

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

**RESULTADOS PATOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS SWISS POR *Angiostrongylus costaricensis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elise Benvegnú

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

**RESULTADOS PATOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS POR**
Angiostrongylus costaricensis

Elise Benvegnú

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 **Mestre em Bioexperimentação**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

Passo Fundo, RS, Brasil
2018

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

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

**RESULTADOS PATOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA
INFECCÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS POR
*Angiostrongylus costaricensis***

Elaborada por
Elise Benvegnú

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

Comissão Examinadora

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

Alessandra Morassutti, PhD, PUCRS

Rubens Rodriguez, Dr. UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sérgio e Marilene Benvegnú, por acreditarem em mim. Pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram e me ajudaram a concretizá-lo: à minha família, ao meu marido Marcelo e aos meus amigos.

A minha orientadora Dra. Maria Isabel Botelho Vieira, por sua orientação e dedicação. Agradeço por todo conhecimento, estímulo, amizade e ajuda durante esta caminhada.

Ao professor Dr. Rubens Rodriguez, pela sua co-orientação, pelo incentivo e valioso conhecimento transmitido.

À minha querida colega e companheira de trabalho Carol Hermes, pela parceria e amizade.

Aos funcionários do Biotério da Universidade de Passo Fundo ficam os meus agradecimentos, em especial a querida Cleonice Several.

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

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da UPF e ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UPF, pelo espaço cedido para execução deste trabalho e todo o auxílio prestado por seus integrantes.

Aos professores Márcio Costa e Leonardo Barcellos pela colaboração.

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

A todos aqueles que direta ou indiretamente tornaram possível a realização desse trabalho, Muito Obrigada!!!

EPÍGRAFE

“ O essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint-Exupéry

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	14
2.1.1 Ciclo Biológico	15
2.1.2 Patogenia	17
2.1.3 Tratamento e controle	18
3. CAPÍTULO 1	20
4. CONCLUSÕES	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
6. REFERÊNCIAS	53
7. ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1	Distribuição geográfica do <i>Angiostrongylus costaricensis</i> nas Américas.....	15
FIGURA 2	Ciclo biológico do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	16
FIGURA 3	Hospedeiros intermediários do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	17
FIGURA 4	Hospedeiros definitivos do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	17

3. CAPÍTULO 1

FIGURA 1	Achados histopatológicos da angiostrongilíase abdominal em camundongos Swiss. (A) Submucosa do intestino delgado com granuloma englobando ovos e larvas (HE 200X). (B) Artéria da submucosa do intestino grosso com arterite eosinofílica e nematódeo na luz vascular (HE 100X). (C) Pancreatite aguda – área de necrose com infiltrado eosinofílico (HE 100X). (D) Fígado contendo trombo com larvas (HE 50X). Coloração hematoxilina-eosina (HE).....	43
FIGURA 2	Análise de hematócrito, hemoglobina, eritrócitos totais, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média e proteína plasmática total de camundongos experimentalmente infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> , expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	44
FIGURA 3	Análise de cortisol de camundongos experimentalmente infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> , expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	45
FIGURA 4	Concentrações séricas de IL-12p70 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), MCP-1 (D) e IL-6 (E) de camundongos infectados experimentalmente por <i>Angiostrongylus costaricensis</i> , expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	46

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

TABELA 1	Achados microscópicos no intestino de camundongos infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.....	47
TABELA 2	Achados microscópicos no pâncreas de camundongos infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.....	48
TABELA 3	Achados microscópicos no fígado de camundongos infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.....	49
TABELA 4	Achados microscópicos no baço de camundongos infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.....	50
TABELA 5	Leucograma (mediana, Min-Max) e contagem de plaquetas de camundongos infectados experimentalmente por <i>Angiostrongylus costaricensis</i> , com diferentes dias de infecção.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Angiostrongilíase abdominal
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
DPI	Dias pós-infecção
mm	Milímetros
L1	Larva de primeiro estadio
L2	Larva de segundo estadio
L3	Larva de terceiro estadio
L4	Larva de quarto estadio
RS	Rio Grande do Sul
°C	Graus celsius
Th2	T helper 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IgE	Imunoglobulina E
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN- γ	Interferon gamma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
UPF	Universidade de Passo Fundo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
EDTA	Etilenodiaminotetracético
VCM	Volume Corpuscular Médio
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-Eosina

RESUMO

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

RESULTADOS PATOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA INFECCÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS POR *Angiostrongylus costaricensis*

Autora: Elise Benvegnú
Orientadora: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, 31 de julho de 2018

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma zoonose causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis* e é considerada endêmica na região Sul do Brasil. Para tratar e prevenir esta patologia, é necessária uma maior compreensão da tríade hospedeiro-ambiente-parasito. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar as alterações hematológicas, patológicas e de cortisol causadas por *A. costaricensis* em camundongos swiss. O experimento foi conduzido com grupos infectados e controles nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção (DPI). Nestes dias realizamos a coleta de sangue para os exames hematológicos, de soro para a mensuração de citocinas e, após a eutanásia dos animais, de órgãos para a análise histopatológica de cada grupo. Conseguimos caracterizar achados patológicos, imunológicos, de cortisol e hematológicos da AA em diferentes períodos do ciclo do parasito *A. costaricensis*, tendo como resultados lesões patológicas características, como infiltração de eosinófilos em camadas da parede intestinal, reação granulomatosa e vasculite eosinofílica, além da presença de larvas e ovos do nematódeo em vasos e mucosa de diversos órgãos em ambos grupos. Observamos lesões como granulomas, vasculites, trombos, necrose e inflamação no pâncreas. Destacamos os achados no pâncreas dos animais infectados, pois este é o primeiro trabalho que demonstra e descreve as alterações neste órgão. Detectamos um quadro anêmico no grupo G2 infectado, provavelmente acarretado pelas lesões que o parasito estabelece no organismo do hospedeiro. No leucograma, houve um aumento de neutrófilos segmentados e monócitos, provavelmente causado pelo quadro inflamatório provocado pelo nematódeo. Relativo ao estresse, ambos os grupos infectados demonstraram aumento de cortisol em relação aos respectivos grupos controles, o que poderia ser justificado pela perturbação do parasito no organismo do hospedeiro, que entre outros sinais, causa dor nos indivíduos acometidos. Pela análise de citocinas, confirmamos o processo de inflamação causado pelo nematódeo, através do aumento da IL-6 e do IFN- γ , substâncias pró-inflamatórias e detectamos a diminuição do TNF- α , resultado que pode ter sido influenciado pelo cortisol. Concluímos que os animais infectados por este nematódeo desenvolvem lesões características da AA, possuem um quadro de anemia normocítica e hipocrômica e geram uma resposta imune inflamatória com participação do INF- γ , TNF- α e IL-6, que pode ser influenciada pelo cortisol. Ainda, destacamos que pela primeira vez tais parâmetros foram encontrados em camundongos Swiss até 24 DPI.

Palavras-chave: angiostrongilíase abdominal, citocinas, hematologia, estresse, histopatologia.

ABSTRACT

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

**PATHOLOGICAL, HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESULTS
OF EXPERIMENTAL INFECTION BY *Angiostrongylus costaricensis* IN SWISS
MICE**

Author: Elise Benvegnú
Advisor: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, July 31 2018

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is a zoonosis caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis* and is considered endemic in the Brazil's southern region. In order to treat and prevent this pathology, a better understanding of the host-environment-parasite triad is needed. Thus, the objective of this work was to analyze the hematological, pathological and cortisol alterations caused by *A. costaricensis* in mice. The experiment was conducted with infected groups and controls on days 14 (G1) and 24 (G2) post-infection (dpi). In these days, we performed the collection of blood for the hematological exams, serum for the measurement of cytokines and, after the euthanasia of the animals, of organs for the histopathological analysis of each group. We were able to characterize pathological, cortisol and hematological findings of AA in different periods of the *A. costaricensis* parasite cycle, resulting in characteristic pathological lesions such as eosinophil infiltration in intestinal wall layers, granulomatous reaction and eosinophilic vasculitis, as well as the presence of larvae and nematode eggs in vessels and mucosa of various organs, in both groups. We observed lesions such as granulomas, vasculitis, thrombi, necrosis and inflammation in pancreas, a novelty in this research area. We detected an anemia in the infected G2 group, probably caused by the lesions that the parasite establishes in the host organism. In the leukogram, there was an increase of segmented neutrophils and monocytes, probably caused by the inflammation caused by the nematode. Regarding stress, both groups showed an increase of cortisol in relation to the respective control groups, which could be justified by the parasite disturbance in the host organism, which among other signs causes pain in the affected individuals. By cytokine analysis, we confirmed the inflammation process caused by the nematode, through the increase of interleukin 6 and interferon γ , pro-inflammatory substances and detected a decrease in tumor necrosis factor α , an outcome that may have been influenced by cortisol. We conclude that the animals infected by this nematode develop lesions characteristic of AA, have a normocytic and hypochromic anemia and generate an inflammatory immune response with the participation of INF- γ , TNF- α and IL-6, which can be influenced by cortisol. Also, for the first time such parameters were accessed in Swiss mice up to 24 DPI.

Keywords: abdominal angiostrongyliasis, cytokines, hematology stress, histopathology.

1. INTRODUÇÃO

Os parasitos invadem o hospedeiro onde sobrevivem e se reproduzem, liberando moléculas que ajudam a penetrar as barreiras defensivas e evitar a resposta imune do hospedeiro (1). Helmintos infectam seres humanos há milhares de anos (2), causando infecções crônicas, e como consequência da doença, alterações patológicas. Espécies do Filo Nematoda são um grave problema de saúde pública, pois infectam bilhões de pessoas e animais domésticos por todo mundo (3), sendo que, as zoonoses podem desencadear perdas econômicas significativas (4).

Dentre as doenças causadas por parasitos pertencentes ao Filo Nematoda, está a angiostrongilíase abdominal (AA), que possui como agente *Angiostrongylus costaricensis*, presente em vários países das Américas (5-9). No Brasil, a AA tem sido considerada uma importante doença, principalmente na região Sul (10) e o fato de não haver tratamento bem estabelecido contra o nematódeo, somente cirúrgico, torna-se importante um maior conhecimento no que diz respeito à patogênese e ciclo do parasito e questões epidemiológicas, que envolvem a tríade hospedeiro, parasito e ambiente.

Levando em consideração os aspectos da AA e a relevância de estudos que envolvam o *A. costaricensis*, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros histopatológicos, hematológicos, imunológicos e de estresse em camundongos experimentalmente infectados com este nematódeo. A dissertação compreende, além desta introdução, uma revisão bibliográfica sobre AA, o capítulo na forma de artigo científico que tem como título “Resultados patológicos, hematológicos e imunológicos da infecção experimental em camundongos Swiss por *Angiostrongylus costaricensis*”, considerações finais, conclusão e referências bibliográficas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Angiostrongylus costaricensis*

O nematódeo *A. costaricensis* é um parasito que vive em ramos íleo-cecais das artérias mesentéricas superiores de hospedeiros definitivos causando a AA (11). Este metastrongilídeo, pertencente à família Angiostrongylidae apresenta corpo filiforme e tamanho de acordo com o sexo, sendo que fêmeas podem medir de 24,6 a 27,9 milímetros (mm) e machos de 16,8 a 18,9 mm (12).

Esta doença conhecida como AA foi descrita pela primeira vez na Costa Rica, por Morera e Céspedes (5) como um granuloma parasitário intestinal e foi denominada de tal forma a partir do estudo do *A. costaricensis* recuperados de peças cirúrgicas de intestinos (13). Em sequência, a AA foi relatada em outros países, como Honduras (8), México (9), Equador (7), Estados Unidos (14) e Europa (15). No Brasil, os registros se iniciaram em São Paulo (6) e posteriormente em Minas Gerais (16), Rio de Janeiro (17), Santa Catarina, Paraná (18) e Rio Grande do Sul (10).

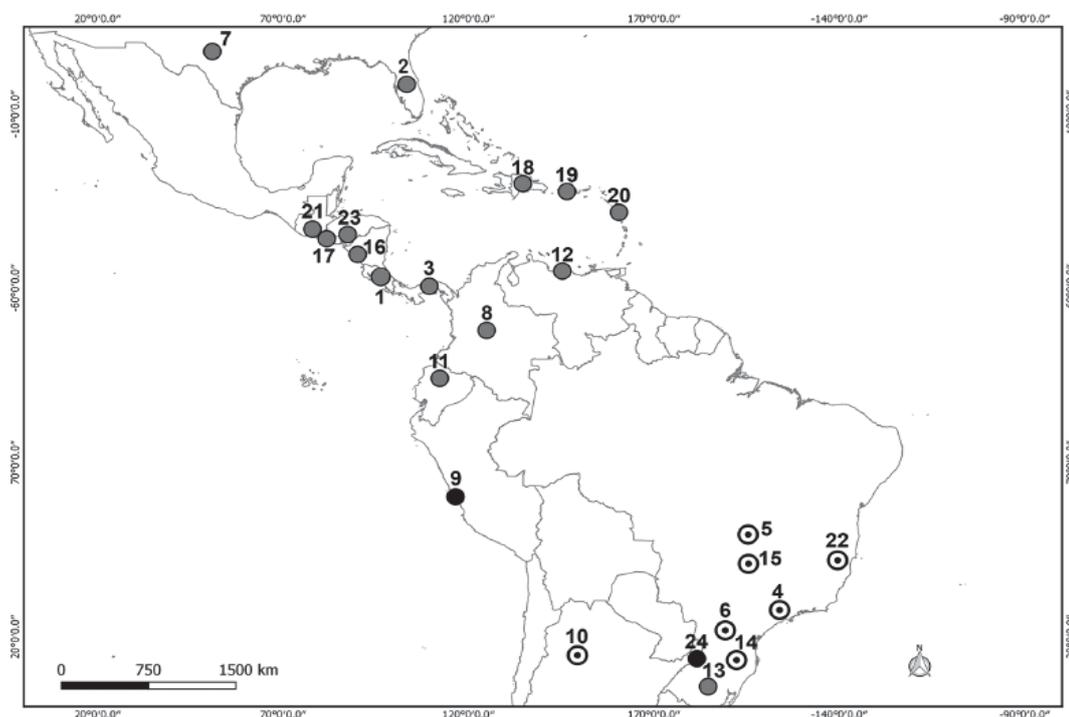


Figura 1. Distribuição geográfica do *Angiostrongylus costaricensis* nas Américas – os pontos pretos são os locais onde há a presença do parasito sem doença, os pontos brancos indicam locais de presença da doença e os pontos cinzas são locais que possuem tanto o parasito quanto a doença. Fonte: Valente et al., 2018 (20).

2.1.1 Ciclo Biológico

Os parasitos adultos vivem e se reproduzem em ramos das artérias mesentéricas superiores de roedores, que são os hospedeiros definitivos (12, 21). As fêmeas realizam a ovipostura e através da corrente sanguínea, os ovos chegam até a parede intestinal formando larvas do primeiro estágio (L1), que são eliminadas pelas fezes dos hospedeiros infectados (21). Estas L1 infectam os hospedeiros intermediários (moluscos) por via oral ou percutânea, penetrando a camada muscular e sofrendo duas mudas (L1 → L2 → L3). Esta L3, considerada a forma infectante, é eliminada através da secreção do muco destes moluscos (22). Em seguida os roedores são infectados pela ingestão do próprio molusco contaminado com as L3, que ao atravessarem a parede intestinal e vasos linfáticos, mudam para L4 chegando até as artérias mesentéricas para se tornarem adultas (21) (Figura 1). Alguns fatores do ciclo ainda não estão claros, como por exemplo o porquê da preferência da L3 pelos vasos linfáticos mesentéricos (para mudança de estágio para L4) e a influência de hormônios intestinais no encontro dos machos e fêmeas adultos (21, 23).

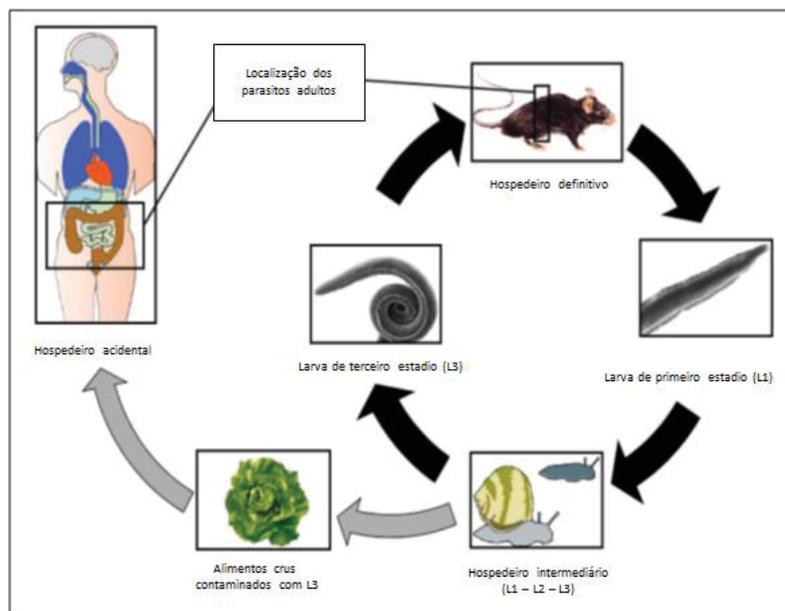


Figura 2 – Ciclo biológico do *Angiostrongylus costaricensis*
Fonte: Araya et al., 2016 (24).

Como hospedeiros intermediários deste ciclo, já foram identificados moluscos terrestres da família *Veronicellidae*, da espécie *Sarasinula plebeia* na Costa Rica (25). No Sul do Brasil, norte da Argentina e Uruguai foi identificado *Phyllocaulis variegatus*, como o primeiro hospedeiro intermediário do *A. costaricensis* (26). *Limax maximus*,

Bradybaena similares e *Limax flavus* também foram identificadas por Graeff-Teixeira et al. (26), no estado do RS (Figura 3). Estudos recentes, confirmaram o molusco *Meghimatium pictum* como um novo hospedeiro intermediário de *A. costaricensis* (27). Além disto, mostraram-se susceptíveis à infecção espécies aquáticas como a *Biomphalaria glabrata* (28), que vem sendo utilizada para a manutenção do ciclo do parasito em laboratório (29).

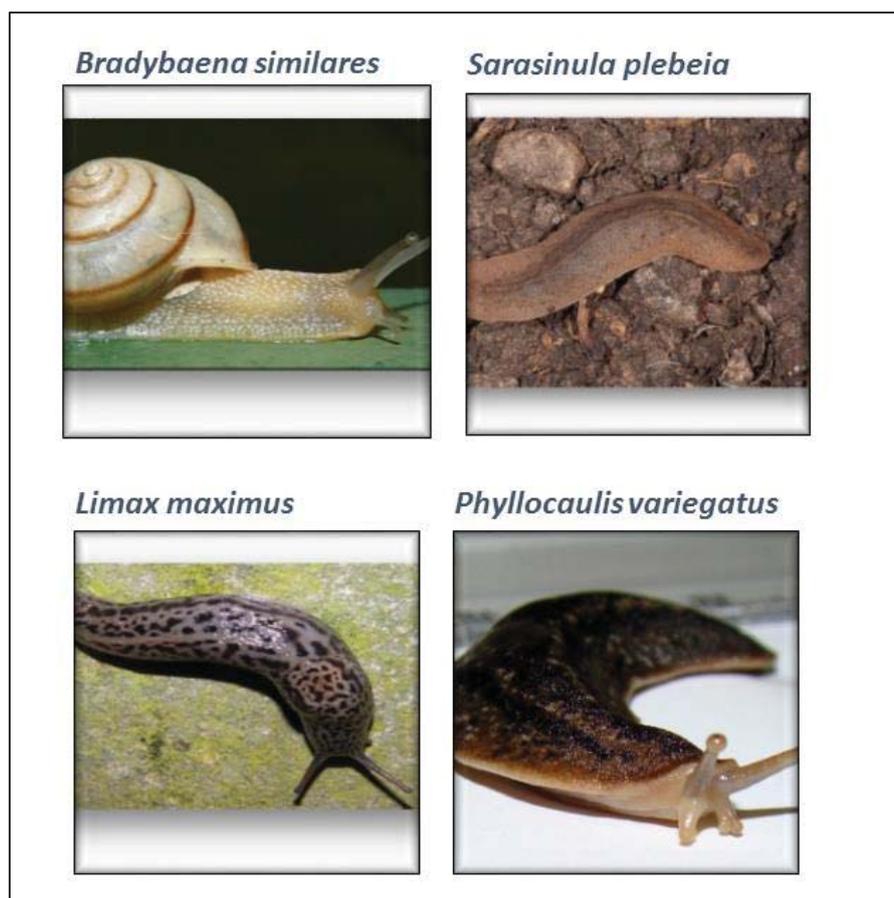


Figura 3. Hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis*.
Fonte: (FLICKR)

O principal roedor, na Costa Rica, que desempenha o papel de hospedeiro definitivo é *Sigmodon hispidus* (12) (Figura 4), entretanto, outras espécies podem transmitir o *A. costaricensis*, como *Rattus rattus*, *Zygodontomys microtinus*, *Oligoryzomys fulvesceus*, *Oligoryzomys caliginosus* (30). No estado do Rio Grande do Sul, *Oligoryzomys nigripes* é o principal hospedeiro definitivo (31) (Figura 4).



Figura 4: Hospedeiros definitivos do *Angiostrongylus costaricensis*.
Fonte: (FLICKR)

O homem é considerado hospedeiro acidental que se infecta ao ingerir água ou alimentos contaminados contendo larvas infectantes (L3), presentes na mucosidade secretada pelos moluscos (L3). Sendo assim, a AA é considerada uma zoonose. Estudos apontaram que cães adultos também podem ser reservatórios da doença, pela identificação de L1 em suas fezes e também através de análise molecular (32, 33).

2.1.2 Patogenia

A patogênese da AA ocorre pela presença dos nematódeos adultos nas artérias mesentéricas e reações inflamatórias locais provocadas pelos ovos e larvas (34). As lesões ocorrem principalmente na região ileocecal, ocasionando infartos hemorrágicos ou isquêmicos e reação granulomatosa que pode progredir para estenose intestinal (5, 35). Os aspectos macroscópicos costumam ser o espessamento da parede intestinal, com padrão pseudo-neoplásico e lesões necróticas congestivas, com padrão isquêmico-congestivo. Já na microscopia, são detectados três achados histopatológicos: infiltração massiva de eosinófilos em todas as camadas da parede intestinal; reação granulomatosa e vasculite eosinofílica que pode afetar artérias, veias, vasos linfáticos e capilares (19).

Uma resposta inicial do hospedeiro ao patógeno é rapidamente gerada pela resposta imune inata (36). Alterações mais comuns observadas durante a infecção por parasitos intestinais é o aumento do número de eosinófilos e mastócitos (37). A liberação de citocinas desempenha um papel importante no controle da infecção, pois atuam como mediadores pró-inflamatórios, proliferando a resposta imunitária (38). A maior parte dos casos que envolve a resposta imune contra nematódeos possui aspectos similares, como a resposta do tipo Th2 consequente produção de interleucina quatro (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, além do desenvolvimento da imunoglobulina (IgE) (39, 40). Além deste perfil de interleucinas classicamente encontrado em infecções por

nematódeos, há citocinas que participam do processo inflamatório mediado pela resposta imune inata (41), como por exemplo, IL-6 e IL-12 (42), TNF- α (43) e IFN- γ (44, 45) possuindo atividade pró-inflamatória. Estas citocinas promovem o processo inflamatório do organismo contra o patógeno e podem acarretar, indiretamente, o processo de dor e febre, por exemplo (46, 47).

Ainda, já está estabelecida uma interação entre o sistema imune e endócrino em resposta a infecções parasitárias (48). O estresse pode desregular o sistema imune frente a um patógeno, aumentando o risco de desenvolver doenças infecciosas, além de prolongar as manifestações clínicas (49). A dosagem plasmática de cortisol tem sido um parâmetro utilizado para verificar o nível de estresse de animais em resposta a agentes estressores (50).

O quadro clínico de humanos com AA consiste no aparecimento de sintomas gerais e digestivos, sendo os gerais: mialgia, mal-estar, perda de peso e anorexia e os sinais digestivos: dor abdominal, vômito, diarreia ou constipação (5, 35, 51). Nos exames laboratoriais podem ser encontradas anemia, leucocitose, que varia de 10.000 a 52.000 mm³, e intensa eosinofilia, variando de 11% a 18% (5). Já no diagnóstico por imagem, podem ser encontrados hepatomegalia, presença de massa tumoral que pode ser palpável, dificuldade de enchimento intestinal e espessamento da parede intestinal (35, 52).

O diagnóstico definitivo da AA é realizado por análise patológica, através da identificação de estruturas parasitárias da massa tumoral que é retirada cirurgicamente do paciente (19). O teste PCR (reação em cadeia da polimerase) pode ser utilizado para detectar antígenos do parasito e a técnica de ELISA pode ser usada para mensuração de anticorpos contra o nematódeo (53, 54). Como o humano não elimina formas do parasito nas fezes, o diagnóstico com este material biológico não é possível (55). Sendo assim, o padrão ouro no diagnóstico do *A. costaricensis* ainda é a anatomia patológica (19, 56).

2.1.3 Tratamento e controle

Não há tratamento medicamentoso recomendado para a AA, pois as drogas anti-helmínticas podem induzir a migração errática ou morte dos parasitos, agravando o quadro da doença (57). Ainda, o uso de drogas anti-inflamatórias como, por exemplo, corticosteroides, usados para tratamento sintomático podem ser ineficazes ou até mesmo agravar as lesões (58). Do mesmo modo, o uso do anticoagulante enoxaparina também

não se mostrou eficiente para o tratamento preventivo das lesões (59). Logo, até mesmo pela questão do diagnóstico, a remoção cirúrgica do tecido afetado por *A. costaricensis* continua sendo a alternativa mais segura e eficaz de tratamento da AA (60). A profilaxia da AA consiste na higienização de hortaliças e verduras com solução de hipoclorito de sódio 1,5% e posterior enxágue com água fervida antes do consumo (61).

3. CAPÍTULO 1

Resultados Patológicos, Hematológicos e Imunológicos da infecção experimental em camundongos Swiss por *Angiostrongylus costaricensis*.

Elise Benvegnú^a, Caroline Chaves Hermes^a, João Antônio Guizzo^b, Suelen Mendonça Soares^c, Márcio Machado Costa^a, Rafael Frandoloso^a, Rubens Rodriguez^d, Maria Isabel Botelho Vieira^{a*}.

^aPrograma de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo – UPF, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

^cPrograma de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

^dInstituto de Patologia de Passo Fundo - Teixeira Soares, 885 - Centro, 99010-08, Passo Fundo, Brazil.

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

Artigo submetido e formatado segundo as normas do periódico *Acta tropica*, de qualis A2 (quadriênio 2013-2016) e fator de impacto 2,509 (2017).

RESUMO

Este estudo descreve alterações nos perfis hematológico, de citocinas e alterações na histopatologia e nos níveis de cortisol em camundongos infectados experimentalmente com *Angiostrongylus costaricensis*, causador da angiostrongilíase abdominal (AA) nas Américas. Para isso, foram utilizados 28 camundongos swiss, divididos em dois grupos (G1 e G2) com 14 animais cada, dentre esses, oito foram infectados com dez L3, pela via oral, e seis como grupo controle. Os camundongos dos grupos G1 e G2 foram eutanasiados aos 14 e 24 dias pós-infecção (DPI), respectivamente. As amostras foram coletadas para análises histopatológicas, hematológicas, perfil de citocinas e cortisol. Foram observados: formação de granulomas, eosinofilia e vasculite, no intestino, pâncreas, fígado e baço, em diferentes intensidades nos animais infectados. Nos exames hematológicos, detectamos um quadro de anemia normocítica hipocrômica, diminuição das proteínas plasmáticas totais, neutrofilia e monocitose. Houve um aumento na concentração sérica de IL-6 e uma diminuição de TNF- α , sendo que este segundo achado pode ter ocorrido pelo aumento no cortisol dos animais infectados. Salientamos que este é o primeiro trabalho que avalia os parâmetros citados aos 24 dias pós-infecção por *A. costaricensis* em camundongos Swiss.

Palavras-chave: angiostrongilíase abdominal, histopatologia, anemia, cortisol, citocinas.

1. Introdução

O *Angiostrongylus costaricensis* é o agente causador da angiostrongilíase abdominal (AA), uma zoonose reportada desde a América do Norte até regiões subtropicais da América do Sul (Incani et al., 2007; Kramer et al., 1998; Morera et al., 1983; Rambo et al., 1997; Rodriguez et al., 2008). O ciclo de vida do *A. costaricensis* possui moluscos terrestres como hospedeiros intermediários (Graeff-Teixeira et al., 1991) e mamíferos roedores como hospedeiros definitivos (Morera & Céspedes, 1971) sendo o humano considerado hospedeiro acidental (Morera & Céspedes, 1971). O período pré-patente deste nematódeo é em torno de 24 dias, sendo que, a oviposição dos parasitos fêmeas se inicia ao 15º dia pós-infecção (Spratt, 2015).

Em humanos, o diagnóstico da AA é baseado em achados histopatológicos, identificando-se vermes, ovos ou larvas nas luzes arteriais ou vasculares (Graeff-Teixeira et al., 1991). Também, podem ser encontradas alterações nos exames hematológicos, como leucocitose, eosinofilia e anemia (Rodriguez et al., 2008; Romero-Alegría et al., 2014).

Infecções por parasitos intestinais geralmente incrementam o número de eosinófilos circulantes, modulam uma resposta T helper 2 com secreção de imunoglobulinas predominantemente da classe E e citocinas pró-inflamatórias (Moreau & Chauvin, 2010). As citocinas desempenham um papel importante no controle de infecções e atuam como moléculas orquestradoras da resposta imune inata (Paim et al., 2011) e polarizadoras dos linfócitos T helper naïves. Entre as moléculas pró-inflamatórias que merecem destaque encontram-se as interleucinas 6 e 12 (IL-6, IL-12) (Fernando et al., 2014), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Korner et al., 2010) e interferon gama (IFN- γ) (Green et al., 2013; Inoue et al., 2013).

O estresse pode ser considerado como um processo no qual o organismo reage a mudanças e se manifesta através de um conjunto complexo de respostas adaptativas (Chrousos, 1998; Selye, 1973). O cortisol tem sido um parâmetro utilizado para verificar o nível de estresse de animais em resposta a agentes estressores (Maria et al., 2004). Os parasitos podem, dentre outros fatores, explorar o ambiente hormonal dentro de seus hospedeiros para favorecer sua permanência dentro do mesmo, sendo que, dentre os hormônios que facilitam a proliferação de alguns parasitos, está o cortisol (Escobedo et al., 2005; Maswoswe et al., 1985). Logo, o objetivo do nosso estudo foi avaliar parâmetros hematológicos, cortisol e citocinas paralelamente as alterações da histopatologia em camundongos infectados experimentalmente com *A. costaricensis* aos 14 e 24 DPI.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Vinte e oito camundongos machos (Swiss) adultos, procedentes do Biotério da Universidade de Passo Fundo, foram incluídos neste estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas recebendo água e ração comercial (Nuvilab®), *ad libitum*, sob condições ideais de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo 12/12 horas claro/escuro). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo (CEUA-UPF - Protocolo N° 034/2016).

2.2 Obtenção de larvas infectantes de A. costaricensis

O isolado de *A. costaricensis* foi obtido de caramujos *Biomphalaria glabrata* oriundos do Laboratório de Parasitologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Logo após a aquisição das larvas de terceiro estágio (L3), o ciclo foi mantido no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UPF,

utilizando camundongos Swiss como hospedeiros definitivos e moluscos terrestres *Phyllocaulis* sp., como hospedeiros intermediários. A obtenção das L3 foi realizada pelo método previamente descrito por Bender et al., (2003), através da eutanásia e digestão dos moluscos em solução de pepsina 0,03% e ácido clorídrico 0,07%.

2.3 Formação dos grupos experimentais

Os 28 animais foram divididos em dois grupos (G1 e G2) homogêneos (n=14), com cada um dos grupos composto por 8 animais infectados e 6 animais controles (não infectados). A infecção experimental foi realizada através do método de gavagem, utilizando uma dose infectante de 10 L3 por animal. Os animais foram eutanasiados 14 (G1) e 24 (G2) dias pós infecção (DPI) e as amostras foram coletadas nos respectivos momentos da eutanásia.

2.3.1 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas às 07:30 am através de punção intracardíaca, com prévia anestesia dos animais com Isoflurano (Isoforine®). Para as análises hematológicas, o sangue foi armazenado em tubos com EDTA. Já para a mensuração dos níveis de cortisol e citocinas, o sangue foi coletado em tubos de 1,5 mL e o soro foi separado por centrifugação a 2.500 rpm por cinco minutos e armazenado em a -70°C até o seu uso.

2.3.2 Hemograma

As amostras com EDTA foram processadas e analisadas para realização do hemograma. Uma alíquota de sangue foi retirada através de microcapilar para realização do microhematócrito e esfregaço sanguíneo, para posterior contagem diferencial de leucócitos. Os microcapilares foram selados por calor e centrifugados em uma

velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos, com leitura efetuada através de cartão próprio. A contagem de hemácias, leucócitos, plaquetas e a determinação de hemoglobina foram realizadas em analisador hematológico automatizado (pocH-100iV Diff®). Os índices eritrocitários (VCM e CHCM) foram calculados conforme Schalm & Jain (1986).

2.3.3 Determinação do cortisol

O cortisol foi determinado por meio de teste imunoenzimático do tipo ELISA competitivo, utilizando o kit cortisol ELISA (DBC, Canadá) e o leitor multidetecção de microplacas Synergy™ H1 (BioTek, Estados Unidos).

2.3.4 Histopatologia

A confecção e análise histopatológica foi realizada de acordo com a metodologia já descrita anteriormente pelo nosso grupo (Sandri et al., 2017). Durante a necropsia, foi realizada a avaliação macroscópica, observando a presença de lesões isquêmicas e formação de pseudotumores. Em seguida, estes espécimes foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e emblocados em parafina para a obtenção dos cortes histológicos (5 µm de espessura). A coloração utilizada nas lâminas histológicas foi Hematoxilina e Eosina (HE), para posterior análise em microscópio óptico, sendo que os seguintes aspectos foram investigados: (1) presença de infarto; (2) identificação de ovos, larvas e parasitos adultos; (3) infiltrado eosinofílico; (4) formação de granuloma e (5) caracterização de vasculite e trombose.

2.3.5 Citocinas

O perfil de citocinas inflamatórias presentes no soro dos animais (IL-6, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ) foi avaliado por citometria de fluxo através do kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation BD Biosciences, USA). As diluições das amostras

de soro, assim como o ajuste dos parâmetros do citômetro e a avaliação das leituras foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante do kit.

2.4 *Análise estatística*

As variáveis quantitativas foram testadas quanto a sua normalidade, através do teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis como hematócrito, eritrócitos totais, hemoglobina, VCM, CHCM e proteína plasmática total, que apresentaram distribuição normal, foram analisadas através do teste *t* para amostras independentes. Já as demais variáveis, que não apresentaram distribuição normal (leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, plaquetas, cortisol, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ e IL-6 foram analisadas através do teste U de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram organizadas em tabelas de contingência, obtendo-se, a partir de estatística descritiva, as frequências relativas e/ou absolutas. O teste exato de Fisher foi empregado em tabelas 2 x 2, enquanto que o teste Likelihood ratio foi empregado em tabelas 3 x 2 e 4 x 2, para se verificar associação entre as variáveis categóricas, uma vez que as frequências esperadas foram menores do que 5. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade de (*p*) menor que 5%. O programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.01, foi empregado para análise estatística e confecção dos gráficos.

3. Resultados

3.1 Achados anatomopatológicos

Todos os animais experimentalmente infectados com *A. costaricensis* desenvolveram a patogênese da AA, confirmada pelo exame histopatológico. Foram encontradas alterações morfológicas nos intestinos, pulmões, fígado, baço e pâncreas.

Por outro lado, não houve alterações macroscópicas e microscópicas nos animais controles de ambos os grupos, demonstrando a ausência de um processo infeccioso concomitante com repercussão sobre os tecidos estudados.

3.1.1 Achados macroscópicos

Durante o procedimento de necropsia, observamos alterações macroscópicas no fígado e baço. As lesões identificadas foram infarto no baço, somente no G2 infectado (37,5%) e nódulos no fígado nos dois grupos (28% - G1 infectado e 62,5% - G2 infectado).

3.1.2 Achados microscópicos

A microscopia, observamos conforme representado na Tabela 1, a presença de trombos, eosinófilos e vasculite nos intestinos dos animais do G1. A presença de eosinófilos foi mais acentuada nos animais do grupo G2, assim como a necrose, entretanto, a presença de trombos diminuiu entre o G1 e G2. A presença de granulomas (Fig. 1A) foi notada em todos os indivíduos do G2 infectado, em diferentes graus, assim como a vasculite (Fig. 1B).

No pulmão, a única alteração detectada foi à presença de broncopneumonia leve nos dois grupos, sendo que no G2 a proporção de animais acometidos foi maior (G1: 12,5%; G2: 37,5%). As alterações no pâncreas (Fig. 1C) foram importantes, sendo que a pancreatite aumentou entre os diferentes períodos da infecção (G1: 37,5%; G2: 75%). A presença de infiltrado eosinofílico teve um incremento bastante importante nos animais do G2 (G1: 12,5%; G2: 62,5%). Os granulomas, vasculites, trombos, necrose, ovos e larvas foram observados somente no G2 infectado, conforme Tabela 2.

De acordo com a Tabela 3, encontramos no fígado lesões como a formação de granulomas no G2 em diferentes intensidades, e também a presença de eosinófilos,

hepatite, ovos e larvas que aumentaram do G1 para o G2. Houve a presença de trombos (Fig. 1D) e infartos leves nos dois grupos (G1 e G2)

Na Tabela 4 apresentamos os resultados histológicos do impacto da infecção sobre o tecido esplênico; no G1 observamos apenas esplenite e eosinofilia e no G2, além destes achados, encontramos granulomas, infartos e ovos e larvas.

3.2 Parâmetros hematológicos

Com relação ao hematócrito, hemoglobina e eritrócitos totais dos animais infectados do G2 (24 DPI) observou-se uma redução dos valores, quando comparados com os respectivos grupos controle, da mesma forma que o CHCM e proteína plasmática total (Fig. 2). Não houve diferença no volume corpuscular médio de hemoglobina entre os grupos (Fig. 2D). A análise dos leucócitos revelou um aumento de neutrófilos segmentados nos animais do G1 e G2 infectados. Observamos uma monocitose nos animais do G1 infectados quando comparados aos controles. No entanto, o número de eosinófilos, assim como a contagem de plaquetas se manteve estável durante o experimento. O leucograma e a contagem de plaquetas estão em detalhes na Tabela 5.

3.3 Parâmetros de Cortisol

Na análise sérica do cortisol, detectamos um aumento significativo tanto no G1 quanto G2 quando comparados aos respectivos grupos controles (Fig. 3).

3.4 Citocinas

Durante o processo de infecção experimental observamos um aumento significativo dos níveis plasmáticos de IFN- γ e IL-6 nos animais infectados com *A. costaricensis* em relação aos animais controles (Fig. 4C e 4D). Os valores de IFN- γ

detectados nos animais infectados (G1:0,242pg/mL; G2: 0,534 pg/mL) foram 2 a 3 vezes maiores que os encontrados nos animais controles (G1: 0,127pg/mL; G2: 0,146pg/mL). Ainda, mais importante foram as diferenças na concentração sérica de IL-6, sendo possível observar um incremento de 20 vezes nos animais infectados (G1:23,27pg/mL; G2:10,66pg/mL) em relação aos seus respectivos controles (G1:2,69pg/mL; G2:0,41pg/mL).

Não houve diferença na concentração de IL-12p70 entre todos os animais analisados (Fig. 4A). Já no que se refere ao TNF- α , detectamos um aumento nos animais infectados em relação aos animais controles 14 DPI (infectados:13,51pg/mL; controle:7,34pg/mL). De forma contrária, 24 DPI os valores de TNF- α encontrados nos animais controles eram significativamente inferiores aos observados nos animais infectados (infectados:4,23pg/mL; controle:9,40pg/mL) (Fig. 4B).

4. Discussão

A AA é considerada como uma doença presente em vários países das Américas (Valente et al., 2018) e pelo fato de não haver tratamento medicamentoso estabelecido contra o nematódeo, torna-se importante um maior conhecimento no que diz respeito à patogênese e tempo de infecção, que envolvem a tríade hospedeiro, parasito e ambiente.

A partir do nosso desenho experimental, conseguimos caracterizar achados histopatológicos, hematológicos, imunológicos e de cortisol da AA durante o processo infeccioso do parasito *A. costaricensis*. Salientamos a importância deste trabalho visto que é a primeira descrição destes parâmetros aos 24 DPI, período em que o ciclo do parasito se completa (Spratt, 2015).

Os achados histopatológicos nos permitem a caracterização para o diagnóstico da AA nos animais infectados, sendo encontrados larvas e ovos do nematódeo em vasos

e mucosa de diversos órgãos de ambos os grupos, o que concorda com dados de Mota & Lenzi (1995, 2005) e Spratt (2015), de que as fêmeas iniciam a oviposição em torno do 14º/15º dia após a infecção.

Os humanos se infectam com *A. costaricensis* através da ingestão de alimentos crus contaminados com L3. As larvas deste nematódeo migram dos vasos sanguíneos e linfáticos, alcançando a circulação arterial para chegar até os vasos mesentéricos, onde os estádios larvais atingem a forma madura (Walls et al., 2017). Os ovos produzidos pelos parasitos adultos são liberados para os capilares da parede intestinal, onde provocam uma resposta inflamatória (Rebello et al., 2013). Estes dois fenômenos de migração das larvas e liberação de ovos aos tecidos intestinais foram detectados em nosso trabalho, permitindo a caracterização de uma intensa resposta inflamatória com formação de granulomas (Fig. 1A).

As principais alterações microscópicas da AA descritas por Graeff-Teixeira et al., (1991) que se resumem em infiltração de eosinófilos nas camadas da parede intestinal, reação granulomatosa e vasculite eosinofílica também foram observadas neste estudo, principalmente no intestino, fígado e baço com o aumento da severidade destas lesões aos 24 DPI. As lesões observadas no pâncreas que merecem consideração foram pancreatite em 75% dos animais do G2, enquanto que o infiltrado eosinofílico aumentou consideravelmente entre os dias 14 DPI e 24 DPI; granuloma, vasculite, trombos e necrose foram observados aos 24 DPI. Trabalhos anteriores somente citam a presença de ovos e larvas neste órgão (Mota & Lenzi, 1995, 2005), enquanto que nossos resultados mostraram que os mesmos somente estavam presentes no grupo 24 DPI, com uma intensidade de leve a moderada, o que sugere a importância deste órgão no processo migratório do *A. costaricensis*.

Em relação ao hematócrito dos animais infectados, foi detectado um quadro de anemia, já observado nos roedores (Ishih & Nishimura, 1997), em cães (Alfaro-Alarcon

et al., 2015) e humanos (Romero-Alegría et al., 2014). Entretanto, enquanto nestes outros trabalhos a anemia é somente citada como um achado, no nosso trabalho conseguimos caracterizar a anemia como normocítica e hipocrômica (Chulilla et al., 2009). Este tipo de anemia indica deficiência de ferro, possivelmente associada à perda de sangue (Burkhard et al., 2001). Sobre a causa desta anemia, a nossa hipótese é que as lesões ocasionadas por *A. costaricensis* nos vasos intestinais, como artérias cecais e *vasa vasorum* (Vasconcelos et al., 2017) podem levar a perda de sangue nos animais, de modo semelhante ao *Angiostrongylus vasorum* em cães (Schnyder et al., 2010). Esta perda de sangue ainda pode justificar a queda nas proteínas plasmáticas totais observadas nos animais infectados (Lamps, 2009). Especulamos também que este achado aos 24 DPI pode ter ocorrido pelo fato do parasito já estar estabelecido nos órgãos causando reações inflamatórias e dando continuidade ao seu ciclo reprodutivo (Mota & Lenzi, 2005; Spratt, 2015), resultado este observado neste modelo experimental.

Na análise do leucograma, observamos que houve um quadro de neutrofilia e monocitose. Os dois fenômenos podem ser justificados pelo processo infeccioso e inflamatório que os indivíduos infectados com *A. costaricensis* passam, sendo que, tanto neutrófilos quanto macrófagos são ativados e recrutados para os tecidos alvos invadidos pelos helmintos (Anthony et al., 2007). O aumento dos neutrófilos no G1 e G2 infectados sugere que há uma forma de combate do organismo do hospedeiro contra o parasito (Chen et al., 2012), enquanto que a monocitose observada somente no G1 infectado indica que houve um maior recrutamento destas células de defesa para a reposição de macrófagos teciduais (Volkman & Gowans, 1965) no dia 14, acontecimento esse que parece ser cessado até o dia 24 DPI.

No que se refere ao cortisol, tem-se relatado que alguns parasitos utilizam este hormônio para seu estabelecimento, sendo que, animais estressados geralmente possuem carga parasitária maior (Hodder & Chapman, 2012; Li et al., 2013; Silva et al.,

2016). Do contrário, também é demonstrado que a infecção parasitária pode perturbar o organismo do hospedeiro e ativar respostas imunes e endócrinas (Dangel et al., 2014; Romano et al., 2015; Triki et al., 2016). Como no nosso trabalho foi observado o aumento do cortisol nos animais infectados de ambos os grupos, acreditamos que a infecção por *A. costaricensis* induziu um estresse independente do período do ciclo, seja pelas ações mórbidas do organismo do hospedeiro, relatada anteriormente, como pelo quadro clínico estabelecido na AA, que entre outros sinais, causa dor nos indivíduos acometidos (Alfaro-Alarcon et al., 2015; Rebello et al., 2011; Törnhaage & Alfvén, 2015). Por exemplo, a pancreatite em geral gera desconforto nos indivíduos acometidos (Gulen et al., 2016) e este quadro inflamatório foi observado nos animais do nosso trabalho, o que pode ter aumentado o nível de cortisol dos animais infectados. Ainda, durante a reação inflamatória, a liberação de citocinas também pode resultar na ativação de resposta ao estresse (Calcagni & Elenkov, 2006).

Um processo inflamatório intenso e prolongado como o descrito em infecções causadas por helmintos, desencadeia uma resposta por parte do sistema imunológico dos hospedeiros. Esses eventos são orquestrados por células efetoras do sistema imune inato e adaptativo que interagem através da secreção de citocinas (Anthony et al., 2007; Geiger et al., 2001). O padrão de citocinas inflamatórias encontradas nos animais infectados nos diferentes períodos do ciclo parasitário avaliados neste estudo, caracterizam um quadro inflamatório agudo aos 14DPI, com altas concentrações de TNF- α e IL-6 que se estende até a avaliação final aos 24DPI, com retorno a níveis basais de TNF- α , e com diminuição, porém se mantendo elevados os níveis de IL-6. As grandes diferenças entre as concentrações séricas de IL-6 dos animais controles e infectados, além de caracterizar o quadro inflamatório auxiliam na explicação do quadro de anemia e diminuição da proteína plasmática total. Níveis elevados de IL-6 diminuem a captação de ferro a nível intestinal o que poderia levar a

um quadro de hipoferremia (Nemeth et al., 2004), causa de anemias normocíticas e hipocrômicas. A diminuição das proteínas plasmáticas totais poderia estar associada ao fato da IL-6 apesar desencadear a produção de proteínas de fase aguda, inibir a síntese da albumina, a mais abundante das proteínas plasmáticas (Tanaka et al., 2014), embora a perda sanguínea seja a causa mais óbvia.

O TNF- α tem um papel central na inflamação, uma vez que desencadeia uma série de eventos no processo, como vasodilatação e edema, recrutamento de células para o sítio de infecção e ativação de fatores de coagulação (Zelová & Hošek, 2013). A soma dos eventos desencadeados pela secreção de TNF- α pelas células sejam dos tecidos ou leucócitos, explica achados da presença de eosinófilos nos locais de inflamação, formação de trombos e necrose no fígado, pâncreas e intestino dos animais infectados. A diminuição dos níveis séricos de TNF- α nos animais do G2 infectado ocorreu mesmo com indícios de que o processo inflamatório não teria cessado aos 24 DPI, fato este que poderia estar relacionado ao aumento das concentrações cortisol nesta etapa do estudo, sendo que, já é relatado que o mesmo pode causar uma supressão de citocinas relacionadas à resposta inflamatória (Castro et al., 2011). O aumento dos níveis de IFN- γ nos animais infectados em comparação aos do grupo controle é uma alteração esperada, tendo em vista da resposta inflamatória desencadeada por *A. costaricensis*. Com papel central na ativação de macrófagos, modulação na resposta imune inata e direcionamento para uma resposta adaptativa de base TH1 (Hu & Ivashkiv, 2009), esta citocina apesar de não estimular uma resposta TH2, é a mais efetiva na eliminação dos parasitos, pois apresenta funções regulatórias que mantêm a homeostase e preserva os tecidos acometidos, diminuindo a severidade da doença (Cortes et al., 2014). Na avaliação microscópica dos tecidos (Tabelas 1, 2, 3, 4), observamos que os achados que caracterizam inflamação nestes tecidos variam de leves a moderados, mesmo nos camundongos que permaneceram por mais tempo infectados, podendo estes fatos

estarem associados a ação regulatória do IFN- γ não só no intestino, como o descrito por Cortes (2014) em camundongos infectados com *Echinostoma caproni*, mas também nos demais órgãos aqui avaliados. A IL-12p70 não demonstrou alteração quando comparada entre animais controles e infectados. Quanto à patogênese observada nos grupos, sabe-se que o quadro inflamatório agudo geralmente termina quando a infecção é eliminada e se inicia o processo de reparação do tecido danificado, conforme observado principalmente no G2 infectado (Headland & Norling, 2015; Medzhitov, 2010).

5. Conclusões

Verificamos que os animais infectados por este nematódeo formam lesões características da AA, possuem um quadro de anemia normocítica e hipocrômica e geram uma resposta imune inflamatória com participação do INF- γ , TNF- α e IL-6, sendo que estas citocinas, em partes, podem ser influenciadas pelo cortisol, hormônio presente em maior quantidade nos animais infectados devido à doença. Ainda, pela primeira vez tais parâmetros foram mensurados em camundongos Swiss até 24 DPI, permitindo melhor entendimento da interação nematódeo/hospedeiro no decorrer do processo de parasitose.

6. Bibliografia

- Alfaro-Alarcon, A., Veneziano, V., Galiero, G., Cerrone, A., Gutierrez, N., Chinchilla, A., Annoscia, G., Colella, V., Dantas-Torres, F., Otranto, D., Santoro, M., 2015. First report of a naturally patent infection of *Angiostrongylus costaricensis* in a dog. *Vet. Par.* 212, 431-434.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975-987.

- Bender, A.L., Maurer, R.L., Silva, M.C.F.d., Ben, R., Terraciano, P.B., Silva, A.C.A.d., Graeff-Teixeira, C., 2003. Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensely recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 449-454.
- Burkhard, M.J., Brown, D.E., McGrath, J.P., Meador, V.P., Mayle, D.A., Keaton, M.J., Hoffman, W.P., Zimmermann, J.L., Abbott, D.L., Sun, S.C., 2001. Evaluation of the erythroid regenerative response in two different models of experimentally induced iron deficiency anemia. *Vet. Clin. Pathol.* 30, 76-85.
- Calcagni, E., Elenkov, I., 2006. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* 1069, 62-76.
- Castro, R., Zou, J., Secombes, C.J., Martin, S.A., 2011. Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 215-223.
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J.F., Jr., Wynn, T.A., Gause, W.C., 2012. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat. Med.* 18, 260-266.
- Chrousos, G.P., 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* 851, 311-335.
- Chulilla, J.A.M., Colás, M.S.R., Martín, M.G., 2009. Classification of anemia for gastroenterologists. *World J. Gastroenterol.:* WJG 15, 4627.
- Cortes, A., Sotillo, J., Muñoz-Antoli, C., Fried, B., Esteban, J.-G., Toledo, R., 2014. Intestinal IFN- γ production is associated with protection from clinical signs, but not with elimination of worms, in *Echinostoma caproni* infected-mice. *Parasitol. Res.* 113, 2037-2045.

da Silva, A.S., Zanette, R.A., Monteiro, S.G., Mattia, D.L., Noal, S.A., 2007. Efeito da piperazina e ivermectina no tratamento de camundongos *Mus musculus* naturalmente infectados com *Aspiculuris tetraptera* e *Syphacia obvelata*. Revista da FZVA 14.

Dangel, K.C., Keppel, M., Tabujew, K., Sures, B., 2014. Effects of *Anguillicola novaezelandiae* on the levels of cortisol and hsp70 in the European eel. Parasitol. Res. 113, 3817-3822.

Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? Trends Parasitol. 21, 588-593.

Fernando, M.R., Reyes, J.L., Iannuzzi, J., Leung, G., McKay, D.M., 2014. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. PloS one 9, e94188.

Geiger, S.M., Abrahams-Sandi, E., Soboslay, P.T., Hoffmann, W.H., Pfaff, A.W., Graeff-Teixeira, C., Schulz-Key, H., 2001. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. Acta Trop. 80, 59-68.

Graeff-Teixeira, C., Camillo-Coura, L., Lenzi, H.L., 1991. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. Parasitol. Res. 77, 606-611.

Green, A.M., Difazio, R., Flynn, J.L., 2013. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 190, 270-277.

Gulen, B., Dur, A., Serinken, M., Karcioğlu, O., Sonmez, E., 2016. Pain treatment in patients with acute pancreatitis: A randomized controlled trial. The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turk. J. Gastroenterol. 27, 192-196.

- Headland, S.E., Norling, L.V., 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin. Immunol.* 27, 149-160.
- Hodder, S.A., Chapman, C.A., 2012. Do Nematode Infections of Red Colobus (*Procolobus rufomitratu*s) and Black-and-White Colobus (*Colobus guereza*) on Humanized Forest Edges Differ from Those on Nonhumanized Forest Edges? *Int. J. Primatol.* 33, 845-859.
- Hu, X., Ivashkiv, L.B., 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon- γ : implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 31, 539-550.
- Incani, R.N., Caleiras, E., Martin, M., Gonzalez, C., 2007. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 197-200.
- Inoue, S., Niikura, M., Mineo, S., Kobayashi, F., 2013. Roles of IFN-gamma and gammadelta T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Front. Immunol.* 4, 258.
- Ishih, A., Nishimura, M., 1997. Differential responses of SM/J and A/J mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Int. J. Par.* 27, 1411-1414.
- Korner, H., McMorran, B., Schluter, D., Fromm, P., 2010. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int. J. P.* 40, 879-888.
- Kramer, M.H., Greer, G.J., Quinonez, J.F., Padilla, N.R., Hernandez, B., Arana, B.A., Lorenzana, R., Morera, P., Hightower, A.W., Eberhard, M.L., Herwaldt, B.L., 1998. First reported outbreak of abdominal angiostrongyliasis. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 26, 365-372.
- Lamps, L.W., 2009. Miscellaneous Helminthic Infections, *Surgical Pathology of the Gastrointestinal System: Bacterial, Fungal, Viral, and Parasitic Infections.* Springer, pp. 193-199.

- Li, M., Leatherland, J.F., Woo, P.T., 2013. Cortisol and dexamethasone increase the in vitro multiplication of the haemoflagellate, *Cryptobia salmositica*, possibly by interaction with a glucocorticoid receptor-like protein. *Int. J. Par.* 43, 353-360.
- Maria, G.A., Villarroel, M., Chacon, G., Gebresenbet, G., 2004. Scoring system for evaluating the stress to cattle of commercial loading and unloading. *Vet. Rec.* 154, 818-821.
- Maswoswe, S.M., Peters, W., Warhurst, D.C., 1985. Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79, 607-616.
- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.
- Moreau, E., Chauvin, A., 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *BioMed. Res. Int.* 2010.
- Morera, P., Céspedes, R., 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Ver. Biol. Trop.* 18, 173-185.
- Morera, P., Lazo, R., Urquiza, J., Llaguno, M., 1983. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1460-1461.
- Mota, E.M., Lenzi, H.L., 1995. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 707-709.
- Mota, E.M., Lenzi, H.L., 2005. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 407-420.

- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T., 2004. IL-6 mediates hypoferraemia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Inv.* 113, 1271-1276.
- Paim, F.C., Duarte, M.M., Costa, M.M., Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Silva, C.B., Paim, C.B., Franca, R.T., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Krause, A., Lopes, S.T., 2011. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 128, 365-370.
- Rambo, P.R., Agostini, A.A., Graeff-Teixeira, C., 1997. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil--prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 9-14.
- Rebello, K.M., Barros, J.S., Mota, E.M., Carvalho, P.C., Perales, J., Lenzi, H.L., Neves-Ferreira, A.G., 2011. Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis*, a human parasitic nematode. *J. Proteomics* 74, 1545-1559.
- Rebello, K.M., Menna-Barreto, R.F., Chagas-Moutinho, V.A., Mota, E.M., Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Oliveira-Menezes, A., Lenzi, H., 2013. Morphological aspects of *Angiostrongylus costaricensis* by light and scanning electron microscopy. *Acta Trop.* 127, 191-198.
- Rodriguez, R., Dequi, R.M., Peruzzo, L., Mesquita, P.M., Garcia, E., Fornari, F., 2008. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 50, 339-341.
- Romano, M.C., Jimenez, P., Miranda-Brito, C., Valdez, R.A., 2015. Parasites and steroid hormones: corticosteroid and sex steroid synthesis, their role in the parasite physiology and development. *Front. Neurosci.* 9, 224.
- Romero-Alegría, A., Belhassen-García, M., Velasco-Tirado, V., Garcia-Mingo, A., Alvela-Suárez, L., Pardo-Lledias, J., Sánchez, M.C., 2014. *Angiostrongylus costaricensis*: systematic review of case reports. *Adv. Infect. Dis.* 4, 36.

- Sandri, A.S.S., Rodriguez, R., Costa, M.M., Porto, S.M., Schwingel, D., Vieira, M.I.B., 2017. High-dose enoxaparin in the treatment of abdominal angiostrongyliasis in Swiss mice. *J. Helminthol.* 1-6.
- Schalm, O.W., Jain, N.C., 1986. *Schalm's veterinary hematology*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Schnyder, M., Fahrion, A., Riond, B., Ossent, P., Webster, P., Kranjc, A., Glaus, T., Deplazes, P., 2010. Clinical, laboratory and pathological findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 107, 1471-1480.
- Selye, H., 1973. The evolution of the stress concept. *American scientist.* 61, 692-699.
- Silva, M.L., Ines Ede, J., Souza, A.B., Dias, V.M., Guimaraes, C.M., Menezes, E.R., Barbosa, L.G., Alves Mdel, C., Teixeira, M.C., Soares, N.M., 2016. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Trop.* 154, 133-138.
- Spratt, D.M., 2015. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *International journal for parasitology. Parasites Wild.* 4, 178-189.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a016295.
- Törnhaage, C.J., Alfvén, G., 2015. Children with recurrent psychosomatic abdominal pain display increased morning salivary cortisol and high serum cortisol concentrations. *Acta Paediatr.* 104.
- Triki, Z., Grutter, A.S., Bshary, R., Ros, A.F., 2016. Effects of short-term exposure to ectoparasites on fish cortisol and hematocrit levels. *Mar. Biol.* 163, 187.
- Valente, R., Robles, M.D.R., Navone, G.T., Diaz, J.I., 2018. *Angiostrongylus* spp. in the Americas: geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 143-152.

Vasconcelos, D.I.B.d., Mota, E.M., Pelajo-Machado, M., 2017. Characterisation of the vascular pathology in *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) following experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Metastrongylidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 0-0.

Volkman, A., Gowans, J.L., 1965. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. Br. J. Exp. Pathol. 46, 62-70.

Walls, T., Cavuoti, D., Channabasappa, N., Yang, M., Southern, P., Gill, M.A., Park, J.Y., 2017. Abdominal Angiostrongyliasis: A Presentation of Eosinophilic Granulomatous Colitis. Int. J. Surg. Pathol.

Zelová, H., Hošek, J., 2013. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. Inflamm. Res. 62, 641-651.

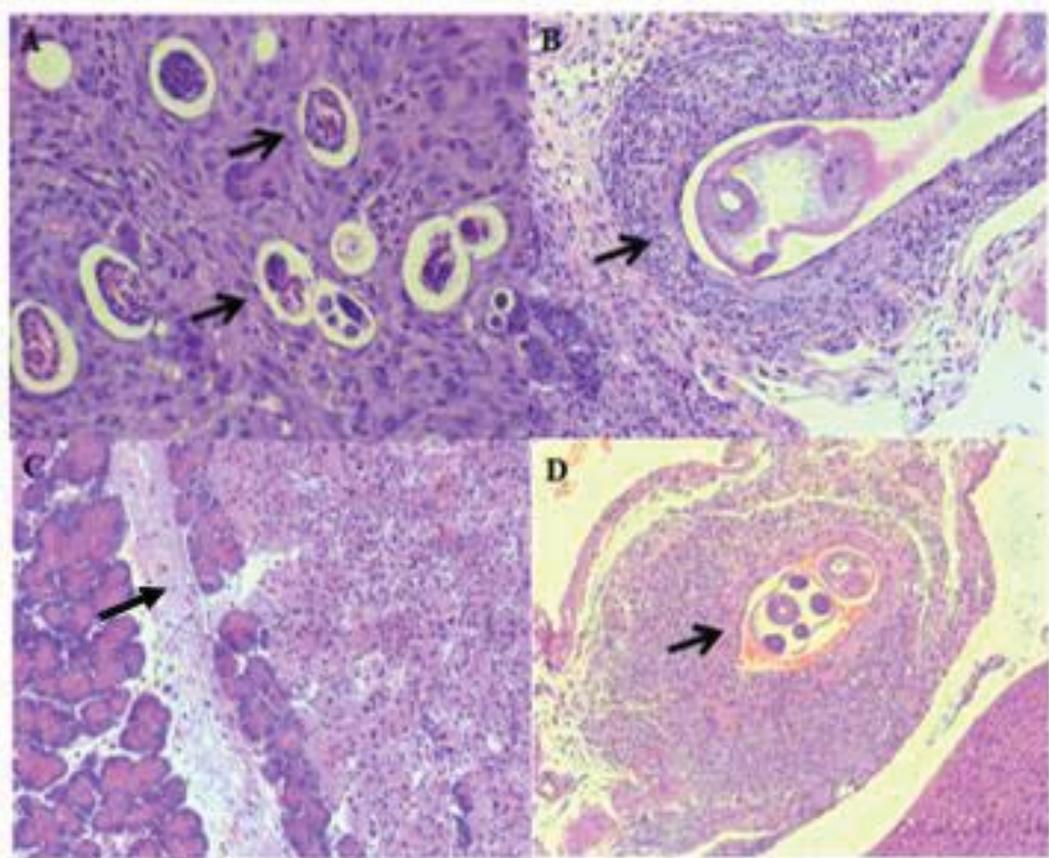


Fig. 1. Achados histopatológicos da AA em camundongos Swiss. (A) Submucosa do intestino delgado com granuloma englobando ovos e larvas (HE 200X). (B) Artéria da submucosa do intestino grosso com arterite eosinofílica e verme adulto na luz vascular (HE 100X). (C) Pancreatite aguda aos 24 DPI – área de necrose com infiltrado eosinofílico (HE 100X). (D) Artéria no fígado contendo trombo e verme de *Angiostrongylus costaricensis* (HE 50X). Coloração hematoxilina-eosina (HE).

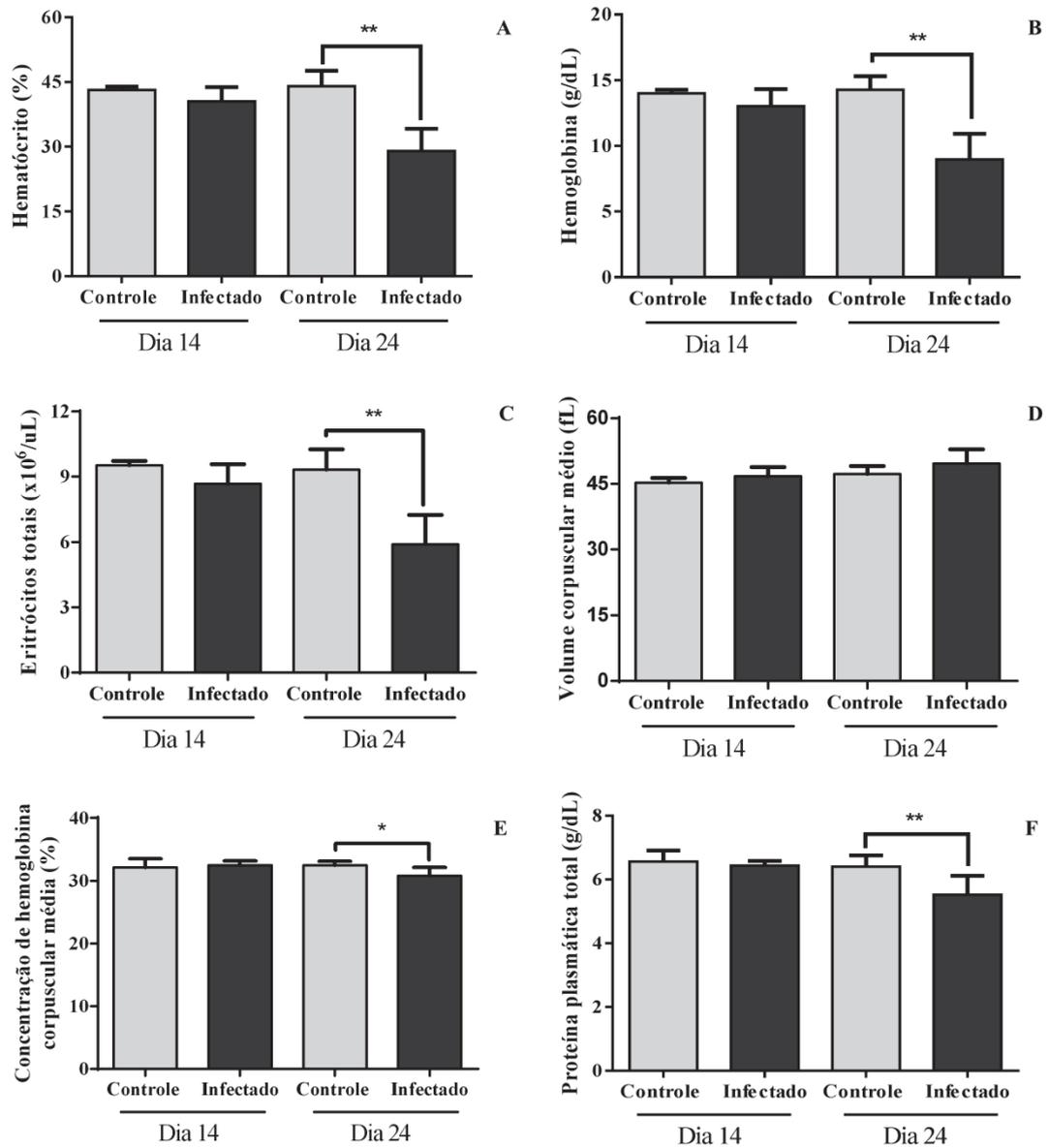


Fig. 2. Análise de hematócrito (A), hemoglobina (B), eritrócitos totais (C), volume corpuscular médio (D), concentração de hemoglobina corpuscular média (E) e proteína plasmática total (F) de camundongos experimentalmente infectados com *Angiostrongylus costaricensis*, expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

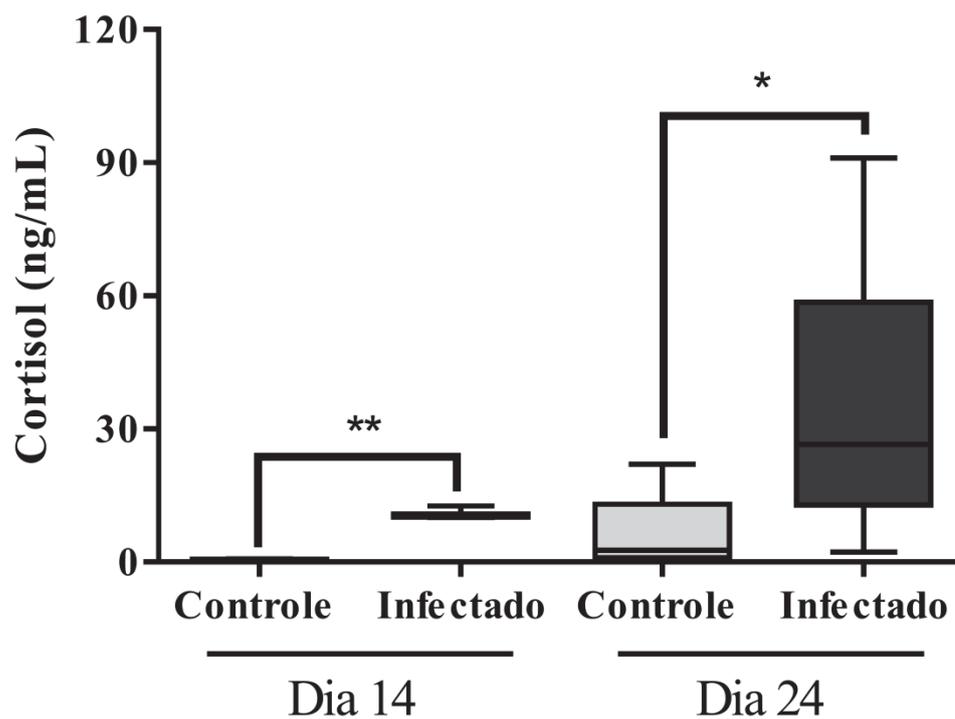


Fig. 3. Análise de cortisol de camundongos experimentalmente infectados com *Angiostrongylus costaricensis*, expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

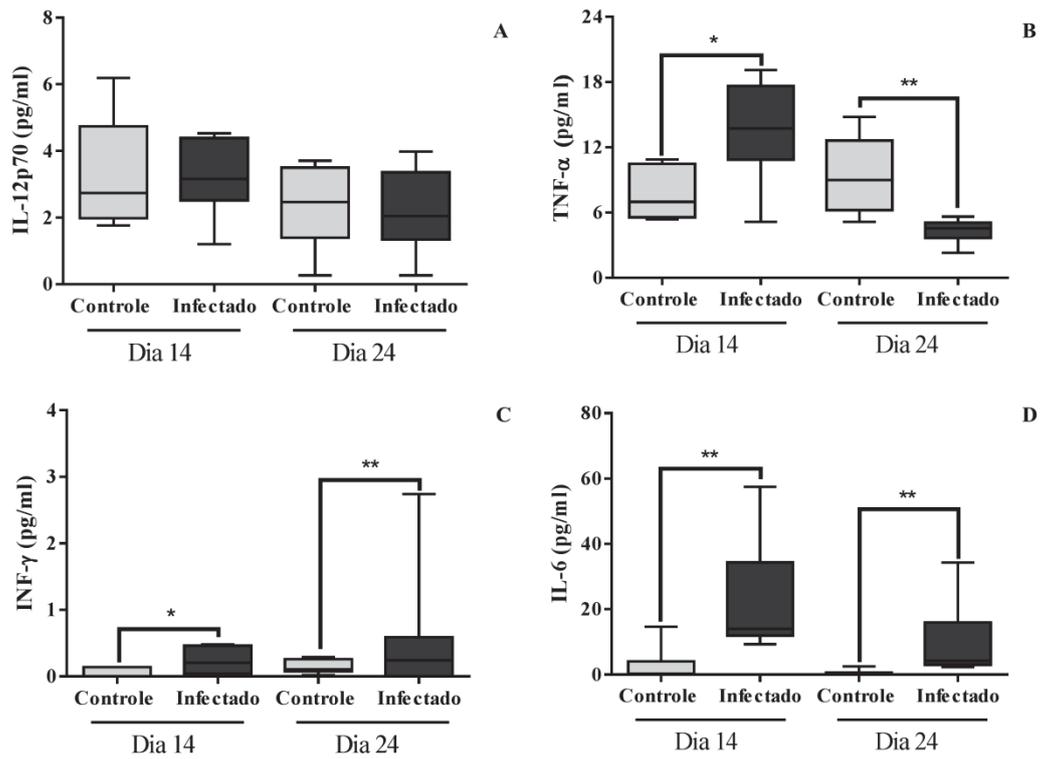


Fig. 4. Concentrações séricas de IL-12p70 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e IL-6 (D) de camundongos infectados experimentalmente por *Angiostrongylus costaricensis*, expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 1. Achados microscópicos no intestino de camundongos infectados com *Angiostrongylus costaricensis* nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.

	Variáveis	G1		G2		P	
		N	%	n	%		
Intestino	Granuloma	Ausente	8	100	0	0	<0,01
		Leve	0	0	3	37,5	
		Moderado	0	0	3	37,5	
		Intenso	0	0	2	25	
	Eosinófilos	Ausente	1	12,5	0	0	<0,01
		Leve	0	0	0	0	
		Moderado	7	87,5	3	37,5	
		Intenso	0	0	5	62,5	
	Vasculite	Ausente	5	62,5	0	0	<0,01
		Leve	3	37,5	4	50	
		Moderado	0	0	2	25	
		Intenso	0	0	2	25	
	Trombos	Ausente	4	50	5	62,5	0,5
		Leve	4	50	3	37,5	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
Necrose	Ausente	8	100	5	62,5	0,1	
	Leve	0	0	3	37,5		
	Moderado	0	0	0	0		
	Intenso	0	0	0	0		

Tabela 2. Achados microscópicos no pâncreas de camundongos infectados com *Angiostrongylus costaricensis* nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.

	Variáveis	G1		G2		P	
		n	%	n	%		
Pâncreas	Granuloma	Ausente	8	100	2	25	<0,01
		Leve	0	0	2	25	
		Moderado	0	0	4	50	
		Intenso	0	0	0	0	
	Eosinófilos	Ausente	7	87,5	3	37,5	0,1
		Leve	0	0	0	0	
		Moderado	1	12,5	5	62,5	
		Intenso	0	0	0	0	
	Vasculite	Ausente	8	100	4	50	0,07
		Leve	0	0	4	50	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
	Trombos	Ausente	8	100	7	87,5	1
		Leve	0	0	1	12,5	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
	Pancreatite	Ausente	5	62,5	2	25	0,3
		Leve	3	37,5	6	75	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
Ovos/Larvas	Ausente	8	100	3	37,5	<0,05	
	Leve	0	0	4	50		
	Moderado	0	0	1	12,5		
	Intenso	0	0	0	0		
Necrose	Ausente	8	100	6	75	0,4	
	Leve	0	0	2	25		
	Moderado	0	0	0	0		
	Intenso	0	0	0	0		

Tabela 3. Achados microscópicos no fígado de camundongos infectados com *Angiostrongylus costaricensis* nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.

Variáveis	G1		G2		P		
	n	%	n	%			
Fígado	Granuloma	Ausente	8	100	2	25	<0,01
		Leve	0	0	3	37,5	
		Moderado	0	0	3	37,5	
		Intenso	0	0	0	0	
	Eosinófilos	Ausente	3	37,5	0	0	0,1
		Leve	1	12,5	1	12,5	
		Moderado	4	50	6	75	
		Intenso	0	0	1	12,5	
	Hepatite	Ausente	4	50	0	0	<0,05
		Leve	4	50	8	100	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
	Trombos	Ausente	7	87,5	6	75	0,5
		Leve	1	12,5	2	25	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
Infartos	Ausente	4	50	0	0	0,1	
	Leve	4	50	8	100		
	Moderado	0	0	0	0		
	Intenso	0	0	0	0		
Ovos/Larvas	Ausente	7	87,5	0	0	<0,01	
	Leve	1	12,5	4	50		
	Moderado	0	0	3	37,5		
	Intenso	0	0	1	12,5		

Tabela 4. Achados microscópicos no baço de camundongos infectados com *A. costaricensis* nos dias 14 (G1) e 24 (G2) pós-infecção.

	Variáveis		G1		G2		P
			n	%	n	%	
Baço	Granuloma	Ausente	8	100	4	50	<0,05
		Leve	0	0	4	50	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
	Eosinófilos	Ausente	7	87,5	0	0	<0,01
		Leve	1	12,5	2	25	
		Moderado	0	0	6	75	
		Intenso	0	0	0	0	
	Esplenite	Ausente	7	87,5	0	0	<0,01
		Leve	1	12,5	8	100	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	0	0	
	Ovos/Larvas	Ausente	8	100	4	50	<0,05
		Leve	0	0	3	37,5	
		Moderado	0	0	0	0	
		Intenso	0	0	1	12,5	

Tabela 5. Leucograma (mediana, Min-Max) e contagem de Plaquetas de camundongos infectados experimentalmente por *Angiostrongylus costaricensis*, com diferentes dias de infecção.

	Controle (n=6)	Infectado (n=8)	P
Leucócitos totais (/μL)			
14 dias pós-infecção	1.700 ^a (900-5.100)	3.600 ^a (1.300-5.900)	0,12
24 dias pós-infecção	3.600 ^a (3.000-4.800)	4.400 ^a (1.800-6.900)	0,22
Neutrófilos bastonetes (/μL)			
14 dias pós-infecção	0 ^a (---)	0 ^a (0-13)	1,00
24 dias pós-infecção	0 ^a (---)	0 ^a (0-315)	0,21
Neutrófilos segmentados (/μL)			
14 dias pós-infecção	183 ^a (95-714)	1.427 ^b (416-2.065)	< 0,01
24 dias pós-infecção	667 ^a (300-950)	2.214 ^b (1.044-3.243)	< 0,01
Eosinófilos (/μL)			
14 dias pós-infecção	0 ^a (0-15)	0 ^a (---)	1,00
24 dias pós-infecção	62 ^a (38-96)	18 ^a (0-126)	0,06
Linfócitos (/μL)			
14 dias pós-infecção	1.474 ^a (684-4182)	2.010 ^a (832-3.068)	0,57
24 dias pós-infecção	2.613 ^a (2.414-3.726)	2.308 ^a (630-3.036)	0,11
Monócitos (/μL)			
14 dias pós-infecção	19 ^a (0-204)	198 ^b (39-767)	0,03
24 dias pós-infecção	126 ^a (76-288)	166 ^a (0-483)	0,92
Plaquetas (x10³/μL)			
14 dias pós-infecção	1.242 (912-1.507)	1.111 (1.007-1.310)	0,30
24 dias pós-infecção	1.275 (292-1.415)	1.325 (867-1.700)	0,47

4. CONCLUSÕES

A angiostrongilíase abdominal é uma zoonose que apresenta grande importância pela sua prevalência no RS e pelo fato de o único tratamento eficaz ainda ser somente cirúrgico. Ainda há dúvidas em relação à patogenia desta parasitose e este trabalho foi realizado com o intuito de esclarecer algumas destas dúvidas. A partir dos resultados deste estudo, foi possível o esclarecimento de questões hematológicas, imunológicas e patológicas do ciclo do *A. costaricensis* nos dias 14 e 24 pós-infecção, além do perfil de cortisol dos hospedeiros infectados. Salientamos a importância deste trabalho na caracterização dos parâmetros acima citados aos 24 dias, dados que são inéditos e que podem auxiliar no esclarecimento da patogenia deste nematódeo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma parasitose descrita há mais de 40 anos e ainda se desconhece vários aspectos do parasito, da patogenia e epidemiologia desta doença. Além destes fatores, faltam métodos de diagnóstico padronizados e protocolos de tratamento não invasivos. Diante de tantas questões, o objetivo deste trabalho foi o maior esclarecimento da patogenia da AA, utilizando camundongos Swiss como modelo experimental e avaliando parâmetros patológicos, hematológicos, imunológicos e de cortisol nos animais infectados em diferentes períodos do ciclo de *A. costaricensis*.

Os resultados deste estudo permitiram uma maior compreensão do ciclo deste nematódeo em todos os parâmetros analisados. A partir destes resultados, a AA poderá ser melhor caracterizada e novos estudos poderão partir dos dados obtidos, objetivando melhorias no diagnóstico e tratamento desta infecção. Ainda, se enfatiza a importância da manutenção do ciclo deste nematódeo no grupo de pesquisa, devido à necessidade de responder a dúvidas que ainda permanecem no meio científico. Destaca-se também a relevância de se utilizar um modelo animal que permita a coleta de material biológico em diferentes períodos de tempo sem a necessidade de eutanásia, para acompanhamento do ciclo do parasito em tempo real.

Levando em consideração todos os fatos já comentados, as perspectivas futuras em nosso grupo de estudo, já mantido no Biotério o ciclo do parasito em roedores Gerbis, permitindo a coleta de material biológico sem a necessidade de eutanásia e mensuração dos parâmetros já pesquisados em maiores períodos de tempo do ciclo de *A. costaricensis*, para aprimoramento dos conhecimentos já obtidos sobre a patogenia deste nematódeo.

6. REFERÊNCIAS

1. Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*. 2006;53(1):33-64.
2. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1311-21.
3. MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ. Immunology of parasitic helminth infections. *Infection and Immunity*. 2002;70(2):427-33.
4. Torgerson PR. One world health: socioeconomic burden and parasitic disease control priorities. *Veterinary Parasitology*. 2013;195(3-4):223-32.
5. Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un estrombilídeo (*Strongylata*). *Acta Médica Costarricense*. 1967;10:235-55.
6. Iabuki K, Montenegro MR. Appendicitis caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Presentation of a case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1979;21(1):33-6.
7. 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.
8. Sierra E, Morera P. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). *Acta Médica Costarricense*. 1972;14:95-9.
9. Zavala V, Ramírez B, Reyes P, Bates F. *Angiostrongylus costaricensis*. Primeros casos Mexicanos. *Clinical and Translational Investigation*. 1974;26:389-94.
10. Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JM, Lisot JU. [Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984;79(4):443-5. Angiostrongiliase abdominal. Estudo anatomico-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil.
11. Vasconcelos DIBd, Mota EM, Pelajo-Machado M. Characterisation of the vascular pathology in *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) following experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Metastrongylidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017.
12. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1973;22(5):613-21.
13. Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 1971;18(1-2):173-85.
14. Ubelaker JE, Hall NM. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 in the United States. *Journal of Parasitology*. 1979;65(2).
15. 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;105(5):1544-9.
16. 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.

17. Zuccaro A, Zani R, Aymoré I. Abdominal angiostrongyliasis: report of a potential autochthonous case from Rio de Janeiro. *Arquivos de Gastroenterologia*. 1998;35(1):54-61.
18. Ayala MAR. Angiostrongiloidíase abdominal. Seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987;82(1):29-36.
19. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitology Research*. 1991;77(7):606-11.
20. Valente R, Robles MDR, Navone GT, Diaz JI. *Angiostrongylus* spp. in the Americas: geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018;113(3):143-52.
21. Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(4):407-20.
22. Conejo ME, Morera P. Influencia de la edad de los veronicélidos en la infección con *Angiostrongylus costaricensis*. *Revista de Biología Tropical*. 1988;36(2B):519-26.
23. Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995;90(6):707-9.
24. Araya Rivera A, Quesada Lobo L, Vargas Vargas H. Angiostrongilosis abdominal. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2016;72(617):711-8.
25. Morera P, Ash LR. Studies on the intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971). *Boletín Chileno de Parasitología*. 1970;25(3/4).
26. Graeff Teixeira C, Thomé J, Pinto S, Camillo-Coura L, Lenzi H. *Phillocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1989;84(1):65-8.
27. Rodriguez R, Sandri ASS, Porto SM, Osorio JB, Muller CA, Cognato BB, et al. Invasive slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) infected by *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, and the possible risk of human infection associated with grape consumption. *Journal of Helminthology*. 2018:1-3.
28. Lima LC, Massara CL, de Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho Odos S. The susceptibility of Planorbidae from the metropolitan area of Belo Horizonte, MG (Brazil) to *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1992;34(5):399-402.
29. Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J. Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). *Journal of Parasitology*. 1980;66(5):856-7.
30. Malek EA. Presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;30(1):81-3.
31. Graeff Teixeira C, Pires FDA, Machado RCC, Camillo-coura L, Lenzi HL. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. *Revista Internacional de Medicina Tropical*. 1990;32(3):147-50.
32. Rodriguez R, Agostini AA, Porto SM, Oliveira AJ, Branco SL, Genro JP, et al. Dogs may be a reservoir host for *Angiostrongylus costaricensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002;44(1):55-6.
33. Alfaro-Alarcon A, Veneziano V, Galiero G, Cerrone A, Gutierrez N, Chinchilla A, et al. First report of a naturally patent infection of *Angiostrongylus costaricensis* in a dog. *Veterinary Parasitology*. 2015;212(3-4):431-4.

34. Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un estrombilídeo (*Strongylata* Railliet y Henry 1913) II Aspecto patológico (Nota previa). *Acta Médica Costarricense*. 1967;10:257-65.
35. Romero-Alegría A, Belhassen-García M, Velasco-Tirado V, Garcia-Mingo A, Alvela-Suárez L, Pardo-Lledias J, et al. *Angiostrongylus costaricensis*: systematic review of case reports. *Advances in Infectious Diseases*. 2014;4(01):36.
36. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in Immunology*. 2006;27(8):352-7.
37. Urban J, Katona IM, Paul WE, Finkelman FD. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(13):5513-7.
38. 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;128(4):365-70.
39. MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ. Immunology of parasitic helminth infections. *Infection and Immunity*. 2002;70(2):427-33.
40. Geiger SM, Abrahams-Sandi E, Soboslay PT, Hoffmann WH, Pfaff AW, Graeff-Teixeira C, et al. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Tropica*. 2001;80(1):59-68.
41. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-6.
42. Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PloS One*. 2014;9(4):e94188.
43. Korner H, McMorran B, Schluter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *International Journal for Parasitology*. 2010;40(8):879-88.
44. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*. 2013;190(1):270-7.
45. Inoue S, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F. Roles of IFN-gamma and gammadelta T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:258.
46. Kinra P, Dutta V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Tropical Biomedicine*. 2013;30(4):645-53.
47. Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2013;14(12):877-82.
48. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*. 2004;26(6-7):247-64.
49. Sheridan JF, Dobbs C, Brown D, Zwillling B. Psychoneuroimmunology: stress effects on pathogenesis and immunity during infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994;7(2):200-12.
50. Maria GA, Villarroel M, Chacon G, Gebresenbet G. Scoring system for evaluating the stress to cattle of commercial loading and unloading. *The Veterinary Record*. 2004;154(26):818-21.
51. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Abdominal angiostrongyliasis: an under-diagnosed disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987;82:353-4.

52. Lobo Sanahuja F, Loria Cortés R, González G. Angiostrongilosis abdominal: Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de la literatura. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1987;44(1):4-9.
53. Palominos PE, Gasnier R, Rodriguez R, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Individual serological follow-up of patients with suspected or confirmed abdominal angiostrongylosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):93-7.
54. da Silva AC, Graeff-Teixeira C, Zaha A. Diagnosis of abdominal angiostrongylosis by PCR from sera of patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2003;45(5):295-7.
55. Morera P, Cespedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. 1971. *Revista de Biología Tropical*. 2002;50(2):783-96.
56. Rodriguez R, da Silva ACA, Müller CA, Alves SL, Graeff-Teixeira C, Fornari F. PCR for the diagnosis of abdominal angiostrongylosis in formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *PloS One*. 2014;9(4):e93658.
57. Bontempo García I, Morera Villalobos P. Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. 1985.
58. Fante CA, Dieterish S, Rodriguez R. Betamethasone and aqueous extract of *Arctium lappa* for treating angiostrongylosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(6):654-7.
59. Rodriguez R, Porto SM, Dos Santos Ferrari R, Marcolan AM, da Silva AC, Graeff-Teixeira C, et al. Outcomes in mice with abdominal angiostrongylosis treated with enoxaparin. *Parasitology Research*. 2011;109(3):787-92.
60. Ramírez PM, Fonseca NC. Diagnóstico de la Angiostrongilosis Abdominal en Costa Rica, CNRP, 2010.
61. Zanini GM, Graeff-Teixeira C. Abdominal angiostrongylosis: its prevention by the destruction of infecting larvae in food treated with salt, vinegar or sodium hypochlorite]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1995;28(4):389-92.

7. ANEXOS



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Cerificamos que a proposta intitulada "Estudo da angiostrongilíase abdominal em camundongos *Swiss*" registrada com o nº 034/2016, sob a responsabilidade de **Caroline Chaves Hermes** e **Elise Benvegnú**, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO (CEUA-UPF), em reunião de 28/10/16.

Finalidade: Pesquisa

Vigência da autorização: 28/10/16 a 22/10/17

Nº animais: 48 Sexo: Machos

Idade/ peso: 10 semanas

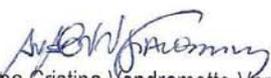
Espécie/linhagem/raça: Camundongo *Swiss*

Origem: Biotério – ICB - UPF

Resumo:

Serão utilizados 48 camundongos *Swiss* machos. Trinta e dois camundongos serão infectados com 10 L3 de *Angiostrongylus costaricensis* por gavagem. Após 14, 21., 28 e 35 dias serão eutanasiados por inalação de isoflurano com o objetivo de estudar as respostas inflamatória tecidual e hematológica. Um grupo de 12 animais não serão infectados e servirão de grupo controle sendo eutanasiados nos mesmos dias dos grupos infectados. Serão quantificados os eosinófilos, as citocinas e a proteína C reativa.

Passo Fundo, 28 de outubro de 2016.


Profa. Dra. Ana Cristina Vendrametto Varrone Giacomini
Coordenadora – CEUA – UPF