

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**ELIMINAÇÃO DE LARVAS E HISTOPATOLOGIA DE
CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM DIFERENTES
DOSES DE *Angiostrongylus costaricensis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Chaves Hermes

Passo Fundo, RS, Brasil, 2018

**ELIMINAÇÃO DE LARVAS E HISTOPATOLOGIA DE CAMUNDONGOS
SWISS INFECTADOS COM DIFERENTES DOSES DE *Angiostrongylus*
*costaricensis***

Caroline Chaves Hermes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**.

Orientador: Prof. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira
Coorientador: Rubens Rodriguez

Passo Fundo, RS, Brasil
2018

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA DE MESTRADO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ELIMINAÇÃO DE LARVAS E HISTOPATOLOGIA DE CAMUNDONGOS SWISS
INFECTADOS COM DIFERENTES DOSES DE *Angiostrongylus costaricensis***

Elaborada por
Caroline Chaves Hermes

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Maria Isabel Botelho Vieira, Dra. UPF
(Orientadora/Presidente)**

**Rubens Rodriguez, Dr. UPF
(Coorientador)**

Luiz Carlos Kreutz, PhD. UPF

Alessandra Loureiro Morassutti. Dra. PUCRS

Passo Fundo, RS, Brasil

2018

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria Isabel Botelho Vieira, um grande exemplo a ser seguido, pela imensurável ajuda e dedicação.

Ao Prof. Dr. Rubens Rodriguez, pelo apoio, incentivo e confiança em mim depositada.

À minha colega Elise Benvegnú, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Prof MSc. Sérgio Machado Porto, por sua contribuição no experimento.

Ao Prof. Dr. Márcio Machado Costa, pela ajuda na análise estatística.

Aos colaboradores do Biotério da Universidade de Passo Fundo, Franciele Amaral, Cleonice Several e Lucas Portela, sem os quais a execução desse trabalho não seria possível, pela troca de conhecimentos e pela inestimável colaboração.

Aos colaboradores do Instituto de Patologia de Passo Fundo, pela compreensão de minhas faltas e auxílio na execução de tarefas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelo incentivo.

Aos colaboradores do Laboratório de Parasitologia da Pontifícia Universidade Católica, pela colaboração na execução do experimento.

Aos bolsistas Laura Ruschel e Bruno Weber, por toda ajuda na realização do experimento.

Às minhas amigas Pâmela Rodrigues e Thaís Morates, pelos anos de amizade, apoio, incentivo e compreensão.

Aos meus amigos e ex-colegas de graduação, por serem sempre presentes e nunca me deixaram desistir.

Aos meus pais, Leandro Márcio Alberton Hermes e Marli de Fátima Chaves, pela educação e incentivo para que alcançasse meus objetivos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Marli de Fátima Chaves e ao meu pai Leandro Márcio Alberton Hermes.

Ao meu irmão Pedro Henrique Hermes, pelo companheirismo

À minha vó “in memoriam” Romilda Alberton, por ter me mostrado a importância do estudo e a ter coragem para enfrentar as adversidades.

EPIGRAFE

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 PARASITO.....	14
2.1.1 Histórico.....	14
2.1.2 Características morfológicas.....	14
2.2 HOSPEDEIROS DEFINITIVOS.....	14
2.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS.....	15
2.4 CICLO BIOLÓGICO.....	15
2.5 PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS.....	17
2.6 DIAGNÓSTICO.....	17
2.6.1 Imunodiagnóstico.....	17
2.6.2 Diagnóstico molecular.....	18
2.6.3 Anatomopatológico.....	18
2.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	18
2.8 ELIMINAÇÃO DE LARVAS.....	19
3. CAPÍTULO 1. Shedding of <i>Angiostrongylus costaricensis</i> larvae into the feces of Swiss mice experimentally infected with different infective doses	20
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Material and methods.....	22
Results.....	23
Discussion.....	24
References.....	25
4. CAPÍTULO 2. Aspectos histopatológicos correlacionados com diferentes doses infectantes de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	30
Resumo.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e métodos.....	32
3. Resultados.....	34
4. Discussão.....	35
Referências.....	36
5. CONCLUSÕES	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7. REFERÊNCIAS	47
8. ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Ciclo de vida do *Angiostrongylus costaricensis*.....16

3. CAPÍTULO 1

Fig. 1. Variation in the fecal shedding of L1 of *Angiostrongylus costaricensis* in Swiss mice experimentally infected with different infective doses of L3. *Asterisk highlights a significant difference ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis, Dunn's test, 5 L3 vs. 30 L3).....28

Fig. 2. Mortality rates in each experimental group according to different infective doses..29

4. CAPÍTULO 2

Fig. 1. A) Grupo 2: trombose arterial com ovos e calcificação (HE 100x); B) Grupo 2: trombose de artéria mesentérica (HE 100x); C) Grupo 3: artéria com trombo recanalizado (HE 200x); D) Grupo 3: infarto intestinal transmural com necrose de coagulação (HE 50x).....42

Fig. 2. Grupo 3: pancreatite aguda com necrose do parênquima (HE 50x); B) Infarto esplênico com trombo (HE 50x), C) Grupo 1: broncopneumonia (HE 50x); D) Grupo 2: broncopneumonia (HE 100x).....43

Fig. 3. A) Grupo 2: infarto hepático (HE 50x); B) Grupo 3: infarto hepático com necrose de coagulação (HE 50x); C) Grupo 3: numerosos ovos envolvidos por granulomas no parênquima hepático (HE 100x); D) Grupo 3: granulomas englobando ovos no parênquima hepático (HE 400x).....44

5. ANEXOS

Figura 1. A) Camundongos acondicionados em gaiolas individuais; B e C) Coleta das fezes dos camundongos; D) Método Bermann para isolamento de L1 de *Angiostrongylus costaricensis*.....50

Figura 2. A) 1 ml do sedimento homogeneizado após permanecer *over night*; B) 3 amostras de 10 μ l para a contagem de larvas; C e D) contagem de L1 de *Angiostrongylus costaricensis*.....51

Figura 3. Camundongo do grupo 2 apresentando vermes adultos na luz arterial (HE 25x).....52

Figura 4. Camundongo do grupo 3 apresentando artéria hepática contendo vermes adultos associado a trombose (HE 50x).....52

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

Table 1.	Shedding of <i>Angiostrongylus costaricensis</i> larvae (median; minimum; maximum) into feces of Swiss mice infected with different infective doses.....	27
Table 2.	Survival time of each mouse in days post infection (DPI).....	28

4. CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Óbito dos animais dos grupos infectados com diferentes doses de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> em intervalo de dias.....	38
Tabela 2.	Achados macroscópicos e microscópicos em camundongos Swiss associados a infecções com diferentes doses de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	39
Tabela 3.	Achados microscópicos em camundongos Swiss associados a infecções com diferentes doses de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	40

5. ANEXOS

Tabela 1.	Taxa de eliminação diária de L1 em camundongos Swiss infectados com diferentes doses de L3 de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	54
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Angiostrongilíase abdominal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
°C	Graus Celsius
DPI	Dias pós-infecção
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
g	Gramas
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPPF	Instituto de Patologia de Passo Fundo
L1	Larvas de primeiro estadio
L3	Larvas de terceiro estadio
mg	Miligramas
PUC	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PCR	Reação da cadeia da polimerase
RS	Rio Grande do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo
ul	Microlitro

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

ELIMINAÇÃO DE LARVAS E HISTOPATOLOGIA DE CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM DIFERENTES DOSES DE *Angiostrongylus costaricensis*

Autora: Caroline Chaves Hermes
Orientadora: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, 03 de agosto de 2018

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma doença causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, descrito pela primeira vez na Costa Rica. Trata-se de uma zoonose, endêmica da região Sul do Brasil, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres. O homem infecta-se acidentalmente pela ingestão da forma infectante do parasito (L3) em verduras, legumes e/ou frutas e os sintomas característicos são dor abdominal e massa tumoral palpável, podendo ser confundida com apendicites ou tumores. A relação entre infecções com diferentes doses de larvas de terceiro estadio (L3), gravidade dos sinais clínicos e sobrevida dos animais ainda não é elucidado, bem como a relação com a eliminação de larvas de primeiro estadio (L1). O estudo foi executado no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (ICB/UPF) e utilizou-se trinta e dois camundongos Swiss machos (*Mus musculus*), infectados com diferentes doses de L3 de *A. costaricensis*, divididos em quatro grupos de oito animais: grupo 1: 5 L3; grupo 2: 15 L3; grupo 3: 30 L3 e grupo 4: controle. As fezes dos animais foram coletadas individualmente, a partir do 20º dia pós-infecção (DPI) até virem a óbito, sendo feita análise macro e microscópica dos mesmos. Estudos que auxiliem para uma melhor elucidação da doença é importante para a compreensão da relação parasito e hospedeiro e na fisiopatologia da enfermidade. Avaliamos a eliminação de larvas L1 nas fezes de camundongos com sua sobrevida e análise histopatológica *post mortem*, relacionando a gravidade dos sinais clínicos com as diferentes doses infectantes do parasito. Nossos resultados mostraram que animais infectados com uma dose infectante maior apresentam maior taxa de eliminação de larvas. Notamos também que a maioria dos roedores morreram entre 20 a 40 dias após a infecção, apresentando broncopneumonia e hepatite, destacando as diferenças entre os grupos em relação a presença de trombos intestinais, esplenite, ovos/larvas e infarto no fígado. Concluímos que diferentes doses infectantes de L3 de *A. costaricensis* interfere na eliminação de L1, assim como altera os aspectos histopatológicas nos camundongos, sendo que doses maiores resultam em presença abundante de ovos e larvas e infarto no fígado, esplenite e trombose intestinal, porém não altera a mortalidade desses roedores.

Palavras-chave: angiostrongilíase abdominal, camundongos Swiss, eliminação de larvas, dose infectante, histopatologia

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Bio-Experimentation
University of Passo Fundo

SHEDDING OF LARVAE AND HISTOPATHOLOGY OF SWISS MICE INFECTED WITH DIFFERENT DOSES OF *Angiostrongylus costaricensis*

Author: Caroline Chaves Hermes
Advisor: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, August 3rd, 2018

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is a disease caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*, and was first described in Costa Rica. It is a zoonosis endemic to south Brazil. Wild rodents as the final hosts of this nematode, and molluscs the intermediate hosts (Graeff-Teixeira et al., 1989). The man is accidentally infected by ingestion of the infective form of the parasite (L3) in vegetables, fruits and/or fruits and the characteristic symptoms are abdominal pain and palpable tumor mass, which can be confused with appendicitis or tumors. Correlations between infections and different doses of third stage larvae (L3), severity of clinical signs and survival of the animals has not been elucidated, as well as the relation with the shedding of first stage (L1) larvae. The study was performed at the laboratory animal facility of the Institute of Biological Sciences of Universidade de Passo Fundo (ICB/UPF) and thirty-two male Swiss mice (*Mus musculus*) infected with different doses of L3 from *A. costaricensis* were divided into four groups of eight animals: group 1: 5 L3; group 2: 15 L3; group 3: 30 L3 and group 4: control. Fecal sampling of the animals were collected individually, from the day 20 post infection (DPI) until death, and macro and microscopic analysis of them. Studies that help to better elucidate the disease are important for the understanding of the parasite and host relationship in the pathophysiology of the disease. We evaluated the elimination of L1 larvae in the feces with the survival and histopathological analysis of the rodents post mortem, relating the severity of the clinical signs with the different infective doses of the parasite. Our results showed that animals infected with a higher infective dose had a higher larval elimination rate. We also noticed that the majority of rodents died between day 20 and 40 post infection, presenting bronchopneumonia and hepatitis, highlighting the differences between the groups in relation to the presence of intestinal thrombi, splenitis, eggs / larvae and liver infarction. We conclude that different infective doses of L3 from *A. costaricensis* interfere with the shedding of L1, as well as alter the histopathological aspects in the mice, with higher doses resulting in the abundant presence of eggs and larvae and liver infarction, splenitis and intestinal thrombosis but don't alter the mortality of these rodents.

Key words: abdominal angiostrongyliasis, Swiss mice, shedding of larvae, infective dose, histopathology

1. INTRODUÇÃO

O nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, família Angiostrongylidae, causador da angiostrongilíase abdominal (AA) descrito pela primeira vez, no ano de 1970, por Morera e Céspedes, como um novo metastrongilídeo encontrado na Costa Rica, sendo esta a segunda espécie do gênero de importância ao homem. Sua denominação foi proposta para diferir de *Angiostrongylus cantonensis*, causador da meningoencefalite eosinofílica (1).

Trata-se de uma zoonose, endêmica da região Sul do Brasil, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres, hospedeiros intermediários moluscos terrestres e o homem participando do ciclo de maneira acidental, afetando crianças e adultos (2). Seus principais sintomas são dores abdominais que podem vir acompanhadas de febre, náuseas, vômitos, anorexia, diarreia ou perda de peso. As principais manifestações histopatológicas da AA são lesões vasculares com presença de infiltrado eosinofílico e granulomas perivasculares, podendo estar relacionadas com trombos, além da caracterização de estruturas parasitárias na luz vascular (3; 4).

A patogênese da AA ainda não está totalmente elucidada, sendo seus fenômenos estudados em modelos experimentais como camundongos da espécie *Mus musculus*, os quais desenvolvem a enfermidade, apresentando sinais clínicos semelhantes aos sintomas no homem (5; 6). Tais roedores quando infectados pelo parasito, liberam formas parasitárias em suas fezes, as quais sendo quantificadas também expressa uma melhor interação entre o parasito e seus hospedeiros (7).

Ainda não há esclarecimento se a quantidade de larvas de terceiro estadio (L3) infectadas em um modelo experimental está relacionado com a maior eliminação de larvas de primeiro estadio (L1) nas fezes, bem como com a gravidade dos sinais clínicos e sobrevivência dos animais. Nosso objetivo foi avaliar a eliminação de L1 liberadas por camundongos *M. musculus*/Swiss infectados com diferentes doses de *A. costaricensis*, correlacionando com o índice de mortalidade e alterações histopatológicas *post mortem* de cada roedor.

A presente dissertação compreende, além desta introdução, uma breve revisão da literatura sobre *A. costaricensis* e dois capítulos na forma de artigos científicos. O capítulo 1 possui como título “Eliminação de larvas de *Angiostrongylus costaricensis* em fezes de camundongos Swiss infectados com diferentes doses infectantes e será submetido ao periódico *Journal of Helminthology*, qualis B1 e fator de impacto 1,42. O capítulo 2 possui como título “Aspectos histopatológicos

correlacionados com diferentes doses infectantes de *Angiostrongylus costaricensis*” e será submetido ao periódico Acta Tropica, qualis A2 e fator de impacto 2,21.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PARASITO

2.1.1 Histórico

O primeiro caso da doença foi descrito no ano de 1952, na Costa Rica, onde relatou-se um parasito zoonótico em uma ressecção ileocecal de uma criança de 7 anos, a qual apresentava dor abdominal, infecção e massa palpável, desde então mais de 70 casos foram estudados até sua identificação (8). Outros casos foram registrados em Honduras (9), México (10), Equador (11), Estados Unidos da América (12) e na Europa (13). No Brasil, também há registros em São Paulo (14), Santa Catarina e Paraná (15), Minas Gerais (16), Espírito Santo (17) e Rio de Janeiro (18).

Em 1983, houveram registros de 3 casos no Rio Grande do Sul (RS), onde os pacientes relataram dor abdominal difusa e dor na fossa ilíaca direita. Na análise microscópica, observou-se infiltrado inflamatório intenso, grande número de eosinófilos e o parasito encontrava-se no interior dos ramos das arteríolas mesentéricas (3).

2.1.2 Características morfológicas

Ambos os sexos do parasito adulto se caracterizam pelo corpo filiforme. O macho apresenta comprimento que varia entre 16,78mm a 18,96mm e largura de 0,28mm, exibindo a extremidade caudal levemente curvada, terminando em uma bolsa copulatória bem desenvolvida. A fêmea apresenta entre 24,57mm a 27,90mm de comprimento e uma extremidade distal levemente curvada, de forma cônica (19).

2.2 HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

O principal hospedeiro definitivo do parasito é o roedor silvestre *Sigmodon hispidus*, popular rato do algodão, com distribuição desde o sul dos Estados Unidos, até o norte da Venezuela e

nordeste do Peru. No RS, duas espécies do gênero *Oryzomys* foram identificadas: *Oryzomys raticiceps* e *Oryzomys nigripes*, sendo este o mais numeroso em lavouras e matas, o que pode explicar o número de casos registrados no estado (19).

Outros hospedeiros definitivos são os camundongos da espécie *Mus musculus*, porém estes apresentam alta morbidade à infecção e o rato *Rattus rattus*, que apresenta alta resistência em condições experimentais (4).

Estudos anteriores propuseram que cães adultos podem participar do ciclo como hospedeiros reservatórios da doença, podendo representar risco de infecção a humanos (20). No ano de 2014, na Costa Rica, demonstrou-se pela primeira vez um cão de 4 meses de idade, naturalmente infectado por *A. costaricensis*. O animal apresentava perfuração intestinal, peritonite e presença de larvas de primeiro estadió em suas fezes, confirmando sua atuação como hospedeiro definitivo para este parasito (21).

Há também evidências de que o coati de nariz branco (*Nasua narica*) é um hospedeiro definitivo naturalmente susceptível a infecção de *A. costaricensis* na Costa Rica, devido a obtenção de larvas de primeiro estadió de suas fezes, as quais foram identificadas morfológicamente e por caracterização molecular (22).

2.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

A primeira espécie identificada como hospedeiro intermediário de *A. costaricensis* foi o molusco terrestre *Phyllocaulis variegatus* ocorrendo no sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina e Uruguai (23). No sul do Brasil, é reportada a ocorrência de *Limax maximus*, *Limax flavus*, *Bradybaena similares* e *Belocaulus angustipes* infectadas com *A. costaricensis* (24).

2.4 CICLO BIOLÓGICO

Os roedores são infectados por alimentarem-se de legumes, verduras, frutas e/ou moluscos contaminados por L3 de *A. costaricensis* (1). Seres humanos adquirem o parasito pela ingestão de L3, ou do próprio parasito, conforme já descrito (Figura 1) e são considerados hospedeiros acidentais por não eliminarem larvas em suas fezes (25).

O parasito adulto de *A. costaricensis* vive nos ramos da artéria mesentérica superior de roedores. As fêmeas do parasito põem ovos, os quais percorrem a corrente sanguínea na parede intestinal, local onde ocorre a larvogênese gerando a L1, que será eliminada junto as fezes. As larvas podem penetrar os hospedeiros intermediários por via oral ou percutânea, onde em sua camada muscular, as larvas sofrem duas mudas ($L1 \rightarrow L2 \rightarrow L3$), sendo a L3 a forma infectante para os hospedeiros definitivos, a qual é eliminada junto ao muco dos moluscos (25).

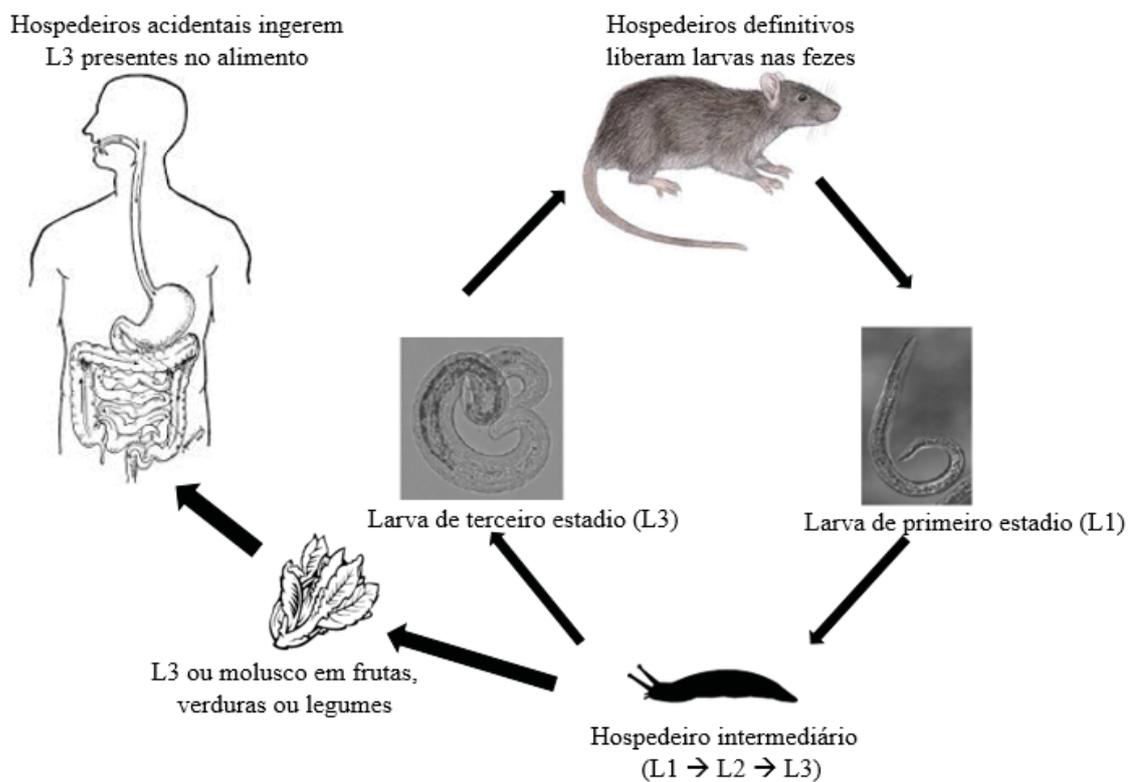


Figura 1 - Ciclo de vida de *Angiostrongylus costaricensis*.

A enfermidade AA, trata-se de uma zoonose parasitária importante no RS, estado onde foi diagnosticada maior parte dos casos, com destaque a região norte, evidenciando a presença de sazonalidade da doença. O maior número de casos ocorre na primavera, devido à reprodução e aumento da atividade dos moluscos, já no inverno, há diminuição de suas atividades (4).

2.5 PATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS

Relataram-se dois casos de AA com diferenças em suas manifestações patológicas. No primeiro caso, descreve-se a forma aguda da doença, onde o paciente, um homem de 32 anos, apresentou abdome agudo e perfuração ileocecal. Na análise anatomopatológica, a confirmação diagnóstica se deu pela detecção de vermes adultos intra-arteriais de *A. costaricensis*. O segundo caso, uma mulher de 34 anos, apresentou uma forma insidiosa da doença, com envolvimento hepático, no entanto, a confirmação da doença foi devida a análise sorológica e presença de eosinófilos nos espaços-porta do fígado (26).

Um estudo experimental, utilizando Swiss Webster e *S. hispidus*, infectados com *A. costaricensis*, demonstrou que uma migração alternativa para veias hepáticas do hospedeiro pode ocorrer naturalmente, atingindo o fígado pelos ramos das artérias hepáticas e veia porta, fazendo com que o parasito amadureça e deposite seus ovos neste local (25).

Na análise macroscópica, a mucosa intestinal apresenta úlceras, discreta reação inflamatória e espessamento da parede, devido a intensa e difusa infiltração eosinofílica. Ovos embrionados são encontrados na parede intestinal e o parasito adulto na artéria mesentérica e seus ramos, acarretando em arterite e trombose (1). No hemograma há aumento no número de eosinófilos, de 11% a 81% e presença de leucocitose, podendo variar de 10.000 a 52.000 mm³. É rara a observação de eosinofilia menor de 10% e leucocitose maior de 50.000 mm³ (26).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Imunodiagnóstico

A padronização da técnica ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) para detectar IgG a partir de antígenos totais da fêmea de *A. costaricensis*, apresentou resultados satisfatórios, com sensibilidade de 86% e especificidade de 83% (27). A utilização da técnica para diagnóstico da fase aguda da AA, em soro de pacientes diagnosticados por meio de anatomopatológico, obteve-se especificidade de 76,2% e sensibilidade de 91,15% (28).

2.6.2 Diagnóstico molecular

A técnica de PCR (reação da cadeia da polimerase), pode ajudar no diagnóstico de AA, pois detecta o DNA do parasito em tecido humano embebido em parafina e fixado em formalina. Realizou-se um estudo com 20 casos confirmados da enfermidade, 20 casos presumíveis, 3 casos negativos e 7 casos com outras parasitoses (Estrongiloidíase, Ascaridíase, Esquistossomose e Enterobíase), denotando uma sensibilidade intermediária de 55% e uma ótima especificidade de 100%, o que representa grande relevância clínica, pois descartou-se os casos negativos e com outras parasitoses, mostrando-se positiva para os casos com AA (29).

2.6.3 Anatomopatológico

O diagnóstico definitivo é feito através do exame anatomopatológico, com a identificação do verme adulto ou ovos, necessitando inclusão de quase totalidade do material para confirmação da enfermidade (4).

Os achados macroscópicos característicos são lesões com aspecto de infarto-enteromesentérico, espessamento intestinal difuso e nodulações no ceco-cólons, podendo ser presente áreas de perfurações intestinais, provocadas pela necrose. Na microscopia, evidencia-se arterite eosinofílica, infiltrado eosinofílico e granulomas, bem como a identificação de ovos e vermes do parasito, a fim de confirmar-se a enfermidade (30).

2.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Tratamentos com anti-helmínticos não se mostraram eficazes contra o parasito e devido as manifestações clínicas que ocorrem após sua maturação, pode provocar lesões devido sua morte dentro dos vasos sanguíneos (31). O anticoagulante Enoxaparina, utilizado a fim de prevenir lesões intestinais isquêmicas em camundongos, não mostrou efeito protetor contra AA, mesmo em altas doses, sendo seu uso não recomendado como tratamento da doença (32).

Por se tratar de frutas e verduras contaminadas com o muco dos moluscos como fonte de transmissão ao homem, é recomendado a utilização de hipoclorito de sódio para inativação da forma infectante do parasito. A incubação de larvas infectantes (L3) a 5°C por 12 horas em

hipoclorito de sódio 1,5%, com resultado de 0% da viabilidade das mesmas. Outros meios como, solução saturada de cloreto de sódio e vinagre e, obtiveram viabilidade de 1,8% e 2,4%, respectivamente, mostrando também serem úteis para descontaminação dos alimentos (33).

2.8 ELIMINAÇÃO DE LARVAS

Os camundongos *M. musculus*, linhagem Swiss, desenvolvem AA, porém apresentam uma alta mortalidade, pois não há registros de camundongos infectados naturalmente (34), sendo também muito utilizados como modelo experimental em pesquisas (6). A quantificação de formas parasitárias de L1 liberadas por esses roedores pode expressar uma melhor interação parasito e hospedeiro (7), corroborando para elucidação da enfermidade.

Anteriormente, avaliou-se o ritmo circadiano de eliminação de L1 de *A. costaricensis* em fezes de camundongos Swiss, onde apresentaram maior eliminação de larvas à noite devido a maior quantia de fezes neste período, também apontaram o fenômeno de tolerância ao parasito em animais que sobreviveram por mais tempo (35). Outro estudo relatou a eliminação irregular e variação no número de L1 eliminadas diariamente por camundongos da mesma linhagem, infectados com 10 L3 de *A. costaricensis* (7).

3. CAPÍTULO 1

(Artigo submetido e formatado segundo as normas do periódico *Journal of Helminthology*, de qualis B1 e fator de impacto 1,42).

Shedding of *Angiostrongylus costaricensis* larvae into the feces of Swiss mice experimentally infected with different infective doses

Caroline Chaves Hermes¹, Elise Benvegnú¹, Márcio Machado Costa¹, Rubens Rodriguez², Maria Isabel Botelho Vieira^{1*}.

¹ Graduate Program in Bio-Experimentation, University of Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Faculty of medicine, University of Passo Fundo – UPF; Institute of Pathology of Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Universidade de Passo Fundo – UPF, Campus I, BR 285, Bairro São José. 99052-900 – Passo Fundo, RS, Brazil. Tel.: +55 54 33168485, e-mail: marisabel@upf.br.

Abstract

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is an endemic zoonosis in south Brazil caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*, and have wild rodents as final hosts and terrestrial molluscs as intermediate hosts. Humans are accidentally infected by ingesting the infecting stages of the parasite. To date, correlations between shedding of first stage larvae (L1) and different infective doses (L3) have not been fully elucidated. Thus, we assessed the rate of fecal shedding of L1 excreted by Swiss mice experimentally infected with different parasite doses of *A. costaricensis* and its correlation to mortality rates in these laboratory rodents. Thirty-two male Swiss mice were infected with L3 of *A. costaricensis* and divided into 4 groups: group 1: 5 L3; group 2: 15 L3; group 3: 30 L3; and group 4: control. Fecal samples were collected from each animal starting at the day 20 post infection (DPI). The results of the present study show that animals infected with a higher infective dose had a higher rate of fecal shedding of larvae. We conclude that different infective doses of L3 from *A. costaricensis* interfere with the shedding of L1. Different infective doses of L3 do not alter the mortality rate of these experimental animals.

Keywords: fecal shedding of larvae, infective doses, abdominal angiostrongyliasis

Introduction

Abdominal angiostrongiliasis (AA) is a disease caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*, and was first described in Costa Rica (Morera & Céspedes, 1971). It is a zoonosis endemic to south Brazil. Wild rodents are the final hosts of this nematode, and molluscs the intermediate hosts (Graeff-Teixeira *et al.*, 1989). In the intermediate host, first stage larvae (L1) undergo two molts. Third stage larvae (L3) are the infective form which are excreted by the host admixed with intestinal mucus (feces). The adult parasite lives in the branches of the superior mesenteric artery of rodents which are infected after ingesting L3-contaminated molluscs. Infected rodents shed L1 in their faeces (Morera & Céspedes, 1970).

Human are accidental hosts, and ingest food contaminated with L3 (Mota & Lenzi, 2005). Typical symptoms of the disease in humans include abdominal pain and the presence of a palpable tumor-like mass which may be misinterpreted as appendicitis or neoplasia (Graeff-Teixeira *et al.*, 1989). Abdominal angiostrongiliasis is of major importance in the State of Rio Grande do Sul (RS), south Brazil, where most of the cases of the disease have been diagnosed, especially in the northern region part of the State. The disease has a seasonal pattern in this particular geographic region of the country. An increased number of cases of this parasitic infection is diagnosed during the summer due to the reproduction and increased activity of the molluscs during this particular season (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991).

Swiss mice develop AA with high mortality rates (Morera, 1985). These laboratory animals are used as an animal model of the disease (Ishih & Nishimura, 1997). The quantification of L1 released by these rodents expresses a better parasite and host interaction (Canali *et al.*, 1998).

Correlations between infections and different doses of L3 in a murine experimental model, fecal shedding of L1, and survival of these animals after natural or experimental infection are aspects of the disease yet to be elucidated. Additional studies are needed to further our knowledge on the pathogenesis of this disease, which is especially important from a public health standpoint. These studies may provide a better understanding of the relationship between parasite and host. Our hypothesis is that infected animals with higher parasite doses have faster mortality rate and higher fecal shedding of larvae. Therefore, we evaluated the shedding rate of L1 excreted by Swiss mice in feces in an experimental model of infection with different parasite doses of *A. costaricensis* correlating to their mortality rates.

Materials and Methods

Animals

Thirty-two male mice *M. musculus*, Swiss strain, with ages ranging between 8 and 10 weeks, were used in this study. These animals were prophylactically medicated with ivermectin (Ivermic® 1%) 30 days before the experimental infection started.

Isolation of A. costaricensis larvae

L3 were obtained from the molluscum *Biomphalaria glabrata* infected with *A. costaricensis* from the Parasitology Laboratory at the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUC-RS), Brazil, which were euthanized and digested in pepsin solution 0.03% and hydrochloric acid 0.7% at 37° C. Mice were infected with L3 by gavage (Bender *et al.*, 2003).

Experimental design

Mice were divided into 4 groups: Group 1 (G1): animals infected with 5 L3; Group 2 (G2): animals infected with 15 L3; Group 3 (G3): animals infected with 30 L3; and Group 4 (G4/control): non-infected animals. At the end of the experiment, animals that survived the infection were humanely euthanized by inhalation with isoflurane (Isoforine®). Animals were subjected to minimal stress during euthanasia, and did not feel any pain during this procedure.

Fecal sampling

Twenty-four infected mice were housed individually in cages and provided with water and food *ad libitum*. In order to avoid that faeces became dehydrated, cage floors were coated with moist paper and metal grids. Fecal sampling followed the same schedule to assure that the total amount of stool specimens collected per day was similar. Fecal samples were weighed on a precision scale, placed into a funnel with water, and stored overnight to allow sedimentation to occur. Then 10 ml of the homogenized sediment was centrifuged and aliquoted into 3 samples of 10 µl each which were examined under a light microscope for L1 counting. The sum of the sample counts was multiplied by 100 and divided by 3 to estimate the total number of L1 in 1 ml of suspension. The absolute count of L1 in the amount of feces collected was divided by the weight of feces in grams and expressed in number of L1/g of feces (Azevedo *et al.*, 2010).

Statistical analyses

The larval excretion variable had its normality tested by the Kolmogorov-Smirnov test. This variable had a non-normal distribution. Thus, groups were compared using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test. In addition, the Kaplan-Meier statistical method was used to obtain the accumulated survival curve followed by a comparison between the groups using the log-rank test. Data were considered significantly different with a (P) probability of less than 5%. The statistical software GraphPad Prism, version 6.01, was used for statistical analysis and graphing.

Results

Shedding of L1

Starting on day 23 post infection (DPI), all infected mice that survived shed L1 in their feces; 3 animals from group 2 and 2 animals from group 3 died before the first day of fecal shedding of larvae (20 DPI). Animals from groups

1, 2 and 3 shed L1 until 66 DPI, 39 DPI and 61 DPI, respectively. Group 1 showed lower L1 shedding/g while group 3 showed higher L1 shedding/ g in comparison with the other groups (Fig. 1). The differences of L1 fecal shedding per gram between the 3 experimental groups were more significant according to Table 1.

Mortality rates

Animals from group 1 had a longer survival time than animals from other groups; 2 animals survived up to 100 DPI, and were humanely euthanized. Groups 2 and 3 initially presented similar mortality rates. However, animals from group 2 died earlier than animals from group 3. There were no statistically significant differences between groups. Animals from the control group were euthanized at 100 DPI. Control animals were kept under the same conditions as animals from other groups (Fig. 2).

Within the same group animals had different survival rates. In group 1, animals started dying between 24 DPI and 100 DPI. In groups 2 and 3, deaths occurred between 19 DPI and 39 DPI and 13 DPI and 61 DPI, respectively (Table 2).

Discussion

Some aspects on the pathogenesis of AA in murine experimental models warrants further research to be elucidated especially with regard to the interactions that occur between parasite and host. In the present study, we evaluated the rate of fecal shedding of L1 in Swiss mice experimentally infected with different infective doses of L3 of *A. costaricensis*, and its correlation to mortality rates in the experimental groups.

Our study showed that there were daily variations in the rate of fecal shedding of L1 between groups and within groups as well, and that these variations occurred in specific days. Canali *et al.* (1998) reported a irregular pattern of fecal shedding of L1 and variations in the number of L1 excreted in the stools daily by mice from the same strain which were infected with 10 L3 of *A. costaricensis*. To date, there are no studies reporting parasite rates of mice infected with different doses of larvae.

Infected animals from group 1 (5 L3) presented longer survival times compared with those from group 3 (30 L3); 2 animals from group 1 were alive until the end of the experiment. Mice from the control group were euthanized at 100 DPI which shows that the other animals died due to the experimental infection without external interferences. De Azevedo *et al.* (2010) correlated the circadian rhythm of L1 fecal shedding and the number of larvae per gram of feces with the survival of mice infected with 10 L3. Shedding of L1 in the stools was more intense during the evening due to the greater production of feces (increased defecation) that occurs at night. Increased fecal shedding of larvae also demonstrated that these rodents tolerate well this helminth infection.

Differences in the tolerance to infection highlight the coevolution relationship between parasite and host interaction in which the host survives for a certain period of time after infection ensuring its reproduction and propagation (Gandon *et al.*, 2008). The variation in the survival time of rodents is the result of the genetic variability of each individual which explains the susceptibility or resistance of each individual to infection (Ishih & Sano, 1989). Rodents such as *Sigmodon hispidus* and *Rattus rattus* are considered natural hosts of this parasite. However, there are no published reports of natural cases of *A. costaricensis* infection in *M. musculus* (Tesh *et al.*, 1973). Quantification of

L1 shed in the feces by experimentally infected mice may demonstrate a better interaction between the host and the parasite (Canali *et al.*, 1998).

To our knowledge, this is the first study comparing patterns and variations of fecal shedding of L1 by animals experimentally infected with different doses of *A. costaricensis*. The results of our study showed remarkable differences mainly between the 5 L3 and 30 L3 groups. In helminth infections, host susceptibility is linked to the major histocompatibility complex (MHC) (Ishih *et al.*, 2000). Previous studies have highlighted the importance of MHC-II-mediated immune responses in regulating fecal shedding of L1, and demonstrates that mice with MHC-II deficiency shed larger numbers of L1 in their stools compared with mice with a functional immune system. However, this finding is not associated with the survival times of these animals (Geiger *et al.*, 2003).

Based on our findings, we conclude that different infective doses containing L3 of *A. costaricensis* interfere with the fecal shedding of L1 by Swiss mice. Higher doses result in increased shedding of larvae in the stools but do not have any influence in the mortality rates.

Acknowledgements

We would like to thank the University of Passo Fundo (UPF), Brazil, for the support during this study that was carried out in its laboratory animal facility, and the Parasitology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUC/RS), Brazil.

Conflict of interest statement

None.

Ethical standards

The study was conducted at the laboratory animal facility of the Institute of Biological Sciences of the University of Passo Fundo, Passo Fundo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The research proposal was approved by the UPF Committee on Animal Research and Ethics (CEUA-UPF - Protocol No. 034/2016).

References

- Bender, A.L., Maurer, R.L., da Silva, M.C.F., Bem, R., Terraciano, P.B., da Silva, A.C.A. & Graeff Teixeira, C.** (2003) Ovos e órgãos reprodutores de fêmeas de *Angiostrongylus costaricensis* são reconhecidos mais intensamente por soros humanos de fase aguda na angiostrongilíase abdominal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 449 – 454.
- Canali, C., Goulart, A.H. & Graeff-Teixeira, C.** (1998) Study on the elimination of *Angiostrongylus costaricensis* first stage larvae in the experimental infection of Swiss mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 269 – 272.

- de Azevedo, G.V., Rodriguez, R., Porto, S.M., Graeff-Teixeira, C. & Fornari, F.** (2011) Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. *Parasitology Research* 108, 537–540.
- Gandon, S., Buckling, A., Decaesrecker, E. & Day, T.** (2008) Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *Journal of Biology* 21, 1861 – 1866.
- Geiger, S.M., Hoffmann, W.H., Soboslay, P.T., Pfaff, A.W., Graeff-Teixeira, C. & Schulz-Key, H.** (2003) *Angiostrongylus costaricensis* infection in C57BL/6 mice: MHC-II deficiency results in increased larval elimination but unaltered mortality. *Parasitology Research* 90, 415–420.
- Graeff-Teixeira, C., Thomé, J.W., Pinto, S.C.C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H.L.** (1989) *Phyllocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84, 65 – 68.
- Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H.L.** (1991) Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in Southern Brazil. *Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo* 33, 373 – 378.
- Ishih, A. & Nishimura, M.** (1997) Differential Responses of SM/J and A/J Mice to Experimental *Angiostrongylus costaricensis* Infection. *Journal of Parasitology* 27, 1411-1414.
- Ishih, A., Ohno, T., Nishimura, M. & Terada, M.** (2000) Genetic analysis of mortality in murine angiostrongyliasis costaricensis using SMXA recombinant inbred mouse strains. *Parasitology International* 49, 335–338.
- Ishih, A.I. & Sano, M.** (1989) Strain dependent differences in susceptibility of mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Journal of Helminthology* 63, 302-306.
- Mota, E.M. & Lenzi, E.M.M.** (2005) *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 407-420.
- Morera, P.** (1985) Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitology* 1, 173–175
- Morera, P. & Céspedes, R.** (1971) *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 18, 17.
- Tesh, R.B., Ackerman, L.J., Dietz, W.H. & Williams, J.A.** (1973). *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27, 348-356.

Table 1. Shedding of *Angiostrongylus costaricensis* larvae (median; minimum; maximum) into feces of Swiss mice infected with different infective doses.

	Experimental groups		
	G1 (5 L3)	G2 (15 L3)	G3 (30 L3)
24 DPI	0,00 ^a (0,00 - 15,55)	261, 90 ^{ab} (0,00 -922,22)	953,33 ^b (11,11 – 1206,66)
25 DPI	0,00 ^a (0,00 – 22,22)	240,00 ^{ab} (00,00 – 766,66)	840,55 ^b (33,33 – 2583,33)
26 DPI	0,00 ^a (0,00 – 183,33)	557,14 ^{ab} (33,33 – 2116,66)	1339,52 ^b (93,33 – 2400,00)
27 DPI	2,91 ^a (0,00 – 183,33)	447,61 ^{ab} (277,77 – 742,85)	2331,42 ^b (100,00 – 3166,66)
28 DPI	35,23 ^a (0,00 – 166,66)	973,33 ^{ab} (422,22 – 1958,33)	3250,00 ^b (100,00 – 5458,33)
29 DPI	125,00 (13,33 – 377,77)	1222,22 (722,22 – 1333,33)	3548,60 (88,88 – 5733,33)
30 DPI	111,11 (0,00 – 1166,66)	2550,00 (1150,00 – 3950,00)	4161,11 (150,00 – 7888,88)
33 DPI	155,55 ^a (11,11 – 666,66)	2144,44 ^{ab} (1900,00 – 2388,88)	8055,55 ^b (4133,33 – 10333,33)
35 DPI	400,00 ^a (33,33 – 1583,33)	2375,00 ^{ab} (1650,00 – 3100,00)	8111,11 ^b (7444,44 – 8333,33)
36 DPI	233,33 ^a (16,66 – 1100,00)	3127,77 ^{ab} (1200,00 – 5055,55)	13333,33 ^b (5166,66 – 15666,66)
38 DPI	355,55 ^a (0,00 – 1216,66)	-	4611,11 ^b (4500,00 – 10666,66)
39 DPI	249,99 ^a (0,00 – 800,00)	-	4833,33 ^b (4444,44 – 8500,00)
40 DPI	311,10 ^a (16,66 – 383,33)	-	8000,00 ^b (5666,66 – 9833,33)
41 DPI	916,66 ^a (0,00 – 1500,00)	-	14666,66 ^b (7777,77 – 30333,33)
42 DPI	783,33 (0,00 – 4650,00)	-	7222,22 (3388,88 – 9500,00)
43 DPI	794,44 ^a (8,33 – 1155,55)	-	7222,22 ^b (5083,33 – 7416,66)
44 DPI	850,00 ^a (66,66 – 1777,77)	-	5888,88 ^b (3683,33 – 8000,00)
45 DPI	658,33 ^a (0,00 – 1277,77)	-	6966,66 ^b (3766,66 – 9222,22)
46 DPI	1188,88 (66,66 – 3466,66)	-	6033,33 (3391,66 – 13183, 33)
47 DPI	794,44 ^a (11,11 – 1766,66)	-	5033,33 ^b (4450,00 – 5883,33)
48 DPI	1249,99 (33,33 – 4016,66)	-	10755,55 (2433,33 – 24300,00)
49 DPI	1468,05 (33,33 – 2000,00)	-	4500,00 (1311,11 – 14700,00)
50 DPI	1733,33 ^a (44,44 – 1911,11)	-	9933,33 ^b (4500,00 – 13883,33)
51 DPI	555,55 ^a (33,33 – 966,66)	-	12066,66 ^b (6366,66 – 14966,66)
52 DPI	2083,33 (22,22 – 3800,00)	-	8833,33 (5500,00 – 12166,66)

^{a,b}. Different letters indicate significant differences ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

Table 2. Survival time of each mouse in days post infection (DPI).

G1 (5 L3)		G2 (15 L3)		G3 (30 L3)	
	DPI		DPI		DPI
R1	100	R1	38	R1	53
R2	27	R2	27	R2	61
R3	24	R3	30	R3	52
R4	38	R4	20	R4	13
R5	100	R5	27	R5	35
R6	66	R6	39	R6	20
R7	29	R7	19	R7	22
R8	50	R8	21	R8	19

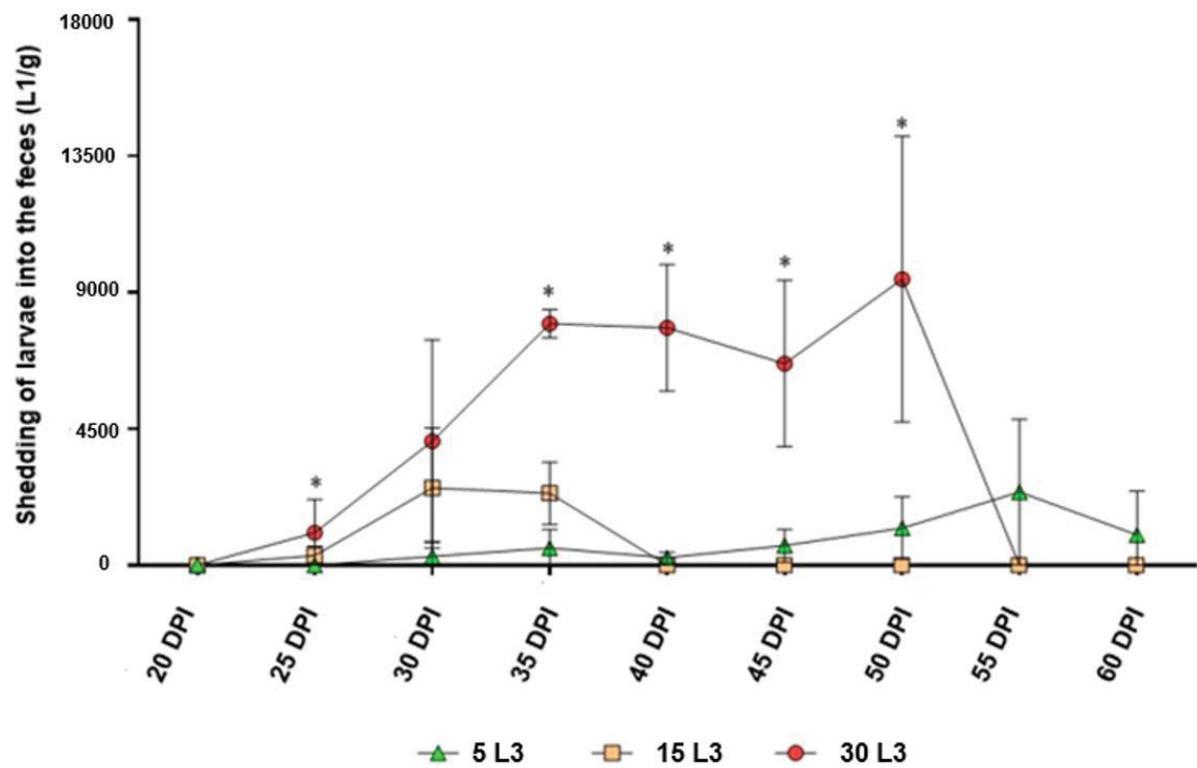


Fig. 1. Variation in the fecal shedding of L1 of *Angiostrongylus costaricensis* in Swiss mice experimentally infected with different infective doses of L3. *Asterisk highlights a significant difference ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis, Dunn's test, 5 L3 vs. 30 L3).

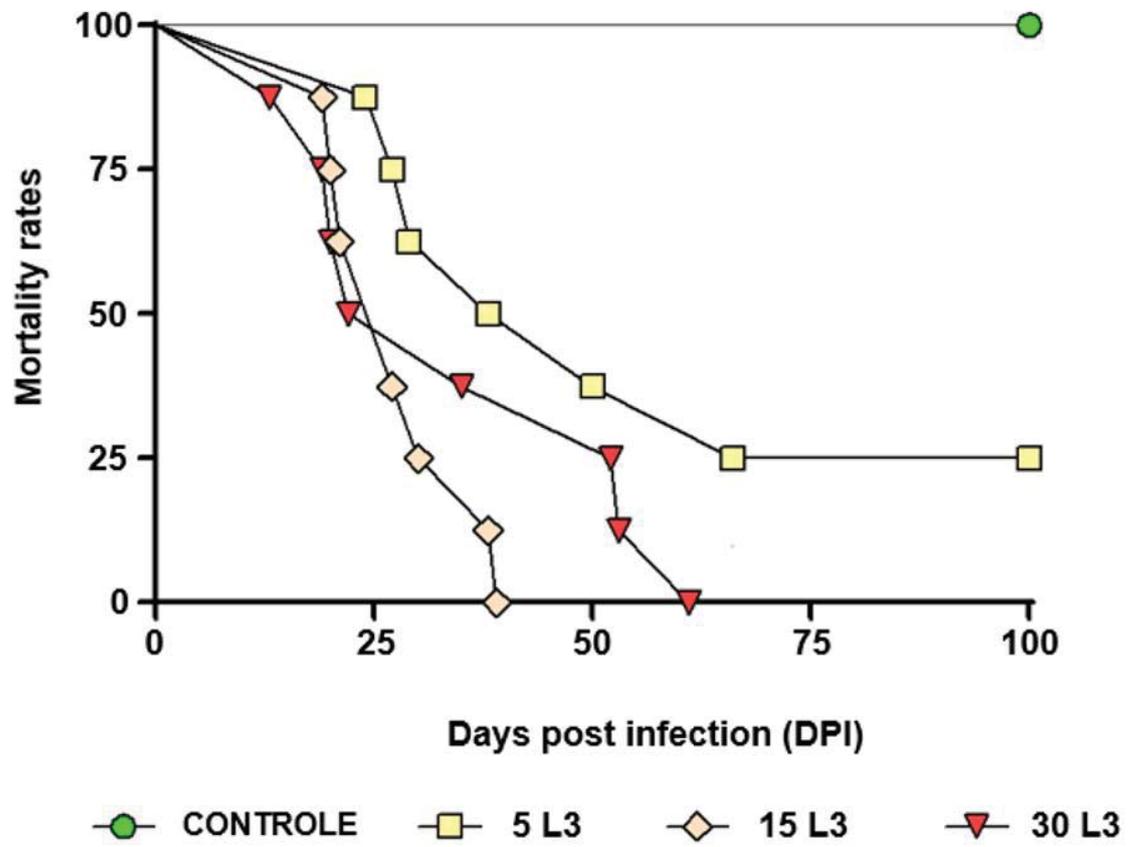


Fig. 2. Mortality rates in each experimental group according to different infected doses.

4. CAPÍTULO 2

(Artigo formatado segundo as normas do periódico *Acta Tropica* de qualis A2 e fator de impacto 2,21).

Aspectos histopatológicos em camundongos Swiss infectados com diferentes doses de *Angiostrongylus costaricensis*

Caroline Chaves Hermes^a, Elise Benvegnú^a, Márcio Machado Costa^a, Rubens Rodriguez^b, Maria Isabel Botelho Vieira^{a*}

^a Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo – UPF, BR 285, São José, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Universidade de Passo Fundo; Instituto de Patologia de Passo Fundo - Teixeira Soares, 885 - Centro, 99010-08, Passo Fundo, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 54 33168485.

E-mail: marisabel@upf.br.

Resumo

A patogênese da angiostrongilíase abdominal (AA) ainda permanece com lacunas a serem estudadas, sendo os camundongos Swiss utilizados como modelos experimentais à infecção. Trata-se de uma enfermidade causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres, sendo o homem considerado hospedeiro acidental pela ingestão da forma infectante do parasito. Ainda não há esclarecimento se a dose infectante (L3) em um modelo experimental está relacionada com a gravidade das lesões e mortalidade dos animais. Portanto, nosso objetivo foi analisar as alterações histopatológicas de camundongos Swiss infectados com diferentes doses de *A. costaricensis*. Trinta e dois camundongos Swiss foram infectados com L3 de *A. costaricensis*, divididos em quatro grupos: grupo 1: 5 L3; grupo 2: 15 L3; grupo 3: 30 L3 e grupo 4: controle. Após o óbito de cada animal, realizou-se sua necropsia para análise macro e microscópica dos espécimes. Nossos resultados mostraram que a maioria dos roedores morreram entre 20 a 40 dias após a infecção, apresentando broncopneumonia e hepatite, destacando as diferenças entre os grupos em relação a presença de trombos intestinais, esplenite, ovos/larvas e infarto no fígado. Concluímos que diferentes doses infectantes de *A. costaricensis* alteram os aspectos histopatológicos dos camundongos, onde maiores doses resultam em presença abundante de ovos e larvas e infartos no fígado, assim como esplenites e tromboes intestinais, reduzindo também a sobrevivência desses animais.

Palavras-chave: Angiostrongilíase abdominal, dose infectante, histopatologia

1. Introdução

O nematódeo *Angiostrongylus costaricensis* é causador da angiostrongilíase abdominal (AA) descrito pela primeira vez, no ano de 1970, por Morera e Céspedes (Morera and Céspedes, 1971). Apresenta como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres, sendo o homem hospedeiro acidental com a ingestão da forma infectante do parasito em alimentos (Graeff-Teixeira et al., 1987). As principais manifestações histopatológicas da AA são lesões vasculares com presença de infiltrado eosinofílico e granulomas perivasculares, podendo estar relacionadas com trombos, além da caracterização de estruturas parasitárias na luz vascular (Agostini et al., 1984).

Tratamentos com anti-helmínticos não se mostraram eficazes contra a enfermidade devido as manifestações clínicas que ocorrem após a maturação do parasito, podendo causar lesões em decorrência de sua morte dentro dos vasos sanguíneos (Mentz and Graeff-Teixeira, 2003). Através do exame anatomopatológico é feito seu diagnóstico definitivo, por meio da identificação do verme adulto ou ovos (Graeff-Teixeira et al., 1991).

A patogênese da AA ainda não está totalmente elucidada, sendo suas manifestações estudadas em modelos experimentais, como camundongos da espécie *Mus musculus*, os quais desenvolvem a enfermidade, apresentando sinais clínicos semelhantes aos sintomas no homem, porém com uma alta mortalidade (Morera, 1985; Ishih and Nishumura, 1997).

Ainda não há esclarecimento se a dose infectante (L3) em um modelo experimental está relacionada com a gravidade das lesões e mortalidade dos animais. Portanto, nosso objetivo foi analisar as alterações histopatológicas de camundongos Swiss infectados com diferentes doses de *A. costaricensis*.

2. Materiais e métodos

2.1 Sujeitos

Utilizou-se 32 camundongos Swiss machos, com idades entre oito a 10 semanas, profilaticamente medicados com Ivermectina (Ivermic® 1%), 30 dias antes da infecção, os quais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1 (G1) - animais

infectados com 5 L3; Grupo 2 (G2) - animais infectados com 15 L3; Grupo 3 (G3) - animais infectados com 30 L3 e Grupo 4 (G4/controle) - animais não infectados.

2.2 Obtenção de larvas L3 de *A. costaricensis*

A obtenção de L3 deu-se a partir do molusco *Biomphalaria glabrata*, oriundos do laboratório de Parasitologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) os quais foram eutanasiados e digeridos em solução de pepsina 0,03% e ácido clorídrico 0,7%, a 37° C e inoculados nos camundongos pelo método gavagem (Bender *et al.*, 2003).

2.3 Ética

O estudo foi executado no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UPF (CEUA-UPF - Protocolo N° 034/2016).

2.4 Análise histopatológica

Após o óbito de cada animal, realizou-se a necropsia, sendo os espécimes fixados em formol 10% por 24 h. Após, para análise microscópica, os mesmos foram emblocados em parafina e obtidos cortes histológicos em micrótomo com 3,5µm de espessura, corados em Hematoxilina e Eosina (HE), para serem analisados ao microscópio óptico. Foram investigados os seguintes aspectos: (1) presença de infarto; (2) identificação de parasitas, larvas e ovos adultos; (3) infiltrado eosinofílico; (4) formação de granuloma; (5) caracterização de vasculite e trombose, (6) pancreatite e (7) broncopneumonia.

2.5 Análise estatística

As variáveis qualitativas foram organizadas em tabelas de contingência, obtendo-se, a partir de estatística descritiva, as frequências relativas e/ou absolutas. Likelihood ratio test foi empregado em tabelas 3 x 2 e 3 x 4, para se verificar associação entre as variáveis categóricas, quando as frequências esperadas foram menores do que 5. Os dados

foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$). O programa SPSS®, versão 20.0, foi empregado para a realização das análises.

3. Resultados

3.1 Mortalidade

A maioria dos animais morreram entre 20 a 40 dias após a infecção (70,8%), onde dois animais do G1 permaneceram vivos até os 100 dias pós infecção (DPI), no entanto, os animais do G2 vieram a óbitos mais precocemente que os animais dos demais grupos (Tabela 1).

3.2 Achados macro e microscópicos

No intestino, houve presença de trombo em todos os animais do G2 (Fig. 1A, 1B), em comparação com 37,5% do G1 e 75% do G3 (Fig. 1C), apresentando diferença significativa entre os grupos. O infarto intestinal mostrou-se de maneira mais intensa nos animais do G3 (87,5%) (Fig. 1D). Presença de pancreatite em 50% dos animais do G1 e 87,5%, nos animais do G2 e G3 (Fig. 2A) (Tabela 2). No entanto, o G1 apresentou granuloma (62,5%) e eosinofilia intestinal (87,5%), ambos de intensidade moderada, em maior porcentagem dos que os demais grupos (Tabela 3).

No baço, a esplenite mostrou-se presente em todos os grupos, sendo o G2 e G3, em maior proporção (87,5% e 100%, respectivamente), em comparação com 50% do G1, apresentando diferença significativa. Houve infarto esplênico em 50% dos animais do G1 e do G2 e 62,5% dos animais do G3 (Fig. 2B) (Tabela 2).

Presença de broncopneumonia em 75% dos animais do G1 (Fig. 2C) e 100% dos animais do G2 (Fig. 2D) e G3, assim como a porcentagem de animais que apresentaram hepatite (G1: 75%; G2 e G3: 100%). Houve infarto hepático em maior proporção no G2 (Fig. 3A) e G3 (Fig. 3B) (75% e 50%, respectivamente), em relação ao G1 (12,5%), apresentando diferença significativa (Tabela 2). Os animais dos G2 e G3 (Fig. 3C, 3D) tiveram ovos e larvas no fígado, de moderada intensidade em 50%, enquanto os do G1 apresentaram 37,5% de leve intensidade, com diferença significativa (Tabela 3).

4. Discussão

Por ser a AA uma doença de grande importância, devido suas manifestações clínicas, histológicas e dificuldade em seu tratamento, cada vez mais tornam-se indispensáveis estudos que auxiliem para elucidação da enfermidade. Portanto, analisamos as alterações histopatológicas de camundongos Swiss infectados com diferentes doses de *A. costaricensis*.

Em nosso experimento, todos os camundongos do G2 (15 L3), apresentaram formação de trombos no intestino, foi também o grupo que apresentou mortalidade precoce dos animais. Anteriormente Graeff-Teixeira et al. (1991), relataram as principais manifestações histopatológicas da AA, com presença de trombo intestinal, além de lesões do vaso mesentérico com presença de infiltração eosinofílica e granulomas perivasculares.

O infarto intestinal, presente principalmente nos camundongos do G3 (30 L3), é considerado outra principal complicação da AA, podendo levar à morte (Graeff-Teixeira et al., 1991). Em casos de obstrução ou infarto intestinal em pacientes com AA, faz-se necessário tratamento por meio de cirurgia (Rodriguez et al. 2008), pois o uso de anti-inflamatórios não apresenta resultados satisfatórios (Mentz e Graeff-Teixeira 2003). Altas doses do anticoagulante enoxaparina também não impede a formação de lesões intestinais, nem mesmo promove aumento da sobrevivência de camundongos infectados experimentalmente com o parasito (Sandri et al., 2017).

Nossa hipótese é que devido ao fato de 100% dos animais do G2 apresentarem trombo intestinal, isso resultaria em infarto, levando a peritonite e pôr fim a sepse, resultando no óbito dos roedores. Um estudo anterior realizado por Rodriguez et al. (2011), indicou a sepse como uma importante causa de morte em camundongos Swiss infectados com 10 L3 de *A. costaricensis*.

Diferentemente do G3, onde 50% dos animais apresentaram granuloma intestinal de moderada intensidade e 100% vasculite intestinal, sendo que o granuloma vascular pode levar a sua obliteração e a isquemia do órgão. O mesmo estudo realizado por Rodriguez et al. (2011), propôs que a formação de vasculites e granuloma podem culminar em oclusão vascular e isquemia tecidual enfatizando a importância dessas reações inflamatórias na patogênese da AA. Em relação aos nossos achados, o infarto intestinal pós trombose mesentérica seria uma forma mais rápida de levar os camundongos a óbito e a obliteração vascular por granuloma intestinal associado a vasculite eosinofílica, uma forma mais lenta.

Ao nosso conhecimento esse é o primeiro estudo que correlaciona diferentes doses de *A. costaricensis* com as possíveis manifestações em um modelo experimental. Concluímos que diferentes doses infectantes de *A. costaricensis* alteram os aspectos histopatológicos estudados em camundongos Swiss, sendo que doses maiores (15 L3 e 30 L3), resultam em presença abundante de ovos e larvas e infarto no fígado, assim como esplenite e trombose intestinal, reduzindo também a sobrevivência desses animais.

Agradecimentos

Ao Biotério da Universidade de Passo Fundo, pelo suporte na realização do trabalho, ao Laboratório de Parasitologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Instituto de Patologia de Passo Fundo.

Referências

- Agostini, A. A., Peixoto, A., Caleffi, A. L., Dexheimer, A., Camargo, R. R., 1984. Angiostrongilíase abdominal: Três casos observados no Rio Grande do Sul. Associação médica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 200 – 203.
- Bender, A. L., Maurer, R. L., da Silva, M. C. F., Bem, R., Terraciano, P. B., da Silva, A. C. A., Graeff Teixeira, C., 2003. Ovos e órgãos reprodutores de fêmeas de *Angiostrongylus costaricensis* são reconhecidos mais intensamente por soros humanos de fase aguda na angiostrongilíase abdominal. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36, 449 – 454.
- Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L., Lenzi, H. L., 1991. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. Parasitol Res 77, 606 – 611.
- Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L., Lenzi, H. L., 1987. Abdominal angiostrongyliasis - an under diagnosed disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82, 353-4.
- Ishih, A., Nishimura, M., 1997. Differential Responses of SM/J and A/J Mice to Experimental *Angiostrongylus costaricensis* Infection. *Journal of Parasitology* 27, 1411-1414.
- Mentz, M. B., Graeff-Teixeira, C., 2003. Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45.
- Morera, P., 1985. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitology* 1, 173 – 175.

- Morera, P., Cespedes, R., 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 18, 173 – 185.
- Rodriguez, R., Dequi, R. M., Peruzzo, L., Mesquita P. M., Garcia, E., Fornari, F., 2008. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 50, 339 – 341.
- Rodriguez, R., Porto, S. M., Ferrari, R. S., Marcolan, A. M., da Silva, A. C. A., Graeff-Teixeira, C., Fornari, F., 2011. Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitol Research*, 09, 787–792.
- Sandri, A. S. S., Rodriguez, R., Costa, M. M., Porto, S. M., Schwingell D., Vieira, M. I. B., 2017. High-dose enoxaparin in the treatment of abdominal angiostrongyliasis in Swiss mice. *Journal of Helminthology*.

Tabela 1. Óbito dos animais dos grupos infectados com diferentes doses de *Angiostrongylus costaricensis* em intervalo de dias.

G1 (5 L3)		G2 (15 L3)		G3 (30 L3)	
DPI	Óbitos	DPI	Óbitos	DPI	Óbitos
20-30	3	20-30	6	20-30	4
30-40	1	30-39	2	30-40	1
40-50	1			40-55	2
50-70	1			55-61	1
70-100	0				

Tabela 2. Achados macroscópicos e microscópicos em camundongos Swiss associados a infecções com diferentes doses de *Angiostrongylus costaricensis*.

Variáveis	G1		G2		G3		P
	N	%	N	%	N	%	
Infarto intestinal	4	50	4	50	7	87,5	0,170
Abscesso intestinal	0	0,0	1	12,5	0	0,0	0,319
Granulação intestinal	2	25	2	25	4	50	0,480
Fibrose intestinal	0	0	1	12,5	0	0	0,319
Aderência intestinal	0	0	1	12,5	0	0	0,319
Infarto baço	5	62,5	4	50	4	50	0,844
Trombo intestinal	3	37,5	8	100	6	75	0,009*
Necrose intestinal	5	62,5	7	87,5	8	100	0,082
Broncopneumonia	6	75	8	100	8	100	0,092
Ovos no pulmão	0	0	0	0	1	12,5	0,319
Larvas no pulmão	0	0	0	0	1	12,5	0,319
Esplenite	4	50	7	87,5	8	100	0,024*
Granuloma no baço	3	37,5	3	37,5	1	12,5	0,411
Infarto no baço	4	50	4	50	5	62,5	0,844
Hepatite	6	75	8	100	8	100	0,092
Infarto no fígado	1	12,5	6	75	4	50	0,030*
Pancreatite	4	50	7	87,5	7	87,5	0,146
Ovos no pâncreas	1	12,5	4	50	3	37,5	0,241
Larvas no pâncreas	1	12,5	4	50	3	37,5	0,241
Vermes no pâncreas	2	25	4	50	5	62,5	0,296

* Probabilidade menor que 5% ($P < 0,05$) indica diferença significativa.

Tabela 3. Achados microscópicos em camundongos Swiss associados a infecções com diferentes doses de *Angiostrongylus costaricensis*.

Variáveis	Intensidade	G1		G2		G3		P
		n	%	n	%	N	%	
Granuloma intestinal	AUSENTE	2	25	0	0	1	12,5	0,184
	LEVE	1	12,5	1	12,5	1	12,5	
	MODERADO	5	62,5	3	37,5	4	50	
	INTENSO	0	0	4	50	2	25	
Eosinófilo intestinal	AUSENTE	1	12	0	0	0	0	0,297
	LEVE	0	0	0	0	1	12,5	
	MODERADO	7	87,5	6	75	6	75	
	INTENSO	0	0	2	25	1	12,5	
Vasculite intestinal	AUSENTE	1	12,5	0	0	0	0	0,319
	LEVE	5	62,5	2	25	4	50	
	MODERADO	2	25	4	50	3	37,5	
	INTENSO	0	0	2	25	1	12,5	
Eosinófilo baço	AUSENTE	1	12,5	0	0	0	0	0,521
	LEVE	5	62,5	4	50	4	50	
	MODERADO	2	25	4	50	4	50	
	INTENSO	0	0	0	0	0	0	
Ovos e larvas no baço	AUSENTE	5	62,5	3	37,5	6	75	0,327
	LEVE	1	12,5	3	37,5	1	12,5	

	MODERADO	1	12,5	0	0	1	12,5	
	INTENSO	1	12,5	2	25	0	0	
	AUSENTE	1	12,5	0	0	0	0	
Eosinófilo fígado	LEVE	4	50	1	12,5	2	25	0,235
	MODERADO	3	37,5	7	87,5	5	62,5	
	INTENSO	0	0	0	0	1	12,5	
	AUSENTE	4	50	1	12,5	1	12,5	
Granuloma fígado	LEVE	3	37,5	4	50	4	50	0,401
	MODERADO	0	0	2	25	1	12,5	
	INTENSO	1	12,5	1	12,5	2	25	
	AUSENTE	4	50	0	0	1	12,5	
Ovos/larvas no fígado	LEVE	3	37,5	2	25	1	12,5	0,030*
	MODERADO	0	0	4	50	4	50	
	INTENSO	1	12,5	2	25	2	25	

* Probabilidade menor que 5% ($P < 0,05$) indica diferença significativa.

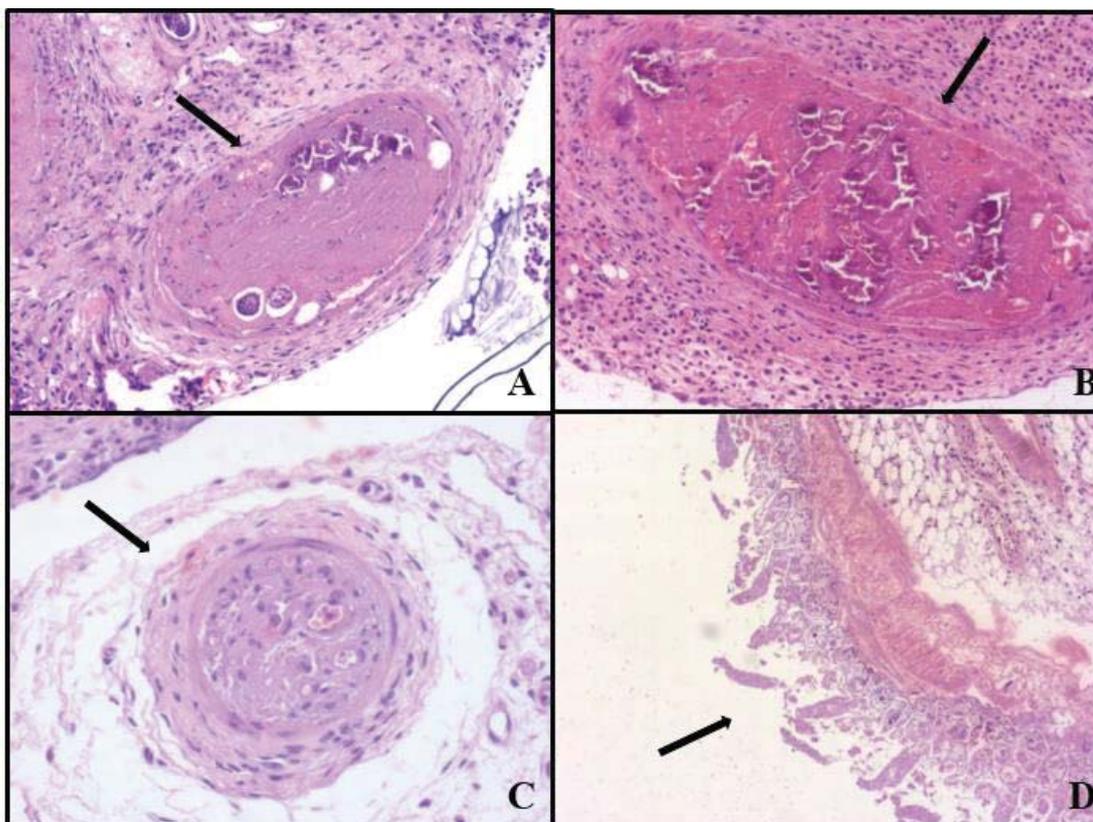


Fig. 1. A) Grupo 2: trombose arterial com ovos e calcificação (HE 100x); B) Grupo 2: trombose de artéria mesentérica (HE 100x); C) Grupo 3: artéria com trombo recanalizado (HE 200x); D) Grupo 3: infarto intestinal transmural com necrose de coagulação (HE 50x).

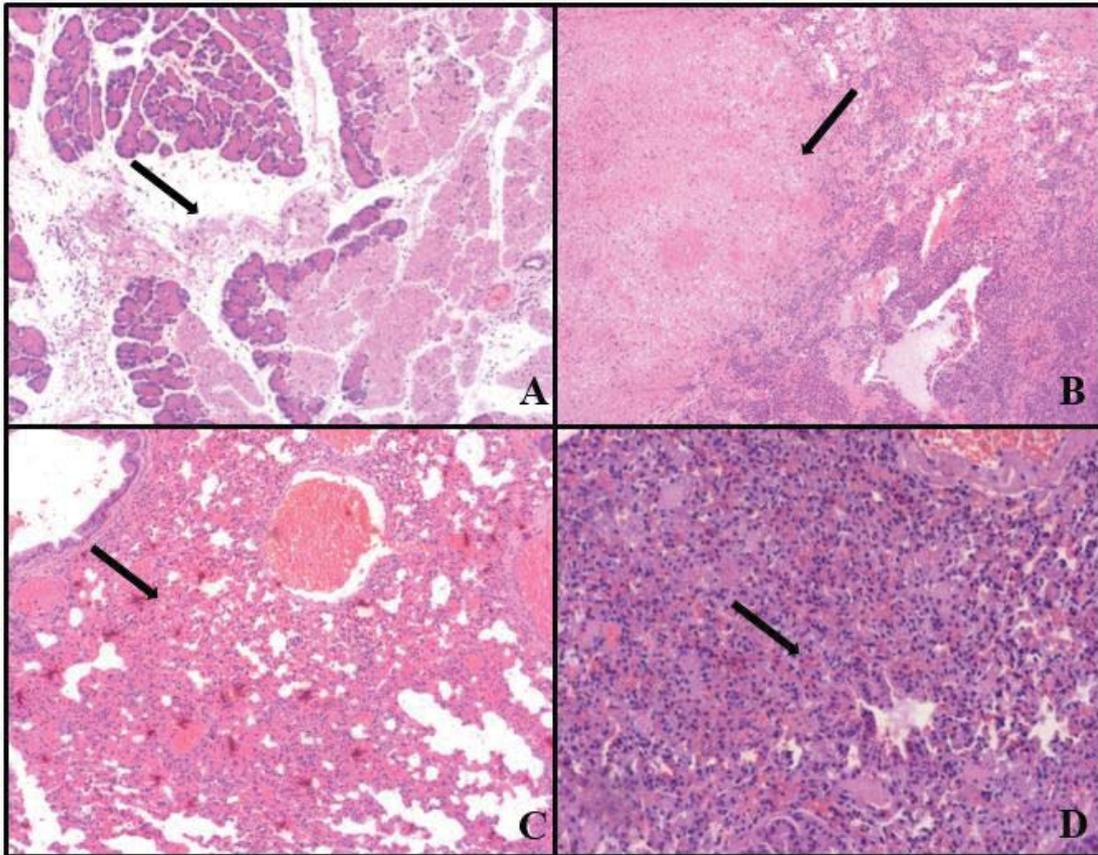


Fig. 2. Grupo 3: pancreatite aguda com necrose do parênquima (HE 50x); B) Infarto esplênico com trombo (HE 50x), C) Grupo 1: broncopneumonia (HE 50x); D) Grupo 2: broncopneumonia (HE 100x).

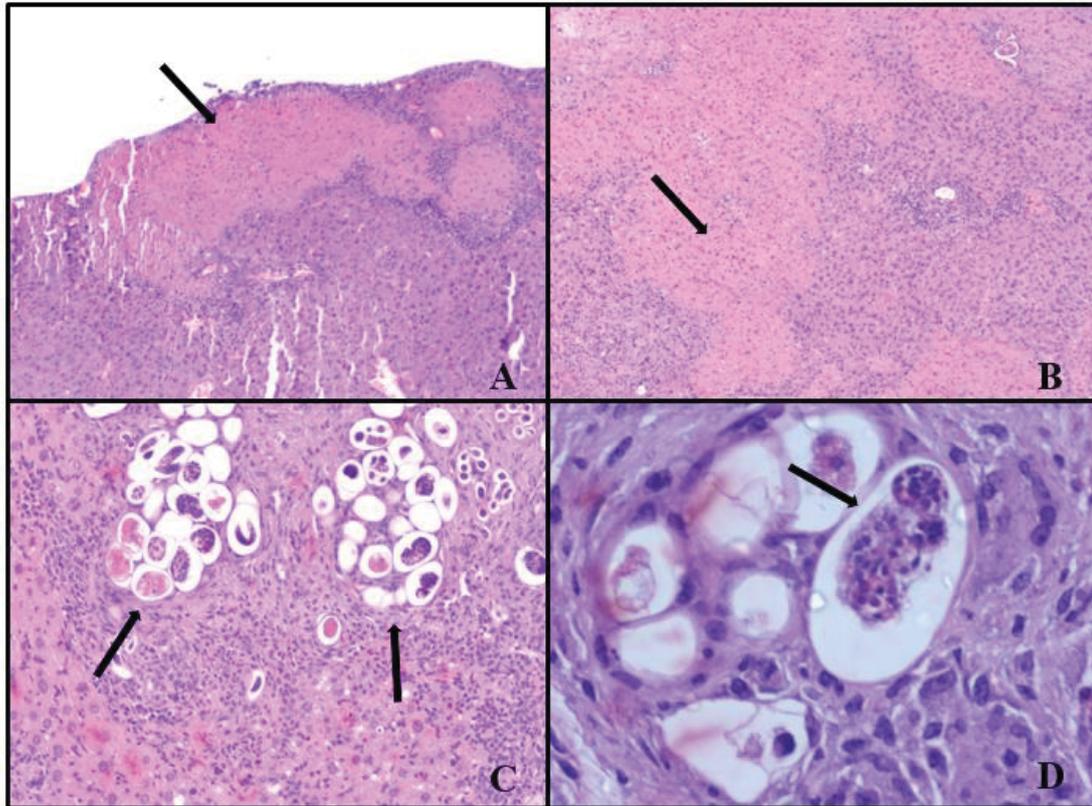


Fig. 3. A) Grupo 2: infarto hepático (HE 50x); B) Grupo 3: infarto hepático com necrose de coagulação (HE 50x); C) Grupo 3: numerosos ovos envolvidos por granulomas no parênquima hepático (HE 100x); D) Grupo 3: granulomas englobando ovos no parênquima hepático (HE 40).

5. CONCLUSÕES

Em virtude da gravidade dos sintomas da AA, falta de tratamento e por ser o RS, estado de maior prevalência da doença, tornam-se indispensáveis estudos que corroborem para elucidação da enfermidade, compreendendo-se melhor sua patologia e interação entre parasito e hospedeiro, estudados em um modelo experimental. Neste trabalho utilizou-se diferentes doses infectantes de *A. costaricensis* a fim de correlacionar com a gravidade dos sintomas apresentados pela AA, a eliminação de L1 e sobrevida dos animais infectados.

No capítulo um, concluímos que diferentes doses infectantes de L3 de *A. costaricensis* interfere na eliminação de L1 por camundongos Swiss, onde doses maiores resultam em maior eliminação de larvas, não interferindo, porém, estatisticamente na mortalidade dos roedores.

No capítulo dois, concluímos que diferentes doses infectantes de *A. costaricensis* alteram os aspectos histopatológicos estudados em camundongos Swiss, sendo que doses maiores (15 L3 e 30 L3), resultam em presença abundante de ovos e larvas e infarto no fígado, assim como esplenite e trombose intestinal, reduzindo também a sobrevida desses animais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nematódeo *A. costaricensis* apresenta ampla distribuição geográfica, geralmente em áreas de matas e de transição urbano-rural, característico do estado do RS. Tal parasito é causador da AA, considerada uma zoonose parasitária, que tem como sintoma característico dores abdominais, acidentalmente infecta o homem, atingindo crianças e adultos. O norte do RS é considerado uma região endêmica para a doença, pois fornece ambientes propícios para desenvolvimento dos hospedeiros definitivos (roedores) e intermediários (moluscos) do parasito.

Nossa perspectiva para estudos futuros ressalta a utilização de hospedeiros definitivos naturais como modelos experimentais, como o roedor silvestre *S. hispidus*, devido sua melhor adaptação ao parasito, ao maior período de duração dos sintomas e maior sobrevivência desses animais. A partir de nosso trabalho, notamos a importância de se conhecer mais sobre o nematódeo *A. costaricensis*, devido a severidade dos sintomas e aos danos causados aos seres humanos, evidenciando assim a necessidade da implantação e manutenção de seu ciclo biológico para novos estudos.

Pesquisas sobre perfis hematológicos, bioquímicos e imunológicos em roedores poderão corroborar com nossos achados, bem como novos estudos epidemiológicos, os quais poderão auxiliar na compreensão da relação entre parasito e hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS

1. Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 1971; 18: 173 – 185.
2. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi, HL. Abdominal angiostrongyliasis - an under diagnosed disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 353-4.
3. Agostini AA, Peixoto A, Caleffi AL, Dexhaimer A, Camargo RR. Angiostrongiliase abdominal: Três casos observados no Rio Grande do Sul. *Associação médica do Rio Grande do Sul*. 1984 jun: 200 – 203.
4. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi, HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in Southern Brazil. *Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo*. 1991; 33: 373 – 378.
5. Morera P. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitology*, 1985; 1: 173–175.
6. Ishih A and Nishimura M. Differential Responses of SM/J and A/J Mice to Experimental *Angiostrongylus costaricensis* Infection. *Journal of Parasitology*. 1997; 27: 1411-1414.
7. Canali C, Goulart AH, Graeff-teixeira C. Study on the elimination of *Angiostrongylus costaricensis* first stage larvae in the experimental infection of Swiss mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 269 – 272.
8. Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tissular producidos por un strongilídeo (*Strongylata*). *Acta Médica Costarricense*. 1967; 235 – 255.
9. Sierra, E, Morera, P. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). *Acta Med*. 1972; 15: 95-99.
10. Velazquez JZ, Baquedano WR, Pérez AR, Flores MB. *Angiostrongilosis costaricensis*: primeros casos mexicanos. *Rev. Invest. Clín*. 1974; 26: 398-394.
11. Morera P, Lazo R, Urquizo J, Llaguno M. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. *J Trop Med Hyg*. 1983 Nov; 32(6): 1460-1.
12. Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J. Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasit*. 1980; 66 (5): 856-857.

13. Vázquez J, Boils, PL, Sola JJ, Carbonell F, Burgueño MdJ, Giner V, Berenguer-Lapuerta J. Angiostrongyliasis in a European patient: A rare cause of gangrenous ischemic enterocoliti. *Gastroenterology*, 1993.
14. Iabuki K, Montenegro MR. Apendicite por *Angiostrongylus costaricensis*. Apresentação de um caso. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 1979; 21: 33-36.
15. Ayala MAR. Angiostrongiloidíase abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 29-36.
16. Rocha A, Moscardini SJ, Salomão EC. Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Rev. Soc. bras. Med. trop.* 1991; 24: 265-268.
17. Pena GPM., Andrade Filho JS, Assis SCde. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1995; 37 (4): 369-374.
18. Zuccaro AM1, Zani R, Aymoré IL. Abdominal angiostrongyliasis: report of a potential autochthonous case from Rio de Janeiro. *Arq Gastroenterol.* 1998 Jan-Mar; 35 (1): 54 - 61.
19. Morera P. Life history and redescription os *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1973 Set; 22 (5): 613 – 621.
20. Rodriguez R, Agostini AA, Porto SM, Olivae AJO, Branco SL, Genro JP, Laitano AC, Maurer RL, Graeff-Teixeira C. Dogs may be a reservoir host for *Angiostrongylus costaricensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical.* 2002 Jan/Fev; 44 (1): 55 – 56.
21. Alacóna-Alfaro A, Veneziano V, Galiero G, Cerrone A, Gutierrez N, Chinchilla A, Annoscia G, Colella V, Torres FD, Otranto D, Santoro M. First report of a naturally patent infection of *Angiostrongylus costaricensis* in a dog. *Veterinary Parasitology.* 2015 Ago; 212: 431–434.
22. Santoro M, Alarcón A, Veneziano V, Cerrone A, Latrofa MS, Otranto D, Hagnauer I, Jiménez M, Galiero G. The white-nosed coati (*Nasua narica*) is a naturally susceptible definitive host for the zoonotic nematode *Angiostrongylus costaricensis* in Costa Rica. *Veterinary Parasitology.* 2016 Ago; 228: 93- 95.
23. Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phyllocaulis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1989 Jan/Mar; 84 (1): 65 – 68.
24. Richinitti LMZ, Graeff-Teixeira C, Agostini AA, Thomé JW. Hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongilidae) no sul do Brasil: diversidade de moluscos infectados naturalmente. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA. 1994 Jun.

25. Mota EM, Lenzi EMM. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005 Jun; 100 (4); 407-420.
26. Rodriguez R, Dequi RM., Peruzzo L, Mesquita PM, Garcia E, Fornari F. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. Revista Instituto Médico Tropical. 2008 Nov/Dez: 339 – 341.
27. Graeff-Teixeira C, Agostini AA, Camillo-Coura L, Ferreira-da-Cruz MF. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in Southern Brazil. Tropical Medicine International Health. 1997; 2: 254-260.
28. Stefan Michael Geiger, Antônio Carlo Laitano, Charlotte Sievers-Tostes, Aventino Alfredo Agostini, Hartwig Schulz-Key, Carlos Graeff-Teixeira. Detection of the Acute Phase of Abdominal Angiostrongyliasis with a Parasite-specific IgG Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001 May; 96 (4): 515-518.
29. Rodriguez R, Silva ACA, Müller CA, Alves SL, Graeff-Teixeira C, Fornari F. PCR for the diagnosis of Abdominal Angiostrongyliasis in formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. PLOS ONE. 2014 Abri.
30. Rodriguez, R. Anatomia patológica da angiostrongilíase abdominal. Dissertação (Mestrado em Patologia – Anatomia patológica). Universidade Federal Fluminense. 1997.
31. Mentz MB, Graeff-Teixeira C. Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2003 Ago; 45 (5).
32. Sandri ASS, Rodriguez R, Costa MM, Porto SM, Schwingell D, Vieira MIB. High-dose enoxaparin in the treatment of abdominal angiostrongyliasis in Swiss mice. Journal of Helminthology. 2017.
33. Zanini GM. Graeff-Teixeira C. Angiostrongilose abdominal: profilaxia pela destruição das larvas infectantes em alimentos tratados com sal, vinagre ou hipoclorito de sódio. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1995; 28 (4).
34. Tesh RB, Ackerman LJ, Dietz WH and Williams JÁ. *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1973; 27: 348-356.
35. de Azevedo GV, Rodriguez R, Porto SM, Graeff-Teixeira C, Fornari F. Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. Parasitology Research, 2010 Out; 108: 537 – 540.

9. ANEXOS

Contagem de L1 em fezes de camundongos Swiss

Adaptação de Azevedo et. (2011) - Elimination of Angiostrongylus costaricensis larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival

Material

- Funil
- Centrífuga
- Vidro de relógio
- Tubo de ensaio
- Lâminas de vidro
- Micropipetador
- Ponteiras
- Lupa
- Peneiras
- Tesouras hemostáticas
- Gaze

Metodologia

- *Coleta das fezes dos camundongos*
- Cada camundongo infectado com *A. costaricensis* foi mantido em uma gaiola individual;
- O fundo da gaiola foi revestido por um papel toalha umedecido para evitar a desidratação das fezes e colocou-se uma grade de metal para facilitar a coleta;
- Diariamente e no mesmo horário as fezes foram coletadas, pesadas e colocadas em um funil de Baerman suspensa por uma peneira e revestida por gaze, onde permaneceram por 24h.



Figura 1. A) Camundongos acondicionados em gaiolas individuais; B e C) Coleta das fezes dos camundongos; D) Método Bermann para isolamento de L1 de *Angiostrongylus costaricensis*.

- *Extração e contagem de L1*

- Após 24h, 10 ml do sedimento homogeneizado foi centrifugado, deixando apenas 1 ml da suspensão sendo separadas em 3 amostras de 10 μ l em uma lâmina de vidro (1 amostra do fundo, 1 amostra do meio e outra amostra da superfície);
- A lâmina com as amostras foi examinada em microscópio para a contagem de L1;
- A soma das contagens das amostras foi multiplicada por 100 e dividida por 3 para estimar o número total de L1 em 1 ml de suspensão;
- A contagem absoluta de L1 na quantidade de fezes foi dividido pelo peso de fezes em grama.

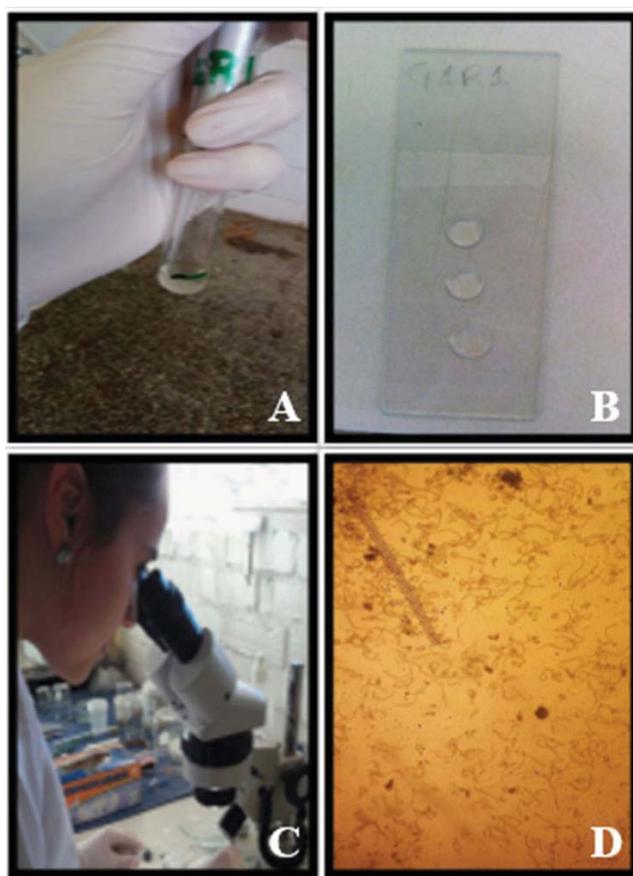


Figura 2. A) 1 ml do sedimento homogeneizado após permanecer *over night*; B) 3 amostras de 10 μ l para a contagem de larvas; C e D) contagem de L1 de *Angiostrongylus costaricensis*.

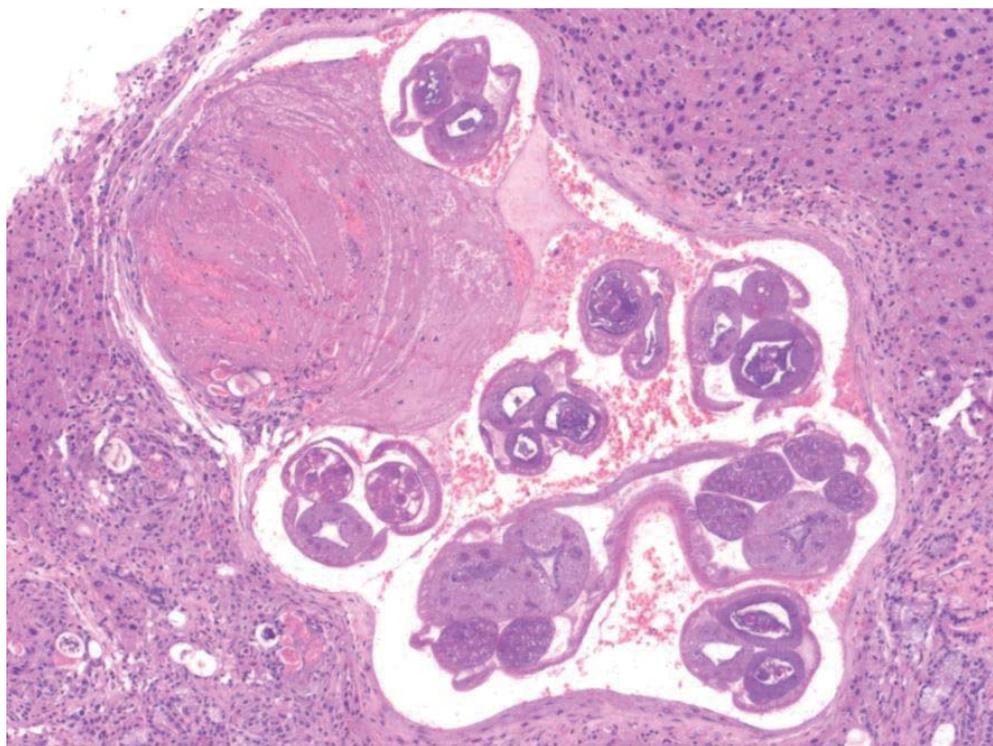


Figura 3. Camundongo do grupo 2 apresentando vermes adultos na luz arterial (HE 25x).

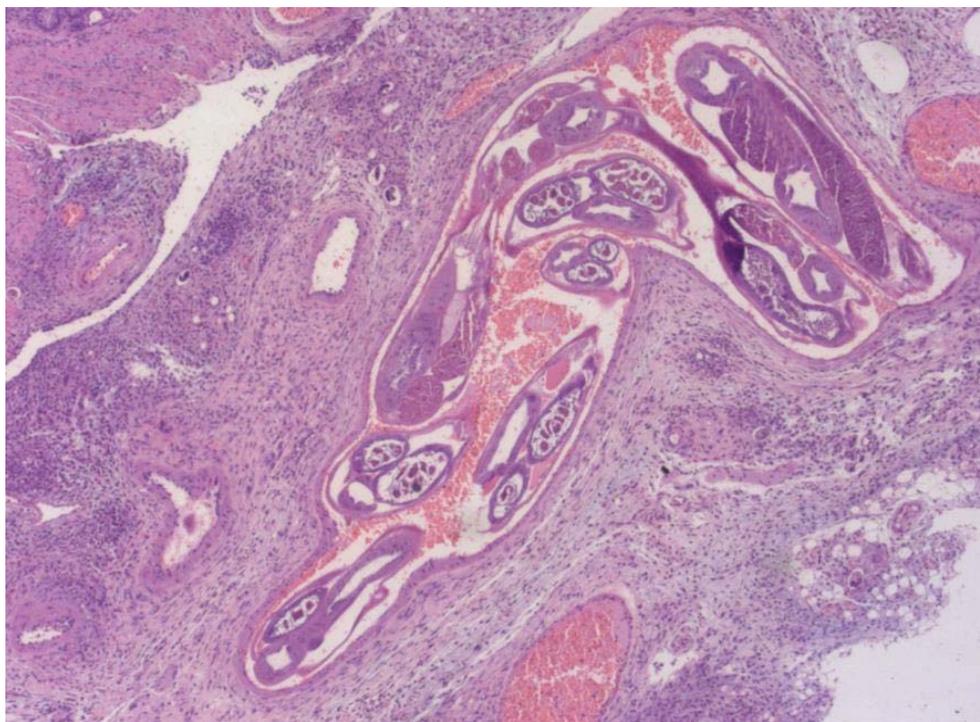


Figura 4. Camundongo do grupo 3 apresentando artéria hepática contendo vermes adultos associado a trombose (HE 50x).

Tabela 1. Taxa de eliminação diária de L1 em camundongos Swiss infectados com diferentes doses de L3 de *Angiostrongylus costaricensis*.

DPI	Grupos experimentais			Significância
	5 L3	15 L3	30 L3	
20 dias	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
21 dias	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
22 dias	0,00 ± 0,00	5,33 ± 11,92	16,65 ± 33,33	0,73
23 dias	6,67 ± 18,68	36,01 ± 55,89	139,58 ± 231,07	0,08
24 dias	2,22 ^a ± 5,87	320,82 ^{ab} ± 354,51	723,70 ^b ± 629,98	0,02*
25 dias	4,36 ^a ± 8,46	324,99 ^{ab} ± 294,03	1074,44 ^b ± 1085,82	0,01*
26 dias	27,14 ^a ± 68,91	929,19 ^b ± 889,87	1293,09 ^b ± 1189,26	<0,01*
27 dias	37,08 ^a ± 82,81	489,41 ^{ab} ± 235,34	1982,37 ^b ± 13,79,73	0,01*
28 dias	63,96 ^a ± 75,07	1117,96 ^{ab} ± 778,20	3014,58 ^b ± 2241,84	0,02*
29 dias	145,44 ± 149,09	1092,59 ± 325,52	1410,36 ± 1864,34	0,06
30 dias	290,55 ± 493,08	2550,00 ± 1979,90	4090,28 ± 3341,17	0,06
31 dias	422,21 ± 400,07	3208,33 ± 3358,76	2916,66 ± 2500,63	0,09
32 dias	761,10 ± 852,70	994,44 ± 259,26	4538,89 ± 3859,63	0,19
33 dias	269,99 ^a ± 297,71	2144,44 ^{ab} ± 345,69	7644,44 ^b ± 2956,18	0,01*
34 dias	445,55 ± 431,73	2738,88 ± 2726,28	4777,77 ± 4005,39	0,25
35 dias	570,00 ^a ± 609,23	2375,00 ^{ab} ± 1025,30	7962,96 ^b ± 462,59	0,02*
36 dias	420,66 ^a ± 433,56	3127,77 ^{ab} ± 2726,28	11388,88 ^b ± 5513,45	0,02*
37 dias	253,33 ± 232,85	1424,99 ± 223,92	3592,59 ± 4061,77	0,20
38 dias	481,94 ^a ± 576,6	2533,33	6592,59 ^b ± 3528,68	0,03*
39 dias	325,00 ^a ± 344,0	—	5925,92 ^b ± 2237,68	0,03*
40 dias	255,55 ^a ± 169,6	—	7833,33 ^b ± 2088,33	0,03*
41 dias	833,33 ^a ± 677,0	—	17592,58 ^b ± 115584	0,03*
42 dias	1554,16 ± 2160,8	—	6703,70 ± 3088,38	0,08
43 dias	688,19 ^a ± 521,97	—	6574,07 ^b ± 1294,67	0,03*
44 dias	886,10 ^a ± 810,17	—	5857,40 ^b ± 2158,50	0,03*
45 dias	648,60 ^a ± 540,97	—	6651,84 ^b ± 2741,37	0,03*
46 dias	1477,77 ± 1677,0	—	7536,10 ± 5065,86	0,08
47 dias	841,66 ^a ± 867,30	—	5122,22 ^b ± 720,79	0,03*
48 dias	1637,50 ± 1738,8	—	12496,29 ± 11036,78	0,08
49 dias	1242,36 ± 844,86	—	6837,03 ± 6993,70	0,29
50 dias	1229,62 ^a ± 1030,4	—	9438,89 ^b ± 4711,16	0,05*
51 dias	518,51 ^a ± 467,76	—	11133,32 ^b ± 4375,31	0,05*
52 dias	1968,51 ± 1891,0	—	8833,33 ± 4714,07	0,08
53 dias	2041,66 ± 1713,5	—	7133,33	—
54 dias	1961,10 ± 2337,4	—	21566,66	—
55 dias	2417,58 ± 2400,0	—	10777,77	—
56 dias	3445,37 ± 3038,1	—	6716,66	—
57 dias	877,77 ± 1103,57	—	6422,22	—
58 dias	1213,89 ± 1148,9	—	7255,55	—
59 dias	816,66 ± 714,74	—	7506,66	—
60 dias	1000,92 ± 1434,6	—	16566,66	—
61 dias	1840,74 ± 3083,1	—	—	—
62 dias	905,55 ± 1439,17	—	—	—
63 dias	2508,33 ± 4322,3	—	—	—
64 dias	3,70 ± 6,41	—	—	—
65 dias	25,00 ± 43,30	—	—	—

(* $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis, teste de Dunn; ab: diferença significativa)