, será tanto maior quanto mais completa for a obstrução.

A GGT presente no soro parece originar-se principalmente do sistema hepatobiliar e suas atividades mostram-se elevadas em todas as formas de doença hepática. É mais elevada em casos de obstrução biliar intra- ou pós-hepática, alcançando níveis de cinco a 30 vezes o normal. A GGT é um indicador enzimático muito sensível de doença hepatobiliar (HESSEL et al., 1996).

7. Alterações nos níveis de substratos séricos em hepatopatias

Os depósitos disponíveis de glicose para suprir os tecidos com uma fonte de energia oxidável são encontrados principalmente no fígado na forma de glicogênio. Uma segunda maior fonte de glicose é o glicogênio do músculo esquelético. Contudo, o glicogênio muscular não é disponível para outros tecidos, uma vez que o músculo não possui a enzima glicose 6-fosfatase.

O principal local de consumo de glicose diário em humanos (75%) é o cérebro, através da via aeróbica. A maior parte da energia restante é utilizada por eritrócitos, músculo esquelético e cardíaco. O corpo obtém glicose através da dieta ou da via da gliconeogênese. A glicose obtida a partir destas duas fontes primárias permanece solúvel nos fluídos do corpo ou é estocada na forma polimérica denominada glicogênio. O glicogênio é considerado a principal forma de depósito de glicose e é encontrado, principalmente, no fígado e no músculo e, secundariamente, nos rins e intestinos. Com mais de 10% do peso constituído de glicogênio, o fígado tem a maior concentração específica deste composto estocado.

O músculo tem menor quantidade de glicogênio por unidade de massa de tecido, mas, considerando-se que a massa do músculo é muito maior do que a do fígado, o glicogênio total do músculo é cerca de duas vezes maior que a do fígado. O estoque de glicogênio no fígado é considerado o principal tampão de níveis de glicose no sangue.

A degradação dos estoques de glicogênio (glicogenólise) ocorre através da ação da glicogênio fosforilase. A ação desta enzima é remover fosforoliticamente um resíduo de glicose através da quebra de uma ligação α -(1,4) nas ramificações da molécula de glicogênio. O produto desta reação é a glicose-1-fosfato. As vantagens desta reação através de um passo fosforolítico são:

- A glicose é removida do glicogênio em um estado ativado (fosforilada) e isto ocorre sem hidrólise de ATP;
- A concentração Pi nas células é alta o suficiente para dirigir o equilíbrio da reação no sentido favorável (LEHNINGER, 2000).

7.1. Proteínas totais e frações

As proteínas são compostos essenciais à todas células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas, além de desempenharem papéis importantes na estrutura celular. São polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas, os

aminoácidos, são unidas entre si por ligações peptídicas. Dentre suas funções biológicas que são influenciadas por sua estrutura e sequência de aminoácido, destacam-se catálise enzimática, transporte, capacidade de contração ou de movimento, suporte e estrutura, imunoproteção e defesa, coagulação sanguínea, reguladores do crescimento e diferenciação celular (LEHNINGER, 2000; SILVERMAN; CHRISTENSON, 1998).

As proteínas plasmáticas podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais, sendo uma fração de albumina e a outra constituída pelas globulinas, as quais se diferenciam da albumina por apresentarem maior tamanho e peso molecular. A concentração total de proteínas no plasma é de aproximadamente 6,0 a 8,0 g/dL e, em pH 7,4, estas proteínas encontram-se em forma aniônica e, assim, constituem parte significativa do complemento aniônico do plasma. A relação normalmente encontrada entre albumina e globulina é de 2:11 (SILVERMAN; CHRISTENSON, 1998).

A albumina, também conhecida como soroalbumina, é a mais abundante das proteínas séricas (3,5 a 5,5 g/dL), sendo sintetizada no fígado a uma taxa de aproximadamente 12g/dia, o que representa 25% da síntese protéica total do fígado e a metade de toda a proteína exportada pelo órgão. A fração globulínica é uma mistura muito complexa, sendo dividida em 05 subfrações: alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 e gamaglobulinas. Dentre as globulinas a fração de migração eletroforética mais rápida é a alfa 1 e a mais vagarosa é gama globulina que, geralmente, é sintetizada pelas células do sistema macrofágico, principalmente pelos linfócitos B (NAOUM, 1990).

As proteínas plasmáticas são ainda classificadas como proteínas de fase aguda uma vez que embora presentes naturalmente no sangue, apresentam sua síntese alterada pelas células parenquimais do fígado em resposta a uma variedade de estresses como inflamações, infecção bacteriana, radiações, toxinas, isquemia, choque térmico, entre outros.

Importantes progressos têm sido acumulados a partir do significado clínico das possíveis patologias associadas às proteínas plasmáticas, entre eles, o estudo da relação albumina/globulina em doenças hepáticas e renais (MURATSUBAKI et al., 2002).

7.2. Bilirrubina

A bilirrubina é o principal produto do metabolismo do heme da hemoglobina. Cerca de 70% a 80% da bilirrubina são provenientes da destruição dos eritrócitos e hemácias, velhas, 15% de fontes hepáticas, e o restante é proveniente da destruição de hemácias defeituosas na medula óssea e nos citocromos.

A hemoglobina é metabolizada no baço e no sistema reticuloendotelial, sendo degradada em heme e globina, o anel heme é aberto, produzindo ferro livre e biliverdina, que é reduzida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase. Essa bilirrubina recém-formada circula no sangue ligada à albumina sérica (forma não conjugada). É transportada pelo sistema porta até o fígado, onde penetra no hepatócito por dois mecanismos distintos: difusão passiva e endocitose.

Uma vez dentro do hepatócito, a bilirubina desliga-se da albumina e forma um complexo protéico com as chamadas proteínas Y e Z (também chamadas ligandinas). É então transportada para o retículo endoplasmático liso, onde se torna um substrato da enzima glicorunil transferase, dando origem a um diglicuronídeo conjugado (mono e triglicuronídeos são formados). A bilirrubina, agora já conjugada, é transportada até a

membrana celular. Na face oposta aos sinusóides e próxima aos canalículos biliares, ela é excretada diretamente, alcançando o trato intestinal, onde é metabolizada pelas bactérias da flora intestinal, formando o estercobilinogênio. A maior parte deste estercobilinogênio é excretada nas fezes, outra parte é reabsorvida e eventualmente re-excretada na bile (circulação entero-hepática). Uma pequena quantidade é excretada pelos rins, sendo designado urobilinogenio (FEVERY; BLANCKAERT, 1999).

7.2.1. Os tipos de bilirrubina

Existem, portanto, dois tipos de bilirrubina circulantes, a não conjugada também chamada de bilirrubina direta, e a conjugada, chamada de bilirrubina indireta. No entanto, existe um terceiro tipo de bilirrubina, chamada de bilirrubina delta, do tipo conjugada de reação rápida e ligada à albumina permanentemente por uma ligação covalente. Pelas técnicas tradicionais, a bilirrubina delta era incluída nos resultados da bilirrubina direta (conjugada) e na bilirrubina total (BITTENCOURT; DA SILVA, 1985).

7.2.2. Significado diagnóstico

A bilirrubina eleva-se no soro na presença de lesões hepáticas, obstrução biliar ou quando a velocidade de destruição dos glóbulos vermelhos está aumentada. O aumento da bilirrubina indireta é observado na síndrome hemolítica, na icterícia neonatal, na síndrome de Cliger-Najjar e na doença de Gilbert. A bilirrubina direta está aumentada nas hepatites agudas e crônicas, nas reações tóxicas a varias drogas e nas obstruções do trato biliar (BLACK; BILLING,1969).

8. Hematologia

É o estudo do sangue e suas doenças. Do ponto de vista didático, podemos dividir a hematologia em duas áreas: a hematologia propriamente dita, que é o estudo das doenças do sangue como entidades clínicas, e o diagnóstico hematológico, que é a identificação, não só das doenças primárias das células do sangue, mas, e isso é bem mais frequente também daquelas doenças ocorridas em outros tecidos e órgãos e que se refletem nos parâmetros sanguíneos. É comum em animais, por exemplo, parasitoses gastrointestinais levarem o paciente a um grau de anemia que chega a determinar a sua morte. Neste caso, o diagnóstico hematológico é, embora importantíssimo, apenas complementar; enquanto não for tratada a enfermidade primária, neste caso a parasitose, o tratamento da alteração hematológica, a anemia será apenas paliativo (BECK, 1977).

8.1. Anemia

As doenças dos eritrócitos se manifestam através de uma alteração quantitativa da massa eritrocitária e, conseqüentemente, da hemoglobina circulante e da capacidade de transporte de oxigênio aos tecidos. Essas alterações podem ser divididas em dois grupos: as anemias e as policitemias ou poliglobulias. Nas primeiras, a quantidade de hemoglobina circulante está diminuída, enquanto que nas policitemias há um aumento da massa eritrocitária com relação aos níveis normais da espécie (MONTENEGRO; FRANCO, 1992).

8.1.1. Sinais Clínicos da Anemia

Na anemia ocorrem três fenômenos interligados: diminuição da volemia, hipóxia tecidual e compensação do organismo. Inicialmente, há uma diminuição do volume de sangue circulante (queda da volemia). Esta, por sua vez, produz uma diminuição do aporte de oxigênio aos tecidos (hipóxia tecidual), a qual põe em funcionamento um mecanismo de compensação do organismo. Cada um destes fenômenos se caracteriza por sinais clínicos bem definidos que, no seu conjunto, fazem os sintomas da anemia.

Os sinais clínicos relacionados com a queda da volemia são palidez das mucosas e conjuntivas e a descoloração (palidez) dos órgãos e tecidos. Esses sinais podem ser muito evidentes nos animais, principalmente no de pigmentação escura (MONTENEGRO; FRANCO, 1992).

8.1.2. Diagnóstico Laboratorial da Anemia

Os sinais clínicos dão apenas um indício da existência de uma anemia, cuja confirmação deve ser, obrigatoriamente, feita através do laboratório. São três os exames de laboratório utilizados no diagnóstico da anemia: o hematócrito, a taxa de hemoglobina e o número de eritrócitos por mm^3 de sangue. O mais simples e rápido dos três é o hematócrito que, na anemia, pode estar abaixo do normal. A taxa de hemoglobina circulante acompanha o valor do hematócrito, permanecendo igualmente baixa na anemia. Quanto à contagem de eritrócito por mm^3 de sangue está diminuída ou não. A contagem encontra-se diminuída nas anemias não regenerativas ou aplásicas, que ocorrem por diminuição da produção de eritrócitos pela medula óssea, mas pode permanecer no limite normal inferior no caso das anemias regenerativas, que ocorrem por perda aumentada de eritrócitos, através de hemorragia ou hemólise, quando eritrócitos aparecem em número normal ou perto do normal, mas com quantidade de hemoglobina por eritrócito abaixo do normal, devido à falta de reposição de ferro na medula óssea (ALMEIDA, 1987).

8.1.3. Classificação das Anemias

Modernamente, as anemias são classificadas em regenerativas e não regenerativas. As anemias regenerativas ocorrem devido a uma perda aumentada de eritrócitos, mantendo-se normal a sua produção. Nas anemias não regenerativas ocorre o inverso, isto é, há uma diminuição da produção dessas células, associada a uma perda das mesmas em quantidades normais (SEARCY, 1976).

8.1.3.1. Anemias regenerativas

Estas são causadas por uma perda aumentada de eritrócitos e compreendem dois grupos: as anemias hemorrágicas e as hemolíticas. As primeiras são causadas por hemorragias crônicas, e as outras, por um aumento na taxa de hemólise. Em ambas, a produção de eritrócitos pela medula óssea permanece normal, havendo mesmo uma aceleração da produção e da liberação de eritrócitos, este fenômeno é chamado de regeneração. São conhecidas como anemias ferroprivas, pois o ferro existente nos eritrócitos perdidos não se apresenta disponível para a formação de nova hemoglobina, como ocorre num indivíduo normal. Nessas anemias, o número de reticulócitos circulantes

está aumentado, funcionando esses eritrócitos jovens como os indicadores de regeneração medular. Do ponto de vista morfológico são chamadas anemias microcíticas hipocrômicas, ou seja, os eritrócitos circulantes são micróцитos (eritrócitos menores que o normal) hipocrômicos (eritrócitos com uma quantidade de hemoglobina menor que o normal). Isso faz com que nessas anemias, o volume globular médio ou VGM e a concentração de hemoglobina globular média ou CHGM permanece abaixo do normal, devido à diminuição da hemoglobina existente nas hemácias (SEARCY, 1976; VERRASTRO et al., 2002).

8.1.3.2. Anemias regenerativas hemorrágicas

São de dois tipos: as causadas por hemorragias agudas e as causadas por hemorragias crônicas. Frequentemente, sobretudo nos casos de traumas ou acidentes hemostáticos, a hemorragia tem uma fase inicial aguda. Nessa fase, a anemia é normocítica e normocrômica, e não regenerativa. O hematócrito se permanece normal, já que a perda de eritrócitos é simultânea e proporcional a do plasma. Após algumas horas, o hematócrito começa a cair, com o início da passagem do líquido intersticial para o interior do espaço vascular, no sentido de compensar a perda de plasma. Aproximadamente 72 horas após o início da hemorragia começa a regeneração medular e a anemia passa a apresentar um aumento de reticulócitos circulantes. Ao mesmo tempo, os eritrócitos vão ficando menores e mais pálidos, devido à falta de ferro para produzir nova hemoglobina. A anemia vai, desta forma, assumindo a sua forma microcítica e hipocrômica, e seu caráter regenerativo. Há casos, entretanto, nos quais a anemia não apresenta uma fase aguda inicial. Ela se instala de forma incipiente, seja através de um parasitismo por parasitos hematófagos, como os carrapatos ou alguns helmintos gastrintestinas, ou através do sangramento de mucosas provocado por ulcerações ou coagulação deficiente. Essas anemias geralmente são descobertas já na sua fase regenerativa e o seu comportamento é igual ao das anemias hemorrágicas crônicas vistas de cima (SEARCY, 1976; VERRASTRO et al., 2002).

8.1.3.3. Anemias regenerativas hemolíticas

São anemias que ocorrem quando o processo de hemólise excede aquele da reposição normal de destruição dos eritrócitos velhos pelas células do sistema monocítico fagocitário (SMF). Eventualmente, pode haver um aumento da taxa de hemólise atingindo inclusive os eritrócitos normais e resultando numa anemia hemolítica. Nas anemias hemolíticas a hemólise pode ser intra ou extra-vascular. No primeiro caso, os eritrócitos são destruídos dentro dos vasos, com liberação de hemoglobina livre (fora dos eritrócitos) no plasma, fenômeno conhecido hemoglobinemia que por sua vez, resulta em hemoglobinúria, ou presença de hemoglobina na urina. No segundo caso, mais frequente, os eritrócitos apresentam anormalidades de superfície causadas por parasitos ou alterações de membrana de origem imunológica e são fagocitados, sobretudo no baço, pelas células do SMF. Esse aumento na destruição dos eritrócitos resulta num aumento da taxa de bilirrubina circulante (pigmento resultante do desmembramento da hemoglobina). Como a bilirrubina é amarela, seu aumento na circulação produz uma pigmentação amarelada da pele e das mucosas, estado clínico conhecido como icterícia. As principais anemias hemolíticas dos animais domésticos são de três tipos: as de origem parasitária, as causadas por distúrbios imunológicos (SEARCY, 1976; VERRASTRO et al., 2002).

8.1.3.4. Anemias não regenerativas

São também chamadas anemias aplásticas e são causadas por uma hipoplasia eritrocitária, que é uma queda da produção de eritrócitos com uma diminuição do número de precursores nucleados dos eritrócitos na medula óssea. Do ponto de vista morfológico, são normocíticas e normocrômicas, e seu índice de reticulócitos é zero. Nos animais domésticos, as anemias não regenerativas são bem menos frequentes que as regenerativas, mas seu tratamento é geralmente, mais difícil. Quanto a sua etiologia, podemos dividi-las em primárias, cuja origem está numa disfunção primária da medula óssea, e secundárias, cuja origem se encontra em outro órgão ou sistema, com consequências sobre a eritropoese (SEARCY, 1976; VERRASTRO et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a escassez de informações sobre diferentes aspectos da relação parasito/hospedeiro em infecção experimental com *Echinostoma spp.*, sobretudo no modelo *E. paraensei*/rato Wistar, o presente estudo teve como objetivos:

- ◆ Estudar a carga parasitária e tempo de infecção de *E. paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).
- ◆ Investigar alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas em *Rattus norvegicus* (Wistar), provocadas pela infecção com *E. paraensei*.

3. CAPÍTULO I

Alterações bioquímicas e histopatológicas em *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentalmente infectados com *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae)

Alterações bioquímicas e histopatológicas em *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentalmente infectados com *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae)

RESUMO

Um ensaio foi realizado para avaliar as alterações bioquímicas em *Rattus norvegicus* após a infecção com o trematódeo intestinal *Echinostoma paraensei*. Os roedores receberam 150 metacercárias, o soro foi coletado e a carga parasitária quantificada, semanalmente, até a quinta semana de infecção. Foram determinados os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALKP), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubina, glicose, proteínas totais e frações e do glicogênio hepático. Todos os animais inoculados com as metacercárias estavam parasitados na 1ª semana, sendo recuperadas as formas adultas até a terceira semana após a infecção. Os níveis de AST, ALT, GGT, bilirrubina, globulina estavam elevados na 1ª e/ou 2ª semana, decrescendo em seguida a níveis próximos ao controle. Ao exame histopatológico os hepatócitos se apresentavam com bordos arredondados e alguns sinais de comprometimento nuclear (núcleos picnóticos, cariorrexia e cariólise), discreta infiltração por polimorfonucleares nos sinusóides que se encontravam ligeiramente expandidos. Os hepatócitos se apresentavam vacuolizados com discreta infiltração linfoplasmocitária perivascular e periportal e poucas células mononucleares presentes na luz do ducto biliar, alguns hepatócitos estavam hipotrofiados. Diferentemente, o conteúdo de proteínas totais no plasma mostrou redução significativa na 1ª semana enquanto a atividade da ALKP apresentou redução a partir da 4ª e 5ª semanas em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa nos níveis de albumina, glicogênio e de glicose. A infecção por *E. paraensei* promove em *R. norvegicus* alterações na função hepática possivelmente decorrente da colestase produzida pela obstrução parcial do ducto biliar pelos helmintos.

ABSTRACT

Tests were performed to evaluate the biochemical alterations in *Rattus norvegicus* after infection by the intestinal trematode *Echinostoma paraensei*. The rodents received 150 metacercariae each, serum samples were collected and the parasite load was quantified weekly until the fifth week of infection. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), gamma-glutamyl transferase (GGT), bilirubin, glucose, total proteins and fractions and hepatic glycogen were determined. All the animals exposed to the metacercariae were infected in the first week and worms were recovered up to the third week after infection. The hepatocytes had rounded edges, with signs of impaired nuclear (pyknotic nuclei, karyorrhexis and karyolysis), mild infiltration of polymorphonuclear and sinusoids slightly expanded. The hepatocytes were vacuolated with discrete perivascular and periportal lymphocytic infiltration. The levels of AST, ALT, GGT, bilirubin and globulin rose in the first and/or second week and declined thereafter to levels near those of the control group. In contrast, the level of total proteins in the plasma fell significantly in the first week while the ALKP activity went down only in the fourth and fifth weeks in relation to the control group. There was no significant difference in the levels of albumin, glycogen and glucose. Infection by *E. paraensei* in *R. norvegicus* causes changes in the hepatic function, possibly resulting from the cholestasis produced by the partial obstruction of the bile duct by the helminths.

1. Introdução

Os equinostomatídeos possuem extensa distribuição geográfica e infectam grande número de animais silvestres e domésticos, inclusive o homem, portanto apresentam importância médica e veterinária (FRIED; GRACZYK, 2000).

A equinostomíase humana tem sido relacionada a, no mínimo, 16 espécies de trematódeos intestinais. Entre os países em que o parasitismo é endêmico estão à China, Índia, Coreia, Malásia, Filipinas e Indonésia. Nas áreas endêmicas, a transmissão do parasito ocorre de forma focal e está associada a determinadas práticas sócio-econômicas e culturais. A infecção ocorre através da ingestão de moluscos, peixes, crustáceos e anfíbios crus ou mal cozidos nos quais as metacercárias se encontram encistadas (GRACZYK; FRIED, 1998).

No Brasil, ovos de *Echinostoma* sp. foram encontrados em fezes obtidas de corpo humano parcialmente mumificados datadas entre 600 e 1200 anos passados (SIANTO et al., 2005). Entretanto, nenhum caso de infecção humana foi assinalado recentemente, apesar de terem sido encontrados parasitando animais de interesse comercial tais como: porco doméstico, galinha, pato e animais de companhia (cão), além de aves (LUTZ, 1924) e roedores silvestres, indicando grande potencial zoonótico (MALDONADO JR; LANFREDI, 2008).

Echinostoma paraensei Lie e Basch, 1967 é uma espécie brasileira de *Echinostoma* descrita através do ciclo experimental, após o encontro de *Biomphalaria glabrata* naturalmente infectada, sendo o roedor silvestre *Nectomys squamipes* posteriormente assinalado como seu hospedeiro natural definitivo (MALDONADO et al., 2001a). O helminto adulto localiza-se no trato gastrintestinal (duodeno) do hospedeiro definitivo onde atinge a maturidade sexual (NOLLEN, 1996) e eventualmente é capaz de migrar para o ducto biliar (MALDONADO et al., 2005).

Echinostoma paraensei tem sido usado como modelo experimental, tendo como abordagem a relação parasito-hospedeiro (MALDONADO et al., 2001b). Apesar do avanço do conhecimento na área da patologia produzida pela infecção experimental (TOLEDO; FRIED, 2005), pouco é conhecido sobre as modificações bioquímicas resultantes da infecção.

Na clínica laboratorial em humanos as enzimas de referência na avaliação das hepatopatias são as aminotransferases, alanina amino transferase e aspartato amino transferase (ALT e AST), a fosfatase alcalina (ALKP) e a gama-glutamil transferase (GGT). De um modo geral as aminotransferases informam sobre a ocorrência de lesão hepatocelular e a ALKP e GGT sobre colestase ou indução enzimática (ANDRIOLO; BORGES, 1989).

O estudo teve como objetivo determinar os parâmetros bioquímicos e histopatológicos hepáticos na infecção aguda experimental por *Echinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos Parasitos e Infecção Experimental

As metacercárias utilizadas para a infecção foram obtidas de *Biomphalaria glabrata* (isolado de Sumidouro, RJ), criadas em laboratório e infectadas experimentalmente. O isolado de *E. paraensei* utilizado foi obtido do roedor silvestre *Nectomys squamipes* naturalmente infectado, proveniente do município de Sumidouro, RJ (22°02'46" S, 42°41'21" W) e o ciclo vem sendo mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ através de passagens em hamster *Mesocricetus auratus* como hospedeiro definitivo e *B. glabrata* como 1^o e 2^o hospedeiros intermediários.

Hamsters adultos infectados com *E. paraensei* foram submetidos à eutanásia em câmara enriquecida com CO₂, segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA L-074/08), e os vermes adultos coletados do intestino delgado e transferidos para placas de Petri contendo solução salina fisiológica a 0,9%. O útero do helminto foi dissecado para liberação dos ovos, os quais foram lavados e incubados em água desclorada, a 26°C, por 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à luz de uma lâmpada de 100W para estimular a eclosão dos miracídeos.

Duzentas *B. glabrata* foram submetidas individualmente à infecção com 10 miracídeos de *E. paraensei* e após 26 dias expostas à luz artificial para o estímulo a emergência de cercárias. As cercárias assim obtidas foram colocadas em contato com outros moluscos da mesma espécie para a obtenção das metacercárias.

2.2. Delineamento experimental

Foram utilizadas 50 fêmeas adultas de *Rattus norvegicus* (Wistar) divididos em dois grupos: um com 35 animais infectados individualmente com 150 metacercárias de *E. paraensei* e o outro grupo controle não infectado com 15 animais. Os animais foram mantidos no biotério do Pavilhão Arthur Neiva, IOC, FIOCRUZ, RJ, onde as salas são equipadas com sistema de insuflação e exaustão de ar, devidamente dimensionados, sendo que o ar insuflado sofre uma bateria de filtração (de acordo com a ABNT e com filtros bactericidas), os parâmetros temperatura e umidade relativa do ar são constantemente monitorados e o sistema de iluminação é controlado eletronicamente com ciclos de luz e escuro programados conforme a necessidade.

Os animais foram acondicionados em caixas plásticas, transparentes e de dimensões padronizadas (41x34x16 cm). As tampas, de grade de arame galvanizado e possuem espessamento de 7 mm, suporte para bebedouro e divisória escamoteável interna separando o bebedouro da ração. Os ratos foram mantidos em grupos com um número máximo de 5 animais por caixa. A ração utilizada na alimentação dos ratos e camundongos é do tipo peletizada comercial. Oferecida à vontade por meio de comedouro suspenso (tampa da caixa de animais), fabricante Nuvilab[®].

A hidratação foi por meio de bebedouros do tipo mamadeira e a água oferecida é filtrada. As caixas dos animais, tampas e bebedouros são higienizados manualmente (após retirada e descarte da cama usada) com detergente líquido e hipoclorito de sódio a 10%. As caixas lavadas e a maravalha (cama) são autoclavadas. A anti-sepsia das dependências do

Laboratório de Experimentação Animal e Biotério são feitos utilizando-se Amonex T A ®, à base de cloreto de benzalcônio 30%.

Semanalmente, sete animais infectados e três animais controle foram submetidos à eutanásia por exposição à atmosfera enriquecida com CO₂.

2.2.1. Determinação bioquímica

Através de punção cardíaca, no momento do sacrifício foram coletadas amostras de sangue, as quais foram colocadas em tubos de 2,5mL contendo gel separador (Microtainer – Becton & Dickson) e centrifugados por 10 minutos a 1200g, obtendo-se assim o soro em seguida o material foi colocado em microtubos e acondicionado em freezer a -20°C. O volume de sangue coletado variou de acordo com o animal.

Para as dosagens de glicogênio foi coletado 1g de fígado sempre do mesmo lóbulo hepático em todos os animais e acondicionado em freezer até o momento da análise.

2.2.2. Histopatologia

Para as análises histopatológicas o fígado foi coletado e fixado em solução de Dubosq-Brasil durante 24 horas. Decorrido este tempo, o material foi transferido para álcool 70% e conservados até o momento do processamento segundo técnica histológica de rotina, inclusão em parafina e realização de cortes seriados (5µm de espessura) para coloração em hematoxilina-eosina (Humason, 1979). As imagens foram obtidas usando Nikon Coolpix 4300.

As determinações bioquímicas da função hepática laboratorial incluiu a detecção da aspartato aminotransferase (AST) EC2.6.1.1, alanina aminotransferase (ALT) EC2.6.1.2, fosfatase alcalina (ALKP) EC3.1.3.1, bilirrubina, glicose, proteínas totais e frações através de sistema automatizado no Laboratório de Controle de Qualidade do Centro de Criação de Animais de laboratório (CECAL – FIOCRUZ) e o kit para diagnóstico Doles® para determinações da atividade da gama-glutamilttransferase (GGT) EC2.3.2.2. O glicogênio hepático foi extraído e determinado pela técnica do 3.5 DNS, segundo Pinheiro & Gomes (1994).

2.3. Análise Estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) para determinar as diferenças entre os grupos e o teste de Tukey-Kramer para comparação entre as médias dos pares por cada semana, utilizando o programa Graph Pad Prism, Prism Inc, V.5.00.288. Valores menores do que ($P < 0.05$) foram considerados significantes.

3. Resultados

Todos os animais expostos à infecção estavam parasitados após a 1ª semana. Foram encontrados helmintos até a terceira semana de infecção (Tabela 1). O percentual de parasitos recuperados na primeira semana correspondeu a 63.70% do total de metacercárias administradas, este índice foi significativamente maior que os observados nas semanas subsequentes. Os vermes foram progressivamente eliminados da 1ª a 3ª semana após a infecção, com valores de 23.1% e 13.2%, respectivamente. O número de vermes recuperados na 1ª semana de infecção variou de 29 a 91.

Tabela 1. Média e desvio padrão de vermes adultos (*Echinostoma paraensei*) recuperados de *Rattus norvegicus* (Wistar) durante cinco semanas de infecção.

| Período de infecção (Semanas) | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Vermes recuperados (X ± SD) | 59.87 ± 22.14 | 21.75 ± 31.65 | 12.37 ± 21.12 | 0 | 0 |

Os hepatócitos apresentavam-se com bordos arredondados e alguns sinais de comprometimento nuclear (núcleos picnóticos, cariorrexia e cariólise), discreta infiltração por polimorfonucleares nos sinusóides que se encontravam ligeiramente expandidos. Os hepatócitos apresentavam vacuolização, discreta infiltração linfoplasmocitária perivascular e periportal com poucas células mononucleares presentes na luz do ducto biliar, alguns hepatócitos estavam hipotrofiados (Fig. 6).

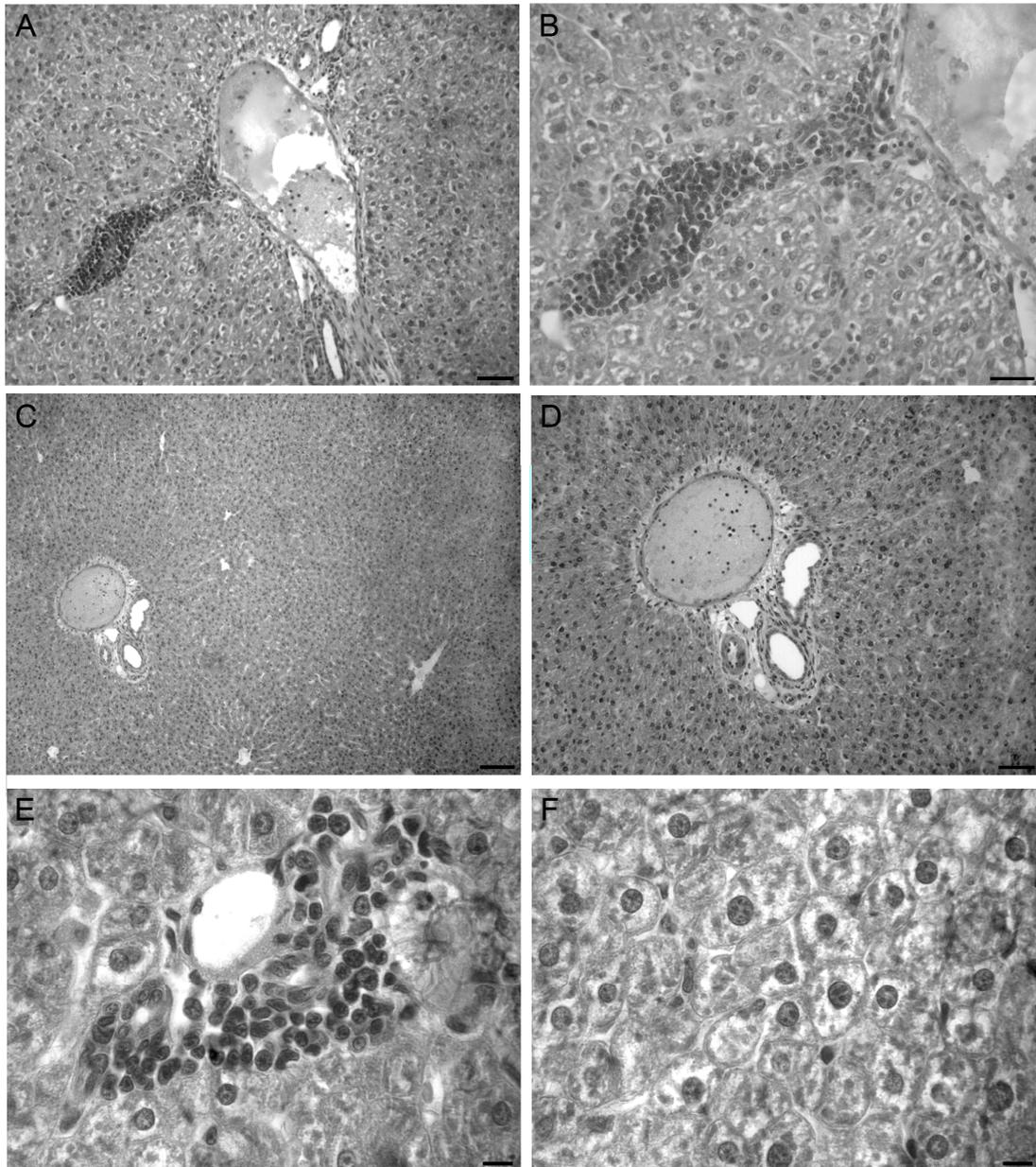


Figura 6. Alterações histológicas no fígado de *Rattus norvegicus* infectados com *Echinostoma paraensei*. A e B – Espaço porta com infiltrado mononuclear periportal, hepatócitos com discreta infiltração por polimorfonucleares nos sinusóides ligeiramente expandido. C e D – Espaço porta com estase venosa, células inflamatórias na luz do vaso. E e F – Hepatócitos com citoplasma vacuolizados, tumefeitos, núcleos picnóticos e infiltrado mononuclear perivascular, cariorrexia e cariólise. Coloração: HE. A, E e F – Barra de escala = 50µm; B e D – barra de escala = 30µm, C – barra de escala = 10µm.

A atividade da AST mostrou-se significativamente aumentada na primeira semana após a infecção, com elevação de 81,97% em relação ao grupo controle ($q = 4,457$; $P < 0,01$). A atividade desta enzima apresentou valor similar ao observado para o grupo controle na 2ª semana após a infecção, reduzindo em seguida a níveis inferiores em 25,3% na 3ª semana, em relação ao observado no grupo controle (Fig. 7), elevando-se daí por diante.

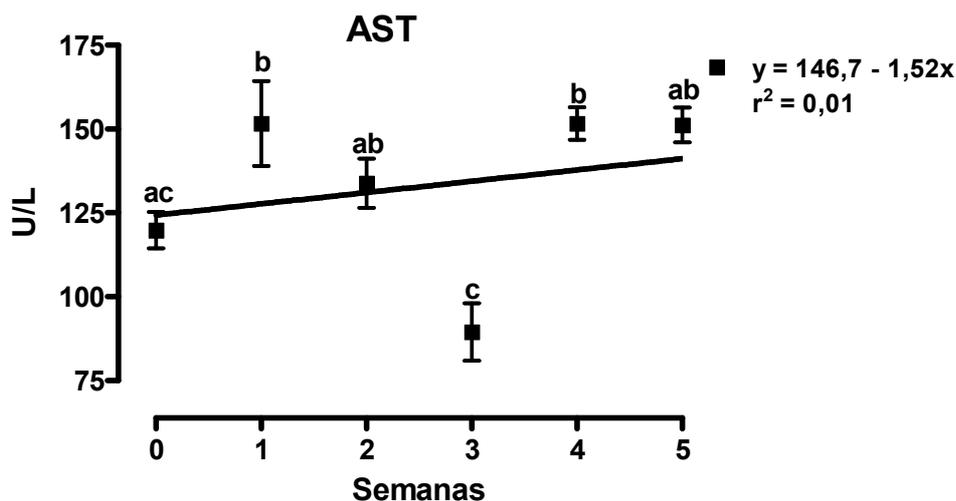


Figura 7. Média dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) ao longo de 5 semanas de infecção por *Echinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

A atividade da ALT sofreu crescente elevação de 78,4% na 1ª semana de infecção em relação ao grupo controle e de 94,7% na 2ª semana de infecção, ambos significativamente maiores que o grupo controle. Após a segunda semana de infecção, a atividade da ALT decresceu, apresentando tendência a assumir valores próximos ao observado para o grupo controle (Fig. 8).

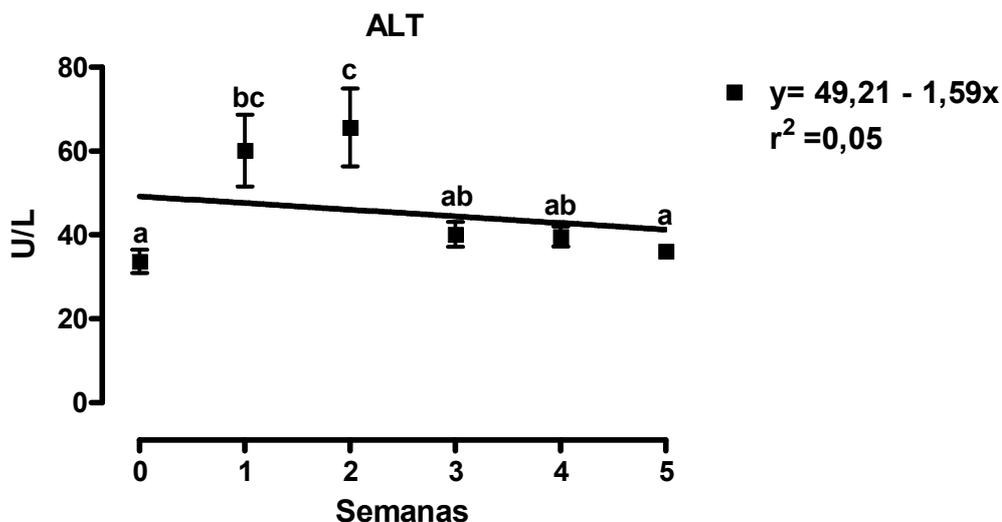


Figura 8. Média dos níveis séricos de Alanina aminotransferase (ALT) ao longo de 5 semanas de infecção por *Echinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

A atividade da ALKP apresentou redução de 30.4% e 33.6% em relação ao grupo controle somente na 4ª e 5ª semanas após a infecção ($q = 4.776$ e $q = 5.270$; $P < 0.01$, respectivamente) (Fig. 9).

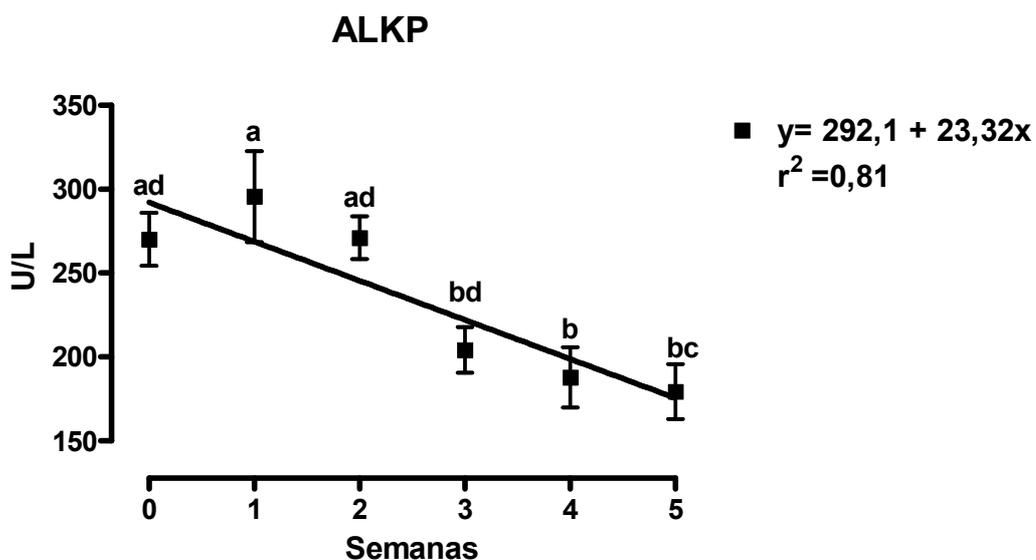


Figura 9. Média dos níveis séricos de Fosfatase alcalina (ALKP) ao longo de 5 semanas de infecção por *Echinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

Os níveis séricos de GGT apresentaram elevação significativa na 1ª semana após a infecção, com aumento de 127.9% em relação ao grupo controle. A partir deste período foi observado decréscimo do nível de atividade da GGT com percentuais de 49.4%, 27.1% e 8.7% acima do valor médio do grupo controle. Entretanto, na 4ª semana após a infecção observou-se aumento de 37.9% nos níveis de GGT (Fig. 10).

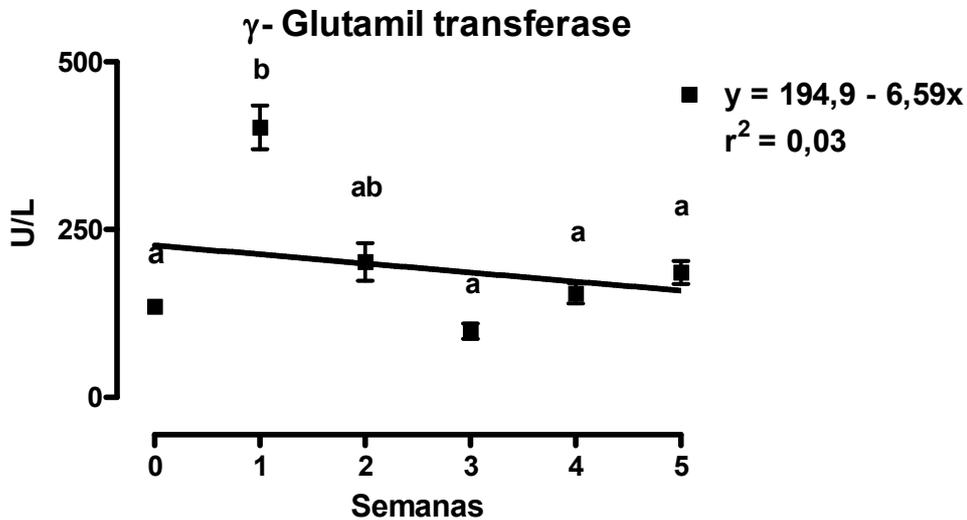


Figura 10. Média dos níveis séricos de Gama-glutamyltransferase (GGT) ao longo de 5 semanas de infecção por *E chinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

Os níveis de bilirrubina foram significativamente elevados na primeira semana de infecção ($q = 5.687$; $P < 0.01$), apresentando uma elevação de 108,3% em relação ao grupo controle (Fig. 11).

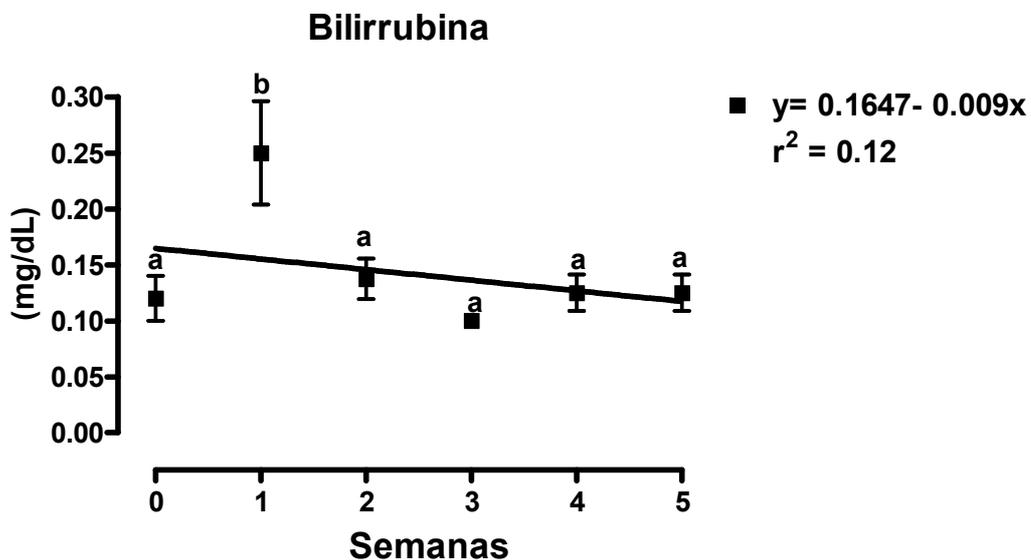


Figura 11. Média dos níveis séricos de Bilirrubina ao longo de 5 semanas de infecção por *Echinostoma paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

Na primeira semana após a infecção, o conteúdo de proteínas totais no plasma mostrou redução significativa de -21.9% em relação ao grupo controle. Da segunda semana

em diante, os valores observados foram superiores aquele observado para o grupo controle, contudo não mostrando variações significativas. O nível de globulina sérica apresentou elevação de 62.5% em relação ao grupo infectado na 1ª semana após a infecção. A partir da 2ª semana até o término do estudo os níveis de globulina situaram-se próximos aos observados nos animais não infectados. Não houve diferença significativa nos níveis de albumina, glicogênio e de glicose entre o grupo infectado e o controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão e variação de proteínas totais (PROT), albumina (ALB), globulina (GLOB), glicogênio (GLIC) e glicose (GLU) no soro de *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentalmente infectado com *Echinostoma paraensei*.

| Valores | Período de infecção (Semanas) | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------------------------------|----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|----------|-------------------------|-----------|-------------------------|------------|
| | Controle | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
| | X±SD | IV | X±SD | IV | X±SD | IV | X±SD | IV | X±SD | IV | X±SD | IV |
| PROT(g/dl) | 4,5 ± 0,3 ^a | 4,1-4,8 | 3,2± 1,2 ^b | 2,3-4,6 | 5,0± 0,6 ^a | 4,2-5,7 | 4,6± 0,3 ^a | 3,9-5,2 | 4,9± 0,1 ^a | 4,7-5,2 | 5,2± 0,776 ^a | 4,2-6,0 |
| ALB (g/dl) | 2,9 ± 0,5 ^a | 2,2-4,3 | 2,5 ± 0,2 ^b | 2,3-2,8 | 3,1± 0,8 ^a | 2,7-5,0 | 3,4± 1,6 ^a | 2,6-6,5 | 3,6± 1,2 ^a | 2,7-6,5 | 3,1± 0,3 ^a | 2,8-3,7 |
| GLOB (g/dl) | 1,6 ± 0,2 ^a | 1,2-1,9 | 0,6 ± 1,1 ^a | 0-2,1 | 1,9± 0,9 ^a | 0,2-2,7 | 1,7 ± 0,4 ^a | 0,9-2,0 | 1,6 ± 0,5 ^a | 1-2,3 | 2,1 ± 0,6 ^a | 1,4-2,7 |
| GLIC (mg/dl) | 15,1±5,0 ^a | 8,9-21,6 | 20,5±3,9 ^a | 13,6-25,9 | 14,4±1,3 ^a | 12,8-16,7 | 17,4±6,0 ^a | 9,9-24,9 | 18,8±4,0 ^a | 13,7-23,9 | 19,3±6,2 ^a | 12,8-28,16 |
| GLU (mg/dl) | 197,4±21,4 ^a | 158-228 | 195,1 ± 27,3 ^a | 144-219 | 228,9 ± 28,1 ^a | 199-276 | 195,4 ± 27,1 ^a | 153-227 | 195,1±27,4 ^a | 159-234 | 213,4±20,4 ^a | 192-255 |

X ± SD = média ± desvio-padrão; IV = intervalo de variação.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

6. Discussão

Estudos experimentais avaliando as alterações metabólicas no curso da infecção utilizando o modelo *Echinostoma-roedor* ainda são incompletos e não permitem generalizações dos fenômenos envolvidos na relação helminto intestinal e hospedeiro vertebrado. Têm sido demonstrados experimentalmente que *Rattus norvegicus* apresenta baixa suscetibilidade à infecção por *Echinostoma* spp. Desenvolvendo apenas a fase aguda da doença (HANSEN et al., 1991; TOLEDO et al., 2004 a,b; TOLEDO et al., 2006).

Toledo et al. (2004^a) demonstraram que na infecção experimental de *R. norvegicus* por *Echinostoma caproni* a eliminação do helmintos ocorria a partir da quarta semana de infecção, sendo constatado que todos os helmintos foram eliminados até oitava semana após a exposição às metacercárias. Característica semelhante foi observada na infecção experimental de *R. norvegicus* por *Echinostoma friedl.*, na qual o parasitismo se manteve sem decréscimo da carga parasitária até a quarta semana após a infecção (TOLEDO et al., 2006). Diferentemente, no presente estudo constatou-se que a partir da segunda semana os helmintos já começaram a ser eliminado sendo que na quarta semana já não havia roedores infectados pelo helminto, sugerindo que *R. norvegicus* apresenta menor suscetibilidade ao *E. paraensei* quando comparado as outras duas espécies já estudadas. A suscetibilidade a infecção por *E. paraensei* no *R. norvegicus* foi semelhante ao observado na infecção experimental do hospedeiro natural *N. squamipes* (MALDONADO Jr et al., 2005), o que sugere a boa adequação do modelo para o estudo da equinostomíase.

O aumento significativo nos níveis de ALT, AST, GGT e bilirrubina no soro dos animais infectados durante a fase inicial da infecção (1^a semana), pode estar relacionado a colestase extra-hepática (MOSS; HENDERSON, 1994) pois após a necrópsia e observação macroscópica dos animais infectados não foi encontrada nenhuma lesão no fígado que pudesse estar relacionada ao aumento dos níveis séricos destas enzimas. Todos os vermes recuperados se encontravam localizados na primeira porção do intestino delgado (duodeno), próximo a ampola de Vater, sugerindo que provavelmente os vermes sejam responsáveis pela obstrução temporária do ducto biliar. Estudos realizados por Maldonado Jr et al. (2001; 2005) mostraram que em *R. norvegicus* (Wistar), assim como em camundongos (*Swiss webster*), infectados com *E. paraensei* ocorre a migração dos helmintos do intestino delgado para o ducto biliar a partir da primeira semana de infecção.

As aminotransferases ALT e AST normalmente estão presentes no soro em baixa concentração (KAPLAN, 1987), e embora sejam enzimas sugestivas de hepatopatias não são produzidas unicamente no tecido hepático apresentando distribuição em diferentes órgãos (ANDRIOLO; BORGES, 1989). O aumento das aminotransferases pode ser ocasionado por diversos fatores, devido à grande sensibilidade destas enzimas a um amplo gama de fatores que possam promover alteração hepática ou extra-hepática. O aumento das aminotransferases pode também decorrer da liberação de produtos de excreção-secreção que levariam ao aumento da permeabilidade da membrana dos hepatócitos causando o extravasamento destas enzimas na circulação sanguínea (KAPLAN, 1987; REJ, 1971). A redução destas enzimas a níveis próximos do observado para o grupo controle ocorreu a partir da segunda semana de infecção período concomitante a eliminação dos helmintos pelo hospedeiro. Semelhantemente, Dement'ev et al. (1978) também observaram aumento da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ovinos infectados com 1.000 metacercárias de *Dicrocoelium dendriticum*, trematódeo parasito do ducto biliar.

A isoenzima ALKP está presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas celulares, e ocorre em níveis elevados em alguns tecidos, particularmente, no epitélio intestinal e no fígado (MOSS; HENDERSON, 1998). A elevação sérica desta enzima é observada principalmente quando há obstrução extra-hepática (ANDRIOLO; BORGES, 1989). Diferentemente, na infecção por *E. paraensei* os níveis desta enzima se manteve significativamente menor ao longo do tempo de infecção quando comparado ao grupo controle, o que pode ser devido à presença maciça dos helmintos na mucosa intestinal causando erosão das vilosidades e lesionando o epitélio intestinal interferindo desta forma na produção da enzima pelos enterócitos. Camundongos infectados com *E. caproni* apresentaram atrofia nas vilosidades intestinais, erosão do tecido intestinal, hiperplasia das criptas intestinais e uma redução da atividade da ALKP (WEINSTEIN; FRIED, 1991; FUJINO et al., 1993).

A GGT presente no plasma tem sua origem no sistema hepatobiliar, sendo uma enzima empregada no diagnóstico da colestase e nos processos obstrutivos da árvore biliar (ANDRIOLO; BORGES, 1989). O aumento desta protease pode estar relacionado diretamente a obstrução do ducto biliar provocada pela presença do helminto.

A ocorrência de colestase extra-hepática pode levar à diminuição do extravasamento da bilirrubina no intestino (NOGUCHI et al., 2002), podendo acarretar o aumento da atividade sérica desta enzima, o que concordaria com o aumento observado desta enzima na infecção de *R. norvegicus* com *E. paraensei*.

O aumento nos níveis de proteínas totais e globulinas séricas podem decorrer da resposta do sistema imunológico do hospedeiro (SCOTT, 2005). Não houve aumento significativo dos níveis de albumina. Casos de hipoalbuminemia, geralmente causada por lesão no parênquima hepático, concorrente com a diminuição da relação albumina/globulina, são estes achados comuns em casos de fasciolose subaguda ou crônica (SCOTT et al., 2005). Não foram observadas variações significativas nos níveis de glicose no soro e glicogênio no fígado dos animais infectados. Manga-González et al. (2004) não observaram alterações nos valores de proteínas totais e glicose e assim como pequeno aumento nos níveis de albumina em animais infectados com *D. dendriticum*.

Pode-se concluir que o estabelecimento da infecção por *E. paraensei* em *R. norvegicus* causa a elevação dos níveis séricos de ALT, AST, GGT, bilirrubina e ALKP na primeira semana de infecção. Em resposta à infecção foram observadas alterações no tecido hepático, provavelmente, devido a uma obstrução do ducto biliar. Os níveis séricos de proteínas totais e globulinas foram reduzidos na primeira semana de infecção, elevando-se daí por diante e atingindo valores próximos aos normais (grupo controle – não infectado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOLO, A.; BORGES, D.R., Enzimologia clínica em doenças do fígado. Rev. Coll. Patol. Clin 25, 95-98. 1989.
- BAIN, B. J., Células Sanguíneas um guia prático. 2ª Ed. São Paulo, Artes Médicas. 1997.
- DEMENT'EV, I. S., SERIKBAEVA, B. K., KARABAEV, D.K., The effect of vitamin C and cobalt chloride on the pathological process in dicrocoeliasis in sheep (in Russian). Tr Kaz Nauchno-Issled. Vet Inst. 17, 79–81. 1978.
- FRIED, B., GRACZYK, T. K., Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer, Dordrecht, pp. 245-266. 2000.
- FUJINO, T., FRIED, B., TADA, I., The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal cytopathology in conventional and congenitally athymic balb/c mice. Parasitology. 106, 297-304. 1993.
- GRACZYK, T. K., FRIED, B., Echinostomatiasis: A common but forgotten food-borne disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58: 501-504. 1998.
- GRACZYK, T. K., FRIED, B., Helminth biology, adaptation, transmission, and survival. Recent Res Devel Microbiology, 5:171-185. 2001.
- HANSEN, K.; NIELSEN, J. W.; HINDSBO, O.; CHRISTENSEN, N. O., *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. Parasitol. Res.. 77, 686-690. 1991.
- HUMASON, G. L., Animal Tissue Techniques. 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA, 661 pp. 1979.
- KAPLAN, M. M., In: Schiff, L., Schiff, E. R. (Editors). Diseases of the Liver., J. L. Lippincott., Philadelphia. 219-260. 1987.
- LIE, K. J.; BASCH, P. F., The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). J. Parasitolol.. 53: 1192-1199. 1967.
- LORENZI, T. F., Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. Ed. Médica e Científica. 1992.
- MALDONADO JR, A.; LOKER, E. S.; MORGAN, J. A. T.; REY, L.; LANFREDI, R. M., Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. Parasitol. Res.. 87: 840-848. 2001a.

- MALDONADO JUNIOR, A.; COURA, R.; GARCIA, JUBERLAN SILVA.; LANFREDI, REINALDA MARISA.; REY, LUIS., Changes on *Shistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae).. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Brasil, v. 96, n. Suppl. I, p. 193-198. 2001b.
- MALDONADO JÚNIOR, A.; ZEITONE, B. K. DO C.; AMADO, L. A.; ROSA, I. F.; SILVA, J. R. M. ; LANFREDI, R. M., Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. J. Helminthol..79: 1-8. 2005.
- MALDONADO JR, A.; GENTILE, R.; FERNANDES-MORAES, C. C.; D'ANDREA, P. S.; LANFRED, R. M.; REY, L., Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. Journal of Helminthology. 80, 369-375. 2006.
- MALDONADO JUNIOR, A.; LANFREDI, R. M., Echinostomes in the Wild. In: Bernard Fried; Rafael Toledo (Org). The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community. Springer, v. 6, p. 129-145. 2008.
- MANGA-GONZÁLEZ, M. Y.; FERRERAS, M. C.; CAMPO, R.; GONZÁLEZ-LANZA, C.; PÉREZ, V.; GARCÍA-MARÍN, J. F., Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Parasitol Res. 93: 344–355. 2004.
- MARKELL, E. K., VOGEL, M., JOHN, D. T., 7^a ed. W. B. Saunders Company, Pennsylvania, USA. Medical Parasitology. 463p. 1992.
- MINCHELLA, D. J., Host life-history variation in response to parasitism. Parasitol, 90:205-216. 1985.
- MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. Enzymes., In Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, Eds. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 735-896, 1994.
- NOGUCHI, A., REIS, J. M. C., DIAS, C. S., EPAMINONDAS, W. A., AZEVEDO, P. S. R., BRITO, M. V. H., Serum levels of aminotransferases, bilirrubins and gamma-glutamyltranspeptidase after copaiba oil administration in rats. Acta Cir Bras. 17, 1-8. 2002.
- ODAIBO, A. A.; CHRISTENSEN, N. O.; UKOLI, F. M. A., Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* in NMRI mice, Proc. Helminthol. Soc. Washington. 56, 192-198. 1989.
- OLSEN, O.W., Parasitologia Animal. I. El Parasitismo y los Protozoa. Editorial AEDOS. Barcelona, España. 284p. 1977.

- PINHEIRO, J.; GOMES, E. M., A method for glycogen determination in mollusks. Arq. Bras. Biol. Tecnol. 37, 569-576. 1994.
- REJ, R., Clinical Chemistry. 24, 1971-1979. 1971.
- SCOTT, P. R., SARGISON, N. D., MACRAE, A., RHIND, S. R., An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: ultrasonographic biochemical and histological studies. Vet. J. 170, 325-331. 2005.
- SIANTO, L.; REINHARD, K.J.; CHAME, M.; CHAVES, S.; MENDONÇA, S.; GONÇALVES, M.L.; FERNANDES, A.; FERREIRA, L.F.; ARAÚJO A., The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600-1,200 years before present. J. Parasitol. 91(4), 972-5. 2005.
- THOMAS, F., POULIN, R., GUÉGAN, P.F., MICHALAKIS, Y., RENAUD, F., Are there pros as well as cons to being parasitized. Parasitol. Today, 16:533-536. 2000.
- TOLEDO, R.; ESPERT, A.; CARPENA, I.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; FRIED, B.; ESTEBAN, J. G., The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. Parasitol. Res.. 93, 439-444. 2004^a.
- TOLEDO, R.; ESPERT, A.; CARPENA, I.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; MARCILLA, A.; FRIED, B.; ESTEBAN, J. G., Kinetics of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antigens in feces and serum of experimentally infected hamsters and rats. J. Parasitol.. 90, 752-758. 2004b.
- TOLEDO, R.; FRIED, B., Echinostomes as experimental models in adult parasite-vertebrate host interactions. Trends in Parasitology. 21, 251-254. 2005.
- TOLEDO, R.; CARPENA, I.; ESPERT, A.; SOTILLO, J.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.G., A quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. J. Parasitol. 92, 16-20. 2006.
- TRAIL, D. R. S., Behavioral interactions between parasites and hosts: host suicide and the evolution of complex life cycles. The American Naturalist, 116:77-91. 1980.
- WEINSTEIN, M. S.; FRIED, B., The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. Int. J. Parasitol.. 21, 255-257. 1991.

4 . CAPÍTULO II
**Anemia na infecção aguda provocada por *Echinostoma paraensei* (TREMATODA:
ECHINOSTOMATIDAE) em *Rattus norvegicus* (Wistar)**

Anemia na infecção aguda provocada por *Echinostoma paraensei* (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE) em *Rattus norvegicus* (Wistar)

RESUMO

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram infectados com *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). Cada roedor foi inoculado com 150 metacercárias, o sangue foi coletado semanalmente, até a quinta semana após infecção. Os glóbulos vermelhos, o hematócrito e os níveis de hemoglobina nos animais infectados evidenciaram valores significativamente mais baixos do que o grupo controle não infectados na primeira semana, sugerindo o desenvolvimento de uma anemia normocítica e normocrômica com alteração anisocítica. Não foi observado entre os grupos aumento no número de eosinófilos. A desnutrição resultante de alterações metabólicas, má absorção, hemorragia associada com danos às vilosidades intestinais e diminuição de ferro podem estar envolvidos com o desenvolvimento da anemia em ratos. Efeitos patológicos das infecções por echinostomas nos animais pode variar em função da carga parasitária.

ABSTRACT

Laboratory rats (*Rattus norvegicus*) were infected with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: *Echinostomatidae*). The rodents received 150 metacercariae each, serum samples were collected weekly until the fifth week of infection. Red blood cells, the haematocrit and the haemoglobin levels in infected animals at the first week evidenced values significantly lower than the control uninfected, suggesting the development of a normocytic and normochromic anaemia with anisocytic alteration. No increase in number of eosinophils was noted among the groups. Malnutrition resulting from metabolic changes, malabsorption, hemorrhage associated with damage to the intestinal villi and depletion of iron can be involved to the development of anaemia in rats. Pathological effects of echinostome infections in animals varies depending on the worm burden.

1. Introdução

Os equinostomatídeos possuem extensa distribuição geográfica e infectam grande número de animais silvestres e domésticos, inclusive o homem, portanto apresentam importância médica e veterinária (FRIED; GRACZYK, 2000). A equinostomose humana tem sido relacionada a, no mínimo, 16 espécies de trematódeos intestinais. Entre os países em que este parasitismo é endêmico estão a China, Índia, Coreia, Malásia, Filipinas e Indonésia. Nas áreas endêmicas, a transmissão do parasito ocorre de forma focal e está associada a determinadas práticas sócio-econômicas e culturais. A infecção ocorre através da ingestão de moluscos, peixes, crustáceos e anfíbios crus ou mal cozidos nos quais as metacercárias se encontram encistadas (GRACZYK; FRIED, 1998).

No Brasil, ovos de *Echinostoma* sp. foram relatados em fezes obtidas de corpos humanos parcialmente mumificados datadas entre 600 e 1200 anos passados (SIANTO et al., 2005). Entretanto, nenhum caso de infecção humana foi assinalado recentemente, apesar de terem sido encontrados parasitando animais de interesse comercial tais como: porco doméstico, galinha, pato e animais de companhia (cão), além de aves (LUTZ, 1924) e roedores silvestres, indicando grande potencial zoonótico (MALDONADO Jr et al., 2005; MALDONADO Jr; LANFREDI, 2008).

Echinostoma paraensei Lie & Basch, 1967 é uma espécie brasileira de equinostomas descrita através do ciclo experimental, após o encontro de *Biomphalaria glabrata* naturalmente infectada, sendo o roedor silvestre *Nectomys squamipes* posteriormente assinalado como seu hospedeiro definitivo natural (MALDONADO Jr et al., 2001b). O verme adulto localiza-se no trato gastrointestinal (duodeno) do hospedeiro definitivo onde atinge a maturidade sexual (NOLLEN, 1996) e eventualmente é capaz de migrar para o ducto biliar (MALDONADO Jr et al., 2005).

Echinostoma paraensei tem sido usado como modelo experimental, tendo como abordagem a relação parasito-hospedeiro (MALDONADO Jr et al., 2001b). Apesar do avanço do conhecimento na área da patologia produzida pela infecção experimental (TOLEDO; FRIED, 2005), pouco é conhecido sobre as modificações bioquímicas resultantes da infecção.

O presente estudo teve como objetivo determinar os parâmetros hematológicos na infecção aguda experimental por *E. paraensei* em *Rattus norvegicus* (Wistar).

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos Parasitos e Infecção Experimental

As metacercárias utilizadas para a infecção foram obtidas de *Biomphalaria glabrata* (isolado de Sumidouro, RJ), criadas em laboratório e infectadas experimentalmente. O isolado de *E. paraensei* utilizado foi obtido do roedor silvestre *Nectomys squamipes* naturalmente infectado, proveniente do município de Sumidouro, RJ (22°02'46'' S, 42°41'21'' W) e o ciclo vem sendo mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC, FIOCRUZ, RJ através de passagens em hamster *Mesocricetus auratus* como hospedeiro definitivo e *B. glabrata* como 1^o e 2^o hospedeiros intermediários.

Hamsters adultos infectados com *E. paraensei* foram submetidos à eutanásia em câmara enriquecida com CO₂, segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA L-074/08), e os vermes adultos coletados do intestino delgado e transferidos para placas de Petri contendo solução salina fisiológica a 0,9%. O útero do helminto foi dissecado para liberação dos ovos, os quais foram lavados e incubados em água desclorada, a 26°C, por 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à luz de uma lâmpada de 100W para estimular a eclosão dos miracídios.

Duzentas *B. glabrata* foram submetidas individualmente à infecção com 10 miracídios de *E. paraensei* e após 26 dias expostas à luz artificial para o estímulo a emergência de *ollusks*. As cercaria,s assim obtidas, foram colocadas em contato com outros moluscos da mesma espécie para a obtenção das metacercárias.

2.2. Delineamento experimental

Foram utilizadas 50 fêmeas adultas de *Rattus norvegicus* (Wistar) divididas em dois grupos: um com 35 animais infectados individualmente com 150 metacercárias de *E. paraensei* e o outro grupo controle não infectado com 15 animais. Semanalmente, sete animais infectados e três animais controle foram submetidos à eutanásia por exposição à atmosfera enriquecida com CO₂ e o sangue coletado através de punção cardíaca.

2.3. Análises hematológicas

O sangue foi coletado em microtubos de 500µl heparinizados, e as análises constaram do estudo das série vermelha (eritrograma) e branca (leucograma). No eritrograma foi feita a dosagem de hematócrito, hemoglobina, plaquetas, hemácias, do VCM – volume corpuscular médio, da HCM – hemoglobina corpuscular média e da CHCM – concentração da hemoglobina corpuscular média. No leucograma contaram-se os leucócitos e fez-se a contagem da diferenciação celular utilizando Capiject – dipotássico-EDTA tubos de coleta de sangue capilar e analisadas por um sistema totalmente automatizado para hematologia veterinária ABX ABC Vet (Horiba ABX, França Montpellier). Para a contagem de leucócitos, uma parte das amostras de sangue foram preparados e tratadas para May-Grunwald Giemsa.

2.4. Análise Estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) para determinar as diferenças entre os grupos e o teste de Tukey-Kramer para comparação entre as médias dos pares por cada semana, utilizando o programa Graph Pad Prism, Prism Inc, V.5.00.288. Valores menores do que ($P < 0.05$) foram considerados significantes.

3. Resultados

Todos os animais expostos à metacercárias estavam infectados na primeira semana, e os helmintos foram recuperados até o final da terceira semana de infecção.

Os parâmetros hematológicos dos ratos infectados com *E. Paraensei* e o grupo controle estão resumidos na Tabela 1, indicando que o número de eritrócitos do sangue, o hematócrito e os níveis de hemoglobina nos animais infectados na primeira semana evidenciaram valores significativamente inferiores ao controle ($P < 0,05$). Estes parâmetros sugerem o desenvolvimento de uma anemia normocítica e normocrômica com alteração anisocítica. Quando o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas dos animais infectados e não infectados foram comparados não foi observada diferença significativa.

Tabela 1. Análises hematológicas– Média e desvio-padrão, de *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentalmente infectados com *Echinostoma paraensei*.

| Parâmetros | Controle | Periodo de infecção (Semanas) | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| Eritrócitos (/mm ³) | 6.751 ± 0.973 ^{ac} | 5.538 ± 0.973 ^b | 6.240 ± 0.529 ^{ab} | 5.916 ± 0.470 ^{ab} | 5.704 ± 1.436 ^{ab} | 6.986 ± 0.408 ^{cd} |
| Hematocrito (%) | 40,810 ± 5,097 ^a | 33,713 ± 4,372 ^b | 38,263 ± 2,682 ^{ab} | 34,975 ± 2,636 ^{ab} | 33,063 ± 8,314 ^{cb} | 39,763 ± 1,894 ^{ab} |
| Hemoglobina (g/dL) | 14,790 ± 1,898 ^a | 12,088 ± 1,334 ^b | 14,025 ± 1,038 ^{ab} | 13,813 ± 0,822 ^{ab} | 13,425 ± 1,961 ^{ab} | 14,838 ± 0,853 ^a |
| VCM (fm ³) | 60,70 ± 1,90 ^a | 60,625 ± 1,302 ^a | 61,500 ± 2,268 ^a | 59,250 ± 1,389 ^{ab} | 58,000 ± 0,926 ^b | 57,000 ± 1,195 ^b |
| HCM (pgL) | 21,980 ± 0,909 ^{ab} | 21,850 ± 0,733 ^{ab} | 22,400 ± 1,344 ^{ab} | 23,438 ± 1,528 ^{ab} | 24,113 ± 3,316 ^a | 21,250 ± 0,798 ^b |
| CHCM (g/dL) | 36,290 ± 1,159 ^a | 35,950 ± 1,358 ^a | 36,700 ± 2,124 ^a | 39,575 ± 2,229 ^{ab} | 41,588 ± 5,849 ^b | 37,338 ± 1,208 ^a |
| Plaquetas (/mm ³) | 714,10 ± 112,21 ^a | 641,13 ± 243,02 ^a | 747,50 ± 87,13 ^a | 747,13 ± 122,92 ^a | 652,38 ± 66,72 ^a | 726,25 ± 104,25 ^a |

VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P <0,05).

As análises da série branca do sangue não revelaram alterações significativas no número de eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos dos animais infectados e não infectados. Entretanto, houve uma diferença significativa nos leucócitos na terceira semana após a infecção em relação aos outros grupos. Os basófilos tiveram aumento significativo na segunda semana em relação a primeira semana, quarta e quinta, embora quando comparados ao grupo controle não foi detectada diferença significativa (Tabela 2).

Tabela 2 . Análises hematológicas (WBC) em *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentalmente infectados com *Echinostoma paraensei*. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P <0,05).

| Parâmetros | Controle | Período de infecção (Semanas) | | | | |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a |
| Leucocitos (mm ³) | 0,800 ± 0,240 ^a | 0,725 ± 0,266 ^a | 0,738 ± 0,226 ^a | 0,588 ± 0,173 ^b | 0,688 ± 0,259 ^a | 0,850 ± 0,200 ^a |
| Linfócitos (%) | 66,700 ± 9,810 ^a | 74,125 ± 11,180 ^a | 72,250 ± 5,574 ^a | 72,000 ± 8,928 ^a | 60,000 ± 19,669 ^a | 64,750 ± 11,659 ^a |
| Monócitos (%) | 0,170 ± 0,134 ^a | 1,500 ± 3,843 ^a | 0,225 ± 0,219 ^a | 0,150 ± 0,120 ^a | 0,250 ± 0,302 ^a | 0,250 ± 0,233 ^a |
| Eosinófilos (%) | 0,100 ± 0,115 ^a | 0,0125 ± 0,035 ^a | 0,0375 ± 0,074 ^a | 0,000 ± 0,000 ^a | 0,088 ± 0,099 ^a | 0,100 ± 0,169 ^a |
| Neutrófilos (%) | 19,470 ± 8,905 ^a | 13,375 ± 12,690 ^a | 10,750 ± 9,658 ^a | 12,500 ± 9,881 ^a | 24,788 ± 20,031 ^a | 18,375 ± 6,479 ^a |
| Basófilos (%) | 0,180 ± 0,175 ^{a b} | 0,063 ± 0,074 ^a | 0,438 ± 0,316 ^b | 0,325 ± 0,349 ^{a b} | 0,100 ± 0,076 ^a | 0,100 ± 0,107 ^a |

4. Discussão

Os estudos experimentais realizados para avaliar as alterações metabólicas durante o curso da infecção com o “modelo Echinostoma” em roedores são ainda incompletos e não permitem generalizações sobre a relação entre os helmintos intestinais e hospedeiros vertebrados. Tem sido demonstrado experimentalmente que *R. Norvegicus* apresenta baixa suscetibilidade à infecção por Echinostoma spp, apenas desenvolvendo a fase aguda da doença. (HANSEN et al., 1991., TOLEDO et al., 2004^a., TOLEDO et al., 2006).

Esta é a primeira vez que os parâmetros hematológicas em ratos infectados experimentalmente com *E. Paraensei* foram observados.

A anemia é um estado mórbido, onde pode haver uma diminuição da quantidade de hemoglobina circulante. Raramente, a anemia é um distúrbio primário, aparecendo mais como uma manifestação secundária de uma doença em algum outro órgão ou sistema. Para o diagnóstico da anemia se faz necessário a realização de exames laboratoriais, como a verificação do hematócrito, a taxa de hemoglobina e o número de eritrócitos por mm³ de sangue (LORENZI, 1992)

A redução ocorrida no hematócrito, hemácias, hemoglobina são parâmetros utilizados para confirmar a ocorrência da anemia na primeira semana de infecção, Valero et al. (2008) observaram o mesmo em roedores infectados com *Fasciola hepatica*. Diferentemente, Huffman et al., (1988^a) observaram em hamsters infectados com *E. Revolutum* e *E. Liei* um aumento na concentração de hemoglobina. A desnutrição resultante de alterações metabólicas e a deficiência na absorção de nutrientes podem estar envolvidos na promoção da anemia. Além disso, a hemorragia associada com danos às vilosidades intestinais causadas pelos hemintos (HUFFMAN et al., 1988b), mais as rápidas mudanças sugere que outros fatores possam contribuir para a diminuição de glóbulos vermelhos. (KAUSAR et al., 1985).

Bindseil e Christensen (1984) mostraram que os efeitos patológicos das infecções por Echinostoma no hospedeiro vertebrado pode variar de acordo com a carga parasitária. No caso de infecção por nematóides Stear (1995), Rahaman e Collins (1990) atribuíram a redução dos parâmetros hematológicos à hemorragia provocada nos locais onde esses vermes ficam fixados, e a depleção de ferro (SILVERMAN, 1970). No entanto, é difícil explicar como essas mudanças foram mostradas em um período tão curto de tempo.

Eosinofilia é uma característica comum nas infecções por helmintos e está envolvida diretamente com a resposta imune (ROTH; LEVY, 1980; MATANOVIÉ et al., 2007). Entretanto, no presente estudo não foi observado, provavelmente devido ao longo período necessário para este trematódeo estimular a resposta imune. Huffman et al. (1988) também não observaram aumento nos eosinófilos em hamsters infectados com *E. Trivolvis*.

O fato do helminto não fazer migrações fora do aparelho digestório, o torna menos agressivo para o hospedeiro, sensibilizando menos o roedor.

Embora, *E. Paraensei* seja um parasito gastrointestinal, ele foi capaz de produzir alterações hematológicas em *R. Norvegicus* causando anemia. Este sistema pode ser, portanto, um modelo útil para estudar os efeitos diretos e indiretos de uma infecção gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BINDSEIL, E., CHRISTENSEN, N. O. Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. *Parasitology* 88, 431-438. 1984.
- DE MAEYER, E.M., DALLMAN, P., GURNEY, J.M., MHALLBERG, L.; SOOD, S.K., SRIKANTIA, S.G. Preventing and Controlling Iron Deficiency Anemia Through Primary Health Care: A Guide for Health Administrators and Programme Managers. WHO, Geneva. 1989.
- FRIED, B., GRACZYK, T. K., Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer, Dordrecht, pp. 245-266. 2000.
- GRACZYK, T. K., FRIED, B. Echinostomatiasis: A common but forgotten food-borne disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 501-504. 1998.
- HANSEN, K., NIELSEN, J. W., HINDSBO, O., CHRISTENSEN, N. O. *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. *Parasitol. Res.* 77, 686-690. 1991.
- HUFFMAN, J. E., ALCAIDE, A., FRIED, B. Single and concurrent infections of the Golden hamster, *Mesocricetus auratus*, with *Echinostoma revolutum* and *E. liei* (Trematoda: Digenea). *J. Parasitol.* 74: 604-608, 1988a.
- HUFFMAN, J. E., IGLESIAS, D., FRIED, B. *Echinostoma revolutum*: Pathology of extraintestinal infection in the Golden Hamster. *Int. J. Parasitol.* 18: 873-874, 1988b.
- KAUSAR, J. C., SCOFIELD, A. the influence of level of infection of rats with *Nippostrongylus brasiliensis* on the haematology and phospholipase activity and mast cell numbers in the small intestine and colon. *Int. J. Parasitol.*, 15, 55-60. 1985.
- MALDONADO Jr, A., LOKER, E. S., MORGAN, J. A. T., REY, L.; LANFREDI, R. M. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol. Res.*, 87: 840-848. 2001a.
- MALDONADO Jr, A., COURA, R., GARCIA, J. S., LANFREDI, R. M., REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Brasil*, 96, Suppl. I, 193-198. 2001b.

- MALDONADO Jr, A.; ZEITONE, B. K. C., AMADO, L. A., ROSA, I. F., SILVA, J. R. M., LANFREDI, R. M. Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. J. Helminthol. 79: 1-8. 2005.
- MALDONADO Jr, A., LANFREDI, R. M. Echinostomes in the Wild. In: Bernard Fried; Rafael Toledo (Org). The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community. Springer, v. 6, p. 129-145. 2008.
- MANTANOVIĆ, K.; SEVERIN, K.; MARTINKOVIĆ, F.; SIMPRAGA, M.; JANICKI, Z.; BARISIĆ, J. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitol Res. 101: 1657-1661. 2007.
- NOLLEN, P.M. Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* in concurrent infections in mice. J. Helminthol. 70, pp 133-136. 1996.
- RAHMAN, W. A., COLLINS, G.H. 1990. Changes in live weight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheepderived strain of *Haemonchus contortus*. British Vet. J., 146, 543-550. 1990.
- ROTH, R. L., LEVY, D.A. *Nippostrongylus brasiliensis*: Peripheral leucocyte responses and correlation of basophilis with blood histamine concentrations during infection in rats. Exptl Parasitol. 50: 331-341. 1980.
- SIANTO, L., REINHARD, K.J., CHAME, M., CHAVES, S., MENDONÇA, S., GONÇALVES, M.L., FERNANDES, A., FERREIRA, L.F., ARAÚJO A. The finding of Echinostoma (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600-1,200 years before present. J. Parasitol. 91, 972-5. 2005.
- SILVERMAN, P., MANSFIELD, M. E., SCOTT, H. L. *Haemonchus contortus* infection in sheep: effects of various levels of primary infections on nontreated lambs. American J. Vet. Res. 31, 841-854. 1970.
- STEAR, M. J., BAIRDEN, K., DUNCAN, J.L. A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. Vet. Parasitol. 60, 69-81. 1995.
- TOLEDO, R. ESPERT, A., CARPENA, I., MUÑOZ-ANTOLI, C., FRIED, B., ESTEBAN, J. G. The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. Parasitol. Res., 93, 439-444. 2004a.
- TOLEDO, R. FRIED, B. Echinostomes as experimental models in adult parasite-vertebrate host interactions. Trends in Parasitology. 21, 251-254. 2005.

- TOLEDO, R., CARPENA, I., ESPERT, A., SOTILLO, J., MUÑOZ-ANTOLI, C., ESTEBAN, J.G. A quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. J. Parasitol. 92, 16-20. 2006.
- VALERO, M. A.; GIRONÈS, N.; GARCÍA-BODELÓN, M. A.; PERIAGO, M. V.; CHICO-CALERO, I.; KHOUBBANE, M.; FRESNO, M.; MAS-COMAS, S. Anaemia in advanced chronic fasciolosis. Acta Tropica 108, 35-43. 2008.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- 1 – No período inicial (1ª e 2ª semana) da infecção por *E. paraensei* ocorreram alterações no tecido hepático, acarretando elevações nos níveis séricos de ALT, AST, GGT, bilirrubina e ALKP, enquanto que os níveis de proteínas totais e globulinas foram reduzidos.
- 2 – Os roedores (*R. norvegicus*) infectados por *E. paraensei* desenvolveram anemia, a qual foi classificada como normocítica normocrômica, apresentando anisocitose. Esta infecção não provocou alterações na série branca (WBC) do sangue dos hospedeiros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUSSALAM, M. K.A., FERSTEIN, F.K., MOTT, K.E. Food safety measures for the control of food borne trematode infections. *Food Control* 6:71–79, 1995.
- ALMEIDA, T. V. Hematologia. In: Moura, R. A., Wada, C. S., Purchio, A., Almeida, T. V. *Técnicas de Laboratório*. Liv. Atheneu, Rio de Janeiro, RJ. p. 333-414. 1987.
- ANDRIOLO, A., BORGES, D.R. Enzimologia clínica em doenças do fígado. *Rev. Bras. Patol. Clin* 25, 95-98. 1989.
- BECK, W. S., *Hematology*. 2nd ed. The MIT Press. 1997.
- BITTENCOURT, P.L., DA SILVA, L.C. Fígado e drogas. In: *Fígado e drogas: Compêndio de Hepatologia*. 2 ed. São Paulo, p 264-85. 1985.
- BLACK, M., BILLING, B. H. Hepatic bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome. *New Eng. J. Med.* 280: 1266-1271, 1969.
- BONVICINO, C. R., LINDBERGH, S. M., MAROJA, L. S. Small non-flying mammals in altered and conserved areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz. J. Biol.*, v.62, n. 4, p.1-12. 2002.
- D'ANDREA, P. S., LAGAMBA, R. Estudos Preliminares sobre a Ecologia de Populações de Pequenos Mamíferos em um Trato Florestal isolado na Fazenda Santa Carlota, Município de Cajuru, São Paulo. **Monografia de Bacharelado**. Faculdade Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. 1987.
- D'ANDREA, P. S., MAROJA, L. S., GENTILE, R., CERQUEIRA, R., MALDONADO JR., A. & REY, L. The oollusks of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology* 120: 573-582. 2000.
- DIXON, B.R., FLOHR, R.B. Fish- and shellfish-borne trematode infections in Canada. *Asian J Trop Med Public Health* 28:58–64. 1997.
- EMMONS, L. H., FEER, F. *Neotropical Rainforest Mammals – a field guide*. The University of Chicago Press. 307 p. 1997.
- ERNEST, K. A. *Nectomys squamipes*. *Mammalian species*. 265: 1 – 5. 1986.
- ERNEST, K. A.; MARES, M. A., Ecology of *Nectomys squamipes*, the Neotropical Water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. *J. Zool.*, 210: 599-612. 1986.
- FEVERY, J., BLANCKAERT, N. In Bircher, J, Benhamou, JP et al. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, Oxford Medical Publications, 1999.

- FRIED, B., GRACZYK, T.K., TAMANG, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitol Res* 93:159–170. 2004.
- FUJINO, T., FRIED, B., TADA, I. The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal cytopathology in conventional and congenitally athymic balb/c mice. *Parasitology*. 106, 297-304. 1993.
- GIBSON, D. I. Keys to Trematoda, Vol. 1. D. I. Gibson, A. Jones and R. A. Bray (eds), The Natural History Museum, London, UK. 544p. 2002.
- GRACZYK, T. K., FRIED, B. Echinostomatiasis: A common but forgotten food-borne disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 501-504. 1998.
- GRACZYK, T. K., FRIED, B. Helminth biology, adaptation, transmission, and survival. *Recent Res Devel Microbiology*, 5:171-185. 2001.
- HANSEN, K., NIELSEN, J. W., HINDSBO, O., CHRISTENSEN, N. O. *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. *Parasitol. Res.* 77, 686-690. 1991.
- HESSEL, G., DE SANTI NETO, D., COLLARES, E. F. Correlation between the severity of acute hepatic necrosis induced by acetaminophen and serum aminotransferases levels in rats fasted and sucrose-fed rats. *Brazilian J. Med Biol Res.* 29:793-6, 1996.
- HUFFMAN, J. E., ALCAIDE, A., FRIED, B. Single and concurrent infections of the Golden hamster, *Mesocricetus auratus*, with *Echinostoma revolutum* and *E. liei* (TREMATODA: DIGENEA). *J. Parasitol.* 74(4), pp. 604-608, 1988a.
- HUFFMAN, J. E., IGLESIAS, D., FRIED, B. *Echinostoma revolutum*: Pathology of extraintestinal infection in the Golden Hamster. *Int. J. Parasitol.*, 18, 873-874, 1988b.
- ISAACSON, A. C. Infectivity, growth, development and pathology of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in the golden hamster. *Int. J. Parasitol.* 19, 943-944. 1989.
- LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Ed. Sarvier, cap. 6 e 7, p. 134-195. 2000.
- LIE, K. J., BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *J. Parasitol.* 53: 1192-1199. 1967.
- LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. Parte especial: 1. Echinostomidae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 17: 55-73. 1924.
- MALDONADO JR, A., LOKER, E. S., MORGAN, J. A. T., REY, L., LANFREDI, R. M. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei*

- (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol. Res.* 87: 840-848. 2001a.
- MALDONADO Jr, A., COURA, R., GARCIA, J. S., LANFREDI, R. M., REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96, Suppl. I, 193-198. 2001b.
- MALDONADO Jr, A., ZEITONE, B. K. DO C., AMADO, L. A., ROSA, I. F., SILVA, J. R. M., LANFREDI, R. M. Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. *J. Helminthol.*, 79: 1-8. 2005.
- MALDONADO JR, A.; GENTILE, R.; FERNANDES-MORAES, C. C.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L., Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. *J. Helminthol.*, 80, 369-375. 2006.
- MALDONADO Jr, A., LANFREDI, R. M. Echinostomes in the Wild. In: Bernard Fried; Rafael Toledo (Org). *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*. Springer, v. 6, p. 129-145. 2008.
- MARKELL, E.K., VOGEL, M., JOHN, D.T. *Medical Parasitology*. 7^a ed. W. B. Saunders Company, Pennsylvania, USA. 463p. 1992.
- MINCHELLA, D.J. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitol*, 90:205-216. 1985.
- MONTENEGRO, M. R., FRANCO, M. *Patologia processos gerais*. 3^a Ed., Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, PP. 86-88. 1992.
- MOSS, D. W., HENDERSON, A. R. Enzymes., *In Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, Eds. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 735-896, 1994.
- MURATSUBAKI, H., SATAKE, K., YAMAMOTO, Y., ENOMOTO, K. Detection of serum proteins by native polyacrylamide gel electrophoresis using Blue Sepharose CL-6B-containing stacking gels. *Anal. Biochem.*, 307:337-340, 2002.
- NAOUM, P. C. *Eletroforese: técnicas e diagnósticos*. 2 ed. São Paulo: Santos, 1990.
- NIELSEN, C. **Animal Evolution. Interrelationships of the living Phyla**. University Press, Oxford, New York, USA. 565p. 1995.
- NOLLEN, P.M. Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* in concurrent infections in mice. *J. Helminthol.*, 70: 133-136. 1996.

- ODAIBO, A. A., CHRISTENSEN, N. O., UKOLI, F. M. A. Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* in NMRI mice, Proc. Helminthol. Soc. Washington. 56, 192-198. 1989.
- OLSEN, O.W. Parasitologia Animal. I. El Parasitismo y los Protozoa. Editorial AEDOS. Barcelona, España. 284p. 1977.
- PINHEIRO, J., GOMES, E. M. A method for glycogen determination in mollusks. Arq. Bras. Biol Tecnol. 37, 569-576. 1994.
- ROBERTS, L. S., JANOVY, J. R. J. Foundations of Parasitology. 5th edition. Wm. C. Brown Publishers. USA. 658p.1996.
- SEARCY, G. P. The differential diagnosis of anemia. Symposium on Clinical laboratory Medicine. The Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract., W. B., Saunders. Vol. 6, N. 4, pp. 981-1002. 1976.
- SIANTO, L., REINHARD, K. J., CHAME, M., CHAVES, S., MENDONÇA, S., GONÇALVES, M. L., FERNANDES, A., FERREIRA, L. F. ARAÚJO A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600-1,200 years before present. J. Parasitol.91(4), 972-5. 2005.
- SLIFKO, T. R., SMITH, H. V. ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol 30:1379–1393. 2000.
- SILVERMAN, L. M. CHRISTENSON, R. H. Aminoácidos e proteínas. In: Burtis, C. A., Ashwood, C. L. Tietz: Fundamentos de Química Clínica. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.18, p. 234-274. 1998.
- THOMAS, F., POULIN, R., GUÉGAN, P.F., MICHALAKIS, Y., RENAUD, F. Are there pros as well as cons to being parasitized. Parasitol. Today, 16:533-536. 2000.
- TIETZ, N.W. Ed. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3 rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1995.
- TOLEDO, R., ESPERT, A., CARPENA, I., MUÑOZ-ANTOLI, C., FRIED, B., ESTEBAN, J. G. The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. Parasitol. Res., 93, 439-444. 2004a.
- TOLEDO, R., ESPERT, A., CARPENA, I., MUÑOZ-ANTOLI, C., MARCILLA, A., FRIED, B., ESTEBAN, J. G. Kinetics of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antigens in feces and serum of experimentally infected hamsters and rats. J. Parasitol., 90, 752-758. 2004b.

- TOLEDO, R., FRIED, B. Echinostomes as experimental models in adult parasite-vertebrate host interactions. *Trends in Parasitology*. 21, 251-254. 2005.
- TRAIL, D. R. S. Behavioral interactions between parasites and hosts: host suicide and the evolution of complex life cycles. *The American Naturalist*, 116:77-91. 1980.
- VERRASTRO, T., LORENZI, T. F., WENDEL NETO, S. *Hematologia e Hemoterapia – Fundamentos de Morfologia, Fisiologia e Patologia Clínica*. Ed. Atheneu, São Paulo. 2002.
- WEINSTEIN, M. S., FRIED, B. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. *Int. J. Parasitol.*, 21, 255-257. 1991.
- YU, S., MOTT, K. Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections. *Trop Dis Bull* 91:125–152. 1994.

ANEXO

**BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL RESPONSES OF *Rattus norvegicus*
(WISTAR) INFECTED BY *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae)
J.S. Garcia, C.S. Hooper, R.O. Simões, M.A.J. dos Santos, A. Maldonado Jr, J.
Pinheiro**



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae)

Juberlan S. Garcia^{a,b}, Cleber S. Hooper^c, Raquel O. Simões^c, Marcos Antônio J. dos Santos^d, Arnaldo Maldonado Jr.^a, Jairo Pinheiro^{e,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Av. Brasil, 4365 Rio de Janeiro, RJ, CEP 21.045-900, Brazil

^b Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

^c Departamento de Controle de Qualidade Animal, Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^d Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Km 7, BR465, CEP 23.890-000 Seropédica, RJ, Brazil

^e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Km 7, BR465, CEP 23.890-000 Seropédica, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2010

Received in revised form 9 December 2010

Accepted 21 December 2010

Keywords:

Hepatic function
Aminotransferases
ALKP
Bilirubin
Globulin
Albumin

ABSTRACT

Tests were performed to evaluate the biochemical alterations in *Rattus norvegicus* after infection by the intestinal trematode *Echinostoma paraensei*. The rodents received 150 metacercariae each, serum samples were collected and the parasite load was quantified weekly until the fifth week of infection. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), gamma-glutamyl transferase (GGT), bilirubin, glucose, total proteins and fractions and hepatic glycogen were determined. All the animals exposed to the metacercariae were infected in the first week and worms were recovered up to the third week after infection. The levels of AST, ALT, GGT, bilirubin and globulin rose in the first and/or second week and declined thereafter to levels near those of the control group. In contrast, the level of total proteins in the plasma fell significantly in the first week while the ALKP activity went down only in the fourth and fifth weeks in relation to the control group. There was no significant difference in the levels of albumin, glycogen and glucose. Infection by *E. paraensei* in *R. norvegicus* causes changes in the hepatic function, possibly resulting from the cholestasis produced by the partial obstruction of the bile duct by the helminths.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The echinostomatidae are widely distributed geographically and infect a large number of wild and domestic animals, along with humans. Therefore, they are of great medical and veterinary interest (Fried and Graczyk, 2000).

Human echinostomiasis has been related to at least 16 species of intestinal trematodes. Among the countries

where these parasites are endemic are China, India, Korea, Malaysia, Philippines and Indonesia. In endemic areas, the parasite is usually focally transmitted and is associated with certain socioeconomic and cultural practices. The infection occurs from eating raw or poorly cooked snails, fish, crustaceans and amphibians in which the metacercariae are encysted (Graczyk and Fried, 1998).

In Brazil, eggs of *Echinostoma* sp. were reported in faeces obtained from partially mummified human bodies dated to between 600 and 1200 years ago (Sianto et al., 2005). However, no case of human infection has been reported recently, although Lutz (1924) recorded commercial animals found infected, such as pigs, chickens and

* Corresponding author. Tel.: +55 21 26814825; fax: +55 21 26823222.
E-mail address: jps@ufrj.br (J. Pinheiro).

ducks, along with dogs, wild birds and rodents, indicating significant zoonotic potential (Maldonado and Lanfredi, 2008).

Echinostoma paraensei Lie and Basch (1967) is a Brazilian species of echinostoma, described through an experimental life cycle, after finding naturally infected *Biomphalaria glabrata*. Further, the water rat *Nectomys squamipes* was indicated as its definitive natural host (Maldonado et al., 2001a). The adult worms were dispersed in the gastrointestinal tract (duodenum) of the definitive host, where it reaches sexual maturity (Nollen, 1996), after which some worms can migrate to the bile duct (Maldonado et al., 2001b). Despite the advances in knowledge of the pathologies produced by experimental infection (Toledo and Fried, 2005) little is known about the biochemical changes resulting from infection by echinostomatids. In clinical laboratory studies of humans, the enzymes used to evaluate hepatopathies are alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALKP) and gamma-glutamyl transferase (GGT). In general, the increase of these aminotransferases levels indicates the occurrence of hepatocellular lesions and increases of ALKP and GGT indicates the occurrence of cholestasis or enzymatic induction (Andriolo and Borges, 1989). The aim of this study was to determine the histological and biochemical parameters in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected by *Echinostoma paraensei*.

2. Materials and methods

2.1. Parasite and experimental infection

The isolate of *E. paraensei* used was obtained from specimens of *N. squamipes* that were naturally infected, captured in the municipality of Sumidouro, Rio de Janeiro state (22°02'46"S, 42°41'21"W), after which the cycle was maintained in the Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (IOC) FIOCRUZ—Rio de Janeiro (Brazil), by passages in hamsters (*Mesocricetus auratus*) as the definitive host and *B. glabrata* as the first and second intermediate hosts. The metacercariae utilized for infection were obtained from *B. glabrata* (Sumidouro isolate), raised in the laboratory and experimentally infected.

Adult hamsters infected with *E. paraensei* were euthanized in a CO₂ chamber, according to the protocol approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA L-074/08). The adult worms were collected from the small intestine and transferred to Petri dishes containing a 0.9% physiological saline solution. The helminthes uterus was dissected to release the eggs, which were washed and incubated in dechlorinated water at 26 °C for 14 days. After this period, the eggs were exposed to light under a 100-W incandescent lamp to stimulate hatching of the miracidia.

Two hundred *B. glabrata* specimens were individually infected with 10 *E. paraensei* miracidia each and after 26 days were exposed to artificial light to stimulate emergence of the cercariae. The cercariae were then placed in contact with other snails of the same species to encyst and obtain the metacercariae.

2.2. Experimental design

A total of 50 adult female rats (Wistar) were divided into two groups: the treatment group, infected individually with 150 *E. paraensei* metacercariae, and the control group, free of infection. Seven infected and three control animals were euthanized weekly, until the fifth week of infection, as described above. The experimental infection was made in duplicate ($n = 100$).

The blood was collected by cardiac puncture and the serum was separated by centrifuging at 1200 × g. For the histopathological analyses, the liver was fixed in Dubosq-Brasil solution for 24 h, after which the material was transferred to 70% alcohol and preserved for future use.

To measure the glycogen levels, 1 g of liver tissue was collected, always from the same hepatic lobe of all the animals.

2.3. Liver histopathology

Fragments of livers from the necropsied animals were dehydrated in an ethanol crescent series with xylol and imbedded in paraffin. The thin section were obtained using 5 μm and stained with hematoxylin–eosin (Humason, 1979). These images were obtained using Nikon Coolpix 4300.

2.4. Biochemical determination

The biochemical determination of laboratory hepatic function included the detection of AST EC2.6.1.1, ALT EC2.6.1.2, ALKP EC3.1.3.1, bilirubin, glucose and total and fractional proteins using an automated system at the Laboratório de Controle de Qualidade do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL – Fiocruz). A commercial diagnostic kit (Dole's Reagents, Ltda., Brazil) was used to determine the activity of gamma-glutamyl transferase (GGT) EC2.3.2.2. The hepatic glycogen was extracted by the technique described by Pinheiro and Gomes (1994) and determined by the 3,5 DNS technique (Pinheiro and Amato, 1994).

2.5. Statistical analysis

Variance analysis (one-way ANOVA) was used to determine the differences between the groups and the Tukey–Kramer test was employed to compare the pairwise differences in means each week, using the Graph Pad Prism program (V.5.00.288, Prism Inc., USA). Values with $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

All the animals exposed to the metacercariae were infected in the first week, and worms were found up to the end of the third week of infection (Table 1). The percentage of worms recovered in the first week was 63.70% of the number of metacercariae administered, a significantly higher rate than in the following weeks. The worms were progressively eliminated starting in the first week after infection, with rates of 23.1% and 13.2% in the second

Table 1Mean and standard deviation of adult worms (*Echinostoma paraensei*) loaded from *Rattus norvegicus* (Wistar) through 5 weeks of infection.

| Period of infection (weeks) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---|---|
| Worms loaded (X ± SD) | 59.87 ± 22.14 | 21.75 ± 31.65 | 12.37 ± 21.12 | 0 | 0 |

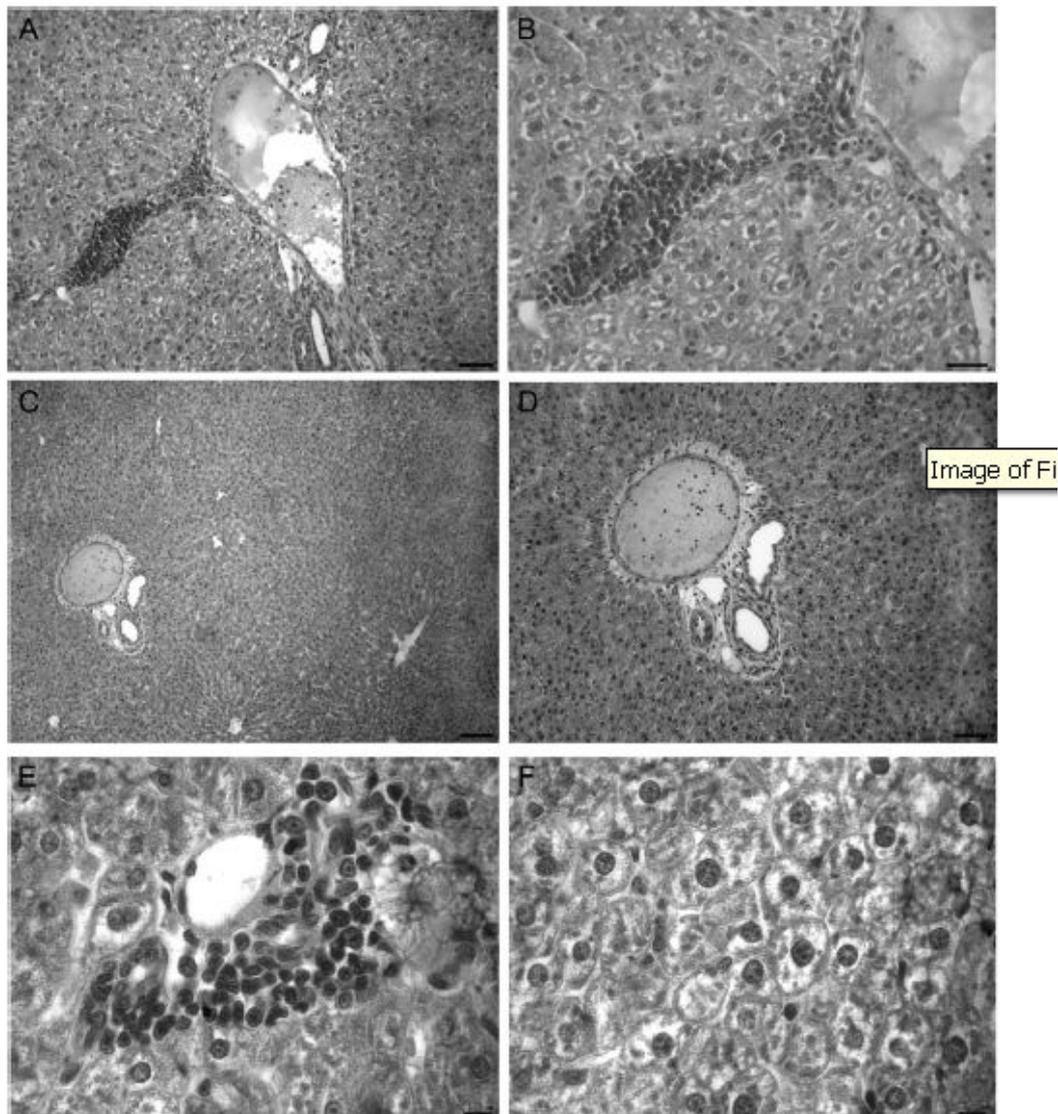


Fig. 1. Histological changes in liver *Rattus norvegicus* infected with *Echinostoma paraensei*. (a and b) The hepatocytes with infiltration of polymorphonuclear. (c and d) Portal space with estasis and inflammatory cells in the lumen of the vessel. (e and f) Hepatocytes had rounded edges, pyknotic nuclei, karyorrhexis and karyolysis, mild infiltration of polymorphonuclear and sinusoids slightly expanded. The hepatocytes were vacuolated with discrete perivascular and periportal lymphocytic infiltration expanded. Staining: HE. (a, e and f) Scale bar = 50 μm; (b) scale bar = 30 μm; (c) scale bar = 10 μm.

and third weeks post infection, respectively. The number of worms recovered in the first week of infection ranged from 29 to 91. The hepatocytes had rounded edges, with signs of impaired nuclear (pyknotic nuclei, karyorrhexis

and karyolysis), mild infiltration of polymorphonuclear and sinusoids slightly expanded. The hepatocytes were vacuolated with discrete perivascular and periportal lymphocytic infiltration (Fig. 1a–f).

Please cite this article in press as: García, J.S., et al., Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Vet. Parasitol.* (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.040

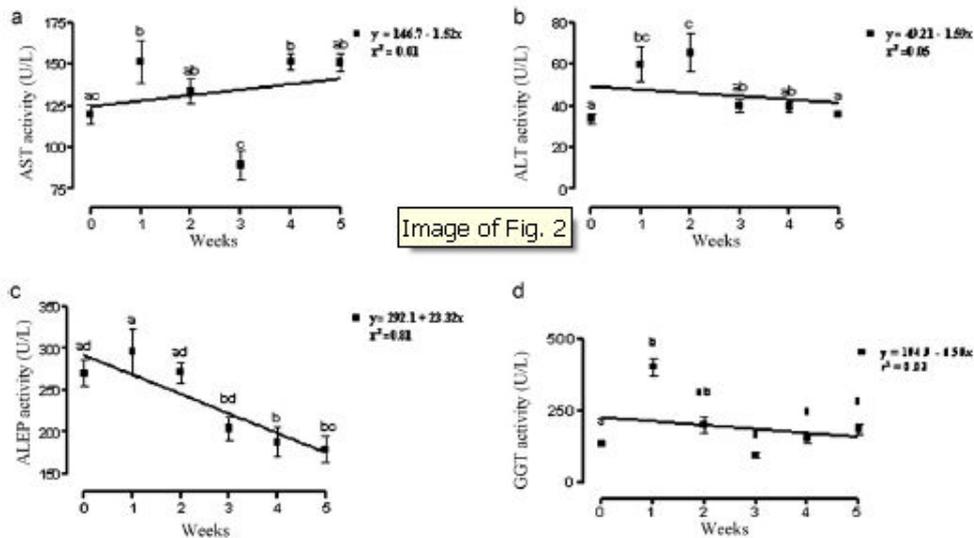


Fig. 2. Biochemical alterations in the serum of *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *Echinostoma paraensei*. (a) Mean values of aspartate aminotransferase (AST). (b) Mean values of alanine aminotransferases (ALT). (c) Mean values of alkaline phosphatase (ALKP). (d) Mean values of γ -glutamyl transferase (GGT). ^{a,b,c}Different letters indicate significant differences between values ($\alpha = 5\%$).

The AST activity significantly increased in the first week after infection, with a level 81.97% higher than in the control group ($q = 4.457$; $P < 0.01$). The activity of this enzyme was similar to that observed in the control group in the second week post infection, and then fell to levels lower than 25.3% in the third, fourth and fifth weeks in relation to the control group (Fig. 2a).

The ALT activity increased by 78.4% in the first week of infection in relation to the control group, and by 94.7% in the second week, in both cases significantly higher than in the control group. After the second week of infection, the ALT activity declined, ranging values observed in the control group (Fig. 2b).

The ALKP activity declined by 30.4% and 33.6% in relation to the control group in the fourth and fifth weeks after infection ($q = 4.776$ and $q = 5.270$; $P < 0.01$, respectively) (Fig. 2c).

The serum levels of GGT rose significantly in the first week after infection, with an increase of 127.9% in relation to the control group. Thereafter it decreased, with percentages of 49.4%, 27.1% and 8.7% above the average level of the control group. However, in the fifth week post infection there was an increase of 37.9% in the GGT level (Fig. 2d).

In the first week after infection the level of total proteins in the plasma was significantly, reduced by 21.9%. From the second week on the levels were greater than that observed in the control group, but the variations were not statistically significant. The level of serum globulin increased 62.5% in relation to the control group in the first week after infection. From the second week to the end of the experiment the globulin levels were near those observed in the

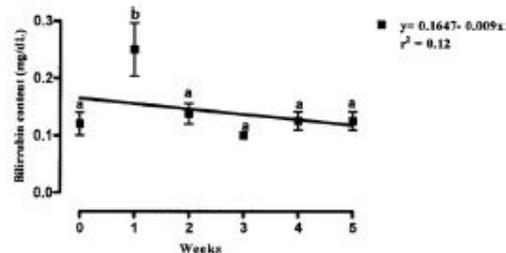


Fig. 3. Alterations in the bilirubin content in serum of *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *Echinostoma paraensei*. ^{a,b}Different letters indicate significant differences between values ($\alpha = 5\%$).

uninfected animals. There was no significant difference in the levels of albumin, glycogen and glucose between the infected and control groups (Table 2).

Finally, the bilirubin levels were significantly higher in the first week of infection ($q = 5.687$; $P < 0.01$), with a rise of 108.3% in relation to the control group (Fig. 3).

4. Discussion

Experimental studies to evaluate the metabolic changes during the course of infection using the *Echinostoma*-rodent model are still incomplete and do not allow generalizations about the relation between intestinal helminths and vertebrate hosts. It has been demonstrated experimentally that *Rattus norvegicus* has low susceptibility to infection by *Echinostoma* spp., only developing the

Table 2
Mean, standard deviation and range of variation of total proteins (PROT), albumin (ALB), globulin (GLOB), glycogen (GLIC) and glucose (GLU) in serum of *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *Echinostoma paraensei* ($n=38$).

| Values | Period of infection (weeks) | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------------------------|----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|----------|--------------|-----------|--------------|------------|
| | Control | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | | | |
| | X ± SD | Range | X ± SD | Range | X ± SD | Range | | | | | | |
| PROT (g/dl) | 4.5 ± 0.3 | 4.1–4.8 | 3.2 ± 1.2 | 2.3–4.6 | 5.0 ± 0.6 | 4.2–5.7 | 4.6 ± 0.3 | 3.9–5.2 | 4.9 ± 0.1 | 4.7–5.2 | 5.2 ± 0.776 | 4.2–6 |
| ALB (g/dl) | 2.9 ± 0.5 | 2.2–4.3 | 2.5 ± 0.2 | 2.3–2.8 | 3.1 ± 0.8 | 2.7–5 | 3.4 ± 1.6 | 2.6–6.5 | 3.6 ± 1.2 | 2.7–6.5 | 3.1 ± 0.3 | 2.8–3.7 |
| GLOB (g/dl) | 1.6 ± 0.2 | 1.2–1.9 | 0.6 ± 1.1 | 0–2.1 | 1.9 ± 0.9 | 0.2–2.7 | 1.7 ± 0.4 | 0.9–2 | 1.6 ± 0.5 | 1–2.3 | 2.1 ± 0.6 | 1.4–2.7 |
| GLIC (mg/dl) | 15.1 ± 5.0 | 8.9–21.6 | 20.5 ± 3.9 | 13.6–25.9 | 14.4 ± 1.3 | 12.8–16.7 | 17.4 ± 6.0 | 9.9–24.9 | 18.8 ± 4.0 | 13.7–23.9 | 19.3 ± 6.2 | 12.8–28.16 |
| GLU (mg/dl) | 197.4 ± 21.4 | 158–228 | 195.1 ± 27.3 | 144–219 | 228.9 ± 28.1 | 199–276 | 196.4 ± 27.1 | 153–227 | 195.1 ± 27.4 | 159–234 | 213.4 ± 20.4 | 192–255 |

acute phase of the disease (Hansen et al., 1991; Toledo et al., 2004a, 2006).

In experimental infection of *R. norvegicus* by *Echinostoma caproni*, the elimination of the helminths occurred as of the fourth week of infection, and that all of them had been eliminated by the eighth week after exposure to the metacercariae (Odaibo et al., 1989). A similar characteristic was observed in experimental infection of *R. norvegicus* by *Echinostoma fited*, in which the parasite load remained stable until the fourth week after infection (Toledo et al., 2004b, 2006). In contrast, in the present study we observed that the helminths started to be eliminated in the second week and in the fourth no more rodents were infected by helminths. This suggests that *R. norvegicus* is less susceptible to *E. paraensei* than these two other species studied. In another study, the susceptibility of *R. norvegicus* to infection by *E. paraensei* was similar to that observed in experimental infection of the natural host *N. squamipes* (Maldonado et al., 2006), suggesting the model is suitable to study echinostomiasis.

The significant increases in the levels of ALT, AST, GGT and bilirubin in the serum of the infected animals during the initial phase of infection (first week) may be related to extrahepatic cholestasis (Burtis et al., 2006). All the worms recovered were located in the first portion of the small intestine (duodenum), near the ampulla of Vater, suggesting that the worms probably cause temporary obstruction of the bile duct. Studies by Maldonado et al. (2001b, 2005) showed that in *R. norvegicus* (Wistar) and in mice (Swiss Webster) infected with *E. paraensei*, the worms migrate from the small intestine to the bile duct starting in the first week of infection.

The aminotransferases ALT and AST are normally present in low concentrations in the serum (Kaplan, 1987). Although they are enzymes suggestive of hepatopathies, they are not produced solely in the hepatic tissue, but instead are distributed in other organs (Andriolo and Borges, 1989). The increase of these aminotransferases levels can be caused by various factors, due to the high sensitivity of these enzymes to a wide range of factors that can cause hepatic or extrahepatic changes. This increase of aminotransferases can also result from release of excretion-secretion products, leading to increased permeability of the hepatocyte membrane, allowing these enzymes to enter the bloodstream (Kaplan, 1987; Rej, 1971). The reduction of these enzymes to levels near those observed in the control group occurred starting in the second week of infection, in the same period the helminths were being eliminated by the host. Likewise, Dement'ev et al. (1978) also observed an increase of AST and ALT in sheep infected with 1,000 metacercariae of *Dicrocoelium dendriticum*, a trematode parasite of the bile duct.

The isoenzyme ALKP is present in practically all tissues of living organisms, especially in cell membranes, and it occurs in high levels in some tissues, particularly the intestinal epithelium and liver (Burtis et al., 2006). The elevation of the level of this enzyme in the serum is mainly observed when there is extrahepatic obstruction (Andriolo and Borges, 1989). In contrast, in the infection by *E. paraensei* in this study, the levels of this enzyme remained significantly lower during the infection period

in the treatment group than in the control group. This can be due to the presence of large numbers of helminths in the intestinal mucosa, causing erosion of the villus and injury to the intestinal epithelium, thus interfering in the production of the enzyme by the enterocytes. Mice infected by *E. caproni* presented atrophied intestinal villus, erosion of the intestinal tissue, hyperplasia of the intestinal crypts and a reduction of ALKP activity (Weinstein and Fried, 1991; Fujino et al., 1993).

The absence of adult worms in the intestine of rats at the fourth and fifth weeks after metacercariae inoculation may explain the recovery of the parameters analyzed, except ALKP, because at this time the animals were no longer infected. Beside this, from the second week of metacercariae inoculation onward, the most of parameters of infected animals were not significantly different from those observed to uninfected (control) group, reflecting the high capacity of liver regeneration and hepatic reserve in mammals. Indeed, the data observed at fourth and fifth weeks post metacercariae inoculation already reflect the recovery of liver function after the worms' elimination. So, it is possible to infer that the results obtained in the present study, at fourth and fifth weeks, reflect a temporal recovery of the hepatic function after worm expulsion. The GGT present in the plasma originates from the hepatobiliary system, and can be used to diagnose cholestasis and obstructions of the biliary tree (Andriolo and Borges, 1989). The increase of this protease can be related directly to the obstruction of the bile duct caused by the helminth's presence. The occurrence of extrahepatic cholestasis can lead to a reduction in bilirubin extravasation into the intestine (Noguchi et al., 2002), causing an increase in the serum activity of this enzyme. This can explain the increase of this enzyme activity observed in the infection of *R. norvegicus* by *E. paraensei*.

An increase in the levels of total proteins and serum globulins can result from the response of the host's immunological system (Scott et al., 2005). In the present study, there was no significant increase in the levels of albumin. We did not observe any significant variations in the levels of glucose in the serum or glycogen in the liver of the infected animals. Manga-González et al. (2004) did not observe alterations in the levels of total proteins and glucose, and only a small increase in the levels of albumin, in lambs infected by *D. dendriticum*.

The increases in the ALT, AST, ALKP and GGT activities and bilirubin content occur at the first week of infection, when the highest worm load was observed. These results suggest that in the beginning of infection by *E. paraensei* it can cause obstruction of the bile duct and impairment of the intestinal villus, altering the levels of ALT, AST, GGT, bilirubin and ALKP, but not causing changes in the hepatic tissue and levels of albumin, glucose and glycogen. This infection can also stimulate the activity of the immunological system, with a resulting increase in the levels of total proteins and globulin.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Andriolo, A., Borges, D.R., 1989. Enzimologia clínica em doenças do fígado. Rev. Bras. Patol. Clin. 25, 95–98.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, E.R. (Eds.), 2006. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier, Amsterdam, 2448 pp.
- Dement'ev, I.S., Serikbaeva, B.K., Karabaev, D.K., 1978. The effect of vitamin C and cobalt chloride on the pathological process in microcoeliasis in sheep (in Russian). Tr. Kaz. Nauchno-Issled. Vet. Inst. 17, 79–81.
- Fried, B., Graczyk, T.K., 2000. Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Kluwer, Dordrecht, 273 pp.
- Fujino, T., Fried, B., Tada, I., 1993. The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal cytopathology in conventional and congenitally athymic balb/c mice. Parasitology 106, 297–304.
- Graczyk, T.K., Fried, B., 1998. Echinostomatiasis: a common but forgotten food-borne disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 501–504.
- Hansen, K., Nielsen, J.W., Hindsbo, O., Christensen, N.O., 1991. *Echinostoma caproni* in rats: worm population dynamics and host blood eosinophilia during primary infections with 6, 25 and 50 metacercariae and resistance to secondary and superimposed infections. Parasitol. Res. 77, 686–690.
- Humason, G.L., 1979. Animal Tissue Techniques, 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA, 661 pp.
- Kaplan, M.M., 1987. In: Schiff, L., Schiff, E.R. (Eds.), Diseases of the Liver. J. Lippincott, Philadelphia, pp. 219–260.
- Lie, K.J., Basch, P.F., 1967. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). J. Parasitol. 53, 1192–1199.
- Lutz, A., 1924. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. Parte especial: I. Echinostomidae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 17, 55–73.
- Maldonado Jr., A., Loker, E.S., Morgan, J.A.T., Rey, L., Lanfredi, R.M., 2001a. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. Parasitol. Res. 87, 840–848.
- Maldonado Jr., A., Coura, R., Garcia, J.S., Lanfredi, R.M., Rey, L., 2001b. Changes on *Shistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96 (Suppl. 1), 193–198.
- Maldonado Jr., A., Zejtone, B.K., do Carmo, Amado, L.A., Rosa, L.F., Silva, J.R.M., Lanfredi, R.M., 2005. Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. J. Helminthol. 79, 1–8.
- Maldonado Jr., A., Gentile, R., Fernandes-Moraes, C.C., D'Andrea, P.S., Lanfredi, R.M., Rey, L., 2006. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by exotic trematode *Shistosoma mansoni* in south-eastern Brazil. J. Helminthol. 80, 369–375.
- Maldonado Jr., A., Lanfredi, R.M., 2008. Echinostomes in the wild. In: Fried, B., Toledo, R. (Org.), The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community, vol. 6. Springer, pp. 129–145.
- Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., 2004. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Parasitol. Res. 93, 344–355.
- Noguchi, A., Reis, J.M.C., Dias, C.S., Epaminondas, W.A., Azevedo, P.S.R., Brito, M.V.H., 2002. Serum levels of aminotransferases, bilirubins and gamma-glutamyltranspeptidase after copaiba oil administration in rats. Acta Cir. Bras. 17, 1–8.
- Nollen, P.M., 1996. Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* in concurrent infections in mice. J. Helminthol. 70, 133–136.
- Odaibo, A.A., Christensen, N.O., Ukoli, F.M.A., 1989. Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* in NMRI mice. Proc. Helminthol. Soc. Washington 56, 192–198.
- Pinheiro, J., Gomes, E.M., 1994. A method for glycogen determination in molluscs. Arq. Bras. Biol. Tecnol. 37, 569–576.
- Pinheiro, J., Amato, S.B., 1994. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 407–410.
- Rej, R., 1971. Clin. Chem. 24, 1971–1979.
- Scott, P.R., Sargison, N.D., Macrae, A., Rhind, S.R., 2005. An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: ultrasonographic biochemical and histological studies. Vet. J. 170, 325–331.

Please cite this article in press as: Garcia, J.S., et al., Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.040

- Sianto, L., Reinhard, K.J., Chame, M., Chaves, S., Mendonça, S., Gonçalves, M.L., Fernandes, A., Ferreira, L.F., Araújo, A., 2005. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600–1,200 years before present. *J. Parasitol.* 91 (4), 972–975.
- Toledo, R., Espert, A., Carpena, I., Muñoz-Antoli, C., Fried, B., Esteban, J.G., 2004a. The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parasitol. Res.* 93, 439–444.
- Toledo, R., Espert, A., Carpena, I., Muñoz-Antoli, C., Marcilla, A., Fried, B., Esteban, J.G., 2004b. Kinetics of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antigens in feces and serum of experimentally infected hamsters and rats. *J. Parasitol.* 90, 752–758.
- Toledo, R., Fried, B., 2005. Echinostomes as experimental models in adult parasite–vertebrate host interactions. *Trends Parasitol.* 21, 251–254.
- Toledo, R., Carpena, I., Espert, A., Sotillo, J., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G., 2006. A quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. *J. Parasitol.* 92, 16–20.
- Weinstein, M.S., Fried, B., 1991. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. *Int. J. Parasitol.* 21, 255–257.

Please cite this article in press as: Garcia, J.S., et al., Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Vet. Parasitol.* (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.040