



Comunicação/Communication

Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*

Larvicidal activity of a crude enzyme extract of the fungus *Duddingtonia flagrans* on first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*

Fabio Ribeiro Braga¹, Juliana Milani Araujo¹, Alexandre de Oliveira Tavela¹, Jackson Victor de Araújo¹, Filipe Elias de Freitas Soares², Hugo Leonardo André Geniêr², Walter dos Santos Lima³, Lanuze Rose Mozzer³ e José Humberto de Queiroz²

RESUMO

Introdução: *Angiostrongylus vasorum* é um nematóide que parasita cães domésticos e eventualmente o homem. **Métodos:** O objetivo deste trabalho foi observar a atividade predatória *in vitro* do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio *A. vasorum* em condições laboratoriais no meio ágar-água 2%. **Resultados:** Ao final do experimento, os percentuais de redução das L₁ de *A. vasorum* observados foram de: 53,5% (24h) e 71,3% (48h). **Conclusões:** O extrato bruto enzimático do fungo *D. flagrans* destruiu *in vitro* as L₁, podendo ser utilizado como controle biológico desse nematóide.

Palavras-chaves: Fungos nematófagos. *Angiostrongylus vasorum*. *Duddingtonia flagrans*.

ABSTRACT

Introduction: *Angiostrongylus vasorum* is a nematode parasite of domestic dogs and potentially of humans. **Methods:** This study aimed to observe the predatory activity *in vitro* of a crude enzyme extract of the fungus *Duddingtonia flagrans* on first-stage larvae of *A. vasorum* in laboratory conditions on 2% water-agar. **Results:** At the end of the experiment, the percentage reductions observed for *A. vasorum* L₁ were 53.5% (24h) and 71.3% (48h). **Conclusions:** Crude enzyme extract of the fungus *D. flagrans* destroyed the L₁ *in vitro* and can be used as a biological control for this nematode.

Keywords: Nematophagous fungi. *Angiostrongylus vasorum*. *Duddingtonia flagrans*.

Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, é um nematóide protostrongilídeo, de distribuição cosmopolita. O parasita adulto pode ser encontrado no ventrículo direito, artérias pulmonares e suas ramificações, o que pode causar consequências graves para o hospedeiro definitivo (cães domésticos e canídeos silvestres) e eventualmente o homem. Embora não existam dados sobre a prevalência do *A. vasorum* no Brasil, trabalhos têm demonstrado sua ocorrência em diferentes estados¹. O ciclo biológico do *A. vasorum* é do tipo heteroxeno, diversas espécies de moluscos aquáticos e terrestres são os hospedeiros intermediários. Nas arteríolas

pulmonares do hospedeiro definitivo, ocorre o embrionamento dos ovos até o desenvolvimento das larvas de primeiro estágio (L₁), que eclodem e passam ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios. Estas L₁ migram para a traquéia e são expelidas junto a secreções pulmonares ou são deglutidas e eliminadas junto com as fezes^{1,2}. As L₁ permanecem no bolo fecal, ou podem alcançar coleções de água. Moluscos terrestres ou aquáticos infectam-se ingerindo L₁ via trato digestivo, ou pela penetração delas pelas partes moles do molusco. Após os cães ingerirem as larvas infectantes, estas penetram na parede do trato digestivo migram até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda de L₃ para larva de quarto estágio (L₄), por volta do terceiro dia de infecção e a muda de L₄ para larva de quinto estágio (L₅), em torno do quinto dia de infecção³. O conhecimento do ciclo vital de *Angiostrongylus*, apesar de incompleto, mostra uma complexidade de situações nas quais o homem pode aparecer como hospedeiro eventual. Nos animais, os sintomas clínicos mais frequentes são tosse, dispnéia, intolerância ao exercício, perda de peso, sinais neurológicos, deficiências cardíacas e morte^{4,5}.

A maioria dos anti-helmínticos não age bem sobre *A. vasorum* no hospedeiro definitivo, portanto, medidas alternativas que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental deste parasito e de suas formas infectantes são importantes, como o uso de antagonistas naturais de helmintos. Fungos predadores são certamente os grupos mais estudados e que apresentam o maior potencial de biocontrole de helmintos⁶. A espécie *Duddingtonia flagrans* produz clamidósporos e pode produzir uma série de enzimas, dentre essas as proteases. Além disso, tem sido utilizado com sucesso no combate as formas infectantes de nematóides potencialmente zoonóticos^{7,8} e, o desenvolvimento de formulações fúngicas para uso no controle biológico é um dos principais passos para a produção comercial destes microorganismos⁹.

O objetivo deste trabalho foi observar a atividade predatória *in vitro* do extrato bruto enzimático do fungo *D. flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*.

Foi utilizado um isolado de *D. flagrans* (AC001), oriundo de solo brasileiro, do município de Viçosa na zona da mata de Minas Gerais, (latitude 20°45'20"S, longitude 42°52'40" W, a 649m do nível do mar). O fungo foi mantido em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%), no escuro por 10 dias. Micélios fúngicos foram obtidos através da transferência de discos de cultura (cerca de 5mm de diâmetro) dos isolados fúngicos mantidos em *corn meal*

1. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 3. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Endereço para correspondência: Dr. Fabio Ribeiro Braga. Deptº de Veterinária/UFV. Av. Ph Rolfes s/n, 36570-000 Viçosa, MG.

Tel: 55 31 3899-1458

e-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

Recebido para publicação em 13/05/2010

Aceito em 05/01/2011

ágar 2% (CMA 2%) para frascos erlenmeyers (250mL) contendo 50mL de meio líquido de acordo com a metodologia descrita por Meyers e Wiebe⁷. O meio líquido foi composto por: glicose (10g/l), caseína (18,409g/l), K₂HPO₄ (5,0g/l), MgSO₄ (0,10g/l), ZnSO₄ (0,0050g/l); FeSO₄ (0,001 g/l) e CuSO₄ (0,50mg/l). Os frascos erlenmeyers contendo o inóculo fúngico cresceram em aparelho Shaker sob agitação de 120rpm e pH 9,0. Depois de seis dias o sobrenadante foi coletado e filtrado, em papel filtro Whatman n.º 1 a 4°C.

A cepa utilizada de *A. vasorum* foi originalmente isolada das fezes de dois cães naturalmente infectados, prodecentes do município de Caratinga, MG¹⁰. Esta cepa vem sendo mantida por passagens sucessivas em cães.

Fezes de cães infectados foram colhidas e colocadas em aparelho de Baermann modificado para a recuperação das L₁¹¹. As fezes permaneceram no aparelho por 12h, e o sedimento foi centrifugado a 200Xg, por 2min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as L₁ de *A. vasorum* foi ressuspenso em 5mL de salina 0,8% e alíquotas de 10µL foram contadas com auxílio de estereomicroscópio no aumento de 25x e estimou-se a quantidade total de larvas recuperadas.

Dois grupos foram formados em tubos eppendorf de 1,5mL estéreis, um grupo tratado e um grupo controle nos horários de 24 e 48h, sendo feitas seis repetições para cada grupo em cada horário estudado. No grupo tratado, 50L₁ (20µl) de *A. vasorum* foram vertidas em tubos eppendorf de 1,5mL estéreis contendo 150µl de extrato bruto enzimático de *D. flagrans* (AC001). O grupo controle continha 50 L₁ (20µl) de *A. vasorum* em 150µl de extrato enzimático bruto fervido por 10min no tubo eppendorf de 1,5ml estéril. Os tubos foram incubados a 25°C, no escuro, por 24-48h. Após incubação, foi contado o número total das L₁ de *A. vasorum* presentes em cada tubo - tratamento de acordo com a metodologia descrita por Niu cols¹².

Os dados obtidos nesse ensaio foram analisados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. A eficiência de predação das L₁ em relação ao controle em cada tempo (24 e 48h) foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

O percentual de redução da média de larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{média de larvas do controle} - \text{médias de larvas do tratamento})}{\text{média de larvas do controle}} \times 100$$

No intervalo de 24h, o extrato bruto enzimático de *D. flagrans* (AC001) apresentou um percentual de redução de 53,5% sobre as L₁ de *A. vasorum*. Para o intervalo de 48 horas, o extrato bruto enzimático de AC001 foi capaz de destruir 71,3% das L₁. Por outro lado, foi notada diferença ($p < 0,05$) no número de larvas destruídas presentes nos grupos tratados em relação às larvas presentes nos grupos controle, nos dois intervalos de tempo estudados. A comprovação da atividade larvicida do extrato enzimático de AC001 sobre as L₁ de *A. vasorum* está demonstrada na **Figura 1 (A-B)**.

A. vasorum, além de sua importância médico-veterinária, como parasita cardiopulmonar de cães domésticos e canídeos silvestres, requer atenção especial e investigação, uma vez que pode infectar o homem¹³. Em trabalho recente, Braga cols⁸ demonstraram que AC001 crescido meio de cultura sólido (AA 2%) em placas de Petri destruiu 80,3% das L₁ de *A. vasorum* ao final de sete dias. Comparando

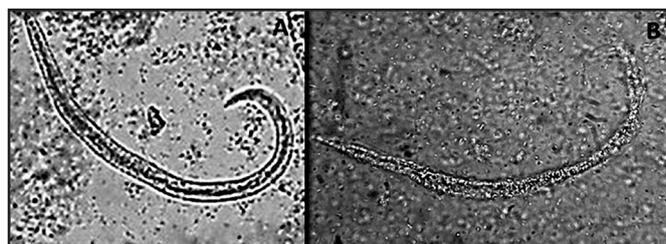


FIGURA 1 (A-B) - Larva (L₁) de *Angiostrongylus vasorum* tratada com extrato bruto enzimático de *Duddingtonia flagrans* no período de 24h (grupo tratado; A) e 48h (grupo tratado; B).

sua atividade predatória no presente trabalho, nota-se que a utilização do seu extrato bruto enzimático é promissora, uma vez que, a destruição das larvas ocorreu após 24h (53,5%) e se manteve até o final do experimento com atividade predatória de 71,3% (48h). Este é o primeiro relato da atividade predatória de extrato bruto enzimático obtido a partir de um fungo nematófago, *D. flagrans*, o que poderá contribuir no futuro como uma ferramenta para novas pesquisas no combate as formas infectantes de nematóides. Na **Figura 1 (B)**, pode-se observar a hidrólise da cutícula pela ação enzimática do extrato, o que permitiu que o mesmo também atuasse no interior do nematóide, causando a sua destruição.

Barçante⁴ demonstrou que a infecção de cães com L₃ de *A. vasorum* pode ocorrer, independente da ingestão do hospedeiro intermediário e que cães podem se infectar ingerindo alimentos ou bebendo água onde tenham moluscos infectados. Além disso, pelo fato das larvas estarem livres no ambiente, abre-se a possibilidade de infecção humana, uma vez que outros parasitos do gênero *Angiostrongylus* são comprovadamente zoonóticos^{14,15}. Nesse contexto, sugere-se a aplicabilidade dos fungos nematófagos, destacando-se o isolado AC001 da espécie *D. flagrans*.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam trabalhos anteriores da eficiência de fungos nematófagos no controle de larvas de nematóides potencialmente zoonóticas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUPORTE FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Patteson MW, Gibbs C, Wotton PR, Day MJ. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. *Vet Record* 1993; 4:565-570.
2. Cury MC, Guimarães MP, Lima WS, Caldeira MCM, Couto TR, Murta K, et al. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet Parasitol* 2002; 128:121-127.
3. Barçante TA. Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). [Tese]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006. 179p.

4. Oliveira-Jr SD, Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Lima WS. Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. *Vet Parasitol* 2004; 141:101-106.
5. Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO. Helminths of red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol* 2006; 139:168-179.
6. Nordbring-Hertz B, Jansson HB, Tunlid A. Nematophagous fungi. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Basingstoke: Macmillan Publishers; 2002. p. 1-10.
7. Meyer WJ, Wiebe MG. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnol Letters* 2003; 25:791-795.
8. Braga FR, Carvalho RO, Araujo JM, Silva AR, Araújo JV, Lima WS, et al. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. *J Helminthol* 2009; 83:303-308.
9. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13:165-170.
10. Lima WS, Costa HMA, Guimarães MP, Leite ACR. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80:233-235.
11. Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res* 2003; 89:89-93.
12. Niu Q, Huang X, Tian B, Yang J, Liu J, Zhang L, et al. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 69:722-730.
13. Eckert J, Lämmler G. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. *Parasitol Res* 1972; 39:303-322.
14. Rambo PR, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Abdominal Angiostrongylosis in Southern Brazil – Prevalence and Parasitic Burden in Mollusc Intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92:9-14.
15. Prociw P, Spratt DM, Carlisle MS. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. *Int J Parasitol* 2000; 30:1295-1303.