

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

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: ESTUDO EM
CAMUNDONGOS TRATADOS COM ALTAS DOSES DE
ENOXAPARINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Saldanha da Silva Sandri

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: ESTUDO EM CAMUNDONGOS
TRATADOS COM ALTAS DOSES DE ENOXAPARINA**

Aline Saldanha da Silva Sandri

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 para a obtenção de grau de **Mestra 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: ESTUDO EM CAMUNDONGOS
TRATADOS COM ALTAS DOSES DE ENOXAPARINA**

Elaborada por
Aline Saldanha da Silva Sandri

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

(SUBSTITUIR PELA FOLHA COM ASSINATURAS)

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

CIP – Catalogação na Publicação

S219a Sandri, Aline Saldanha da Silva

Angiostrongilíase abdominal: estudo em camundongos tratados com altas doses de enoxaparina / Aline Saldanha da Silva Sandri. – 2016.

42 f. : il., color. ; 30 cm.

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

1. Angiostrongilíase abdominal. 2. Zoonoses.
3. Doenças inflamatórias intestinais. 4. Medicamentos -
Dosagem. 5. Alimentos - Contaminação. I. Vieira, Maria
Isabel Botelho, orientadora. II. Título.

CDU: 616.34

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a colaboração de inúmeras pessoas. Serei eternamente grata a todos que passaram pelo meu caminho e deixaram um pouco de si. Pessoas imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Primeiramente, a Deus, pela grande oportunidade de cursar este mestrado e pelas tantas coisas boas que me concedeu.

A minha orientadora, professora Maria Isabel Botelho Vieira, pela paciência, apoio, dedicação, ensinamentos e esforços para que tudo desse certo.

Ao professor Rubens Rodriguez, sempre prestativo, pessoa de grande conhecimento e caráter inigualável, obrigada pelo incentivo e disponibilidade.

Ao professor Sérgio Porto, pelo tempo despendido e ajuda na fase experimental do trabalho, além dos valiosos ensinamentos no manuseio dos animais.

Ao professor Márcio Machado Costa, pela disponibilidade e auxílio prestado no trabalho dos dados estatísticos.

Ao Instituto de Patologia de Passo Fundo, por disponibilizar toda a estrutura do laboratório para que fossem confeccionadas as lâminas histológicas.

A colega Daniela Schwingel, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas.

Ao colega José Roberto da Silva Filho, profissional apaixonado pela Medicina Veterinária, pelo compartilhamento de seu conhecimento e experiência.

Aos meus colegas do mestrado e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da UPF, que muito contribuíram para minha evolução.

Enfim, a todos que participaram desta caminhada e torceram pelo meu sucesso, muito obrigada!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho, Marco Antônio, que com seu sorriso encantador me mostra que a felicidade está nas coisas mais simples da vida. Ao meu marido, Marcos Paulo, pelo amor, amizade e companheirismo. A minha querida mãe, Cleci, pelo amor, dedicação e ajuda em tudo e em todos os momentos.

EPÍGRAFE

“O que destrói o ser humano?

Política sem princípios, prazer sem compromisso, riqueza sem trabalho, sabedoria sem caráter, negócios sem moral, ciência sem humanidade e oração sem caridade”.

Mohandas Karamchand Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 HISTÓRICO	14
2.1.1 PARASITO	14
2.1.2 HOSPEDEIRO DEFINITIVO	15
2.1.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS	15
2.2 CICLO EVOLUTIVO	15
2.3 ASPÉCTOS CLÍNIOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS	16
2.4 ANATOMIA PATOLÓGICA	17
2.5 DIAGNÓSTICO	18
2.6 TRATAMENTO	18
2.7 ANTICOAGULANTES	19
3. CAPÍTULO 1	21
Abstract	22
Introduction	23
Material and Methods	23
Results	25
Discussion	26
References	28
5. CONCLUSÕES	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS**2. REVISÃO DE LITERATURA**

FIGURA 1. Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis*..... 16

3. CAPITULO 1

FIGURA 1. Alterações macroscópicas: infarto de íleo terminal próximo da válvula ileocecal em um camundongo do grupo tratado com enoxaparina..... 34

FIGURA 2. Alterações microscópicas: *a)* Granulomas na submucosa englobando ovos e larvas (200 x.) *b)* Trombose arterial (100x). *c)* Infarto intestinal (50x). *d)* Broncopneumonia com infiltrado neutrofilico (200x)..... 35

FIGURA 3. Curva de sobrevivência estratificada por tratamentos de camundongos parasitados com *Angiostrongylus costaricensis*..... 36

LISTA DE TABELAS**3. CAPITULO 1**

TABELA 1.	Achados macroscópicos em camundongos parasitados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> e tratados com placebo (Grupo 1) ou enoxaparina (Grupo 2).....	29
TABELA 2.	Achados microscópicos em camundongos parasitados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> e tratados com placebo ou enoxaparina	30
TABELA 3.	Associação dos achados macroscópicos em camundongos parasitados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> quanto à sobrevivência.....	31
TABELA 4.	Associação dos achados microscópicos em camundongos parasitados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> quanto à sobrevivência.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Angiostrongilíase abdominal
AT3	Antitrombina III
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C°	Grau Celsius
dpi	Dias pós infecção
HE	Hematoxilina-eosina
L1	Larvas de primeiro estadio
L2	Larvas de segundo estadio
L3	Larvas de terceiro estadio
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/ml	Miligramas por mililitros
PUC-RS	Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
µm	Micrometro
UPF	Universidade de Passo Fundo

RESUMO

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

ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESULTADOS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM ALTAS DOSES DE ENOXAPARINA

Autora: Aline Saldanha da Silva

Orientadora: Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

Passo Fundo, 04 de agosto de 2016.

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma infecção zoonótica causada pelo parasito *Angiostrongylus costaricensis*, que habita as artérias mesentéricas. O único tratamento eficaz para AA é a cirurgia, e como uma das principais complicações da doença é o infarto intestinal, que ocorre devido à formação de trombos, o uso de anticoagulantes poderia ser uma opção de tratamento. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar o efeito de altas doses do anticoagulante enoxaparina na prevenção de lesões isquêmicas intestinais e, consequentemente, na sobrevivência de camundongos infectados experimentalmente com *A. costaricensis*. O desenho experimental foi conduzido da seguinte forma: os camundongos foram divididos em 2 grupos de 12 animais: Grupo 1 – controle, que recebeu placebo; Grupo 2 – tratados com 2,5 mg/kg de enoxaparina. No dia 1 do experimento os camundongos foram infectados através de administração oral (gavagem) de 10 larvas L3 de *A. costaricensis*. Após a infecção, foram mantidos em gaiolas apropriadas e monitorados diariamente. A partir do 15º dia de infecção, os animais do grupo 1 receberam doses diárias de água de injeção (placebo); concomitantemente, os animais do grupo 2 receberam doses diárias de enoxaparina (2,5 mg/kg), ambas administrada via subcutânea. Ambos os grupos receberam 1,6 mg/ml de paracetamol diariamente para aliviar a dor. O período experimental foi de 50 dias, sendo os animais sacrificados no último dia, por meio de anestesia inalatória com isoflurano, para a realização de necropsia. A análise estatística foi realizada pelo teste qui-quadrado ou pelo teste exato de fisher. Os resultados da avaliação macroscópica e microscópica demonstraram que não houve variação na ocorrência das lesões entre os grupos. Também foi feita uma análise entre os sobreviventes e não sobreviventes, onde se verificou que animais que foram a óbito apresentaram frequentemente lesões como granulações na serosa, infarto e aderência intestinal. A taxa de mortalidade não variou entre o grupo tratado com enoxaparina e o grupo controle. Desta forma, demonstramos que altas doses de enoxaparina não têm efeito protetor na AA, pois a taxa de sobrevivência e as lesões nos camundongos não variaram entre o grupo tratado e o grupo controle.

Palavras-chave: angiostrongilíase abdominal, enoxaparina, infarto intestinal.

ABSTRACT

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

ANGIOSTRONGILÍASE ABDOMINAL: RESULTADOS EM CAMUNDONGOS
TRATADOS COM ALTAS DOSES DE ENOXAPARINA

Autora: Aline Saldanha da Silva

Orientadora: Dra. Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, 04 de agosto de 2016.

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is a zoonotic infection caused by the *Angiostrongylus costaricensis* parasite, which resides in the mesenteric arteries. Surgery is the only effective treatment for AA, and since one of the main complications of the disease is intestinal infarction caused by thrombi formation, the use of anticoagulants could be a treatment option. Therefore, this study aimed to assess the effect of high doses of enoxaparin anticoagulant on preventing intestinal ischemic lesions, and consequently, on the survival of mice infected experimentally with *A. costaricensis*. The experimental design was conducted as follows: the mice were divided into 2 groups of 12 animals; Group 1 - control treated with placebo, and Group 2 - treated with 2.5 mg/kg of enoxaparin. On the first day of the experiment, mice (n=24) were infected by oral administration (gavage) of 10 L3 larvae of *A. costaricensis*. After infection, they were maintained in appropriate cages and monitored daily. From the 15th day of infection, the animals of group 1 received daily doses of injected water (placebo), concomitantly the animals of group 2 received daily doses of enoxaparin (2.5 mg/kg) administered subcutaneously. Both groups received 1.6 mg/ml of paracetamol daily for pain relief. The experimental period lasted 50 days, and the animals were sacrificed in the last day through inhalation anesthesia with isoflurane so necropsy could be performed. The statistical analysis was performed by chi-square and Fisher's exact tests. The results from macro- and microscopic assessments showed no variation in the occurrence of lesions between the groups. An analysis was also performed among survivors and non-survivors, which showed that animals that died often presented lesions such as serous granulation, intestinal infarction and adhesion. Mortality rate did not vary between the group treated with enoxaparin and the control group. Thus, we showed that high doses of enoxaparin have no protective effect on AA, because the survival rates and lesions of mice did not vary between the treated group and the control group.

Keywords: abdominal angiostrongyliasis, enoxaparin, intestinal infarction.

1. INTRODUÇÃO

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma doença causada pelo *Angiostrongylus costaricensis*, um parasita da classe Nematoda, que acomete adultos e crianças de ambos os sexos (1). A doença tem sido detectada principalmente na região sul do Brasil e na Costa Rica (2, 3). O parasita tem como hospedeiros definitivos roedores silvestres, tais como *Sigmondon hispidus* na Costa Rica e *Oligoryzomys ratticeps* ou *Oligoryzomys nigripes*, no Brasil (4). Moluscos terrestres são hospedeiros intermediários, incluindo *Vaginulos (Sarasinula) plebeius* na Costa Rica e *Phyllocaulis* no Brasil (5).

O homem (hospedeiro acidental) pode ser infectado ao consumir alimentos contaminados pelas mucosidades dos moluscos que contenham larvas do parasita na fase L3 e, mais raramente, ao ingerir o próprio molusco (6). Quando infecta seres humanos, o *A. costaricensis* pode causar uma doença severa, que usualmente se manifesta com lesões intestinais caracterizadas por infarto, pseudotumor ou apendicite aguda (3). O único tratamento eficaz para AA é cirúrgico, onde ocorre a retirada da porção intestinal acometida pelo parasita. (7). Como uma das principais complicações da doença é a formação de trombos, que podem causar infarto intestinal, o uso de anticoagulantes pode ser uma opção no tratamento da AA.

Por conseguinte, (8) realizou um estudo utilizando doses profiláticas 0,57 mg/kg do anticoagulante enoxaparina em camundongos infectados experimentalmente com *A. costaricensis*. Não houve diferenças na ocorrência de lesões intestinais, bem como na taxa de mortalidade de animais tratados com enoxaparina comparados com um grupo controle (não tratado). A baixa dose de enoxaparina utilizada no estudo poderia explicar a ineficácia em prevenir as lesões isquêmicas causadas pelo parasita.

Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de altas doses de enoxaparina na prevenção de lesões intestinais, formação de trombos e, conseqüentemente, na sobrevivência de camundongos infectados experimentalmente com *A. costaricensis*.

A dissertação compreende, além desta introdução, uma breve revisão de literatura sobre angiostrongilíase abdominal, sua história, característica do parasito, hospedeiro definitivo, hospedeiro intermediário, ciclo de vida, anatomia patológica, anticoagulantes, tratamento, e um capítulo na forma de artigo científico que aborda o tema “Altas dose de enoxaparina no tratamento da Angiostrongilíase abdominal”. As

considerações finais, conclusões, referências bibliográficas e apêndices compõem a última parte da dissertação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A primeira descrição da AA em seres humanos remonta ao ano de 1967, na Costa Rica, como granuloma parasitário intestinal (9). Para diferenciá-la da angiostrongilíase meningo-encefalítica, causada pelo *Angiostrongylus cantonensis*, a doença foi denominada angiostrongilíase abdominal, sendo proposta a classificação do “*Angiostrongylus costaricensis*” como espécie nova (1).

Fora da Costa Rica, o primeiro caso publicado de AA foi em Honduras (10). Em seguida, a doença foi relatada também em outros países das Américas, como México (11) e Equador (12). Casos provavelmente importados ocorreram nos EUA (13) e Europa (14). No Brasil, foram publicados casos em São Paulo, Santa Catarina, Paraná (15), Rio Grande do Sul (2, 3, 16), Minas Gerais (17), Espírito Santo, (18) e Rio de Janeiro (19).

2.1.1 PARASITO

Segundo a sistemática proposta por (20), pode-se adotar a seguinte classificação para o parasito: Filo: Nematoda; Classe: Chromadorea; Ordem: Rhabditida; Subordem: Strongylida; Superfamília: Metastrongyloidea; Família: Angiostrongylidae; Gênero: *Angiostrongylus*; Espécie: *Angiostrongylus costaricensis*

Os primeiros parasitos identificados (2 machos e 1 fêmea) foram obtidos a partir das artérias mesentéricas das peças cirúrgicas de casos humanos e a morfologia foi inicialmente descrita por Morera (1). O macho mede entre 16,78mm e 18,96mm de comprimento e 0,28mm de largura. O corpo é filiforme e, na extremidade caudal, encontra-se levemente encurvado, terminando em uma bolsa copulatriz bem desenvolvida. A fêmea mede entre 24,57 mm e 27,90 mm de comprimento. O corpo filiforme é ligeiramente encurvado na extremidade distal, que é cônica (1).

2.1.2 HOSPEDEIRO DEFINITIVO

Os primeiros hospedeiros definitivos do *A. costaricensis* foram identificados após a captura de roedores no peridomicílio de um paciente com AA. Os roedores nos quais foram identificados os parasitos foram o *Rattus rattus* (rato do sótão) e o *Sigmodon hispidus* (rato do algodão) (1).

No Brasil, no estado do Rio Grande do Sul foram identificados os primeiros roedores naturalmente infectados: *Oligoryzomys nigripes* e *Oligoryzomys ratticeps*, no peridomicílio de um paciente diagnosticado com AA (4). Cães também podem participar do ciclo evolutivo como “hospedeiro reservatório da doença” (21).

2.1.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

O primeiro molusco naturalmente infectado com larvas do terceiro estadio (L3) do *A. costaricensis* foi *Vaginulus (Sarasinula) plebeius*, na Costa Rica, atualmente denominado de *Sarasinula plebeia* (1).

O primeiro hospedeiro intermediário identificado no Brasil foi o *Phyllocaulis variegatus*. Em seguida, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, outras três espécies infectadas foram identificadas: *Limax maximus*, *Bradybaena similaris* e *Limax flavus*. Essas descobertas demonstraram uma diversidade de moluscos infectados (5).

2.2 CICLO EVOLUTIVO

A primeira proposição de ciclo do *A. costaricensis* foi publicado em 1971, apontando dois hospedeiros naturais definitivos e um hospedeiro intermediário. Nos roedores (hospedeiros definitivos), os parasitos adultos encontram-se nos ramos da artéria mesentérica, especialmente da região íleo-cecal. Os ovos são levados pela corrente sanguínea até as camadas da parede intestinal, desde a serosa à mucosa, onde embrionam e formam larvas de primeiro estadio (L1), que atravessam a parede intestinal e caem na luz do órgão, para finalmente serem expelidas ao exterior com as fezes. Nos moluscos terrestres (hospedeiros intermediários), que ingerem fezes de roedores e são encontrados facilmente nas áreas rurais, as larvas L1 se transmudam em larvas infectantes L3. Quando os roedores ingerem moluscos infectados ou alimentos contaminados pelas secreções mucosas dos moluscos, o ciclo se completa. O homem

(hospedeiro acidental) pode ser infectado ao consumir alimentos contaminados pelas mucosidades dos moluscos e ao ingerir o próprio molusco. Após se alojar nas artérias mesentéricas do homem, o parasito adulto deposita os ovos, que não saem para a luz do órgão, ficando presos na parede intestinal (1). O ciclo evolutivo está ilustrado na figura 1.

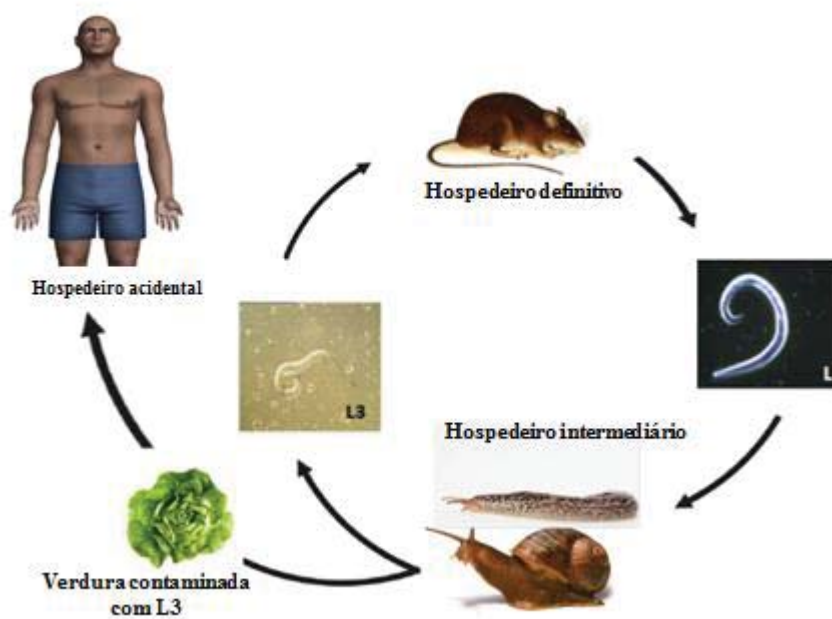


Figura 1. Ciclo evolutivo *Angiostrongylus costaricensis*.

Um ciclo evolutivo diferente foi proposto por (22), o qual descreveu que as larvas no estágio L3 penetram na mucosa intestinal e alcançam o sistema linfático ou venoso, migram até os linfonodos mesentéricos e sofrem muda para L4, e passam novamente para o sistema venoso. Então, as larvas migram para o pulmão, para assim chegarem à circulação arterial, e então se alojam nas artérias mesentéricas, pancreáticas e íleo-cecais, atingem a maturidade e se reproduzem.

Então, este novo ciclo propõe que para chegar ao seu habitat definitivo, que são as artérias mesentéricas, as larvas precisam passar pelo pulmão, para fazer a transposição do sistema linfático/venoso para a circulação arterial, e que não migram diretamente do sistema linfático para o arterial, como proposto anteriormente.

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS E LABORATORIAIS

O principal sintoma da doença é a dor abdominal, que varia de leve a acentuada, podendo evoluir para um quadro de abdômen agudo, obrigando, por vezes, à cirurgia de urgência (9). A dor, na maioria dos casos, é leve, mas recorrente, repetindo-se durante semanas ou meses, mesmo com os diferentes tipos de tratamentos sintomáticos e antiparasitários. Há ainda outros sintomas que acompanham a dor, como febre, náuseas, vômitos, anorexia, diarreia ou constipação, urticária e perda de peso (23).

Clinicamente, os sinais relatados são distensão abdominal, palpação dolorosa do abdômen com resistência muscular ou irritação peritoneal, toque retal doloroso e rigidez abdominal. Um dado relevante é a presença de massa tumoral palpável, muitas vezes localizada no quadrante inferior direito, flanco direito ou mesogástrico. Essa massa tumoral pode ser confundida com plastrão apendicular ou com tumor maligno, sendo por vezes volumosa e dolorosa, e podendo ser palpada ao toque retal (24).

Ao exame radiológico observou-se dificuldade de enchimento intestinal, espasticidade, irritabilidade, distensão de alças delgadas com níveis hidroaéreos e espessamento da parede intestinal. Identificou-se, ainda, íleo terminal ou ceco com calibres reduzidos, velamento do quadrante inferior direito e pneumoperitônio, nos casos de perfuração (24).

Quanto aos aspectos laboratoriais, leucocitose com eosinofilia têm sido costumeiramente evidenciadas em estudos hematológicos. A leucocitose pode variar de 10.000 a 52.000 mm^3 , e a eosinofilia de 11% a 81%. Eosinofilia menor de 10% e leucocitose maior de 50.000 mm^3 raramente têm sido observadas (16).

2.4 ANATOMIA PATOLÓGICA

Na análise macroscópica de peças cirúrgicas, os principais aspectos que já foram observados são: a) necrose isquêmica intestinal, semelhante aos infartos êntero-mesentéricos; b) espessamento segmentar do intestino delgado, mimetizando a doença de Crohn; c) nódulos mimetizando carcinomas, em cólons de adultos; d) apendicites agudas. Lesões no fígado, testículos, vulva, estômago, vesícula biliar e pele raramente são observadas (7, 25).

Como aspectos microscópicos relevantes destacam-se a arterite eosinofílica, infiltrado eosinofílico acentuado e granulomas perivasculares, por vezes, seguindo os trajetos vasculares (26).

2.5 DIAGNÓSTICO

Para a realização do diagnóstico definitivo é necessário identificar estruturas parasitárias, como vermes adultos, ovos ou mais raramente larvas. Muitas vezes é preciso efetuar cortes seriados ou até mesmo a inclusão de toda a peça cirúrgica em bloco parafinado para a localização das estruturas parasitárias, e dessa forma confirmar o diagnóstico da doença (3).

Como os ovos e larvas não são eliminados pelas fezes, o diagnóstico fácil e rápido por um exame parasitológico de fezes é descartado. Assim, a sorologia é uma importante ferramenta de diagnóstico precoce da doença e também em casos de infecções assintomáticas. Testes de Elisa para detecção de anticorpos IgG produzidos em resposta ao *A. costaricensis* estão disponíveis comercialmente.(27).

Uma forma complementar de diagnóstico é a realização de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tecidos já fixados em formalina, para identificação do DNA do parasita. O uso do PCR para diagnosticar AA demonstrou ter ótima especificidade, sendo muito útil para auxiliar no diagnóstico, principalmente quando os patologistas não estão familiarizados com a doença, evitando resultados falso-negativos (28).

2.6 TRATAMENTO

Não existe ainda um tratamento medicamentoso capaz de erradicar o parasito. O uso de drogas anti-helmínticas pode até mesmo agravar as lesões, em razão da morte do parasito no interior das artérias (29). O único tratamento eficaz é a cirurgia, na qual ocorre a retirada da porção intestinal acometida pelos parasitas (7).

Em estudo experimental, no qual roedores *S. hispidus* foram tratados com tiabendazol, levamisol e dietilcarbamazina, foi observado que as drogas utilizadas não paralisam ou matam o parasito (30). Notou-se ainda óbito de alguns roedores depois do tratamento, em razão das migrações erráticas do *A. costaricensis*. Estudo “in vitro” com essas mesmas drogas demonstrou que elas não matam o parasito, mas o excitam, aumentando os seus movimentos, podendo induzir sua migração errática. O PF 1022A, Pyrantel e Flubendazole tem efeito larvicida em modelo experimental (29).

Em contrapartida, outro estudo demonstrou que o anti-helmíntico levamisol foi eficaz na eliminação de larvas de *A. costaricensis* quando administrado oralmente em

camundongos no início da infecção (31). Além disso, o levamisol também foi eficiente em matar vermes adultos em um estudo realizado *in vitro* (32) Portanto baseado nos resultados dos diferentes trabalhos a eficiência do uso de anti-helmínticos ainda não está esclarecida.

Drogas anti-inflamatórias, tais como betametasona, utilizadas com o objetivo de aliviar sintomas, também não se revelaram eficazes, provocando, em alguns casos, até mesmo agravamento das lesões. Da mesma forma, drogas anti-inflamatórias naturais, como a *Arctium lappa*, não mostraram eficácia na prevenção das lesões (33).

Nos casos mais graves, em que há obstrução ou perfuração intestinal, o tratamento da AA exige intervenção cirúrgica. A descoberta do mecanismo através do qual o parasita provoca lesões isquêmicas é vital para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento das complicações a ele associadas. A utilização de anticoagulantes ou trombolíticos poderia ajudar na prevenção de lesões isquêmicas intestinais (34).

2.7 ANTICOAGULANTES

A coagulação sanguínea ocorre por uma complexa interação entre plaquetas, o endotélio vascular, a cascata de coagulação e o sistema fibrinolítico. Quando o corpo humano encontra-se em homeostase há um equilíbrio na formação e destruição de trombos (35). O desequilíbrio deste sistema pode resultar na formação patológica de trombos, capazes de obstruir o fluxo sanguíneo, levando a uma série de condições patológicas graves (36).

Para tanto, existem vários fármacos disponíveis comercialmente que interferem em diferentes etapas da coagulação sanguínea (35). Os antagonistas da vitamina K, como a varfarina, foram os primeiros anticoagulantes orais disponíveis. Eles são usados no tratamento e prevenção de eventos trombóticos em pacientes de alto risco, porém aumentam muito a ocorrência de hemorragias (37). Desta forma, novos anticoagulantes orais mais seguros foram desenvolvidos, como os inibidores do fator 10, inibidores diretos da trombina, fibrinolíticos e as heparinas (35).

As heparinas atuam aumentando a atividade da antitrombina III (AT3), um peptídeo que inibe vários fatores de coagulação (38). Elas são divididas em heparinas não fracionadas e heparinas de baixo peso molecular, dentre as quais se destaca a

enoxaparina (35) que é utilizada principalmente no tratamento de isquemias e de infarto do miocárdio (39).

A enoxaparina é uma heparina de baixo peso molecular amplamente utilizada, sua segurança e eficácia já foram demonstradas em uma grande variedade de condições tromboembólicas venosas e arteriais. Seu mecanismo de ação consiste em inibir indiretamente a conversão de protrombina em trombina e reduz a conversão de fibrinogênio em fibrina, prevenindo a formação de trombos (40).

As principais propriedades farmacocinéticas da enoxaparina são uma alta biodisponibilidade e uma meia vida longa. A enoxaparina é absorvida rapidamente após administração subcutânea, com atividade máxima ocorrendo 2,5 a 4 horas após a aplicação. Desta forma, apresenta uma boa atividade anticoagulante sem a necessidade de monitoramento (40). A droga em questão também é aplicada através de injeções intravenosas, onde apresenta um efeito anticoagulante imediato (39).

3. CAPITULO 1

High-dose enoxaparin in the treatment of abdominal angiostrongyliasis in Swiss mice

Aline Saldanha da Silva Sandri¹, Rubens Rodriguez², Márcio Machado da Costa², Sérgio Machado Porto², Daniela Schwingel¹, Maria Isabel Botelho Vieira³

Article submitted to the Parasitology Research Journal

1 Student, Graduate Program in Bioexperimentation, Universidade de Passo Fundo, 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: marisabel@upf.br

Abstract

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is caused by *Angiostrongylus costaricensis*, which inhabits mesenteric arteries. There is no drug treatment for AA, and since intestinal infarction due to thrombi is one of the main complications of the disease, the use of anticoagulants may be a treatment option. Thus, we aimed to assess the effect of high doses of enoxaparin on the prevention of ischemic intestinal lesions and on the survival of mice infected with *A. costaricensis*. Hence, 24 mice were infected with L3 of *A. costaricensis* and equally divided into two groups: Group 1 - control treated with placebo, and Group 2 - treated daily with enoxaparin (2.5 mg/kg) for 50 days. All mice were subjected to necropsy and histological analysis. The results from gross and microscopic assessments showed no variation in the prevalence of lesions between the groups. An analysis was also performed among survivors and non-survivors, showing that animals that died often presented lesions such as granulation tissue in the serosa and intestinal infarction and adhesion. The mortality rate did not vary between the enoxaparin-treated and control groups. Thus, we showed that high doses of enoxaparin have no protective effect against AA as the survival rates and lesions of mice did not vary between the treated and control groups. Considering that the use of prophylactic doses also showed to be ineffective in a previous study, we do not recommend the use of enoxaparin for AA treatment.

Keywords: abdominal angiostrongyliasis, thrombi, intestinal infarction, enoxaparin.

Introduction

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is a disease caused by nematode *Angiostrongylus costaricensis*, which inhabits the mesenteric arteries of its hosts (Morera and Céspedes 1971). Wild rodents serve as definitive hosts while terrestrial mollusks are the intermediate hosts (Morera and Céspedes 1971).

In humans, the disease often manifests itself through intestinal lesions characterized by infarction, pseudotumor, or acute appendicitis (Graeff-Teixeira et al. 1991). In the most severe cases, with intestinal obstruction or perforation, AA requires surgical treatment. Finding the mechanism whereby the parasite causes ischemic lesions is crucial for developing strategies for the prevention and treatment of associated complications (Mousa 2004).

The use of anthelmintics has not been deemed efficient against AA, as intestinal lesions could be aggravated by the death of the parasite inside the arteries (Mentz and Graeff-Teixeira 2003; Morera and Bontempo 1985). Anti-inflammatory drugs such as betamethasone are not efficacious either, causing deterioration of the lesions in some cases (Fante et al. 2008).

Anticoagulants and thrombolytics could help in the prevention of ischemic intestinal lesions (Mousa 2004). There are several commercially available anticoagulants that interfere in different stages of blood coagulation (Harter et al. 2015). Heparins are widely used, including enoxaparin, a low-molecular-weight heparin for the treatment of ischemia and infarction (Silvain et al. 2012). Enoxaparin inhibits the conversion of prothrombin to thrombin and reduces the conversion of fibrinogen to fibrin, preventing clot formation. It also reduces coagulation factors and inactivates factor X (Harter et al. 2015).

A previous study utilized prophylactic doses of enoxaparin for the treatment of mice infected with larvae (L3 stage) of *A. costaricensis*. The enoxaparin-treated animals did not show any differences in the development and severity of intestinal lesions and in mortality rate when compared to untreated ones. It is hypothesized that the low dose used in this study was not efficient for the prevention of thrombogenesis (Rodriguez et al. 2011).

Therefore, owing to the lack of treatments against AA, the aim of the present study was to assess the effect of high doses of enoxaparin on the prevention of ischemic intestinal lesions and, consequently, on the survival of mice experimentally infected with *A. costaricensis*.

Material and methods

Animals

Twenty-four male Swiss mice aged 6 to 8 weeks and weighing 25 to 38 grams were used. The animals were placed in appropriate cages with water and food *ad libitum*. The experiment was performed at the laboratory animal facility of the Institute of Biological Sciences of Universidade de Passo Fundo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The study protocol (no. 030/2014) was approved by the Animal Research Ethics Committee of Universidade de Passo Fundo.

Isolation of *A. costaricensis* larvae

The larvae (L3) were isolated from infected *Phyllocaulis variegatus*, *Limax maximus*, and *Meghimatium pictum* slugs, in Marau, State of Rio Grande do Sul, Brazil, after detection of a positive case of AA in a local resident. The slugs were stored in moist plastic jars and fed legumes; after 20 days, they were euthanized and the tissues were digested with 0.03% pepsin and 0.7% hydrochloric acid at 37° C for 12 h. Thereafter, the modified Baermann technique was used for isolation of L3 larvae and later inoculation.

Drugs

Enoxaparin (Clexane®), Aventis, (vials containing 20 mg), was injected subcutaneously. The drug was diluted in water and prepared in insulin syringes at doses of 2.5 mg/kg according to the weight of each animal. The volume of placebo in the control group was identical to the volume of enoxaparin used in the treated group. For both sedation and euthanasia, isoflurane (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brazil) was administered by inhalation using an induction chamber.

Experimental design

The mice were infected with 10 L3 larvae of *A. costaricensis*, split into two groups of 12 animals as follows: Group 1 – control, given placebo; Group 2 – treated with enoxaparin.

Experimental protocol: On day 1, the mice (n = 24) were sedated with isoflurane and infected by oral administration (gavage) of 10 L3 larvae of *A. costaricensis*. After infection, the mice were kept in appropriate cages and monitored daily for food acceptance, defecation, activity, and weight. From day 15, the animals in Group 1 were given daily doses of sterile water for injection (placebo); at the same time, the animals in Group 2 received daily doses of enoxaparin (2.5 mg/kg) injected subcutaneously. Both groups received 1.6 mg/mL of paracetamol (Tylenol, Janssen®), on a daily basis, for pain relief. The experimental period covered 50 days, and the animals were sacrificed on the last day by inhaled isoflurane and then submitted to necropsy.

Necropsy and histological analysis

The gross aspect of the digestive tube was examined for signs of ischemic lesions, peritonitis (fibrin deposition), and pseudotumors. The specimens were fixed in 10% formalin for 24 h. For the microscopic analysis, the specimens were embedded in paraffin and sectioned in a microtome (at a 5- μ m thickness). The slides were stained with hematoxylin and eosin and examined by two independent and blinded pathologists. The following microscopic aspects were investigated: 1. Presence of infarction; 2. Identification of adult parasites, larvae, and eggs; 3. Eosinophilic infiltrate (qualitative and quantitative); 4. Granuloma formation; 5. Characterization of vasculitis and thrombosis.

Statistical analysis

The differences in proportions were analyzed by the chi-square test. However, Fisher's exact test, as a substitute for the chi-square test, was used in the tables in which the estimated counts were smaller than 5. The data were considered to be significantly different when $P < 0.05$.

Results

Gross findings

The results of the gross analyses did not indicate significant differences according to Fisher's exact test, as shown in Table 1. Intestinal lesions included granulation in the serosa, adhesion, ileocecal abscess forming a pseudotumor, and intestinal infarction in both groups (Fig. 1).

Microscopic findings

In the intestine, where granulomas were present, no significant difference was observed in their levels of severity between Group 1 (91.7%) and Group 2 (91.7%) (Fig. 2a). On the other hand, Group 2 had mild granuloma (41.7%) of larger proportions than Group 1 (16.7%). Presence of thrombosis was the same for both groups, i.e., 58.3% (Fig. 2b); infarction was detected in 66.7% in Group 1, compared to 58.3% (Fig. 2c) of the cases (Table 2) in Group 2.

In the lungs, there was no difference between treatments in terms of granuloma severity, presence of thrombi, and presence of eggs and larvae, which were absent in both groups. Bronchopneumonia was detected in 58.3% of animals from Group 1 and in 75% of animals (Fig. 2d) from Group 2 (Table 2).

Likewise, in the spleen, there were no significant differences between the groups regarding infarction (G1: 16.7%; G2: 25%), granuloma (G1: 25%; G2: 16.7%), thrombosis (G1: 16.7%; G2: 0%), eosinophilic infiltrate (G1: 75%; G2: 58.3%), eggs and larvae (G1: 16.7%; G2: 25%), and neither in the liver regarding infarction (G1: 25%; G2: 50%), granuloma (G1: 50%; G2: 75%), abscesses (G1: 0%; G2: 8.3%), hepatitis (G1: 91.7%; G2: 83.3%), eosinophilic infiltrate (G1: 91.7%; G2: 75%), and eggs and larvae (G1: 66.7%; G2: 50%), as shown in Table 2. There were no findings in the brains and kidneys of animals from either group.

As to the survival of animals in both groups, 93% (14/15) of those which died had intestinal infarction, with granulation in 87% of the cases (13/15) and adhesions in 66.7% (10/15) (Fig. 3) and (Table 3).

Thrombi and intestinal infarction were present in 93.3% (14/15) and bronchopneumonia and splenitis in 100% of the animals that died (Table 4).

Mild to moderate granuloma and eosinophilic infiltrate were observed in the animals that had an early death compared to those which survived for up to 50 days.

Discussion

In this study, we found that high doses of enoxaparin (2.5 mg/kg) (Andújar et al. 2016) do not have a protective effect against AA, since the survival rate of mice did not vary between the treated and control groups and both gross and microscopic findings were similar between them.

A. costaricensis lodges in mesenteric arteries, leading to an inflammatory reaction with formation of granulomas and prominent eosinophilic infiltrate. (Morera and Céspedes 1971) (Graeff-Teixeira et al. 1991). The major complication of AA is the formation of thrombi, which can result in intestinal infarction – the leading cause of death from the disease (Graeff-Teixeira et al. 1991; Waisberg et al. 1999).

There is no effective drug treatment against AA. The use of anthelmintics is controversial, as some studies indicate that they are inefficacious and even cause deterioration of the lesions (Mentz and Graeff-Teixeira 2003; Morera and Bontempo 1985). Conversely, another study demonstrates that levamisole is efficient in the eradication of *A. costaricensis* larvae when given orally at the onset of infection in mice (Ishii et al. 1989) and in the elimination of the adult parasite *in vitro* (Terada et al. 1986).

In severe cases, surgical intervention is the only treatment choice available for AA, with removal of the affected intestinal segment (Graeff-Teixeira et al. 1991). Due to the lack of an efficacious drug treatment and as one of the main complications of the disease consists of thrombogenesis, the use of anticoagulants could be a way to prevent thromboembolic events and to reduce morbidity and mortality (Rodriguez et al. 2011).

Therefore, a previous study was carried out using daily preventive doses of enoxaparin (0.57 mg/kg) in mice infected with *A. costaricensis*. The treatment was not effective in preventing intestinal lesions and in reducing the mortality rate (Rodriguez et al. 2011). The low dose of enoxaparin used in the study could explain its inefficacy in preventing the lesions caused by the parasite.

So, in the present study, we used the same experimental design of the previous study, but we administered a higher dose of enoxaparin (2.5 mg/kg), which, nevertheless, was not efficient in the treatment of AA. Both gross and microscopic analyses were performed by two pathologists, who agreed on the results.

Gross findings were very similar in the control and treated groups. The mice showed granulation in the serosa, adhesion of the intestine to the abdominal wall, and intestinal infarction. In a previous study, mice experimentally infected with *A. costaricensis* also developed these lesions. However, in the present study, there were a smaller number of intestinal abscesses and a higher prevalence of intestinal infarction, which affected 14 animals, compared to 4 in the previous study. Intestinal infarction is the main complication of AA, eventually leading to death (Graeff-Teixeira et al. 1991; Waisberg et al. 1999), and its higher prevalence is due probably to the larger virulence of the parasites, which were isolated from slugs near where a resident diagnosed with AA lived (Rafaluk et al. 2015).

In the microscopic analysis, the lesions were similar in both groups. Vascular granuloma, eosinophilic infiltrate, thrombosis, and intestinal necrosis were observed. Granuloma and eosinophilic

infiltrate were also detected in the spleen and in the liver. The microscopic findings are quite similar to those described by Rodriguez et al. 2011, showing that high-dose enoxaparin was not efficient in reducing the prevalence of lesions.

Statistical analyses were also performed, with classification of animals into survivors and non-survivors, regardless of the treatment used. Of the 15 mice that died during the experiment, 14 had infarction and intestinal necrosis, which probably led to their deaths. Other frequent findings in non-survivors were adhesion of the intestine to the abdominal wall, granulation of the serosa, and thrombosis, demonstrating worse outcomes for these animals (de Azevedo et al. 2011).

The therapeutic doses of enoxaparin consist of 1.5 mg/kg given subcutaneously every 24 h (Andújar et al. 2016). Drug uptake through this route of administration is approximately 100%, with an average half life of 4.5 h (Andújar et al. 2016). In this study, we used 2.5 mg/kg, whereas in a previous study, the mice given 5 mg/kg showed excellent anticoagulant activity and a half life of 5 h (Li et al. 2004). Hence, the inefficacy of enoxaparin in the prevention of intestinal lesions caused by *A. costaricensis* was not because of insufficient anticoagulation. Thus, thrombogenesis might not be the major cause of vascular occlusion and intestinal infarction; this could be attributed to vascular granulomas and to the parasite itself (Rodriguez et al. 2011), which may explain the inefficacy of the anticoagulant used.

We conclude that high doses of enoxaparin neither prevent intestinal lesions nor increase the survival of mice experimentally infected with *A. costaricensis*. Finally, we also underscore the need for further studies to check the importance of inflammatory reaction in AA pathogenesis.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Andújar MA, Matoses CC, Rodríguez LFJ, Navarro RA (2016) Individualización posológica de enoxaparina en un obeso extremo mediante la monitorización del factor anti-Xa. *Farm Hosp* 40:58-59
- de Azevedo GV, Rodriguez R, Porto SM, Graeff-Teixeira C, Fornari F (2011) Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. *Parasitol Res* 108:537-540
- Fante CA, Dieterish S, Rodriguez R (2008) Betametasona e extrato aquoso de *Arctium lappa* no tratamento da angiostrongilíase. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:654-657
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL (1991) Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77:606-11
- Harter K, Levine M, Henderson SO (2015) Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med* 16:11-17
- Ishii A, Terada M, Fujii Y, Sano M (1989) In vivo efficacy of levamisole against larval stages of *Angiostrongylus cantonensis* and *A. costaricensis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 20:109-117
- Li D-W, Lee IS, Sim J-S, Toida T, Linhardt RJ, Kim YS (2004) Long duration of anticoagulant activity and protective effects of acharan sulfate in vivo. *Thromb Res* 113:67-73
- Mentz MB, Graeff-Teixeira C (2003) Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45:179-184
- Morera P, Bontempo I (1985) Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev méd Hosp Nac Niños Dr Carlos Saenz Herrera* 20:165-74
- Morera P, Céspedes R (1971) *Angiostrongylus costaricensis* n. sp.(Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 18:17
- Mousa SA (2004) Heparin and low molecular weight heparin in thrombosis, cancer, and inflammatory diseases. *Methods Mol Med*:35-48
- Rafaluk C, Goldenhard M, Mitschke A, Telschow A, Schulenburg H, Joop G (2015) Rapid evolution of virulence leading to host extinction under host-parasite coevolution. *BMC Evol Biol* 15:112
- Rodriguez R, Porto SM, dos Santos Ferrari R, Marcolan AM, da Silva ACA, Graeff-Teixeira C, Fornari F (2011) Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitol Res* 109:787-792
- Silvain J, Beygui F, Barthélémy O, Pollack C, Cohen M, Zeymer U, Huber K, Goldstein P, Cayla G, Collet J-P (2012) Efficacy and safety of enoxaparin versus unfractionated heparin during percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 344:e553
- Terada M, Rodriguez O, Dharejo A, Ishii A, Sano M (1986) Studies on chemotherapy of parasitic helminths.(XXVI) Comparative in vitro effects of various anthelmintics on the motility of *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus cantonensis*. *Jpn J Parasitol* 35:365-367
- Waisberg J, Corsi CE, Rebelo MV, Vieira VTT, Bromberg SH, Santos PAd, Monteiro R (1999) Jejunal perforation caused by abdominal angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41:325-328

Table 1. Gross findings in mice infected with *Angiostrongylus costaricensis* and treated with placebo (Group 1) or enoxaparin (Group 2).

Variables		Treatment				<i>P</i>
		n	Group 1 %	n	Group 2 %	
Infarction (intestine)	No	5	41.7	5	41.7	1.00
	Yes	7	58.3	7	58.3	
Abscess (intestine)	No	11	91.7	12	100.0	0.30 ^a
	Yes	1	8.3	0	0.0	
Granulation (intestine)	No	5	41.7	3	25.0	0.67 ^a
	Yes	7	58.3	9	75.0	
Adhesion (intestine)	No	6	50.0	7	83.3	0.68
	Yes	6	50.0	5	16.7	
Splenic infarction	No	11	91.7	12	100.0	1.00 ^a
	Yes	1	8.3	0	0.0	

*Probability lower than 5% ($P < 0.05$) indicates significant difference (chi-square test).

^aFisher's exact test replaced chi-square test when the estimated counts were smaller than 5 (2x2 table).

Table 2. Microscopic findings in mice infected with *Angiostrongylus costaricensis* and treated with placebo (Group 1) or enoxaparin (Group 2).

Variables		Treatment				P
		Group 1		Group 2		
		n	%	n	%	
Granuloma (intestine)	Absent	1	8.3	1	8.3	0.60
	Mild	2	16.7	5	41.7	
	Moderate	4	33.3	2	16.7	
	Severe	5	41.7	4	33.3	
Eosinophils (intestine)	Absent	1	8.3	0	0.0	0.31
	Mild	1	8.3	3	25.0	
	Moderate	9	75.0	6	50.0	
	Severe	1	8.3	3	25.0	
Vasculitis (intestine)	No	1	8.3	0	0.0	1.00 ^a
	Yes	11	91.7	12	100.0	
Thrombosis (intestine)	No	5	41.7	5	41.7	1.00
	Yes	7	58.3	7	58.3	
Infarction (intestine)	No	4	33.3	5	41.7	1.00 ^a
	Yes	8	66.7	7	58.3	
Splentitis	No	1	8.3	2	16.7	1.00 ^a
	Yes	11	91.7	10	83.3	
Granuloma (liver)	Absent	6	50.0	3	25.0	0.18
	Mild	1	8.3	5	41.7	
	Moderate	3	25.0	1	8.3	
	Severe	2	16.7	3	25.0	
Eosinophils (liver)	No	1	8.3	3	25.0	0.59 ^a
	Yes	11	91.7	9	75.0	
Abscess (liver)	No	12	100.0	11	91.7	1.00 ^a
	Yes	0	0.0	1	8.3	
Hepatitis	No	1	8.3	2	16.7	1.00 ^a
	Yes	11	91.7	10	83.3	
Infarction (liver)	No	9	75.0	6	50.0	0.40 ^a
	Yes	3	25.0	6	50.0	
Eggs and larvae (liver)	No	4	33.3	5	50.0	1.00 ^a
	Yes	8	66.7	7	50.0	

*Probability lower than 5% ($P < 0.05$) indicates significant difference (chi-square test).

^aFisher's exact test replaced chi-square test when the estimated counts were smaller than 5 (2x2 table).

Table 3. Gross findings in mice infected with *Angiostrongylus costaricensis* associated with survival.

Variables		Survival				<i>P</i>
		No		Yes		
		N	%	N	%	
Infarction (intestine)	No	1	6.7	9	100.0	< 0.01 ^{*a}
	Yes	14	93.3	0	0.0	
Adhesion (intestine)	No	5	33.3	8	88.9	0.01 ^{*a}
	Yes	10	66.7	1	11.1	
Granuloma (intestine)	No	2	13.0	6	66.7	0.02 ^{*a}
	Yes	13	87.0	3	33.3	

*Probability lower than 5% ($P < 0.05$) indicates significant difference (chi-square test).

^aFisher's exact test replaced chi-square test when the estimated counts were smaller than 5 (2x2 table).

Table 4. Microscopic findings in mice infected with *Angiostrongylus costaricensis* associated with survival.

Variables		Survival				<i>P</i>
		No		Yes		
		n	%	n	%	
Granuloma (intestine)	Absent	1	6.7	1	11.1	0.06
	Mild	7	46.7	0	0.0	
	Moderate	4	26.7	2	22.2	
	Severe	3	20.0	6	66.7	
Eosinophils (intestine)	Absent	0	0.0	1	11.1	0.09
	Mild	4	26.7	0	0.0	
	Moderate	10	66.7	5	55.6	
	Severe	1	6.7	3	33.3	
Vasculitis (intestine)	No	0	0.0	1	11.1	0.38
	Yes	15	100.0	8	88.9	
Thrombosis (intestine)	No	1	6.7	9	100.0	< 0.01* ^a
	Yes	14	93.3	0	0	
Infarction (intestine)	No	1	6.7	8	88.9	< 0.01* ^a
	Yes	14	93.3	1	11.1	
Splentitis	No	0	0.0	3	33.3	0.04* ^a
	Yes	15	100.0	6	66.7	

*Probability lower than 5% ($P < 0.05$) indicates significant difference (chi-square test).

^aFisher's exact test replaced chi-square test when the estimated counts were smaller than 5 (2x2 table).

Fig. 1 Gross findings: infarction of the terminal ileum close to the ileocecal valve in a mouse treated with enoxaparin.

Fig. 2 Microscopic findings: *a)* Granulomas in the submucosal layer with eggs and larvae (200x.) *b)* Arterial thrombosis (100x). *c)* Intestinal infarction (50x). *d)* Bronchopneumonia with neutrophilic infiltrate (200x).

Fig. 3 Survival curve stratified by the treatments used in mice infected with *Angiostrongylus costaricensis*.

Fig. 1

Fig. 2

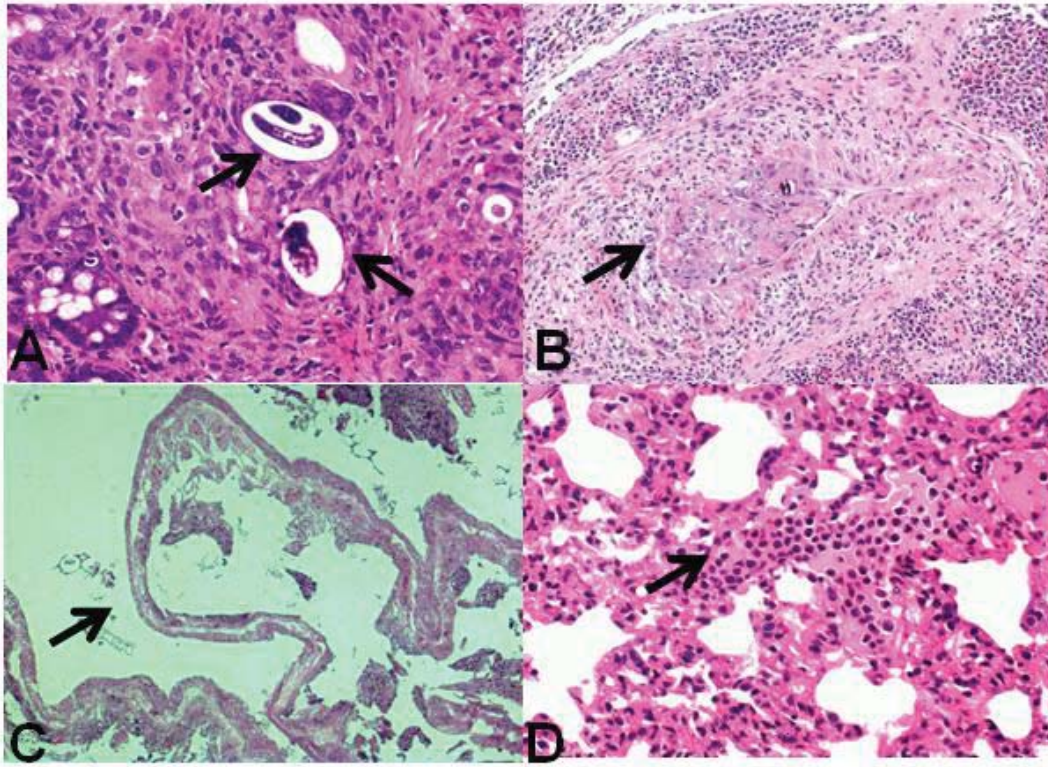
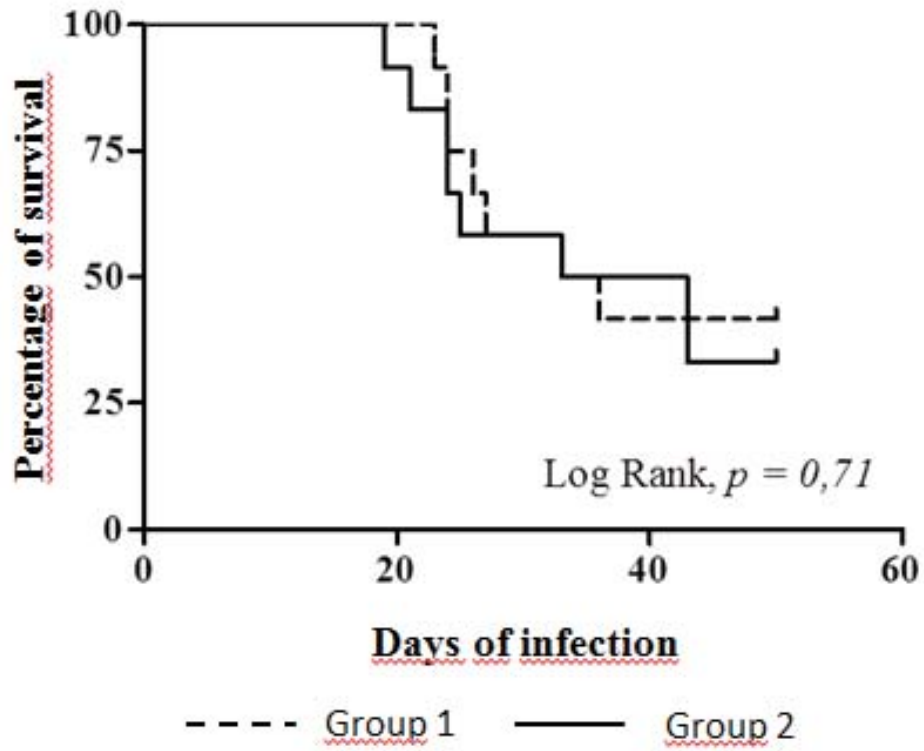


Fig. 3



4. CONCLUSÕES

A angiostrongilíase abdominal é uma parasitose que no Brasil apresenta maior prevalência no Rio Grande do Sul, sendo que até o momento o único tratamento eficaz é a cirurgia. A ausência de um tratamento medicamentoso para esta doença nos levou a testar altas doses do anticoagulante enoxaparina, já que uma dose profilática havia sido testada anteriormente sem resultados positivos.

A partir da experiência realizada neste trabalho, podemos concluir que a utilização de altas doses de enoxaparina não teve efeito na sobrevivência dos camundongos e nem na prevenção de lesões intestinais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, várias pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de encontrar um tratamento eficaz para AA, todas sem sucesso. Ainda que estudos anteriores já tivessem demonstrado a ineficácia da enoxaparina no tratamento da doença, imaginamos que isso se devia ao fato de terem sido utilizadas doses profiláticas. Assim, partimos da hipótese de que a utilização de altas doses poderia apresentar alguma eficácia no tratamento, o que acabou não se confirmando.

Na prática, os resultados encontrados indicaram que mesmo em altas doses a enoxaparina foi incapaz de prevenir o óbito dos animais ou reduzir as lesões. Diante dos resultados deste estudo, não nos parece precipitado sugerir que futuras pesquisas busquem testar novos fármacos para o tratamento, uma vez que a enoxaparina já demonstrou a sua ineficácia, tanto em doses profiláticas quanto em altas doses.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp.(Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1971;18(1/2):17.
2. Agostini AA, Marcolan A, Lisot J, Lisot J. Angiostrongiliase abdominal. Estudo anatomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79(4):443-5.
3. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitology research.* 1991;77(7):606-11. Epub 1991/01/01.
4. Teixeira CG, Pires FDdA, Machado RdCC, Coura LFC, Lenzi HL. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. 1990.
5. Graeff Teixeira C, Thomé J, Pinto S, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phillocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1989;84(1):65-8.
6. Morera P, editor. Angiostrongiliasis abdominal: Transmision y observaciones sobre su posible control. Control y erradicacion de enfermedades infecciosas. Resúmenes del Simposio Internacional OMS/OPS, Série de copublicaciones de la OPS; 1986.
7. Tavares W, Marinho LAC. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias: Atheneu; 2005.
8. Rodriguez R, Porto SM, dos Santos Ferrari R, Marcolan AM, da Silva ACA, Graeff-Teixeira C, et al. Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitology research.* 2011;109(3):787-92.
9. Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un estromilídeo (*Strongylata*). *Acta méd costarric.* 1967;10:235-55.
10. Sierra E, Morera P. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). *Acta Med Costarricense.* 1972;14:95-9.
11. Zavala V, Ramírez B, Reyes P, Bates F. *Angiostrongylus costaricensis*. Primeros casos Mexicanos. *Rev Invest Clin(Mex).* 1974;26:389-94.
12. Morera P, Lazo R, Urquizo J, Llaguno M. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1983;32(6):1460-1.
13. Ubelaker JE, Hall NM. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 in the United States. *Journal of Parasitology.* 1979;65(2).
14. Vázquez JJ, Boils PL, Sola JJ, Carbonell F, de Juan Burgueño M, Giner V, et al. Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *GASTROENTEROLOGY-BALTIMORE THEN PHILADELPHIA-*. 1993;105:1544-.
15. Ayala MAR. Angiostrongiloidíase abdominal. Seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1987;82:29-36.

16. Rodriguez R, Dequi RM, Peruzzo L, Mesquita PM, Garcia E, Fornari F. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2008;50(6):339-41.
17. Rocha A, Moscardini Sobrinho J, Salomão EC. Angiostrongiliase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1991;24(4):265-8.
18. Pena GPM, Andrade Filho JdS, Assis SCd. *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;37(4):369-74.
19. Zuccaro A, Zani R, Aymoré I. [Abdominal angiostrongyliasis: report of a potential autochthonous case from Rio de Janeiro]. *Arquivos de gastroenterologia*. 1997;35(1):54-61.
20. Ubelaker JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *The Journal of parasitology*. 1986:237-44.
21. Rodriguez R, Agostini AA, Porto SM, Olivares AJO, Branco SL, Genro JP, et al. Dogs may be a reservoir host for *Angiostrongylus costaricensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2002;44(1):55-6.
22. Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995;90(6):707-9.
23. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Abdominal angiostrongyliasis: an under-diagnosed disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987;82:353-4.
24. Lobo Sanahuja F, Loria Cortés R, González G. Angiostrongilosis abdominal: Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de la literatura. *Bol méd Hosp infant Méx*. 1987;44(1):4-9.
25. Ruiz PJ, Morera P. Spermatic artery obstruction caused by *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(6):1458-9.
26. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Leonel Lenzi H. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1991;33(5):373-8.
27. Palominos PE, Gasnier R, Rodriguez R, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Individual serological follow-up of patients with suspected or confirmed abdominal angiostrongyliasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):93-7.
28. Rodriguez R, da 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;9(4):e93658.
29. Mentz MB, Graeff-Teixeira C. Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2003;45(4):179-84.
30. Morera P, Bontempo I. Acción de algunos antihelminticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev méd Hosp Nac Niños Dr Carlos Saenz Herrera*. 1985;20(2):165-74.
31. Ishii A, 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;20(1):109-17.
32. Terada M, Rodriguez O, Dharejo A, Ishii A, Sano M. Studies on chemotherapy of parasitic helminths.(XXVI) Comparative in vitro effects of various

- anthelmintics on the motility of *Angiostrongylus costaricensis* and *Angiostrongylus cantonensis*. *Jpn J Parasitol*. 1986;35:365-7.
33. Fante CA, Dieterish S, Rodriguez R. Betametasona e extrato aquoso de *Arctium lappa* no tratamento da angiostrongilíase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(6):654-7.
34. Mousa SA. Heparin and low molecular weight heparin in thrombosis, cancer, and inflammatory diseases. *Methods Mol Med*. 2004:35-48.
35. Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med*. 2015;16(1):11-7.
36. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *European heart journal*. 2005;26(1):3-4.
37. Shehab N, Sperling LS, Kegler SR, Budnitz DS. National estimates of emergency department visits for hemorrhage-related adverse events from clopidogrel plus aspirin and from warfarin. *Archives of internal medicine*. 2010;170(21):1926-33.
38. Weitz JI. Blood coagulation and anticoagulant, fibrinolytic, and antiplatelet drugs. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 12th ed New York, NY: McGraw-Hill Medical. 2011.
39. Silvain J, Beygui F, Barthélémy O, Pollack C, Cohen M, Zeymer U, et al. Efficacy and safety of enoxaparin versus unfractionated heparin during percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2012;344:e553.
40. Iqbal Z, Cohen M. Enoxaparin: a pharmacologic and clinical review. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(7):1157-70.