

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

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TECIDUAL E HEMATOLÓGICA EM CAMUNDONGOS SWISS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

José Roberto da Silva Filho

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL E
HEMATOLÓGICA EM CAMUNDONGOS SWISS.**

José Roberto da Silva Filho

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 **Mestre em Bioexperimentação**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**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

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL E
HEMATOLÓGICA EM CAMUNDONGOS SWISS.**

Elaborada por
José Roberto da Silva Filho

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

Comissão Examinadora

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

Rubens Rodriguez, Dr., UPF

Alessandra L. Morassutti, PhD., PUCRS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

CIP – Catalogação na Publicação

S586a Silva Filho, José Roberto da
Angiostrongiliase abdominal : resposta inflamatória
tecidual e hematológica em camundongos Swiss / José
Roberto da Silva Filho. – 2016.
38 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Angiostrongiliase abdominal. 2. Epidemiologia.
3. Zoonoses. I. Vieira, Maria Isabel Botelho, orientadora. II.
Título.

CDU: 636:616.993

Catalogação: Bibliotecário Luis Diego Dias de S. da Silva - CRB 10/2241

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou outra contribuíram para que eu pudesse concluir este trabalho.

A equipe de professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação agradeço pelos conhecimentos, esclarecimento e compreensão de alguma falha da minha parte.

A minha orientadora, Dra. Maria Isabel Botelho Vieira agradeço aos caminhos proporcionados, por sempre me incentivar, sobre a escolha do tema. Por dar força e perseverança para a conclusão do Mestrado.

As acadêmicas, Aline Saldanha Sandri, Suellen Mendonça Soares, agradeço, auxílio nas horas de precisão, ajuda nas coletas, organização de materiais, bem como a companhia nas horas de descontração.

Aos funcionários Lucas Portella por ajudar na manutenção, Cleonice Several que conseguiu com o seu dom para que tivéssemos camundongo para a pesquisa, ao professor Sérgio Porto pela ajuda e apoio técnico no Biotério da Universidade de Passo Fundo fica meu agradecimento por terem disponibilizado o auxílio, animais e toda estrutura para criação, manejo e coleta de material, favorecendo a realização deste trabalho.

Ao professor Rafael Frandoloso, por conseguir um tempo em sua agenda, por colaboração e efetuação das análises, e principalmente por desmistificar este mundo complexo das interleucinas.

Ao professor Rubens Rodriguez, com pelo seu conhecimento passado, ajuda na leitura das lâminas histológicas e principalmente por nos trazer calma em muitos momentos de angustia.

Ao professor e amigo Marcio Costa, por ajudar a esclarecer um assunto que eu pensava ser impossível de se entender, você é um exemplo de profissional para mim.

Agradeço a minha família pelo apoio, em especial a minha mulher Danielle Catapan, por além do apoio e auxílio em horas que precisei, ter sido sempre muito compreensiva com relação a minha dedicação a este trabalho e aos estudos exigidos por esta pós-graduação, por ser uma supermãe nos momentos que eu estava atarefado com as leituras e produção da dissertação, te amo.

DEDICATÓRIA

Só se torna realidade a vivência de um sonho se você acreditar nele. Dedico esse trabalho a meus pais, exemplos de vida e de força de vontade, e todos aqueles que acreditam que o primeiro passo para se concretizar um sonho, é acreditar nele e na sua capacidade de torná-lo real. É a esperança, seguida da coragem, determinação e a vontade de chegar ao fim.

EPÍGRAFE

“Tente, e não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez”.

Raul Seixas

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CICLO DO <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	14
2.2 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA	15
2.3 SISTEMA IMUNE	16
2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	16
2.5 TRATAMENTO	18
3. CAPÍTULO 1. Abdominal angiostrongyliasis: tissue and blood inflammatory response in Swiss mice ..	19
Abstract	20
Introduction	21
Materials and methods	21
Intermediate hosts	21
Harvest of L3 from <i>A. costaricensis</i>	22
Experimental design	22
Complete blood count	22
Cytokine detection	22
Necropsy and histological analysis	23
Statistical analysis	23
Results	23
Complete blood count findings	23
Gross findings	25
Microscopic findings	25
Cytokine expression by flow cytometry	26
Discussion	26
References	29
APÊNDICE	32
4. CONCLUSÕES	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA	1. Distribuição geográfica da Angiostrongilíase abdominal.....	13
FIGURA	2. Ciclo acidental e natural do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	15

CAPÍTULO 1

FIGURA	1. RBC count in control and infected mice (<i>Mus musculus</i>): total erythrocyte (A); hemoglobin (B); hematocrit (C).....	24
FIGURA	2. WBC count in control and infected mice (<i>Mus musculus</i>): total leukocyte (A); segmented neutrophils (B); lymphocytes (C); monocytes (D); eosinophils (E); platelets (F).....	24
FIGURA	3a. Histological section of mouse liver on day 21, showing hepatitis with eosinophilic infiltrate (200x). Fig. 3b Granuloma with eosinophilic infiltrate in the intestinal wall of infected mouse (200x)	25
FIGURA	4. Histological section of adult <i>A. costaricensis</i> in the arterial lumen of infected mouse (50x).....	25
FIGURA	5. Cytokine levels of control and infected mice (<i>Mus musculus</i>): IL-12p70 (A); TNF- α (B); MCP-1 (C); INF- γ (D); IL-10 (E); IL-6 (F).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Angiostrongilíase Abdominal
CD4	Grupo de Diferenciação 4
°C	grau Celsius
CBA	Cytometric Bead Array
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELISPOT	Ensaio imunoenzimático ligado a enzimas
GC	Grupo controle
IL	Interleucina
INF	Interferon
L1	Larvas do primeiro estadio
L2	Larvas do segundo estadio
L3	Larvas do terceiro estadio
MCP-1	Proteína quimioatraente de Monócitos/Macrófagos -1
NK	Natural Killer
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PUC-RS	Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
TH1	Linfócito T helper-1
TNF	Fator de necrose tumoral
UPF	Universidade de Passo Fundo
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

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

ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL E HEMATOLÓGICA EM CAMUNDONGOS SWISS.

Autor: José Roberto da Silva Filho
Orientador: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, julho de 2016.

O *Angiostrongylus costaricensis* causa uma doença clínica e anatomopatológica denominada angiostrongilíase abdominal e a região Sul do Brasil é considerada endêmica para esta patologia. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a resposta imune dos camundongos através da dosagem das citocinas e células pró-inflamatórias e avaliação macro e microscópica das lesões em animais infectados. O experimento foi conduzido com 4 grupos de camundongos Swiss machos, infectados, constituído cada grupo de 5 animais; o grupo controle não infectado também foi composto com 5 animais, e os mesmos foram acompanhados por 21 dias, período onde se dá início os sinais clínicos. Nos infectados foram administradas 10 larvas de terceiro estadio de *A. costaricensis*. Durante o período experimental nos dias 3, 7, 14 e 21 foram colhidos sangue através de punção intracárdica dos grupos infectados e feita a eutanásia nos respectivos dias. Os animais do grupo controle foram eutanasiados no dia 3. Os exames laboratoriais, tais como hemograma que foi usado como parâmetro para avaliar as células sanguíneas; citometria de fluxo usada para determinar e quantificar a presença de citocinas no soro e relacionar com o processo inflamatório; alterações anatopatologica para identificar as lesões macro e microscópicas. O conjunto de informações obtidas pela citometria de fluxo e histopatologia evidenciam que o processo inflamatório nos camundongos infectados foi observado a partir do 14º dia. No diagnóstico anatomopatológico a avaliação macroscópica do fígado, pulmão, baço, rim e intestino não mostrou alterações. Na histopatologia foram observadas reações eosinofílicas e/ou inflamação no fígado, baço e intestino (10/20); granuloma na parede intestinal (1/20) em camundongos infectados. A partir dos resultados obtidos neste experimento ficou evidenciado que o processo inflamatório dos camundongos infectados foi observado na fase inicial o que pode ser sugerido pelo aumento das citocinas pro-inflamatórias a partir do 14º dia. Na histopatologia foram observados no 14º dia infiltrado eosinofílico intestinal e hepática em 75% dos animais. No 21º dia ocorreu o aumento das interleucinas (IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α e INF- γ), concomitantemente, 100% dos animais apresentaram infiltrado eosinofílico intestinal e hepático. Estes resultados permitem concluir que a compreensão dos mecanismos que envolvem o processo inflamatório através da cinética de citocinas estão relacionados com a defesa contra o patógeno.

Palavras chaves: Angiostrongilíase abdominal, Hemograma, Citometria de fluxo, Interleucinas, Histopatologia.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESPONSE INFLAMMATORY AND TISSUE
HAEMATOLOGICAL IN MICE SWISS.**

Autor: José Roberto da Silva Filho
Orientador: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, julho de 2016.

Angiostrongylus costaricensis causes a clinical and anatomopathologic entity named abdominal angiostrongyliasis, and the southern region of Brazil is considered endemic for this pathology. This work aimed to assess the immune response of mice by measuring cytokines and pro-inflammatory cells, and by macro- and microscopic assessment of the lesions of infected animals. The experiment was conducted with 4 groups of infected male Swiss mice, whereas each group had 5 animals; the uninfected control group also consisted of 5 animals and had a 21-day follow-up. Infected animals received 10 third-stage larvae of *A. costaricensis*. During the experimental period, blood was collected from infected groups at days 3, 7, 14, and 21 through intracardiac puncture, and euthanasia was performed in the respective days. The animals of the control group were euthanized at day 3. Laboratory examinations such as complete blood count were used as assessment parameter of blood cells, and flow cytometry was used to determine and quantify the presence of serum cytokines and to relate the inflammatory process. No significant changes were observed in the complete blood count, and flow cytometry showed an increase in interleukins assessed from day 14. In the anatomopathological diagnosis, the macroscopic assessment of liver, lung, spleen, kidney, and intestine showed no changes. Histopathology showed eosinophilic reactions and/or inflammation in liver, spleen, and intestine (10/20); also granuloma in the intestine wall (1/20) of infected mice. The set of information obtained in this experiment proves that the inflammatory process of infected mice was observed at its initial stage, which may be suggested by complete blood count results. At day 14, histopathology showed intestinal and hepatic eosinophilia in 75% of animals. Interleukins (IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , and INF- γ) increased at day 21, concomitantly 100% of animals presented intestinal and hepatic eosinophilia. These results allow concluding that understanding mechanisms involving the inflammatory process through cytokines kinetics is related to pathogen defense.

Keywords: Abdominal angiostrongyliasis, Complete Blood Count, Flow Cytometry, Interleukins, Histopathology.

1. INTRODUÇÃO

O convívio de boa parte dos moradores de regiões rurais com animais e o campo, são situações normais e inevitáveis em nosso país. Ambientes como sítios e fazendas são comuns possuírem pequenas hortas para o consumo próprio e de vizinhos. Situações que muitas vezes são negligenciadas por falta de informações e a falta de higiene com os alimentos que são consumidos e podem ser importantes fontes de infecção para diversos patógenos. Algumas espécies de moluscos são exóticas e invasoras disseminando parasitos, tais como o *Angiostrongylus costaricensis* (1).

O *A. costaricensis* pertence ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Strongylida, superfamília Metastrongyloidea, família Angiostrongylidae.

Roedores silvestres são reservatórios de diversos parasitos, incluindo o *A. costaricensis* responsável pela angiostrongilíase abdominal (AA) (2). A mesma tem adquirido um papel importante para os profissionais da saúde na região Sul do Brasil (3), desafiando no que diz respeito a vários pontos importantes, tais como: endemicidade, compreensão da fisiopatologia do parasito, aspectos epidemiológicos relacionados aos hospedeiros intermediários e definitivos e quanto ao desenvolvimento do ciclo biológico (2, 3).

Além disto, esta doença não dispõe de tratamentos medicamentosos (4, 5), no entanto Ishii et al, (1989) avaliaram a eficácia do levamisole em roedores, sugerem que o levamisol tem efeitos notáveis in vivo contra os estágios larvais de *A. costaricensis* (6). Ainda faltam estudos relacionados à fisiopatologia da AA, bem como da resposta inflamatória desenvolvida pelo parasito e a resposta imune dos camundongos heterogênicos acometidos (4).

A dissertação compreende, além de uma breve introdução, revisão bibliográfica sobre o *A. costaricensis*, e um capítulo no formato de artigo científico intitulado '**Angiostrongilíase abdominal: resposta inflamatória tecidual e hematológica em camundongos swiss**', que será submetido ao periódico Parasitology Research. A parte final da dissertação compreende, conclusões, considerações finais e referências bibliográficas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AA é uma doença causada por um metastrongilídeo denominado *A. costaricensis* (7). A doença foi descrita inicialmente na Costa Rica a partir de 1952, posteriormente casos semelhantes foram relatados em Honduras (8), México (9), Venezuela (1, 10), América do Norte (11, 12), Equador (1, 13), Sul e Centro-Oeste do Brasil (3, 14, 15), Argentina (16) e Europa (17), (Fig. 1).

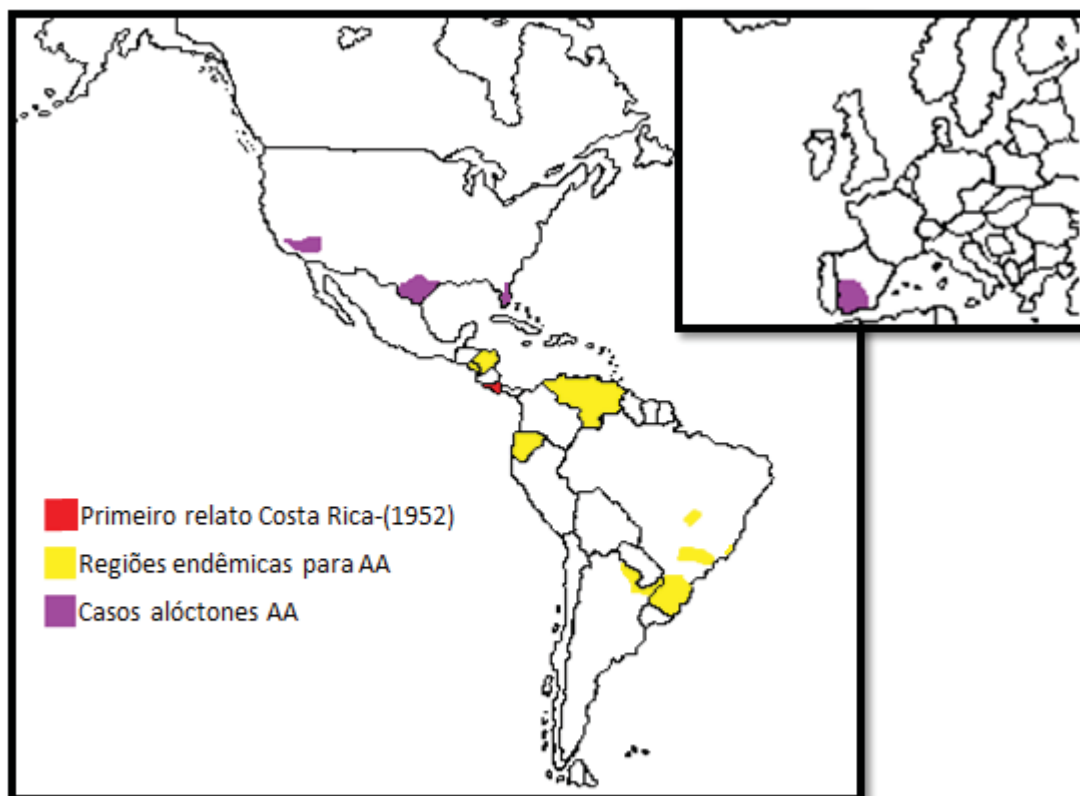


FIGURA 1: Distribuição geográfica da Angiostrongilíase abdominal (Fonte: SILVA FILHO, 2016).

O macho mede de 17,4 a 22,2 mm e a fêmea, de 28,2 a 42,0 mm (7). A denominação de AA para a doença foi para distinguir esta parasitose da angiostrongilíase meningoencefálica, determinada pelo *Angiostrongylus cantonensis* (18).

O parasito tem como hospedeiros definitivos os seguintes roedores silvestres: *Sigmodon hispidus*, *Rattus rattus*, *Zigodontomys microtinus*, *Leomys adspersus* (8) e *Oligoryzomys nigripes* (2), sendo encontrado relatos em outros mamíferos como os primatas não humanos *Saguinus mystax* (19), *Hylobates syndactylus*, *Aotus nancymae* (11) nos canídeos *Nasua narica bullata* (20), *Procyon lotor* e *Didelphis virginiana* (11). Os parasitos adultos vivem nas arteríolas mesentéricas dos roedores, onde as fêmeas colocam os ovos que são arrastados pela pressão sanguínea, chegando até a parede

intestinal, eclodindo e permitindo que as L1 sejam eliminadas com as fezes para o exterior (1).

No Brasil, o primeiro hospedeiro intermediário identificado foi o molusco terrestre *Phyllocaulis variegatus*. Posteriormente, foram identificadas outras espécies infectadas nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul: *Limax maximus*, *Bradybaena similares*, *Limax flavus* (21). Estes dados demonstram uma grande diversidade de moluscos terrestres que podem ser infectados (21), pertencentes principalmente a família Veronicellidae e Philomycidae (2). A infecção do hospedeiro intermediário ocorre ao se alimentar com fezes do roedor infectado com a L1 que evolui até L3. Estas se situam logo abaixo da pele ou próximas ao ducto excretor das glândulas mucosas (8).

2.1 CICLO DO *A. costaricensis*

O *A. costaricensis* pode ser encontrado nas fezes de roedores silvestres como larvas de primeiro estadio (L1). Estas juntamente com as fezes dos roedores podem ser ingeridas pelos moluscos que são os hospedeiros intermediários dando continuidade com as mudas para L2 e L3, fase infectante para os hospedeiros definitivos.

Além disto as L1 podem penetrar ativamente nos moluscos ocorrendo a muda para L2 e L3 que migra para a epiderme do molusco, podendo ser liberada no muco de lesmas como larvas de terceiro estadio (L3). Esta última fase pode infectar seres humanos após a ingestão de alimentos contaminados, particularmente verduras (L3), ou podem ser ingeridas pelo roedor completando o ciclo natural (1) (Fig. 2).

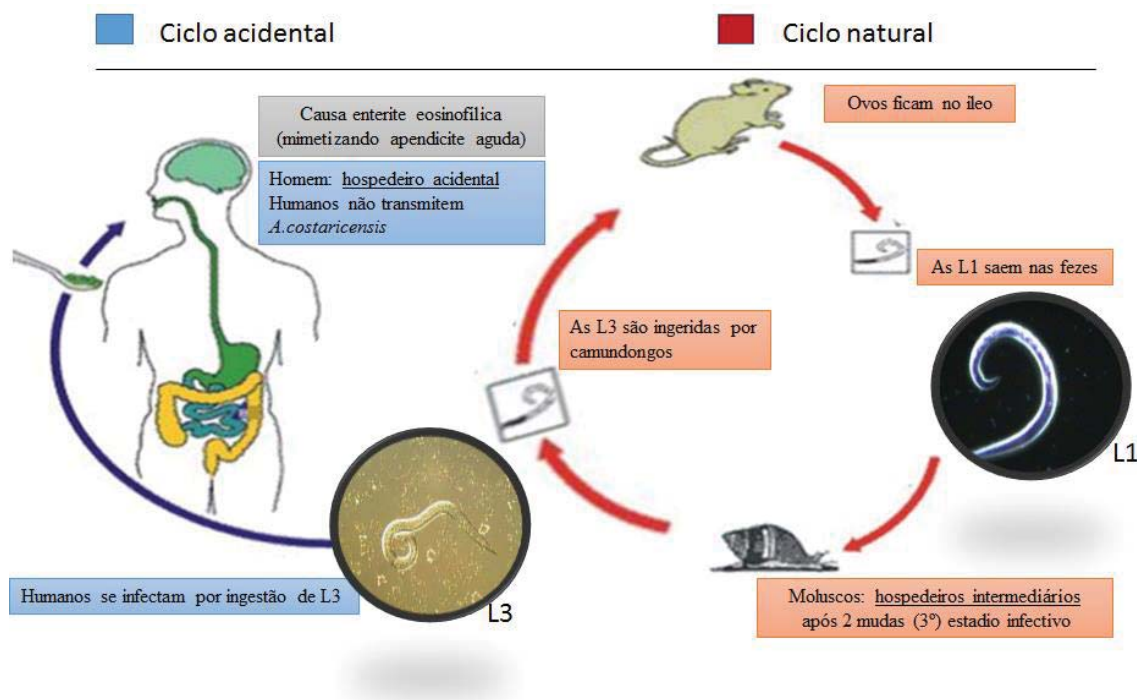


FIGURA 2: Ciclo acidental e natural do *Angiostrongylus costaricensis* (Fonte: SILVA FILHO, 2016).

O homem não faz parte do ciclo natural da AA, sendo considerado um hospedeiro acidental. Os parasitos adultos se localizam na luz dos ramos das arteríolas mesentéricas, principalmente na região ileocecal, podendo levar a infartos, pseudotumores ou apendicites agudas. Uma vez nas artérias mesentéricas do homem, o parasito adulto deposita os ovos, que ficam na parede intestinal, porém, sem sair para a luz do órgão (7). Mota Lenzi (1995), a fim de elucidar questões sobre as vias migratórias, propõem uma passagem pela circulação cardiopulmonar antes de voltar para as artérias mesentéricas, assim como ocorre os demais ciclos de outros nematódeos da superfamília Metastrongylidoidea (22). O ciclo *A. cantonensis* difere do anterior pela presença de uma via pulmonar para passar da circulação linfática/venosa para o sistema arterial e de uma via venosa portal (23).

2.2 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA

Clinicamente a doença se manifesta principalmente em crianças, com quadro de abatimento, palidez, febre, distensão abdominal, constipação, íleo paralítico (3, 24, 25) examinando as características macro e microscópicas é possível localizar um espessamento da parede intestinal, múltiplas úlceras confluentes principalmente na

região íleo terminal. Nos ramos arteriais, encontram-se arteríte eosinofílica e granulomatosa, com trombose, associado a lesões isquêmicas intestinais (17).

2.3 SISTEMA IMUNE

Sistema imune humoral e celular

O sistema imunitário está envolvido no controle da infecção ativa envolvendo diferentes mecanismos celulares, nos quais as citocinas desempenham um papel importante. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, que atuam como mediadores intra e extracelulares envolvidos em muitos processos biológicos, tais como inflamação, fibrose, a angiogênese, o crescimento das células/proliferação e resposta imunitária (26). Estudos evidenciam que as infecções parasitárias causam um aumento das citocinas pró-inflamatórias, ocorrendo um efeito sinérgico entre IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α e INF- γ (27).

2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Entre os métodos disponíveis para avaliar-se *in vitro* a presença de moléculas moduladoras do sistema imunológico, encontram-se o ELISA, ELISpot (28, 29), Western Blot (30) e a Citometria de Fluxo (31-33). Esta última técnica apresenta inúmeras vantagens com relação as anteriores, pois reúne em um mesmo protocolo a possibilidade de avaliar-se um painel completo de molécula pró-inflamatórias, Th1, Th2 ou Th17, com um custo/benefício muito superior aos outros métodos mencionados (31, 32).

Citometria de fluxo: Capta e digitaliza a dispersão de fotões, provocada pela passagem de partículas em suspensão alinhadas uma a uma, num fluxo laminar, frente a um feixe de luz. O sistema permite otimizar o fluxo de trabalho com protocolos específicos, pré-definidos, resultando em ganhos de produtividade, eficiência e qualidade analítica (33).

- Interleucina 12 (IL-12p70) produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas, atuam como citocinas pró-inflamatórias na resposta inata e adaptativa, atuando na produção de interferon gama por linfócitos T e Natural Killer (NK) (34, 35).
- Interleucina 6 (IL-6) produzida por linfócitos T e macrófagos atuam como citocinas pró-inflamatórias (36).

- Interleucina 10 (IL-10) produzida por linfócitos T, é um inibidor de macrófagos ativados, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata (natural, passiva) e imunidade adquirida (adaptativa, ativa) (26).
- Proteína 1 quimiotática para macrófagos (MCP-1) é uma quimiocina sintetizada pelas células do endotélio vascular e pelos leucócitos envolvidos na resposta inflamatória. Sua transcrição elevada, promove a quimioatração dos monócitos para os tecidos que estejam sofrendo um processo patológico (37).
- Fator de necrose tumoral (TNF) produzida principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T CD4, NK, neutrófilos e mastócitos, atuam em uma vasta gama de ações pró-inflamatórias e é capaz de provocar a morte (apoptose) das células tumorais (36).
- Interferon (INF) existem três tipos que são classificados de acordo com seus receptores e as respostas que a ativam. INF-alpha produzido por leucócitos e fibroblastos que age principalmente impedindo a replicação viral; INF-gama produzido por NK e linfócitos T que age principalmente ativando NK e macrófagos e estimulando o complexo de histocompatibilidade; INF-lambda produzida por células dendríticas e monócitos responsável pela potencialização dos outros INF e modula a atividade dos linfócitos B (26).

Exames laboratoriais:

- Análises clínicas: dos exames laboratoriais destaca-se o hemograma com leucocitose e aumento no número de eosinófilos (13). A leucocitose pode variar de 10.000 a 52.000 mm³, e a eosinofilia de 11% a 81% (3). Raramente, observa-se eosinofilia menor de 10% e leucocitose maior de 50.000 mm³ (38).
- Exame de fezes: Não são observadas larvas em exames coproparasitológicos dos pacientes, mostrando esta técnica não ser eficiente (38, 39).
- PCR (Sorologia): A detecção de ácidos nucléicos através da técnica da reação em cadeia da polimerase no soro, tem sido utilizada nos casos em que estruturas parasitárias não são encontradas nos blocos de parafina (5).
- Patológico: O diagnóstico definitivo da AA é feito pelo exame anatomopatológico e biópsias de peças cirúrgicas (39)

2.5 TRATAMENTO

Não existe ainda um tratamento medicamentoso reconhecidamente capaz de controlar o parasito. O uso de drogas anti-helmínticas pode agravar as lesões, em razão da morte do parasito no interior das artérias (38). O tratamento com anticoagulantes, como a enoxaparina também não se mostrou eficiente em relação a prevenção das lesões isquêmicas e óbito (5). Experimentalmente foi avaliado levamisole em ratos e camundongos e os resultados sugerem que o anti-helmíntico tem efeitos *in vivo* contra os estágios larvais do *A.costaricensis* (6). No Brasil, temos um grande número de pacientes assintomáticos com sorologia positiva para *A. costaricensis*, acredita-se ser mais comum do que os pacientes com doença sintomática, mas não se sabe ainda qual seria a predisposição entre estes indivíduos (14). Foi proposta por Strachan (1989), a Hipótese da Higiene, que sugere que os números maiores de infecções na infância, diminuem a tendência para desenvolver doenças alérgicas na idade adulta. Estudos epidemiológicos acerca da hipótese da higiene sugerem que indivíduos com menor contato com patógenos e menor estímulo antigênico, relacionado ao estilo de vida ocidentalizado leva a uma crescente incidência de doenças alérgicas e autoimunes (40).

3. CAPITULO 1.

Abdominal angiostrongyliasis: tissue and blood inflammatory response in Swiss mice.

Filho JRS¹, Costa MM², Rodriguez R², Porto S², Frandoloso R³, Soares S¹, Vieira MIB³

Artigo submetido no Parasitology Research

¹ Master's student, Graduate Program in Bioexperimentation, Universidade de Passo Fundo-UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

² Professor, Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

³ Professor, Graduate Program in Bioexperimentation, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

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

Abstract

Abdominal angiostrongyliasis is a clinical and pathological disease of extreme importance to man. This study assessed the profile of proinflammatory cytokines, the evolution of peripheral leukocytes, and gross and microscopic findings in experimentally infected mice. The experiment was carried out with four groups of five male Swiss mice infected with 10 L3 of *Angiostrongylus costaricensis*; the control group also contained five animals; all the animals were followed up for 21 days. Blood collection and euthanasia were performed on day 3 in the control group and on days 3, 7, 14, and 21 in the infected group. Complete blood count was used for the analysis of blood cells and flow cytometry was used for quantification of serum cytokines. The gross examination of liver, lung, spleen, kidney, and intestine did not reveal any changes. There were eosinophilic infiltrate in the liver, spleen, and intestine (10/20) and intestinal wall granuloma (1/20) in infected mice. Eosinophilic infiltrate was observed in the intestine and liver of 75% of the animals on day 14. A significant increase ($p < 0.05$) of interleukins (IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , and INF- γ) was found on day 21, when 100% of the animals had intestinal and hepatic eosinophilic infiltrate. Our findings suggest that the high serum levels of IL-12p70 could be a molecular characteristic of the infectious process triggered by *A. costaricensis*, converting this molecule to a potential proinflammatory marker.

Keywords: Abdominal angiostrongyliasis, Complete blood count, Flow cytometry, Interleukins, Histopathology

Introduction

Angiostrongylus costaricensis (Morera and Cespedes 1970) belongs to the phylum Nematoda, class Chromadorea, order Rhabditida, suborder Strongylida, superfamily Metastrongyloidea, and family Angiostrongylidae (Ubelaker 1986).

In Brazil, the first intermediate host is *Phyllocaulis variegatus*, a terrestrial mollusk. Later, other infected species were identified in the States of Paraná and Rio Grande do Sul (*Limax maximus*, *Bradybaena similares*, and *Limax flavus*); therefore, a wide variety of mollusks can be infected (Graeff-Teixeira et al. 1989), especially those of the families Veronicellidae and Philomycidae (Graeff-Teixeira et al. 1990).

Wild rodents are the definitive hosts and also reservoirs for several parasites, including *A. costaricensis*, causative agent of abdominal angiostrongyliasis (AA) (Graeff-Teixeira et al. 1990). This disease has played an important role in southern Brazil (Agostini et al. 1984), since human infection is characterized by intense inflammatory reaction, harboring most parasite eggs in the tissues, compromising the release of L1, as occurs in rodents. Inflammation involves the intestine, mainly the ileocecum (Morera 1973). The disease manifests itself clinically with listlessness, pallor, fever, abdominal distension, constipation, and paralytic ileus (Agostini et al. 1984; Ayala 1987; Ayala et al. 1982).

Experimental studies with small rodents allow characterizing AA in terms of its lifecycle and gross and microscopic lesions and also allow investigating the immune response (Ishii and Sano 1989).

Previous experiments with helminth infections by *Onchocerca volvulus* (Hogarth et al. 1995; Lange et al. 1994), *Schistosoma mansoni* (Brunet et al. 1998), *Taenia crassiceps* (Terrazas et al. 1999) or other intestinal nematodes (Grencis 1997) showed that certain lymphocytes and cytokine production have a decisive role in the susceptibility or resistance of vertebrate hosts to infection.

The goals of the present study were to assess the immune response of mice by measuring the levels of cytokines and proinflammatory markers and to evaluate the gross and microscopic characteristics of the lesions in infected animals.

Materials and methods

All the experiments involving slugs and mice were conducted at the animal research facility of Universidade de Passo Fundo after approval by the Ethics Committee on Animal Research, protocol 023/2015.

Intermediate hosts

Biomphalaria glabrata slugs were donated by the Laboratory of Parasitology of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, kept in 15-liter aquariums, at 23 to 27 °C and pH 7, fed lettuce and fish feed up to the collection of *A. costaricensis* larvae.

Harvest of L3 from *A. costaricensis*

The Baermann's method is used to harvest living larvae by positive hydrotropism and thermotropism. In the adaptation of this method, feces were replaced with slugs, which were macerated by a metal screen placed on a 15-mL conical glass tube, bathed for 12 h in a 0.03% pepsin solution and 0.7% hydrochloric acid initially heated to 40 °C; the supernatant was then discarded; the sediment was placed in a watch glass; and the readings were made using a light microscope for detection of L3 from *A. costaricensis* used in this experimental design.

For distinction of the larvae from those of other nematodes, morphological features such as shape of a comma and slower motion (Ishih et al. 1990) were taken into account.

Experimental design

Male Swiss mice (*Mus musculus*) around 10 weeks old, weighing 27 to 44 g, were used. The animals were infected by gavage with 10 L3 of *A. costaricensis*, kept in cages, in groups, and given water and feed (Nuvilab®) *ad libitum*. The experimental design consisted of five groups of mice, with five animals in each group, necropsied as follows: Control group (CG) – day 3; Group A – day 3, Group B – day 7; Group C – day 14, and Group D – day 21.

The welfare of the animals was observed by adopting measures that minimized discomfort and stress. The housing, feeding, and care were appropriate for the species. The animals were euthanized with isoflurane (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brazil) in a quick and painless fashion. The sample size was calculated according to other experiments (Rodriguez et al. 2011).

Complete blood count

The blood stored in EDTA tubes was processed for complete blood count. An aliquot was obtained using a microcapillary tube for blood smears and microhematocrit determination. The blood smears were stained with Diff-Quik for leukocyte differential count and cytologic analysis. The microhematocrits were centrifuged (*Fanem microhemato centrifuge*®) at 10,000 rpm for 5 minutes and read using a microhematocrit card reader. Erythrocyte and total leukocyte counts and hemoglobin concentration were determined using an electronic cell counter (pocH-100iV Diff®). Erythrocyte indices (MCV and MCHC) were calculated as previously established.

Cytokine detection

Serum cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ , and MCP-1) were quantified using the BD™ cytometric bead array (CBA) Mouse Inflammatory kit (Becton Dickson Biosciences, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 μ L of the serum sample (diluted 1:10) was mixed with 50 μ L of capture beads and 50 μ L of PE detection reagent. After 2 hours of incubation in the dark at room temperature, the beads were washed and finally diluted in 300 μ L of wash buffer. The sample was acquired

in the FACSVerse flow cytometer (BD, USA) and analyzed using the FCAP Array™ software (BD Biosciences, USA).

Necropsy and histological analysis

Gross examination of the digestive tract was performed to verify the presence of ischemic lesion, peritonitis (fibrin deposition), and pseudotumors. The intestinal specimens were fixed in 10% formalin for 24 hours. For the microscopic analysis, the specimens were embedded in paraffin and sectioned in a microtome (5 µm thickness). The slides were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by two independent and blinded pathologists. The following microscopic aspects were evaluated: 1. presence of infarction; 2. identification of adult parasites, larvae, and eggs; 3. inflammatory infiltrate (qualitative and quantitative); 4. granuloma formation; and 5. characterization of vasculitis and thrombosis.

Statistical analysis

All variables were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test, and they showed non-normal distribution. The groups were compared by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. The data were considered to be significantly different with a probability (P) less than 5%. The GraphPad Prism software, version 5.01, was used for the statistical analysis and plotting of the graphs.

Results

Complete blood count findings

No abnormal findings were observed in erythrocyte count, hemoglobin concentration, and hematocrit levels, as shown in Fig. 1. Neither the white blood count (total leukocytes, segmented neutrophils, lymphocytes, monocytes, and eosinophils) nor the platelet count showed significant differences when the control group was compared with the infected group, as shown in Fig.2.

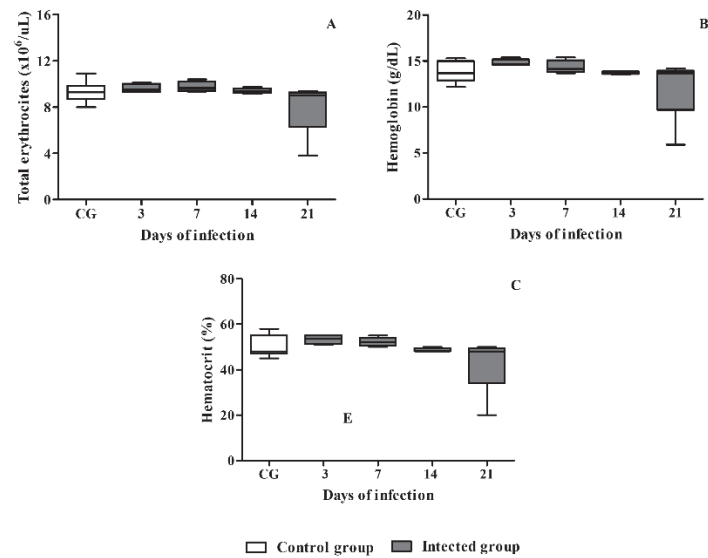


Fig. 1 RBC count in control and infected mice (*Mus musculus*): total erythrocyte (A); hemoglobin (B); hematocrit (C)

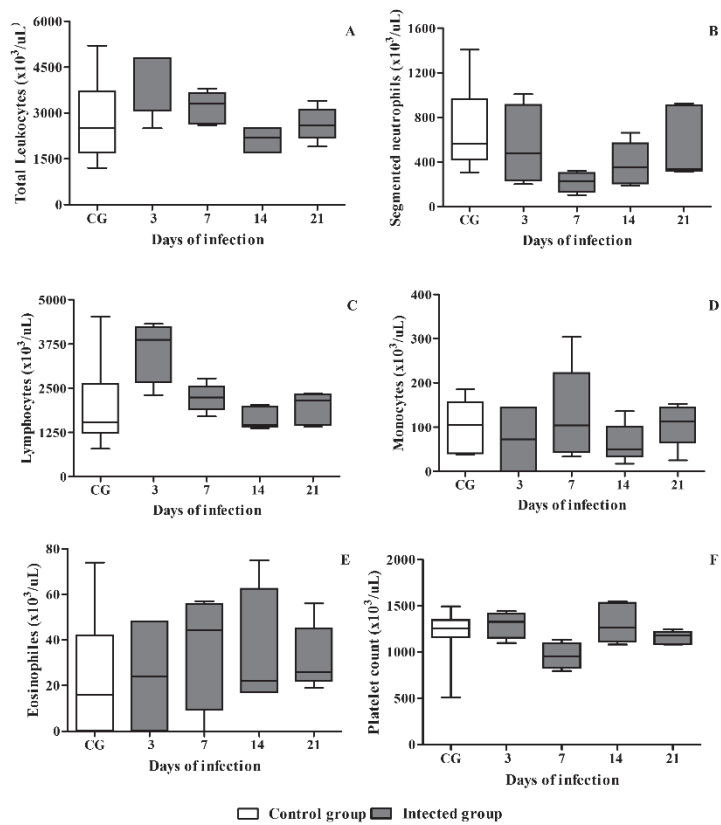


Fig. 2 WBC count in control and infected mice (*Mus musculus*): total leukocyte (A); segmented neutrophils (B); lymphocytes (C); monocytes (D); eosinophils (E); platelets (F)

Gross findings

The gross examination did not indicate any changes in the mice during the experimental period.

Microscopic findings

After 3 days of infection, no microscopic change was detected in the control group and in Group A. On day 7, 25% of the animals from Group B had mild eosinophilic infiltrate in the intestine and liver. On day 14, 75% of the animals from Group C had mild to moderate eosinophilic infiltrate in the intestine and liver. On day 21, 100% of the animals from Group D showed mild to moderate eosinophilic infiltrate in the intestine, liver, and spleen, as demonstrated in (Fig. 3a), 20% had intestinal granulomatous reaction (Fig. 3b), and *A. costaricensis* was found in the intestinal arterial lumen (Fig. 4).

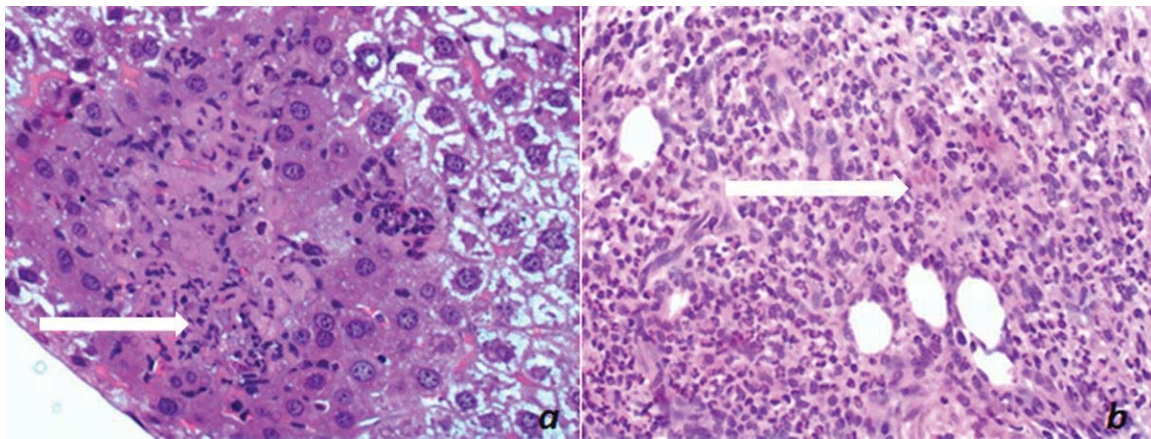


Fig. 3a Histological section of mouse liver on day 21, showing hepatitis with eosinophilic infiltrate (200x). **Fig. 3b** Granuloma with eosinophilic infiltrate in the intestinal wall of infected mouse (200x)

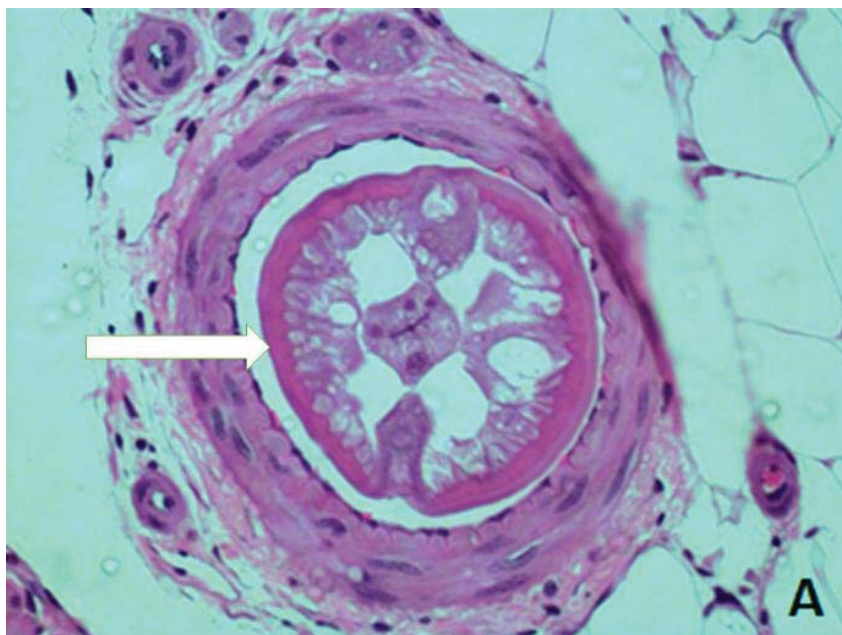


Fig. 4 Histological section of adult *A. costaricensis* in the arterial lumen of infected mouse (50x)

Cytokine expression by flow cytometry

The profile of proinflammatory cytokines in peripheral blood was analyzed in order to shed further light on the molecular modulation of the immune response of mice infected with *A. costaricensis*. There was a significant increase in IFN- γ , MCP-1, TNF- α , IL-6, IL-10, and IL-12p70 in all animals 21 after inoculation (Fig. 5). Among proinflammatory cytokines, the presence of high concentrations of IL-12p70 in the infected animals (~ 42.06 pg/mL) is noteworthy, as this concentration was 24 times greater than in control animals (2.22 pg/mL) (Fig. 5). Likewise, the concentrations of IFN- γ and IL-10 increased by 4.3 and 3.5 times, respectively, when compared with uninfected animals (Fig.5). Also significant but slightly less pronounced were the increases in MCP-1, TNF- α , and IL-6 (Fig. 5).

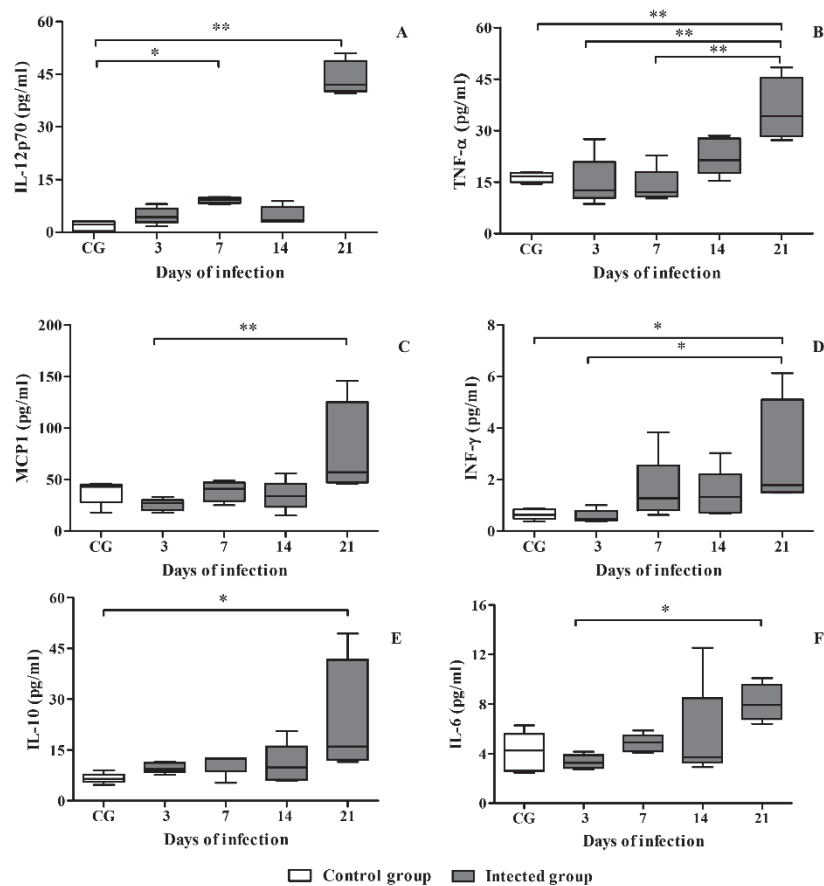


Fig. 5 Cytokine levels of control and infected mice (*Mus musculus*): IL-12p70 (A); TNF- α (B); MCP-1 (C); INF- γ (D); IL-10 (E); IL-6 (F)

Discussion

Abdominal angiostrongyliasis is a disease that causes high mortality amongst humans. Clinically, the patients infected by *A. costaricensis* present listlessness, pallor, fever, abdominal distension, constipation, and paralytic ileus (Agostini et al 1984) and, microscopically, there is intense inflammation of the intestinal wall and abundant eosinophilic infiltrate around the parasite's eggs, suggesting that they could be the major cause of acute inflammation observed in this disease (Graeff-Teixeira et al. 1991).

In this study, we described important pathological and immunological changes induced by *A. costaricensis* during the experimental reproduction of AA in mice. The pathological examination revealed intestinal inflammation with eosinophilic infiltrate (Fig: 3a) consistent with the microscopic findings of this disease in all infected mice 21 days after inoculation (Graeff-Teixeira et al. 1991).

The pathogenesis of infections caused by intestinal helminths is complex and several virulence factors are used to guarantee the survival of the parasite in vertebrate hosts. Just like bacteria and viruses, helminths have to escape the robust immune responses of their hosts by using sophisticated mechanisms. To do that, strategies such as suppressing Th1 and Th2 responses (Maizels et al. 2004), increasing the response of regulatory T lymphocytes (Yazdanbakhsh et al. 2001), and producing immunoregulatory proteins (Maizels et al. 2004; Riffkin et al. 1996) are decisive for maintaining the life and reproduction of the parasite.

In this context, during the acute phase of the infectious process, we noted that *A. costaricensis* induces remarkable production of a broad array of immunomodulatory molecules 21 days after the onset of infection (Fig 5), coinciding with the presence of microscopic inflammatory lesions (Fig 3a and 3b). Amongst the analyzed molecules, we underline the high concentration of IL-12p70 in the serum of the infected animals (~ 43 pg/mL) compared with the controls (~ 1.8 pg/mL). This cytokine is synthesized by phagocytes and antigen-presenting cells (Trinchieri 1998a) as a heterodimer with two subunits known as p35 and p40 (Trinchieri 1998b). Its main biological effect consists in prompting NK cells, T helper lymphocytes, and cytotoxic T lymphocytes to secrete INF- γ (Boehm et al. 1997; de Fost et al. 2003; Kalinski et al. 2001), a cytokine with important activity against intracellular and extracellular pathogens (Kalinski et al. 2000). In our study, we detected a significant increase of INF- γ after the infection with *A. costaricensis*, and such increase is possibly due to the direct effect of IL-12p70. Infections caused by *Brugia malayi* and *Litomosoides sigmodontis* (Maizels et al. 2004) also produce an increase of INF- γ , underscoring the proinflammatory role of this interleukin in helminth infections.

Concomitantly with the increase of INF- γ , we detected a slightly higher increase of IL-10, an important regulatory interleukin secreted by regulatory T lymphocytes (Maizels et al. 2004) and activated macrophages (Mosser and Zhang 2008) capable of suppressing the production of IL-12 (Boehm et al. 1997) and modulating the polarization of Th2 response (Anderson and Mosser 2002). This finding supports previous evidence of the potential of *A. costaricensis* to modulate IL-10 production regardless of the strain of mice used (Geiger et al. 2001). Biologically, the increase in this interleukin during the pathogenesis of this infection may be exerting an anti-inflammatory effect, or a Th2 polarizing effect, or both; however, other specific studies are needed to elucidate these questions.

Th2 cells secrete IL-5 and IL-13, which increase the production of eosinophils in the bone marrow and recruitment into tissues, respectively (Young et al. 1997). Eosinophils perform different activities against infections by *A. cantonensis*, such as granuloma formation (Rumbley et al. 1999), as observed in the microscopic analysis in the present study (Fig 3a and 3b). Eosinophilia is a common finding in patients with eosinophilic meningitis (Sawanyawisuth et al. 2010) and is also observed in experimental studies with rats infected with *A. cantonensis* (Garcia et al. 2014). However, our study did not detect changes in eosinophil count in peripheral blood during the experimental period (21 days), which may be attributed to the short period of infection, whereas Garcia et al. (2014) observed a pronounced increase in eosinophil

count after 4 weeks of infection. Moreover, it is widely known that the production of cytokines such as IL-10 can suppress IgE production and downregulate the IL-5 production (Nonoyama et al. 1993). Consequently, absence of eosinophilia in peripheral blood could be attributed to this modulation as there is an increase in IL-10 production (Zuany-Amorim et al. 1996).

As regards the group of proinflammatory molecules comprised of IL-6, TNF- α , and MCP-1, we also noted a significant increase in the concentrations of these three molecules 21 days after the infection. MCP-1 is a chemokine secreted by endothelial cells as a result of the stimulus mediated by INF- γ and IL-1 β (Rollins et al. 1990), as well as by the direct contact with pathogens (Viebig et al. 2005). Biologically, MCP-1 promotes chemoattraction of monocytes to specific sites and its increase could be related to the presence of the parasite in the mesenteric arterial lumen (Fig. 4), and to eosinophilic granulomatous reaction, as demonstrated in Fig. 3b. Even though MCP-1 was significantly high, we did not observe a homologous effect on peripheral monocyte count (Fig.2), indicating that the recruitment of these cells does not lead to monocytosis, a favorable effect for the survival of the parasite.

Also with respect to proinflammatory molecules, there was a significant increase of IL-6 and TNF- α concomitantly with the inflammatory lesions produced by *A. costaricensis* (Fig.3a and 3b). These two molecules can act upon the vascular endothelium, changing the expression of adhesins (Hoeksema et al. 2016) and thereby favoring the migration of leukocytes into the microenvironment of the infection; they can stimulate the production of acute-phase proteins (Bode et al. 2012) and complement system molecules (Katz et al. 1989). By taking into consideration the important proinflammatory role of these two molecules and the high serum concentrations observed in bacterial infections (Frاندoloso et al. 2013), it could be suggested that *A. costaricensis* controls this increase by inducing the concomitant production of IL-10 in the acute phase of the infection or secretes other yet-unknown molecules with an anti-inflammatory effect.

Our microscopic findings are in line with those of Vazquez et al. (1993), which include thickening of the intestinal wall, multiple confluent ulcers in the terminal ileum region, eosinophilic and granulomatous arteritis, and thrombosis associated with ischemic intestinal lesions. These lesions were observed 21 days after the infection and were potentially related to the modulation of proinflammatory molecules.

In short, in this study, we demonstrated that the microscopic lesions caused by *A. costaricensis* are temporally dependent upon the phase of infection and that the infection occurs concomitantly with the serum increase of a broad array of proinflammatory molecules. The high serum concentration of IL-12p70 can be potentially used as an acute proinflammatory marker of AA and also indicates the importance of INF- γ in the pathogenesis of this infection.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval: "All international, national and/or institutional guidelines applicable to animal use and care were followed."

References

- Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JM, Lisot JU (1984) [Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 79(4):443-5
- Anderson CF, Mosser DM (2002) Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 168(8):3697-701
- Ayala MA (1987) [Abdominal angiostrongyloidiasis. 6 cases observed in Parana and in Santa Catarina, Brazil]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82(1):29-36
- Ayala MA, Guerra IF, Schir RA, Motizuki A (1982) [Abdominal angiostrongyloidosis (presentation of a case)]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 77(2):189-93
- Bode JG, Albrecht U, Haussinger D, Heinrich PC, Schaper F (2012) Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* 91(6-7):496-505 doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.008
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-95 doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749
- Brunet LR, Dunne DW, Pearce EJ (1998) Cytokine Interaction and Immune Responses during *Schistosoma mansoni* Infection. *Parasitology today* 14(10):422-7
- de Fost M, Hartskeerl RA, Groenendijk MR, van der Poll T (2003) Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(2):332-5
- Frndoloso R, et al. (2013) Haemophilus parasuis subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin prevent the expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pigs. *Clinical & developmental immunology* 2013:132432 doi:10.1155/2013/132432
- Garcia JS, et al. (2014) Hematological and histopathological changes in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *Parasitology international* 63(4):631-637
- Geiger SM, et al. (2001) Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta tropica* 80(1):59-68
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL (1991) Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitology research* 77(7):606-11
- Graeff-Teixeira C, de Avila-Pires FD, Machado Rde C, Camillo-Coura L, Lenzi HL (1990) [Identification of wild rodents as hosts of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 32(3):147-50
- Graeff-Teixeira C, Thome JW, Pinto SC, Camillo-Coura L, Lenzi HL (1989) *Phyllocaulis variegatus*--an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(1):65-8

- Grencis RK (1997) Enteric helminth infection: immunopathology and resistance during intestinal nematode infection. *Chemical immunology* 66:41-61
- Hoeksema MA, et al. (2016) Treatment with *Trichuris suis* soluble products during monocyte-to-macrophage differentiation reduces inflammatory responses through epigenetic remodeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30(8):2826-36 doi:10.1096/fj.201600343R
- Hogarth PJ, Folkard SG, Taylor MJ, Bianco AE (1995) Accelerated clearance of *Onchocerca* microfilariae and resistance to reinfection in interleukin-4 gene knockout mice. *Parasite immunology* 17(12):653-7
- Ishih A, Rodriguez BO, Sano M (1990) Scanning electron microscopic observations of first- and third-stage larvae and adults of *Angiostrongylus costaricensis*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 21(4):568-73
- Ishii AI, Sano M (1989) Strain-dependent differences in susceptibility of mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Journal of helminthology* 63(4):302-6
- Kalinski P, et al. (2000) IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *Journal of immunology* 165(4):1877-81
- Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML (2001) Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97(11):3466-9
- Katz Y, Revel M, Strunk RC (1989) Interleukin 6 stimulates synthesis of complement proteins factor B and C3 in human skin fibroblasts. *Eur J Immunol* 19(6):983-8 doi:10.1002/eji.1830190605
- Lange AM, Yutanawiboonchai W, Scott P, Abraham D (1994) IL-4- and IL-5-dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. *Journal of immunology* 153(1):205-11
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE (2004) Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201:89-116 doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x
- Morera P (1973) Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 22(5):613-21
- Morera P, Cespedes R (1970) *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 18(1):173-85
- Mosser DM, Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226:205-18 doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x
- Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter J, Ochs H (1993) B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *The Journal of experimental medicine* 178(3):1097-1102
- Riffkin M, Seow HF, Jackson D, Brown L, Wood P (1996) Defence against the immune barrage: helminth survival strategies. *Immunology and cell biology* 74(6):564-74 doi:10.1038/icb.1996.90

- Rodriguez R, et al. (2011) Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitology research* 109(3):787-92 doi:10.1007/s00436-011-2324-5
- Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 136(6):1229-33
- Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat SA, El Refaei M, Perrin PJ, Phillips SM (1999) Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *The Journal of Immunology* 162(2):1003-1009
- Sawanyawisuth K, et al. (2010) Peripheral eosinophilia as an indicator of meningitic angiostrongyliasis in exposed individuals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(7):942-944
- Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology research* 85(2):135-41
- Trinchieri G (1998a) Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res* 17(1-2):269-78
- Trinchieri G (1998b) Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 70:83-243
- Ubelaker JE (1986) Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *The Journal of parasitology* 72(2):237-44
- Vazquez JJ, et al. (1993) Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology* 105(5):1544-9
- Viebig NK, Wulbrand U, Forster R, Andrews KT, Lanzer M, Knolle PA (2005) Direct activation of human endothelial cells by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infection and immunity* 73(6):3271-7 doi:10.1128/IAI.73.6.3271-3277.2005
- Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM (2001) Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 22(7):372-7
- Young K, Moriello K, Peickert H (1997) Characterization of eosinophil progenitor cells in feline bone marrow. *American journal of veterinary research* 58(4):348-353
- Zuany-Amorim C, Creminon C, Nevers MC, Nahori M-A, Vargaftig BB, Pretolani M (1996) Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity. *The Journal of Immunology* 157(1):377-384

APÊNDICE

Apêndice 1. Alterações microscópicas, no grupo controle e grupo infectados por *A. costaricensis*.

Dados gerais		Micro						
		Intestino			Baço		Fígado	
		granuloma	infiltrado eosinofílico	vasculite	esplenite	infiltrado eosinofílico	infiltrado eosinofílico	hepatite
Controle	1	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	2	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	3	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	4	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3 dias	6	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	7	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	8	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	9	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	10	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
7 dias	11	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	12	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	13	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	14*	NO	1	NO	NO	NO	1	YES
	15*	NO	1	NO	NO	NO	NO	NO
14 dias	16*	NO	2	YES	NO	NO	1	YES
	17*	NO	1	NO	NO	NO	NO	NO
	18	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	19	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	20*	NO	1	NO	NO	NO	2	YES
21 dias	21*	NO	1	NO	YES	1	1	YES
	22*	1	2	YES	NO	NO	2	YES
	23*	NO	1	NO	NO	NO	NO	NO
	24*	NO	1	NO	NO	NO	NO	NO
	25*	NO	2	YES	YES	1	NO	NO

Legenda:

1 – grau leve;

2 – grau moderado

* - animais com alteração microscópica

4. CONCLUSÕES

Este desenho experimental usando camundongos Swiss permite concluir que a associação de métodos diagnósticos como hemograma, citometria de fluxo e análise histológica em camundongos infectados fornece subsídios para a melhor compreensão do processo inflamatório da AA.

O método de citometria é um sistema que pode avaliar muitas moléculas de uma só vez, além de nos permitir compreender a cinética na produção de citocinas envolvidas na patologia do *A.costaricensis* até o 21º dia de infecção.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, epidemias causadas por agentes zoonóticos têm representado cerca de 70% das infecções emergentes e re-emergentes mundiais, fazendo-se necessário um avanço no estudo dos vetores e hospedeiros para a melhor compreensão do processo de adaptação biológica entre os mesmos.

O uso de ferramentas diagnosticas devem ser usadas tanto de forma preventiva, ou seja, no início da infecção e até mesmo na fase crônica. Entre estas ferramentas destacamos a citometria de fluxo usada de forma eficiente neste trabalho.

A partir dos resultados deste experimento, achamos necessário que em um próximo trabalho o delineamento experimental utilizando camundongos Swiss, esteja mais próximo da realidade dos pacientes humanos acometidos com a AA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1973 Sep;22(5):613-21. PubMed PMID: 4729741.
2. Graeff-Teixeira C, de Avila-Pires FD, Machado Rde C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. [Identification of wild rodents as hosts of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1990 May-Jun;32(3):147-50. PubMed PMID: 2135366. Identificacao de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil.
3. Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JM, Lisot JU. [Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984 Oct-Dec;79(4):443-5. PubMed PMID: 6533419. Angiostrongiliase abdominal. Estudo anatomo-patologico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil.
4. Rodriguez R, da Silva AC, Muller 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;9(4):e93658. PubMed PMID: 24705328. Pubmed Central PMCID: 3976301.
5. Rodriguez R, Porto SM, Dos Santos Ferrari R, Marcolan AM, da Silva AC, Graeff-Teixeira C, et al. Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitology research*. 2011 Sep;109(3):787-92. PubMed PMID: 21400113.
6. Ishii AI, Terada M, Fujiu Y, Sano M. In vivo efficacy of levamisole against larval stages of *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1989 Mar;20(1):109-17. PubMed PMID: 2772696.
7. Morera P, Cespedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de biologia tropical*. 1970 Jul-Dec;18(1):173-85. PubMed PMID: 5527668.
8. Tesh RB, Ackerman LJ, Dietz WH, Williams JA. *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathologic findings in wild rodents infected with the parasite. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1973 May;22(3):348-56. PubMed PMID: 4706428.
9. Velazquez JZ, Ramirez Baquedano W, Perez AR, Flores MB. [*Angiostrongilosis costaricensis*. First class in Mexico (author's transl)]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 1974 Oct-Dec;26(4):389-94. PubMed PMID: 4456513. *Angiostrongilosis costaricensis*. Primeros casos mexicanos.
10. Incani RN, Caleiras E, Martin M, Gonzalez C. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2007 May-Jun;49(3):197-200. PubMed PMID: 17625700.
11. Miller CL, Kinsella JM, Garner MM, Evans S, Gullett PA, Schmidt RE. Endemic infections of *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *costaricensis* in two species of nonhuman primates, raccoons, and an opossum from Miami, Florida. *The Journal of parasitology*. 2006 Apr;92(2):406-8. PubMed PMID: 16729706.
12. Ubelaker JE, Hall NM. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 in the United States. *The Journal of parasitology*. 1979 Apr;65(2):307. PubMed PMID: 448616.

13. Morera P, Lazo R, Urquizo J, Llaguno M. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983 Nov;32(6):1460-1. PubMed PMID: 6650746.
14. Graeff-Teixeira C, Goulart AH, Brum Cde O, Laitano AC, Sievers-Tostes C, Zanini GM, et al. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005 Jul-Aug;38(4):310-5. PubMed PMID: 16082477.
15. Pena GP, Andrade Filho J, de Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the State of Espirito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1995 Jul-Aug;37(4):369-74. PubMed PMID: 8599070.
16. Robles Mdel R, Kinsella JM, Galliari C, Navone GT. New host, geographic records, and histopathologic studies of *Angiostrongylus* spp (Nematoda: Angiostrongylidae) in rodents from Argentina with updated summary of records from rodent hosts and host specificity assessment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016 Mar;111(3):181-91. PubMed PMID: 26982178. Pubmed Central PMCID: 4804501.
17. Vazquez JJ, Boils PL, Sola JJ, Carbonell F, de Juan Burgueno M, Giner V, et al. Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology*. 1993 Nov;105(5):1544-9. PubMed PMID: 8224660.
18. Koo J, Pien F, Kliks MM. Angiostrongylus (*Parastrongylus*) eosinophilic meningitis. *Reviews of infectious diseases*. 1988 Nov-Dec;10(6):1155-62. PubMed PMID: 3060943.
19. Sly DL, Toft JD, 2nd, Gardiner CH, London WT. Spontaneous occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in marmosets (*Saguinus mystax*). *Laboratory animal science*. 1982 Jun;32(3):286-8. PubMed PMID: 6808242.
20. Monge E, Arroyo R, Solano E. A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Cespedes 1971). *The Journal of parasitology*. 1978 Feb;64(1):34. PubMed PMID: 627972.
21. Graeff-Teixeira C, Thome JW, Pinto SC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phyllocaulis variegatus*--an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1989 Jan-Mar;84(1):65-8. PubMed PMID: 2319952.
22. Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995 Nov-Dec;90(6):707-9. PubMed PMID: 8731366.
23. Wang JM, Xu JJ, Zhou YH, Tao JP. [Observation of animal model of life cycle of *Angiostrongylus cantonensis*]. *Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi = Chinese journal of schistosomiasis control*. 2014 Dec;26(6):675-7. PubMed PMID: 25856899.
24. Ayala MA. [Abdominal angiostrongyloidiasis. 6 cases observed in Parana and in Santa Catarina, Brazil]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987 Jan-Mar;82(1):29-36. PubMed PMID: 3507564. Angiostrongiloidiase abdominal. seis casos observados no Parana e em Santa Catarina, Brasil.
25. Ayala MA, Guerra IF, Schir RA, Motizuki A. [Abdominal angiostrongyloidosis (presentation of a case)]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1982 Apr-Jun;77(2):189-93. PubMed PMID: 7144553. Angiostrongiloidose abdominal (Apresentacao de um caso).
26. Tizard IR. *Veterinary immunology : an introduction*. 8th ed. St. Louis, Mo.: Saunders; 2009. xiv, 574 p. p.

27. Paim FC, Duarte MM, Costa MM, Da Silva AS, Wolkmer P, Silva CB, et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Experimental parasitology*. 2011 Aug;128(4):365-70. PubMed PMID: 21557939.
28. Xu Z, Shan F, Shan F, Meng C, Xie X, Liu J, et al. [Development of an interferon-gamma ELISPOT for bovine tuberculosis]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*. 2015 Feb;31(2):183-94. PubMed PMID: 26062340.
29. Hagen J, Zimmerman R, Goetz C, Bonnevier J, Houchins JP, Reagan K, et al. Comparative Multi-Donor Study of IFN γ Secretion and Expression by Human PBMCs Using ELISPOT Side-by-Side with ELISA and Flow Cytometry Assays. *Cells*. 2015;4(1):84-95. PubMed PMID: 25679284. Pubmed Central PMCID: 4381211.
30. Ashrafmansouri M, Sarkari B, Hatam G, Habibi P, Abdolahi Khabisi S. Utility of Western Blot Analysis for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian journal of parasitology*. 2015 Oct-Dec;10(4):599-604. PubMed PMID: 26811727. Pubmed Central PMCID: 4724837.
31. Sanders CK, Mourant JR. Advantages of full spectrum flow cytometry. *Journal of biomedical optics*. 2013 Mar;18(3):037004. PubMed PMID: 23478809. Pubmed Central PMCID: 3592788.
32. Subira D, Gorgolas M, Castanon S, Serrano C, Roman A, Rivas F, et al. Advantages of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis of central nervous system non-Hodgkin's lymphoma in AIDS patients. *HIV medicine*. 2005 Jan;6(1):21-6. PubMed PMID: 15670248.
33. Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 2002;31(2):72-82. PubMed PMID: 12040489.
34. Oth T, Van Elssen CH, Schnijderberg MC, Senden-Gijsbers BL, Germeraad WT, Bos GM, et al. Potency of Both Human Th1 and NK Helper Cell Activation is Determined by IL-12p70-Producing PAMP-Matured DCs. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2015 Sep;35(9):748-58. PubMed PMID: 26134473.
35. Verma ND, Hall BM, Plain KM, Robinson CM, Boyd R, Tran GT, et al. Interleukin-12 (IL-12p70) Promotes Induction of Highly Potent Th1-Like CD4(+)CD25(+) T Regulatory Cells That Inhibit Allograft Rejection in Unmodified Recipients. *Frontiers in immunology*. 2014;5:190. PubMed PMID: 24847323. Pubmed Central PMCID: 4023029.
36. Kondrusik M, Swierzbinska R, Zajkowska JM, Pancewicz SA, Hermanowska-Szpakowicz T. [Levels of proinflammatory cytokines: IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha and receptor IL-6R in Lyme borreliosis]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 1999 Nov;7(41):218-20. PubMed PMID: 10680454. Stezenie cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa oraz receptora IL-6R w boreliozie z Lyme.
37. Mingomataj EC, Bakiri AH. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016 Feb;50(1):97-113. PubMed PMID: 26450621.
38. Mentz MB, Graeff-Teixeira C. Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2003 Jul-Aug;45(4):179-84. PubMed PMID: 14502343.
39. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitology research*. 1991;77(7):606-11. PubMed PMID: 1792232.

40. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60. PubMed PMID: 2513902. Pubmed Central PMCID: 1838109.