

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e

Hepatologia

Tese de Doutorado

PCR para o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal
em tecido humano e resultados em camundongos
tratados com enoxaparina

Aluno: Rubens Rodriguez

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fornari

Setembro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Rodriguez, Rubens

PCR para o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal em tecido humano e resultados em camundongos tratados com enoxaparina / Rubens Rodriguez. -- 2013.

90 f.

Orientador: Fernando Fornari.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Angiostrongilíase abdominal. 2. PCR. 3. Enoxaparina. 4. Angiostrongylus. I. Fornari, Fernando, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

À minha esposa Elizani e meus filhos

Flavia, João Pedro e Tomaz

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Fernando Fornari, pela orientação, ensinamentos, e inestimável ajuda na elaboração de todas as etapas da tese, sem a qual não seria possível realizá-la.

Ao amigo Prof. Aventino Alfredo Agostini, que iniciou os estudos da angiostrongilíase abdominal no Rio grande do Sul, sempre me incentivou e dividiu comigo a pesquisa sobre esta parasitose.

Ao Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira, que disponibilizou a estrutura do laboratório da PUC-RS, para a elaboração dos experimentos, pela amizade e muito importante contribuição na finalização dos artigos.

À Prof^a. Dra. Ana Cristina Arámburu da Silva, pela importante contribuição no capítulo da PCR, pela amizade e atenção dispensada.

Ao Prof. Sérgio Machado Porto, pela valiosa colaboração nos experimentos com os animais no biotério da Universidade de Passo Fundo.

A Prof. Ana Maria Marcolan, pela ajuda na leitura das lâminas histológicas, pela amizade e compreensão nas minhas ausências no IPPF e UPF.

A Dra. Adriana Eli Beck, pela compreensão, amizade e apoio para realizar o doutorado.

Aos acadêmicos Carla Aristonara Mller, Silvana Lunardini Alves e Rodrigo dos Santos Ferrari, pelo apoio e importante contribuição na execução dos experimentos com animais e com a PCR.

À secretaria do Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia Moema Goulart, pela amizade, competência e dedicação ao programa.

Ao Instituto de Patologia de Passo Fundo e sua administradora Carmem Maria Tagliari por disponibilizar toda a estrutura do laboratório para o processamento do material e confecção das lâminas histológicas.

Aos Funcionários do Instituto de Patologia de Passo Fundo pela disponibilidade, dedicação e competência na preparação de todo o material a ser analisado na microscopia.

Aos funcionários do biotério da Universidade de Passo Fundo e da Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre-RS, pela colaboração na execução dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas de pós graduação, que dividiram comigo horas de viagens e estudos, sempre com bom humor: Angélica T. Koeppel e Cassiano Forcelini.

Ao Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros pela calorosa acolhida no programa de pós graduação.

Ao Prof. Dr. Renato Borges Fagundes, pela amizade, por mostrar a importância e valorização do trabalho em equipe.

Aos meus pais Eufracio Ramon Rodriguez e Laureana Flaviana Gimenez Rodriguez, pela minha educação, pelo estímulo à leitura e pela formação do meu caráter.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Angiostrongilíase abdominal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Desvio padrão

dpi: Dias pós infecção

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IQ: Intervalo interquartil

L1: Larvas do primeiro estágio

L2: Larvas do segundo estágio

L3: larvas do terceiro estágio

PCR: Reação em cadeia da polimerase

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1: Características clínicas e demográficas nos casos confirmados e suspeitos de AA.....	35
TABELA 2: Resultado da PCR em casos confirmados (n = 20) comparado com outras parasitoses (n = 7).....	36
FIGURA 1: Caso confirmado com verme do <i>Angiostrongylus costaricensis</i> na luz da artéria mesentérica (HE).....	37
FIGURA 2: Larva de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> no centro de um granuloma de caso confirmado (HE).....	38
FIGURA 3: Intenso infiltrado eosinofílico na parede intestinal.....	39
FIGURA 4: Amplificação do DNA de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> na luz da artéria mesentérica: 1-Marcador molecular; 2-Controle negativo no intestino grosso; 3-Controle positivo no verme; 4- Positividade em área granulomatosa; 5-Positividade em verme; 6-MIX.....	40
FIGURA 5: Achados macroscópicos: A) aderências dos intestinos à parede abdominal anterior; B) abscesso na região ileocecal de aspecto pseudotumoral; C) infarto intestinal.....	41
FIGURA 6: Reação granulomatosa na periferia de artéria mesentérica, com verme do <i>Angiostrongylus costaricensis</i> na luz.....	42
FIGURA 7: Vasculite com infiltrado eosinofílico na parede arterial.....	42
FIGURA 8: Artéria mesentérica de médio calibre com trombo obstruindo completamente a luz.....	43
FIGURA 9: Reação granulomatosa no trajeto de pequenos vasos onde há ovos e larvas do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	43

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Histórico.....	15
2.2 Parasito.....	15
2.3 Hospedeiro definitivo.....	16
2.4 Hospedeiro intermediário.....	16
2.5 Ciclo evolutivo.....	17
2.6 Aspectos clínicos e laboratoriais.....	18
2.7 Anatomia patológica.....	19
3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	19
4 TRATAMENTO.....	20
5 HEMOSTASIA E TROMBOSE.....	21
6 JUSTIFICATIVA	23
7 HIPÓTESE.....	24
8 OBJETIVOS.....	24
9 MÉTODOS.....	25
10 RESULTADOS.....	31
11 DISCUSSÃO.....	44
12 CONCLUSÕES.....	50
13- REFERÊNCIAS.....	52
14- ANEXO I.....	56
15- ANEXO II.....	77

RESUMO

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma doença causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, tendo como hospedeiros definitivos roedores silvestres e hospedeiros intermediários moluscos terrestres. No homem, hospedeiro acidental, pode causar infartos intestinais e pseudotumorações, que podem complicar com peritonite e sepse. O diagnóstico definitivo é realizado pelo estudo histopatológico de peças cirúrgicas, ao serem identificadas estruturas parasitárias como vermes, ovos ou larvas. Este processo demanda tempo e experiência do patologista. Até o presente momento não existe tratamento disponível contra o parasito ou para evitar as complicações, apesar de várias tentativas realizadas com o uso de antiparasitários. O presente estudo teve dois objetivos: 1. Testar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em bloco parafinado para o diagnóstico de angiostrongilíase abdominal em seres humanos; e 2. Avaliar o efeito da enoxaparina na prevenção de complicações isquêmicas intestinais em camundongos com AA. Para a técnica da PCR utilizamos iniciadores de DNA do *Angiostrongylus cantonensis*. Blocos parafinados de 4 grupos foram divididos em: (1) casos confirmados (n=20), onde haviam estruturas parasitárias; (2) casos suspeitos (n=20), sendo alvos os granulomas e infiltrado eosinofílico; (3) controle negativo (n=3), proveniente de pacientes operados por adenocarcinomas; e (4) controle de especificidade (n=7), outras parasitoses, representados por estrongiloidíase, enterobiase, ascaridíase e esquistossomose. Para avaliar do tratamento foram utilizados 24 camundongos Swiss infectados com *Angiostrongylus costaricensis* (10L3/animal), sendo 12 tratados com enoxaparina subcutânea (40mg/kg/dia) e 12 com água destilada (placebo) por 50 dias. Os resultados mostraram que a sensibilidade da PCR foi de 55%, a especificidade de

100% e valor preditivo positivo de 100% para confirmação da AA. O tratamento dos camundongos com enoxaparina não mostrou diferença com o grupo placebo, em relação a prevenção das lesões tissulares e óbito. Concluindo, a PCR pode tornar-se uma ferramenta promissora para auxiliar na definição diagnóstica da AA, em especial quando o patologista não está familiarizado com esta doença. A enoxaparina na dose profilática não preveniu as lesões e os óbitos causados pelo parasito.

ABSTRACT

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is a disease caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*. The parasite has wild rodents as definitive hosts and molusks as intermediate hosts. Incidental contamination in men can provoke bowel infarction and pseudotumoral lesions, clinically manifested as acute abdomen. The diagnosis has been confirmed after histopathological examination of surgical specimens, with the identification of parasitic structures such as worms, eggs and larvae. Diagnostic workup demands high expertise from the pathologist. Hitherto there is no available treatment either for parasite eradication or avoidance of complications, despite several studies addressing the effect of anti-parasitic drugs. The current study aimed: 1. To test polymerase chain reaction (PCR) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue for the diagnosis of AA in humans; and 2. To assess the effect of enoxaparin in preventing intestinal ischemic complications in mice with AA. For PCR we used DNA primers from *Angiostrongylus cantonensis*. Four groups of FFPE intestinal tissue from surgically treated patients were tested with PCR: (1) confirmed cases (n = 20), in which AC structures were present in the target tissue; (2) presumptive cases (n = 20), containing eosinophilic infiltrates and/or granulomatous reaction in the absence of AC structures; (3) negative controls (n = 3), consisting of normal colonic tissue surrounding resected colonic adenocarcinoma; and (4) tissue affected by other parasitosis (n = 7), including strongiloidiasis, ascariasis, schistosomiasis, and enterobiasis. In the study with enoxaparin, 24 mice infected with *Angiostrongylus costaricensis* (10L3/animal) were allocated to receive subcutaneous enoxaparin (40mg/kg/day, n = 12) or sterile water (n = 12) for 50 days. Regarding results, PCR showed sensitivity of 55%, specificity of 100% and positive predictive

value of 100% in confirming AA. Treatment with enoxaparin was not superior to placebo in preventing AA related complications or death. In conclusion, the PCR technique might be a promising tool to be used in the diagnostic workup of AA, particularly in the setting of non-experienced pathologists. Enoxaparin in prophylactic doses did not prevent lesions or death in mice suffering from AA.

1- INTRODUÇÃO

A angiostrongilíase abdominal (AA) é uma doença causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, podendo acometer adultos e crianças de ambos os sexos (Morera and Céspedes 1970). A doença tem sido detectada principalmente na região sul do Brasil e na Costa Rica (Agostini et al. 1984, Graeff-Teixeira et al. 1991). Apresenta como hospedeiro definitivo roedores silvestres, tais como *Sigmondon hispidus* na Costa Rica e *Oligoryzomys ratticeps* e *Oligoryzomys nigripes* no Sul do Brasil (Graeff-Teixeira et al. 1990). Moluscos terrestres são hospedeiros intermediários, incluindo *Vaginulos (Sarasinula) plebeia* na Costa Rica e *Phyllocaulis* no Brasil (Graeff-Teixeira et al. 1989). A doença usualmente se manifesta com lesões intestinais caracterizadas por infarto, pseudotumor ou apendicite aguda. O diagnóstico definitivo é realizado pela identificação de vermes, ovos ou larvas em cortes histológicos de peças cirúrgicas intestinais ou apendiculares (Graeff-Teixeira et al. 1991).

Muitas vezes não é possível identificar as estruturas parasitárias nos cortes histológicos, mesmo após a inclusão de toda a peça cirúrgica com a realização de cortes seriados. Nestes casos o diagnóstico de AA é presuntivo. A utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em bloco parafinado poderia ser útil para confirmar a suspeita diagnóstica de AA. No entanto, estudos são necessários para definir a viabilidade e a acurácia da PCR no diagnóstico da AA.

A patogênese da AA não está totalmente esclarecida. Uma das principais hipóteses está relacionada à lesão vascular caracterizada pelo infiltrado eosinofílico e pelos granulomas perivasculares. Estas lesões podem estar associadas com eventos trombóticos, combinados com a presença de estruturas parasitárias na luz vascular

(Agostini et al. 1984; Graeff-Teixeira et al. 1991). Estes fenômenos são estudados em modelo animal experimental infectados pelo *Angiostrongylus costaricensis*, como o camundongo Swiss.

Quanto ao tratamento, não há eficácia comprovada no uso de drogas anti-helmínticas, existindo o risco teórico de agravamento das lesões intestinais com a indução da morte do parasito em localização intra-arterial (Morera and Bontempo 1985; Mentz and Graeff-Teixeira 2003). O uso de drogas que bloqueiam a oviposição (Bohrer et al. 2007) e drogas anti-inflamatórias (Fante et al. 2008), não tiveram resultados satisfatórios. O tratamento cirúrgico pode ser necessário em caso de complicações por oclusão ou perfuração intestinal. Nos demais casos, indica-se a conduta expectante, além de cuidados gerais como hidratação e analgesia (Graeff-Teixeira et al. 2007).

A descoberta do mecanismo pelo qual o *A. costaricensis* induz lesões isquêmicas é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento das complicações a ele associadas. O eventual uso de anticoagulantes ou trombolíticos poderia auxiliar no esclarecimento da patogenia que envolve associação entre parasito e lesão intestinal isquêmica. Drogas como a enoxaparina exercem efeito anticoagulante e são amplamente disponíveis para uso clínico (Mousa 2004). Com base nisto, a hipótese deste estudo é a de que o uso de anticoagulantes poderia prevenir as complicações isquêmicas relacionadas ao *A. costaricensis*. Este estudo tem como objetivo a resposta a este questionamento. Para isto, enoxaparina foi utilizada em modelo animal desenvolvido para o estudo da AA, na tentativa de prevenir as complicações isquêmicas intestinais.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A doença foi inicialmente descrita na Costa Rica, em 1967, como granuloma parasitário intestinal (Céspedes et al. 1967). Foi proposto a denominação de “*Angiostrongylus costaricensis*” como espécie nova por P. Morera e R. Céspedes e a doença como “angiostrongilíase abdominal” para diferenciar da angiostrongilíase meningo-encefalítica, produzida pelo *Angiostrongylus cantonensis* (Morera & Céspedes 1970)

O primeiro caso publicado fora da Costa Rica foi em Honduras (Sierra & Morera 1972). Posteriormente, outros países da América do Sul relataram a doença: México (Velásquez et al. 1974) e Equador (Morera 1983). Casos provavelmente importados ocorreram nos EUA (Ubelaker and Hall 1979) e Europa (Vazquez et al. 1993). No Brasil, foram publicados casos em São Paulo (Iabuki & Montenegro 1979), Santa Catarina/Paraná (Ayala 1987), Rio Grande do Sul (Agostini et al. 1984; Graeff-Teixeira et al. 1991; Rodriguez et al. 2008), Minas Gerais (Rocha et al. 1991), Espírito Santo (Pena et al. 1995) e Rio de Janeiro (Zucaro et al. 1998).

2.2 Parasito

O *Angiostrongylus costaricensis* é um metastrongilídeo, da subfamília Angiostrongylidae. Os primeiros parasitos identificados (2 machos e 1 fêmea) foram obtidos das artérias mesentéricas das peças cirúrgicas de casos humanos e a morfologia inicialmente descrita por Morera & Céspedes 1970.

O macho mede entre 16,8 mm e 18,9 mm de comprimento e 0,3 mm de largura. O corpo é filiforme e, na extremidade caudal, encontra-se levemente

encurvado, terminado em uma bolsa copuladora bem desenvolvida. A fêmea mede entre 24,6 mm e 27,9 mm de comprimento. O corpo filiforme é ligeiramente encurvado na extremidade distal, que é cônica.

Os ovos encontrados nos tecidos humanos costumam apresentar forma ovalada, medindo aproximadamente 90 µm no maior eixo, com parede fina. Podem ser observados em várias etapas de evolução, desde uma fase de mórula, com três ou quatro blastômeros, até a larva bem desenvolvida.

2.3 Hospedeiro definitivo

Morera identificou em 1970 os primeiros hospedeiros definitivos do *Angiostrongylus costaricensis*, ao capturar roedores no peridomicílio de um paciente com AA. Os roedores que apresentaram parasitos foram o *Rattus rattus* (rato do sótão) e *Sigmondon hispidus* (rato do algodão).

No Rio Grande do Sul foram identificados os primeiros roedores naturalmente infectados: *Oligoryzomys nigripes* e *Oligoryzomys ratticeps*, no peridomicílio de um paciente com diagnóstico de AA (Graeff-Teixeira et al. 1990). Cães podem participar do ciclo evolutivo como “hospedeiro reservatório da doença” (Rodriguez et al. 2002).

2.4 Hospedeiro intermediário

Ao estudar a AA, Morera identificou moluscos como os hospedeiros intermediários. O primeiro molusco naturalmente infectado com larvas do terceiro estadio (L3) do *Angiostrongylus costaricensis*, foi *Vaginulus (Sarasinula) plebeia*, na Costa Rica, atualmente denominada de *Sarasinula plebeia* (Morera & Céspedes 1970).

No Brasil, o primeiro hospedeiro intermediário identificado foi o *Phyllocaulis variegatus*. Posteriormente, foram identificadas mais três espécies infectadas nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná: *Limax maximus*, *Bradybaena similaris* e *Limax flavus*. Com isso, foi mostrado uma diversidade de moluscos contaminados (Graeff-Teixeira et al.1989).

2.5 Ciclo evolutivo

Morera descreveu pela primeira vez o ciclo da AA, indicando dois hospedeiros naturais definitivos do *Angiostrongylus costaricensis* e um hospedeiro intermediário. Nos roedores (hospedeiros definitivos), os parasitos adultos localizam-se nos ramos da artéria mesentérica, predominantemente da região íleo-cecal. Os ovos são carreados pela corrente sanguínea até as camadas da parede intestinal, desde a serosa até a mucosa. Nestes locais, os ovos embrionam e formam larvas do primeiro estadio (L1), que atravessam a parede intestinal e caem na luz do órgão, para depois serem expelidas ao exterior com as fezes. As larvas L1 se transformam em larvas L2 não infectantes, e estas posteriormente evoluem para formas infectantes nos hospedeiros intermediários (moluscos terrestres), denominadas L3. O ciclo se completa quando os roedores ingerem moluscos ou alimentos contaminados pelo muco dos moluscos contendo L3. O homem se infecta ao ingerir alimentos contaminados pelo muco dos moluscos ou o próprio molusco, caracterizando-se como um hospedeiro acidental. Uma vez nas artérias mesentéricas do homem, o parasito adulto deposita os ovos que ficam retidos na parede intestinal (Morera & Céspedes 1970).

O ciclo proposto por Mota (Mota et al. 1995) difere do anterior pela presença de uma via pulmonar para passar da circulação linfática/venosa para o sistema arterial, e de uma via venosa portal.

2.6 Aspectos clínicos e laboratoriais

Nos primeiros casos descritos na literatura, observou-se que a dor abdominal é o principal sintoma da doença. Este sintoma varia de leve a intenso, podendo evoluir para um quadro de abdômen agudo e necessitar de laparotomia de urgência (Céspedes et al. 1967). A doença pode ainda se apresentar como dor abdominal recorrente, sendo a forma mais comum da doença. Há ainda outros sintomas que acompanham a dor isolada ou conjuntamente, como febre, náuseas, vômitos, anorexia, diarreia ou constipação, urticária e perda de peso (Graeff- Teixeira et al. 1987).

Os sinais clínicos relatados são distensão abdominal, palpação dolorosa do abdômen com resistência muscular ou irritação peritoneal, e rigidez abdominal. Um dado de muita importância é a presença de massa tumoral palpável no abdômen, localizado no quadrante inferior direito, flanco direito ou mesogástrico. Tal 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 (Lobo-Sanahuja et al.1987).

Ocasionalmente, o quadro clínico pode confundir-se com larva migrans visceral, quando há o acometimento hepático, pelo *A. Costaricensis* (Rodriguez et al. 2008). Mais raramente pode haver o comprometimento dos testículos, omento e em hérnia de parede abdominal (Lobo- Sanahuja et al 1987).

Os estudos hematológicos costumam evidenciar leucocitose com intensa eosinofilia. A leucocitose pode variar de 10.000 a 52.000 mm³, e a eosinofilia de 11%

a 81%. Raramente, observa-se eosinofilia menor do que 10% e leucocitose maior de 50.000 mm³ (Rodriguez et al 2008).

2.7 Anatomia patológica

Os aspectos macroscópicos relevantes na AA 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. Relatos de casos descreveram lesões em fígado, testículos, vulva, omento, estômago, vesícula biliar e pele (Ruiz et al. 1983; Graeff- Teixeira et al. 2007).

No exame microscópico destacam-se a arterite eosinofílica, infiltrado eosinofílico intenso e granulomas perivasculares, por vezes, seguindo os trajetos vasculares (Graeff-Teixeira et al. 1991; Rodriguez 1997).

O diagnóstico definitivo é realizado quando são identificadas estruturas parasitárias, como vermes adultos, ovos ou mais raramente larvas. Muitas vezes é necessário a realização de cortes seriados ou até mesmo a inclusão de toda a peça cirúrgica em bloco parafinado para o encontro das estruturas parasitárias, e assim confirmar o diagnóstico da doença (Graeff-Teixeira et al.1991). Salienta-se ainda a necessidade de experiência do patologista para o sucesso diagnóstico.

3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

3.1 Utilidade da PCR para o diagnóstico de AA

Em casos suspeitos, o diagnóstico presuntivo da AA pode ser realizado por método sorológico ELISA e confirmado pelo exame histopatológico ao serem

identificadas estruturas parasitárias. Recentemente, a detecção de ácidos nucleicos através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada em soros de pacientes com AA (Silva et al. 2003). A PCR em soro mostrou-se técnica específica e promissora para uso clínico.

O diagnóstico da AA nos casos em que não são encontradas as estruturas parasitárias nos cortes histológicos é presuntivo, podendo a PCR em bloco parafinado ser útil para confirmar a doença.

4- TRATAMENTO

Não existe tratamento específico para a AA. Em estudo experimental, roedores *Sigmondon hispidus* foram tratados com tiabendazol, levamisol e dietilcarbamazina e foi observado que as drogas utilizadas não paralisam ou matam o parasito (Morera & Bontempo 1985). Ocorreram óbitos de alguns roedores depois do tratamento, possivelmente devido à migração errática do *Angiostrongylus costaricensis*. Em um estudo “in vitro” com essas mesmas drogas foi demonstrado que elas não matam o parasito, mas o excitam, aumentando os movimentos dos mesmos, podendo induzir migração errática dos mesmos para outros órgãos. O PF 1022A, Pyrantel e Flubendazole apresentaram efeito larvicida em modelo experimental.

Anti-inflamatórios são utilizados com frequência utilizadas para o alívio dos sintomas. Em estudo experimental com betametasona e extrato de *Arctium lappa* em camundongos não houve eficácia na proteção das lesões causadas pelo *Angiostrongylus costaricensis*. Ao contrário, o tratamento com betametasona produziu o agravamento das lesões e morte dos roedores. Portanto, não é

recomendado o uso desses anti-inflamatórios na AA, já que pode haver agravamento das lesões e mascarar sinais e sintomas de complicações, tais como perfurações e peritonites (Fante et al 2008).

Até o presente momento na AA é recomendada a conduta expectante, com monitoramento cuidadoso do paciente, para a detecção precoce das complicações e indicação correta do procedimento cirúrgico, principalmente nos casos de obstrução ou infarto intestinal (Graeff-Teixeira et al 2007).

Apesar dos vários estudos experimentais com drogas no tratamento da infecção por *Angiostrongylus costaricensis*, em ratos e camundongos, ainda muitos aspectos continuam sem respostas e não foi encontrada uma droga eficaz para o tratamento desta parasitose (Mentz & Graeff-Teixeira 2003).

5- HEMOSTASIA E TROMBOSE

5.1 Conceitos básicos

A hemostasia normal é o resultado de uma série de processos bem regulados que mantêm o sangue num estado líquido livre de coágulos e quando há lesão vascular produz um tampão hemostático. A trombose é o oposto patológico da hemostasia. Tanto a hemostasia como a trombose são reguladas por três componentes gerais: parede vascular, plaquetas e cascata da coagulação (Churg 1991).

Na trombose arterial há uma clara relação entre a lesão vascular e a formação do trombo. O trombo que precipita o infarto miocárdico, por exemplo, usualmente é precedido por ruptura da placa aterosclerótica, devido a exposição de ligantes adesivos a plaquetas como o fator VIII, colágeno e também o fator tissular. As plaquetas formam o núcleo do trombo arterial e os componentes celulares estão

intimamente relacionados à parede vascular. Duas condições estão frequentemente associados com a trombose: inflamação e estase. A inflamação local é caracterizada pela ativação do endotélio. De forma aguda, a ativação endotelial resulta na liberação de grânulos de corpos de Weibel Palade, que contém fator VIII e P-seletinas. Estas proteínas tem a capacidade de se ligar a leucócitos e os monócitos em particular e são as células que mais rapidamente sintetizam fator tissular (Churg 1991).

5.2 Hemostasia e trombose na AA

As alterações vasculares na AA ocorrem nos territórios arterial, venoso, capilar e linfático, variando desde depósitos fibrinóides a vasculites e trombozes, sendo essas mais frequentes nas artérias (Agostini et al. 1984). As trombozes têm sido causa de infartos intestinais ou apendiculares, que desencadeiam casos graves e agudos, incluindo necroses, peritonites e óbito. As lesões vasculares podem acometer artérias que não contém o parasito, mas quando os vermes encontram-se degenerados na luz arterial, pode haver associação com arterite eosinofílica e trombose. As áreas de necroses da parede intestinal são frequentemente observadas nos casos de trombose arterial. Dentre as hipóteses que poderiam explicar o fenômeno tromboembólico na AA, salienta-se a produção de fatores pró-coagulantes pelo parasito ou falhas no sistema de coagulação dos pacientes com AA que desenvolvem infartos intestinais (Graeff-Teixeira 1986; Rodriguez 1997).

6- JUSTIFICATIVA

Estudo 1 (PCR)

O diagnóstico definitivo da AA depende do encontro de estruturas parasitárias nos cortes histológicos de peças cirúrgicas ressecadas dos pacientes com complicações da doença. Muitas vezes no exame macroscópico é necessário a inclusão em bloco parafinado de toda a área de lesão na tentativa de localizar ovos, larvas ou vermes adultos, necessitando a confecção de várias lâminas histológicas, seguidas da realização de cortes seriados, aumentando o custo do exame. Quando as estruturas parasitárias não são encontradas o diagnóstico é presuntivo, mesmo com exames sorológicos positivos pelo método de ELISA. Essa dificuldade diagnóstica, juntamente com o pouco conhecimento sobre esta parasitose entre os profissionais da saúde contribuem para o subdiagnóstico da doença. Acreditamos que a técnica da PCR seja uma ferramenta que possa facilitar a elucidação diagnóstica desta parasitose, ao identificar fragmentos de DNA do parasito nos cortes histológicos de tecido humano emblocado em parafina.

Estudo 2 (Enoxaparina)

Atualmente não existe tratamento disponível para a AA. Os anti-helmínticos não apresentam eficácia e não é recomendado a sua utilização devido ao risco das migrações erráticas dos parasitos e suas complicações.

O tratamento da AA é expectante ou cirúrgico nos casos com complicações isquêmicas ou obstrutivas. As complicações isquêmicas são os infartos êntero-mesentéricos, que podem evoluir para perfurações e óbitos. O uso de anticoagulantes poderia ser útil na prevenção das complicações isquêmicas.

7- HIPÓTESE

Estudo 1 (PCR)

A técnica da PCR pode ser uma ferramenta fidedigna no diagnóstico da AA, quando utilizada em blocos parafinados de peças cirúrgicas, de pacientes infectados.

Estudo 2 (Enoxaparina)

Os infartos êntero-mesentéricos na AA estão relacionados com trombozes arteriais causadas pelo parasito. Atualmente não há tratamento contra o parasito. Acreditamos que o uso de anticoagulantes possa prevenir a trombose e evitar os infartos intestinais.

8- OBJETIVOS

Estudo 1 (PCR)

Geral

Testar a técnica da PCR em bloco parafinado para o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal em casos humanos.

Específicos

1. Avaliar o desempenho diagnóstico comparando casos confirmados de AA com outras parasitoses.
2. Avaliar a PCR em casos suspeitos de AA e controles negativos.

Delineamento: Transversal

Enfoque: Diagnóstico

Fator em estudo: PCR

Desfecho: Angiostrongilíase abdominal

Estudo 2 (Enoxaparina)

Geral

Avaliar o efeito da enoxaparina na prevenção de complicações isquêmicas intestinais em camundongos com AA.

Específicos

1. Verificar o peso e achados morfológicos *post-mortem*.
2. Verificar se há redução no número de óbitos nos camundongos infectados.

Delineamento: experimental tipo ensaio clínico

Enfoque: Terapêutico

Fator em estudo: Enoxaparina

Desfecho: Mortalidade por angiostrongilíase abdominal

9- MÉTODOS

Estudo 1 (PCR)

Este estudo foi conduzido de acordo com as regras da declaração Helsinki e Resolução 196/96 do CFM e foi aprovado pelo comitê de ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil (protocolo nº 10/00174).

Utilizamos amostras de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina de 4 grupos de pacientes: casos confirmados de AA (n = 20), casos suspeitos de AA (n = 20), controles negativos (n = 3), e casos com outras parasitoses (n = 6). Todas as amostras foram obtidas do arquivo de laboratório de patologia, de um período entre

1996 e 2012. Os casos confirmados apresentavam estruturas do *Angiostrongylus costaricensis* localizados na luz vascular intestinal, representados por vermes adultos, larvas e ovos. Após a identificação das estruturas parasitárias em cortes corados na hematoxilina e eosina, as áreas alvos eram desemblocadas e reincluídas em blocos menores (5 x 5x 5 mm), para retirar o excesso de parafina e de tecido. Os casos suspeitos eram aqueles que apresentavam infiltrado eosinofílico, reação granulomatosa e vasculite eosinofílica, sem estruturas parasitárias, sendo estas áreas selecionadas e preparadas como os casos confirmados para o estudo pela PCR. Como controle negativo foram utilizados áreas normais de tecido colônico, obtidos de pacientes operados por adenocarcinoma. Para controle de especificidade, foram utilizados blocos parafinados de tecido intestinal contendo *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma mansoni* e *Ascaris lumbricoides*, como alvos para a PCR. Também analisamos dados demográficos e clínicos obtidos dos prontuários, bem como os achados macrocópicos e microscópicos. A reação granulomatosa e o infiltrado eosinofílico foram graduados em leve, moderada e intensa.

PCR

O DNA do *Angiostrongylus costaricensis* foi extraído de tecido fixado em formol e emblocado em parafina, cortados com 10 µm espessura. Esse procedimento foi realizado em triplicata, gerando 3 amostras de cada caso. Os cortes foram desparafinados em xilol, obtendo-se 25 mg de tecido. Este material foi centrifugado e lavado duas vezes com etanol a 100% e deixado secar em temperatura ambiente. DNeasy Tissue kit (Qiagen) foi empregado para a extração do DNA. Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências publicadas de mRNA de *Angiostrongylus*

cantonensis (Genbank, número de acesso U17585) (Silva et al. 2003). A reação de amplificação foi realizada com adição de 25 µL de solução 0,4 µM dos oligonucleotídeos Angio R1 Rev (5'-CTCGGCTTAATCTTTGCGAC-3') e Angio F1 For (5'-AACGAGCGGCAGTAGAAAAA-3'), utilizando o kit de amplificação AmpliTaq Gold PCR Master Mix da Invitrogen. Para a reação foi empregado o seguinte protocolo de ciclos: 94 °C por 4 min, 34 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 2 minutos, e 72 °C por 1 minuto no termociclador FTC405. A verificação da amplificação do DNA, com produto esperado de 232 pares de base, foi realizada por eletroforese horizontal em gel de agarose e análise de imagem através do software Bionumerics (Applied Maths, Bélgica). A visualização das bandas de DNA foi realizada em transiluminador. Para a quantificação da extração do DNA foi usado o Kit QubitTM fluorometer, Invitrogen.

Análise estatística (PCR)

Para os dados quantitativos utilizou-se média e desvio padrão (DP). Para dados qualitativos utilizou-se frequência absoluta e percentual. Teste *t* de Student e teste exato de Fisher foram usados quando apropriados, com a ajuda de Graph Pad Prism versão 4. O software WinPepi foi utilizado para calcular o desempenho da PCR. Significância estatística foi assumida quando o valor de P foi menor que 0.05.

Estudo 2 (Enoxaparina)

O experimento foi realizado de acordo com a lei brasileira 11.794/08 e os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo-UPF sob o nº 161/2008.

Animais

Foram estudados 24 camundongos Swiss machos, com 10 semanas de idade, pesando entre 25 g e 38 g, oriundos do biotério da Universidade de Passo Fundo. Os animais ficaram em caixas apropriadas, com consumo de água e ração (Nuvilab®) *ad libitum*.

Obtenção das larvas L3 do *Angiostrongylus costaricensis*

As larvas L3 do *Angiostrongylus costaricensis* foram obtidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados (cepa Santa Rosa, PUCRS). Após 20 dias os caramujos foram sacrificados e os tecidos digeridos em solução de pepsina 0,03% e ácido clorídrico 0,7% por 3h a 37° C.

Drogas

Foi usado enoxaparina (Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) injetável em frascos de 20 mg. A droga foi diluída em água destilada e colocada em seringa de insulina para aplicação por via subcutânea. As doses variaram de 0,16 a 0,25 ml, de acordo ao peso do animal. No grupo placebo foi injetado apenas água destilada. Para sacrificar os animais foi usado por via inalatória o isoflurano (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brasil)

Protocolo

O experimento com animais foi realizado por três pesquisadores (RR,SMP e RFS), sempre no mesmo horário da manhã. No primeiro dia cada animal foi infectado por gavagem oral com 10 L3. Os animais foram separados em grupos de 2 a 5 em gaiolas apropriadas, com acesso livre a alimentos e água. Os animais foram monitorados diariamente para avaliação de dor (pelo arrepiado, tremores e prostração). Cada animal foi pesado semanalmente durante todo o periodo do estudo. As fezes eliminadas durante a manipulação foram observadas para detecção

macroscópica de sangue. No 15^o dia pós infecção (dpi), os animais foram randomizados para receber 40 mg/Kg de enoxaparina ou água destilada por via subcutânea. Eles receberam tratamento até 50 dpi, quando os que sobreviveram foram sacrificados com isoflurano. Todos os animais foram autopsiados para a descrição dos achados de lesões macroscópicas, seguido de fixação dos órgãos torácicos e abdominais em formol a 10%, para análise microscópica.

Avaliação patológica

Os achados macroscópicos foram descritos como segue: (1) lesões intestinais, incluindo infartos, granulações na serosa, abscessos peritoneais e outros sinais de peritonite; (2) infarto esplênico; (3) abscesso da cápsula hepática; (4) congestão e petéquias pulmonares.

Os achados microscópicos foram descritos após a inclusão do material em blocos de parafina e análise de lâminas coradas em HE na microscopia óptica (Axioplan 2 Zeiss, Alemanha). Para esse propósito os intestinos delgado, grosso e mesentério foram enrolados, fixados e emblocados em parafina, método que permite a avaliação microscópica de todo o trato intestinal. Em análises discordantes, foi realizado um consenso entre os observadores.

Análise estatística (enoxaparina)

Os dados estão apresentados como média (\pm desvio padrão ou amplitude) ou do contrário quando especificado. Testes t de Student (paramétrico ou Wilcoxon-Mann-Whitney) foram usados para analisar dados quantitativos de acordo com o padrão normal ou assimétrica de distribuição. Diferenças entre proporções foram

comparadas com teste de qui-quadrado ou exato de Fisher. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Um valor de P menor que 0,05 foi indicativo de significância estatística.

10- RESULTADOS

Estudo 1 (PCR)

Características demográficas e clínicas

A maioria dos pacientes com AA confirmados eram adultos (quartil 25%: 21 anos), e dois terços eram homens (tabela1). Os casos suspeitos também ocorreram em adultos, igualmente entre homens e mulheres. Não houve diferença estatística em relação à idade e sexo entre os casos confirmados e suspeitos. A maioria dos casos de AA (65%) ocorreram no verão e acometeram principalmente o intestino delgado e grosso. A maioria dos casos suspeitos apresentaram comprometimento do apêndice cecal.

Patologia

Dos 20 casos confirmados, 8 foram encontrados no intestino delgado (5 na forma de pseudotumor e 3 infartos), 6 no intestino grosso (todos na forma de pseudotumor), 4 casos na região ileocecal (forma pseudotumoral) e 2 casos se apresentaram como apendicites agudas. A perfuração ocorreu em 3 casos de infartos intestinais. Dos 20 casos suspeitos, 14 eram apendicites agudas, 4 se apresentaram como pseudotumores no cólon e 2 casos de infartos no intestino delgado, sendo que um deles perfurou. Vermes no lumen arterial foram identificados em 13 casos (figura1). Nos 7 casos restantes haviam larvas ou ovos do *Angiostrongylus costaricensis* na luz de capilares ou arteríolas (figura 2). Neste grupo foi registrado ainda arterite eosinofílica, reação granulomatosa e infiltrado eosinofílico. Este último foi intenso em 75% dos casos. Nos casos suspeitos a arterite eosinofílica esteve presente em 75% dos pacientes, a reação granulomatosa foi leve e o infiltrado eosinofílico moderado (intenso em menos de 50%) (figura 3).

Achados da PCR

A amplificação do DNA do *Angiostrongylus costaricensis* foi positiva em áreas contendo vermes, ovos ou larvas em 11 (55%) dos 20 casos confirmados (figura 4): sendo 6 onde haviam vermes e 5 em ovos e larvas. O DNA do parasito também foi encontrado em área de reação granulomatosa de um caso confirmado, onde não haviam estruturas parasitárias. O caso mais antigo, de 1998, foi positivo pela PCR. Nos casos suspeitos a PCR foi positiva em 4 (20%) dos 20 casos, nas áreas de reação granulomatosa ou de infiltrado eosinofílico. Neste grupo o caso positivo mais antigo foi de 2001. A PCR foi negativa nos casos controles e nas outras parasitoses. Quando comparados os casos confirmados de AA com outras parasitoses (tabela2), a técnica da PCR mostrou sensibilidade de (55%), alta especificidade (100%), alto valor preditivo positivo (100%) e valor preditivo negativo intermediário (44%). A taxa de positivos verdadeiros e negativos verdadeiros (acurácia) foi 67%.

Estudo 2 (enoxaparina)

Animais

Dez camundongos (42%) morreram de AA após 36 ± 8 dpi na média. Destes, cinco (50%) foram tratados com enoxaparina e cinco (50%) estavam no grupo placebo. Não houve diferenças entre estes dois grupos em relação a perda de peso (mediana: 1,3 vs. 4,2 g; $P=0,303$) e sangue nas fezes (25% vs. 50%; $P=0,678$). A dor foi igualmente observada entre os grupos enoxaparina e placebo (58% vs. 58%; $P=0,104$), sendo mais frequente em não sobreviventes comparado com os sobreviventes, entretanto, com significância estatística limítrofe (80% vs. 43%; $P=0,068$).

Achados macroscópicos

As lesões foram vistas nos intestinos, baço, fígado e pulmões. As lesões observadas nos intestinos foram: granulações na serosa em 9 camundongos, aderências dos intestinos com a parede abdominal em 8 camundongos (figura 1a), depósito fibrino-purulento na superfície peritoneal em 7, abscesso ileocecal formando pseudotumor em 6 camundongos (figura 1b), Infarto intestinal em 4 animais (figura 1c). Infarto esplênico foi visto em um animal. Depósito fibrino-purulento na cápsula hepática em 3 camundongos, sendo que a pneumonia estava presente em 6 animais. A comparação entre camundongos tratados com enoxaparina e placebo não mostraram diferenças estatísticas em relação aos achados macroscópicos. Entretanto, a comparação entre sobreviventes (n=14) e não sobreviventes (n=10) revelou que os primeiros apresentaram significativamente mais abscesso ileocecal de aspecto pseudotumoral (43% vs. 0%; P=0,023), mais granulações na serosa (57% vs. 10%; P=0,033) e menos depósito fibrino-purulento (7% vs. 60%; P=0,008) na superfície peritoneal, bem como menos infarto intestinal (0% vs. 40%; P=0,019). Os sobreviventes também tiveram menos pneumonia que os não sobreviventes (7% vs. 50%).

Achados microscópicos

Na comparação entre os grupos tratados com enoxaparina e água destilada, não foram encontradas diferenças em relação à morfologia intestinal, como segue: granuloma vascular [mediana (IIQ 25-75%), 2 (1-3) vs. 3 (2-3); P=0,267] (figura 2a), vasculite eosinofílica (75% vs. 100%; P=0,217) (figura 2b), trombose (42% vs. 58%; P=0,414) (figura 2c), necrose intestinal (42% vs. 58%; P=0,414) e infiltrado eosinofílico [mediana (IIQ 25%-75%), 2 (1,5-2) vs. 3 (2-2); P=0,342]. O padrão de

reação granulomatosa característica foi observado na parede intestinal da maioria dos animais (92%), na qual ovos e larvas de *Angiostrongylus costaricensis* ficaram retidos na luz de pequenos vasos, particularmente da submucosa e camada muscular (figura 2d). As lesões pulmonares foram similares entre os camundongos tratados com enoxaparina e placebo, como pneumonia e reação granulomatosa. Ovos e larvas de *Angiostrongylus costaricensis* foram encontrados em 42% dos animais em ambos os grupos, como mostra a figura 2a. A esplenite foi observada na maioria dos camundongos tratados, tanto com enoxaparina (75%) como placebo (83%). Ovos e larvas foram encontrados no baço de dois animais tratados com enoxaparina. As lesões hepáticas de ambos os grupos estavam representados por: reação granulomatosa (58% vs. 92%; $P=0,666$), infiltrado eosinofílico (92% vs. 92%; $P=0,999$) e hepatite reacional (83% vs. 100%; $P=0,478$). Ovos e larvas de *Angiostrongylus costaricensis* foram encontrados em nove animais (75%) de cada grupo. Foram achados incomuns os abscessos (7% em cada grupo) e infarto hepático (25% vs. 17%; $P=0,999$). A comparação entre não sobreviventes e sobreviventes revelou que os primeiros tiveram mais pneumonia (90% vs. 21%; $P= 0,002$), mais infarto intestinal (40% vs. 0%; $P=0,02$) e mais peritonite purulenta (60% vs. 7%; $P=0,008$) que os sobreviventes.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas nos casos humanos confirmados e suspeitos de AA

	Casos confirmados	Casos suspeitos	P
	(n = 20)	(n = 20)	
Idade em anos, média ± SD	38.8 ± 18.5	36.8 ± 13.4	0.371
Mulheres n (%)	7 (35)	11 (55)	0.203
Estação do ano, n (%)			0.203
Verão	13	9	
Outras*	7	11	
Localização anatômica			0.0002
Intestino delgado e/ou grosso	18	6	
Apêndice cecal	2	14	

*Outono, inverno e primavera

Tabela 2. Resultado da PCR em casos humanos confirmados (n = 20) comparado com outras parasitoses (n = 7).

Parâmetro	Desempenho
	% (0.95 IC)
Sensibilidade	55 (34-74)
Especificidade	100 (65-100)
Valor preditivo positivo	100 (72-100)
Valor preditivo negativo	44 (23-66)
Acurácia	67

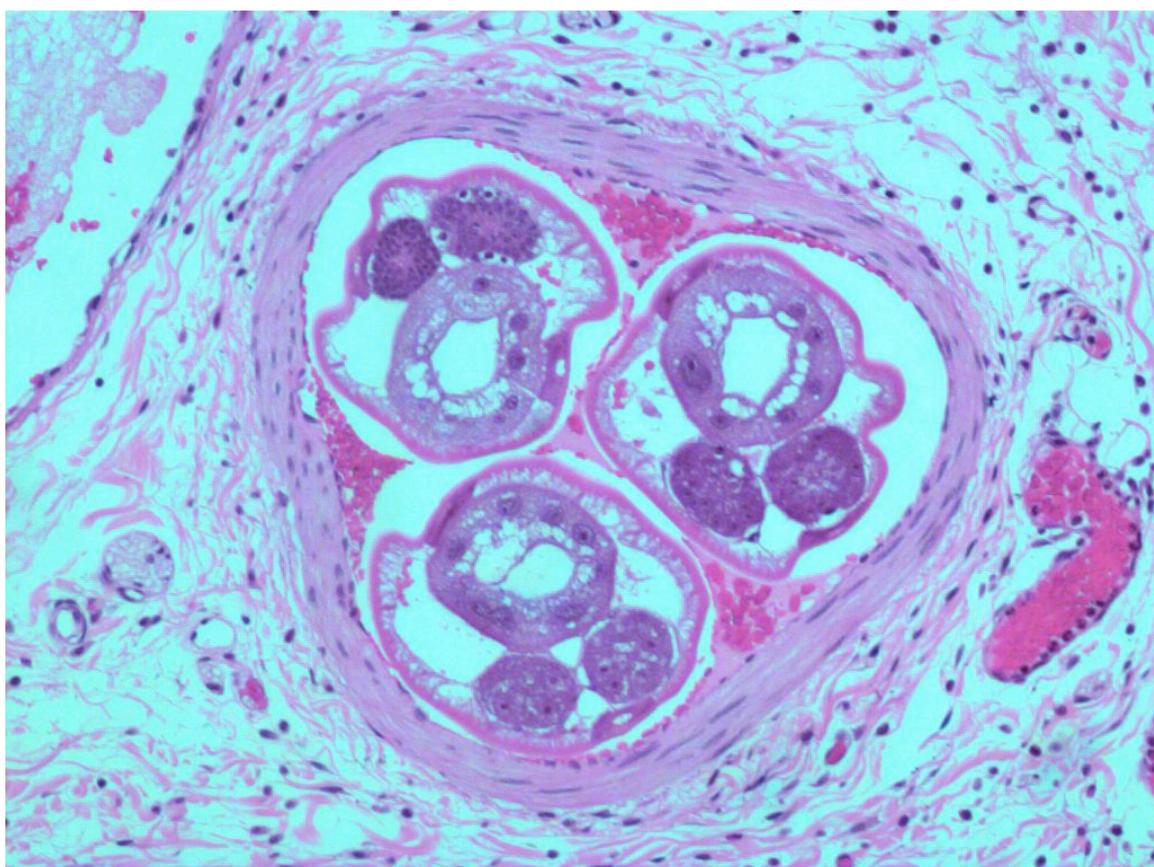


Figura 1. Caso confirmado com verme do *Angiostrongylus costaricensis* na luz da artéria mesentérica (HE 200X).

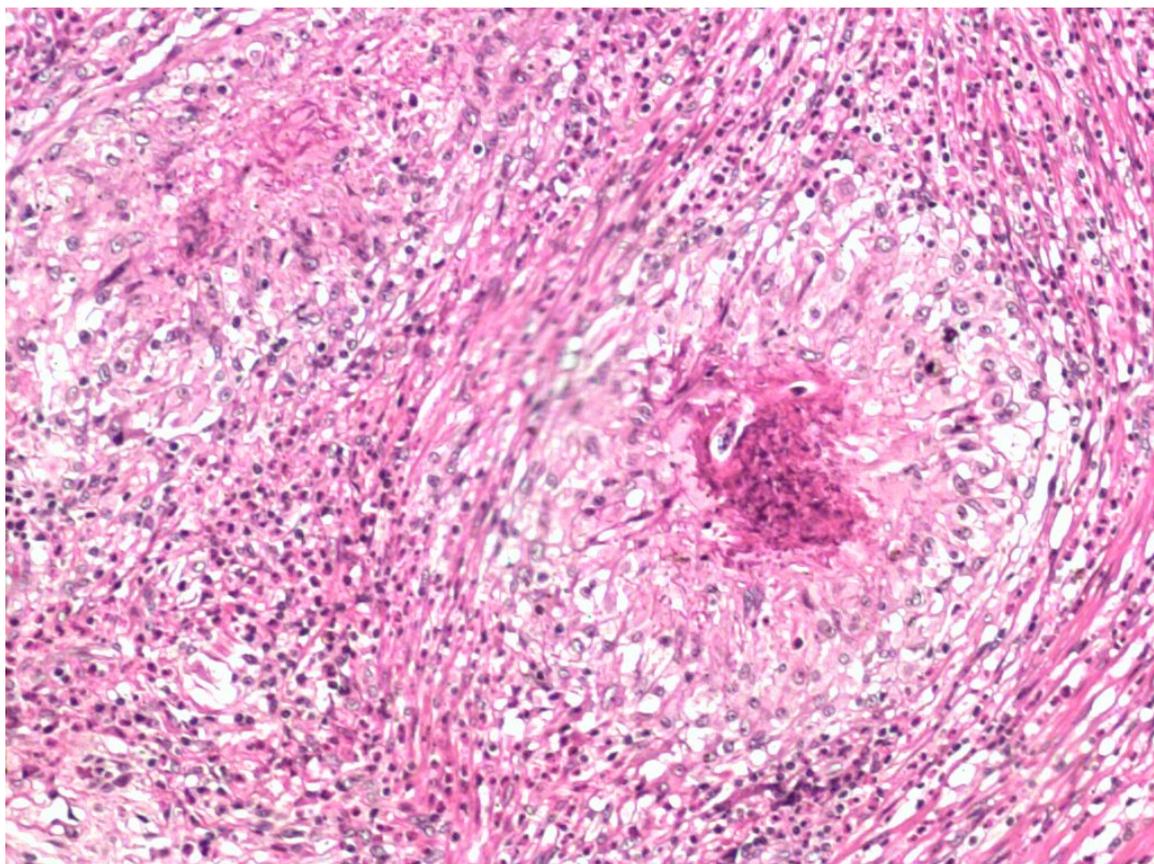


Figura 2. Larva de *Angiostrongylus costaricensis* no centro de um granuloma de caso confirmado (HE 100X).

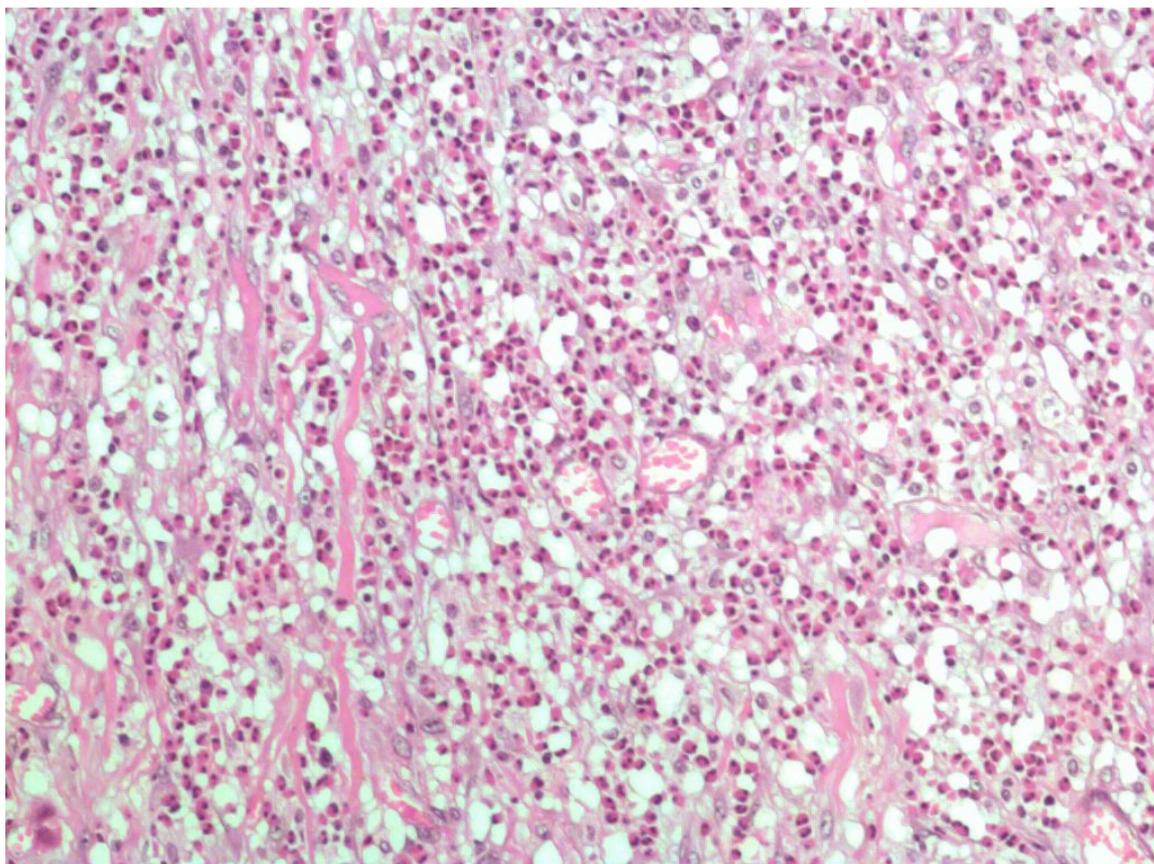


Figura 3. Intenso infiltrado eosinofílico na parede intestinal (HE 200X).

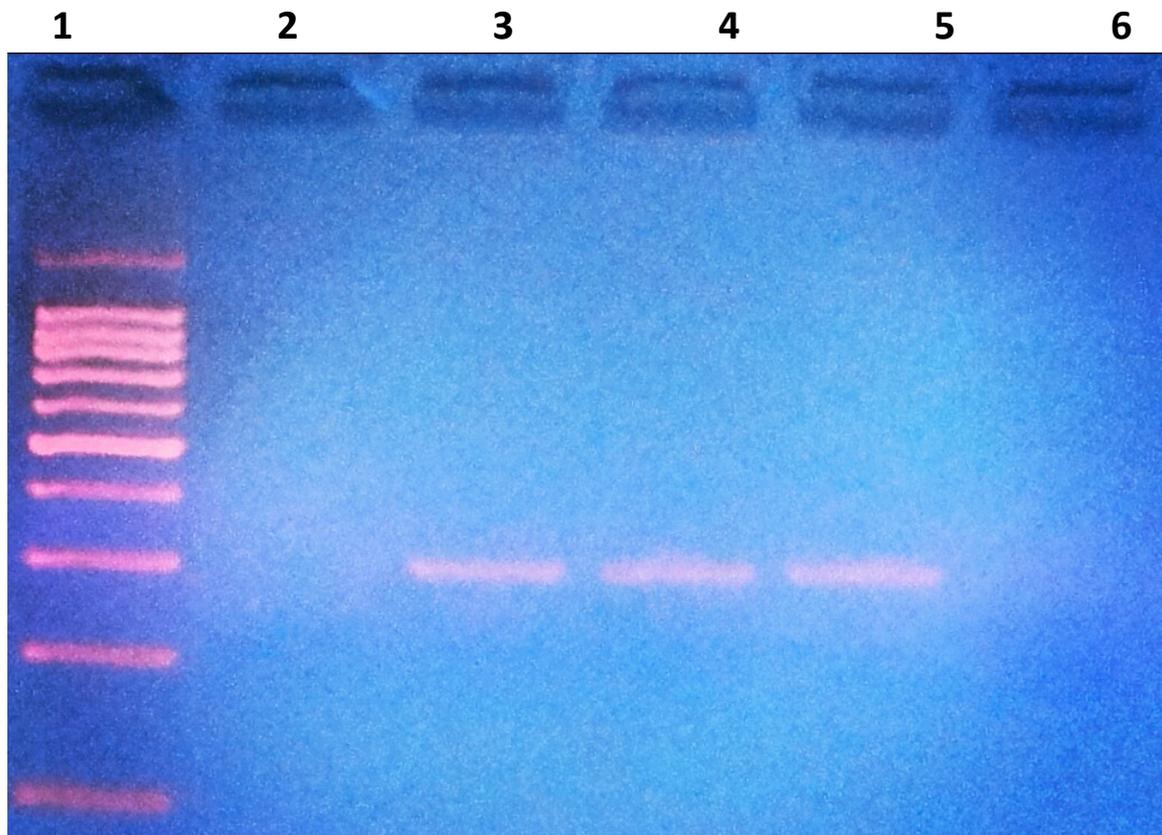


Figura 4. Amplificação do DNA de *Angistrongylus costaricensis* no lumen da artéria mesentérica: 1-Marcador molecular; 2-Controle negativo no intestino grosso; 3-Controle positivo no verme; 4- Positividade em área granulomatosa; 5-Positividade em verme; 6-MIX.

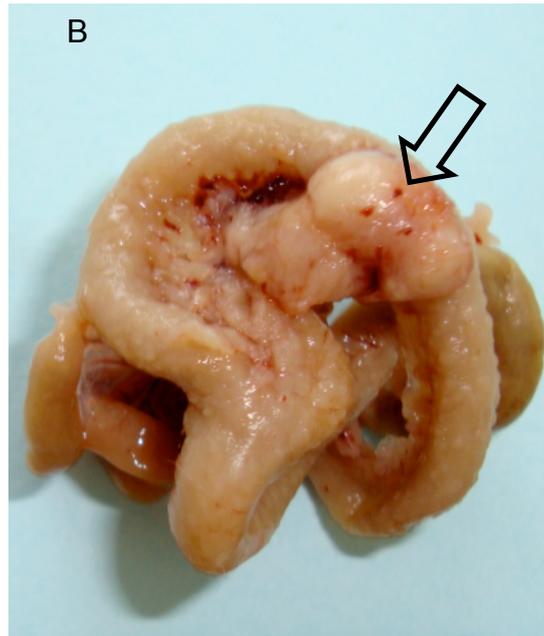
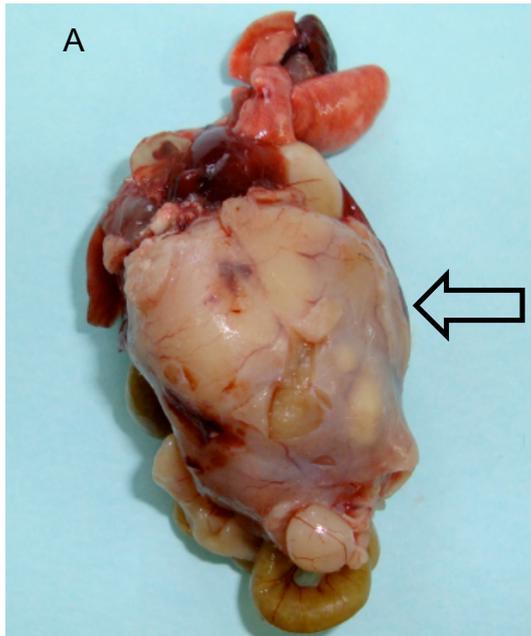


Figura 5. Achados macroscópicos: A) aderências dos intestinos à parede abdominal anterior (seta); B) abscesso na região ileocecal formando aspecto pseudotumoral (seta); C) infarto intestinal (seta).

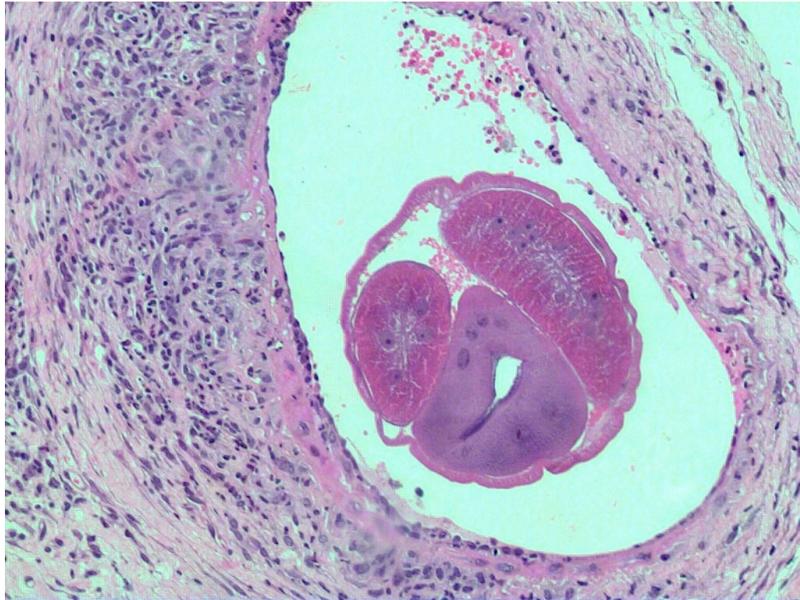


Figura 6: Reação granulomatosa na periferia e parede de arteria mesentérica, com verme do *Angiostrongylus*

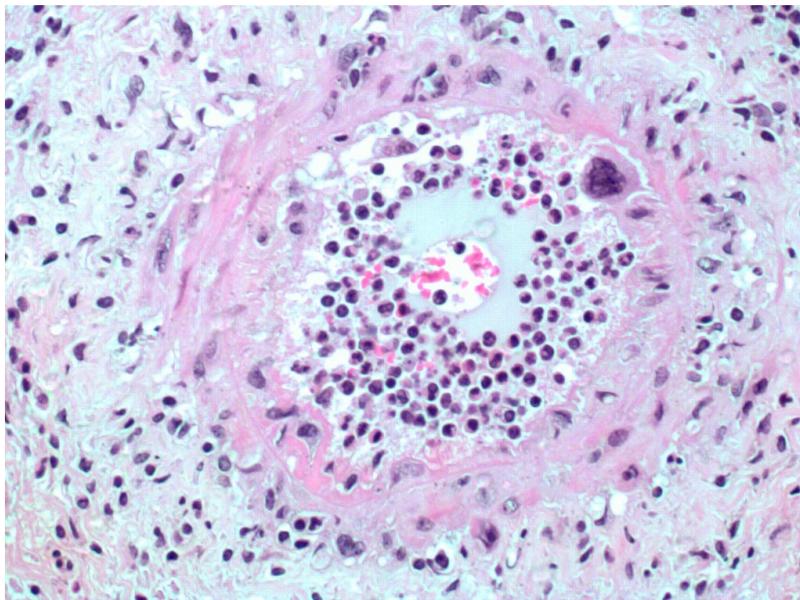


Figura 7: Vasculite com infiltrado eosinofílico na parede arterial.

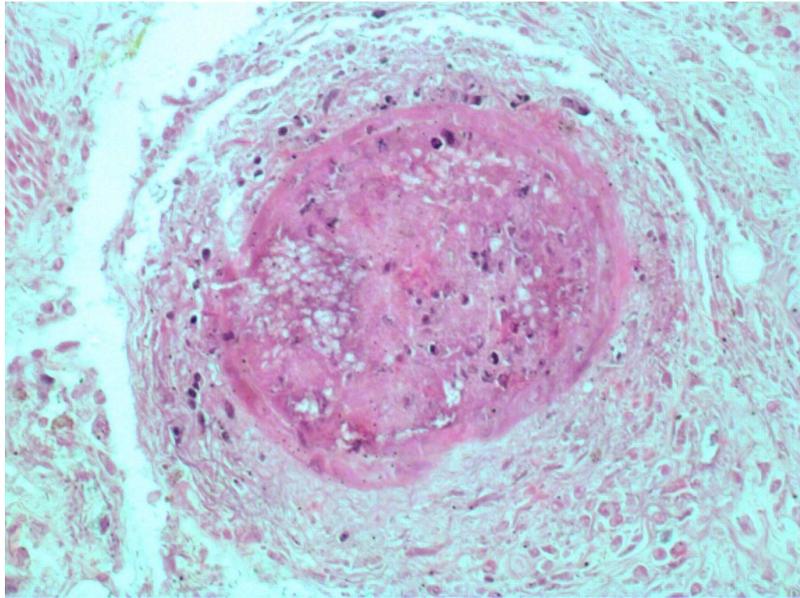


Figura 8: Artéria mesentérica de médio calibre com trombo obstruindo completamente a luz.

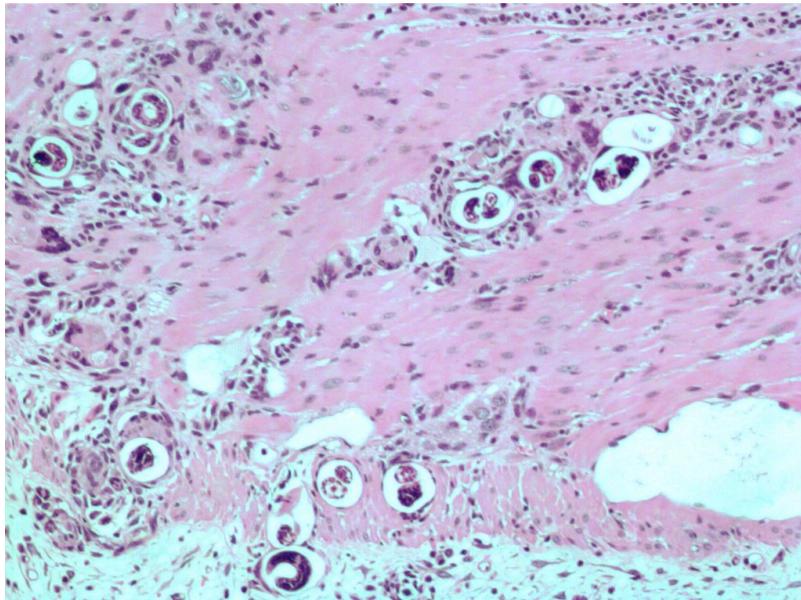


Figura 9: Reação granulomatosa no trajeto de pequenos vasos onde há ovos e larvas do *Angiostrongylus costaricensis*.

11- DISCUSSÃO

Estudo 1 (PCR)

O diagnóstico de AA costuma ser difícil, tanto pelo reduzido número de parasitos nas peças cirúrgicas, quanto pela escassez de patologistas que conhecem a doença. Seu diagnóstico definitivo baseia-se na identificação de estruturas parasitárias, como vermes, larvas e ovos nas amostras de tecido com AA. Esse processo demanda tempo e custos em função do grande número de cortes histológicos necessários para o diagnóstico. Na ausência de estruturas parasitárias, o diagnóstico de suspeita de AA pode ser assumido na presença de lesões intestinais sugestivas, como infiltrado eosinofílico intenso, reação granulomatosa e vasculite eosinofílica (Graeff-Teixeira et al. 1991). No entanto, estas características não são patognomônicas de AA e têm sido descritas em pacientes com outras parasitoses ou mesmo condições não parasitárias como doença de Crohn, gastroenterite eosinofílica e granulomatose de Wegener (Lazarev et al. 2013; Pagnoux et al. 2005). Como consequência, novos métodos de identificação do *Angiostrongylus costaricensis* são necessários para auxiliar no diagnóstico de AA.

Nesta grande série de pacientes com AA tratados com cirurgia, os achados principais foram: (1) A técnica de PCR usando iniciadores de *Angiostrongylus cantonensis* foi capaz de identificar material genético do parasito em tecidos de casos humanos de AA, preservados em blocos de parafina, incluindo amostras conservadas por mais de 10 anos desde a cirurgia; (2) Embora sua sensibilidade tenha sido intermediária (55%) na identificação da doença, a PCR apresentou ótima especificidade (100%), considerando-se que nenhum caso de controles negativos e de outras parasitoses resultou em teste falso-positivo; e (3) Apesar da ausência de

estruturas parasitárias ao estudo histológico de casos suspeitos, a PCR foi positiva em 20% deles, reduzindo o índice de resultados falsos-negativos da histologia.

A técnica de PCR aqui utilizada empregou duas sequências de DNA do gênero *Angiostrongylus* para confirmação de AA em casos humanos. Tais sequências foram previamente descritas em nosso laboratório (da Silva et al. 2003) e recentemente testadas com sucesso na identificação de *Angiostrongylus* em líquido de casos com meningite eosinofílica relacionados a *Angiostrongylus cantonensis* (Eamsobhana et al. 2013). Embora estas duas sequências de DNA tenham sido capazes de identificar casos acometidos tanto por *Angiostrongylus cantonensis* quanto por *Angiostrongylus costaricensis*, estudos adicionais são necessários para o sequenciamento específico das espécies de *Angiostrongylus*, com o intuito de melhorar a acurácia diagnóstica da PCR na AA. Contudo, tal limitação não invalida a utilização da PCR no cenário clínico, uma vez que manifestações anátomo-clínicas específicas para AA e meningite eosinofílica ditam o diagnóstico diferencial.

A PCR possibilitou a identificação de DNA parasitário mesmo em amostras teciduais antigas, apesar da possível degradação sofrida pelos tecidos ao longo de anos de armazenamento. Este achado levanta a possibilidade da revisão diagnóstica de casos antigos eventualmente armazenados em bancos de dados de serviços de patologia (Guerrero et al. 1997). Com base nisso, é possível especular que o desempenho da PCR seria superior ao descrito neste estudo, quando testado prospectivamente em amostras de tecidos recém processadas na rotina de serviços de patologia. Ainda assim, casos de PCR negativa em tecidos com diagnóstico histológico firmado de AA deverão ocorrer como encontrado neste estudo, sem uma explicação plausível no momento atual do nosso conhecimento. Um tempo prolongado de fixação poderia ser um contribuinte para esta falha diagnóstica, como

já sugerido na literatura (Macabeo et al. 2002). A PCR mostrou uma sensibilidade intermediária e uma ótima especificidade para a detecção de DNA do *Angiostrongylus* nos casos confirmados. Na prática clínica, isso significa que a PCR será particularmente útil quando seu resultado for positivo, dada sua alta especificidade e, por conseguinte, baixa probabilidade de falso positivo. Além disso, a PCR foi capaz de modificar o diagnóstico e confirmar a presença de AA em 20 % dos casos suspeitos. A dificuldade em identificar estruturas parasitárias pela histologia nos casos suspeitos pode dever-se a intensa destruição de vermes, larvas e ovos de *Angiostrongylus costaricensis* em decorrência de exuberante resposta imunológica (de Azevedo et al. 2011). Ainda assim, um patologista atento deve manter um nível de suspeição quanto a possibilidade de AA após resultados histológicos negativos na presença de quadro clínico e laboratorial suspeitos. Estudos adicionais são necessários para confirmar o desempenho diagnóstico da PCR nos casos suspeitos.

Na nossa série, casos confirmados de AA ocorreram predominantemente em homens adultos, em contraste com séries da Costa Rica, onde crianças representaram a maioria dos pacientes (Lobo Sanahuja et al. 1987). Observamos concentração de casos nas estações quentes do ano, particularmente no verão. Esta observação provavelmente resulta de uma maior atividade dos moluscos durante estações quentes e úmidas (Graeff-Teixeira et al. 1991), aumentando o risco de transmissão da doença para seres humanos. Finalmente a maioria dos casos da nossa série apresentaram lesões em intestino delgado e/ou intestino grosso, especialmente na forma pseudotumoral. Esta é caracterizada por intenso infiltrado eosinofílico transmural, acompanhado de reação granulomatosa perivascular, eventualmente com retenção de estruturas parasitárias tais como ovos e larvas (Rodriguez R. et al. 2011). Curiosamente, casos de perfuração foram restritos a pacientes com lesões em intestino

delgado, como já descrito por Graeff-Teixeira (1991), enquanto que um número reduzido de casos se manifestou como apendicite aguda. Estes achados anatomopatológicos diferem daqueles de casos suspeitos, nos quais a apendicite aguda foi a forma predominante de apresentação.

Estudo 2 (enoxaparina)

AA é uma doença para a qual não há tratamento específico. Considerando-se que a trombose mesentérica secundária ao *Angiostrongylus costaricensis* provavelmente participe da patogênese da AA, o uso de agentes anti-trombóticos torna-se uma abordagem potencial. Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da enoxaparina na sobrevida e na apresentação histopatológica em camundongos com AA.

Os principais achados do nosso estudo foram: (1) os índices de sobrevida não diferiram entre camundongos tratados com doses profiláticas de enoxaparina ou placebo; (2) as características macro e microscópicas foram similares na comparação destes grupos de tratamento; e (3) em análise separada de camundongos sobreviventes e não sobreviventes, um número maior de animais deste grupo apresentou infartos intestinais e complicações sépticas, incluindo pneumonia e peritonite purulenta.

Pelo que se sabe, este é o primeiro estudo avaliando o efeito de um agente anti-trombótico na AA. A razão para seu uso é a ocorrência de eventos tromboembólicos na patogênese da doença, o que pode resultar em infarto intestinal, uma grande causa de morbidade relacionada a AA (Graeff-Teixeira et al. 1991; Waisberg et al.1999). No entanto, o uso de enoxaparina em doses profiláticas não mostrou benefício no presente estudo, tanto para mortalidade quanto para prevenção de lesões teciduais. A ausência de benefício poderia ser em parte explicada pela dose

insuficiente de enoxaparina ou pelo reduzido tamanho amostral, caracterizando o erro tipo II.

As características macroscópicas foram semelhantes entre camundongos tratados com enoxaparina e placebo. Lesões abdominais incluíram granulações serosas, aderências do intestino com a parede abdominal, depósito fibrinopurulento e abscessos íleo-cecais do tipo pseudotumor. Foi notória a escassez de infartos intestinais nos animais estudados. De acordo com a literatura e na experiência clínica, achados macroscópicos em humanos com AA usualmente limitam-se a lesões pseudotumorais e isquêmica congestiva (Graeff-Teixeira et al. 1991; Rodriguez R. et al. 2008). Os achados peculiares aos camundongos como intenso envolvimento peritoneal resultando em aderências e depósito fibrino-purulento merecem estudos adicionais para elucidação.

Achados microscópicos também não diferiram entre os grupos enoxaparina e placebo. Os animais tratados com estes esquemas apresentaram características semelhantes, incluindo granuloma vascular, vasculite eosinofílica, trombose, necrose intestinal e infiltrado eosinofílico. Cabe ressaltar que a maioria dos animais apresentaram lesões vasculares caracterizadas por vasculite eosinofílica e granuloma, particularmente em locais de retenção de ovos e larvas. Tais achados foram encontrados principalmente na submucosa e camada muscular da parede intestinal, seguindo o trajeto de arteríolas e capilares (Rodriguez R. 1997). Podemos especular que a vasculite e a formação de granuloma possam culminar em oclusão vascular e isquemia tecidual ao invés de eventos trombóticos. Estudos adicionais são necessários para determinar a importância destas reações inflamatórias na patogênese da AA.

Nós realizamos uma análise separada dos camundongos de acordo com sua sobrevivência, independente do tratamento recebido. Assim, não sobreviventes

apresentaram mais infarto intestinal e complicações sépticas comparados aos sobreviventes, ou seja, os animais acometidos de AA que foram sacrificados ao final do estudo. Uma possível explicação para estes resultados é relacionada com achados de um estudo recente mostrando uma correlação entre sobrevida e eliminação de L1 nas fezes de camundongos infectados com *A. costaricensis* (de Azevedo et al. 2010). Tal correlação sugere um fenômeno de tolerância entre o hospedeiro e o parasito, indicando que quanto menor a inflamação vascular, maior a quantidade de L1 eliminadas, e maior a sobrevida.

12- CONCLUSÕES

A angiostrongilíase abdominal é uma doença que no Brasil tem uma prevalência maior no Rio Grande do Sul e até o momento sem tratamento específico e o seu diagnóstico é dependente da experiência do patologista. Neste trabalho foi utilizado a técnica da PCR para auxiliar no diagnóstico, além de testar o tratamento anticoagulante com enoxaparina em camundongos, com o objetivo de prevenir trombozes causados pelo parasito e assim impedir a formação de trombos, infartos, perfurações, peritonites, sepse e óbitos.

A PCR em bloco parafinado é uma técnica que apresenta dificuldades devido ao tempo de fixação, tipo de fixador, tempo de estoque do bloco, retirada de excesso de parafina do tecido e quantidade de DNA na amostra. A possibilidade de utilização da PCR em material fixado em formol e emblocado em parafina poderá auxiliar o patologista no diagnóstico definitivo desta parasitose, em especial nos casos em que as estruturas parasitárias estão degeneradas ou quando identificam-se apenas estruturas granulomatosas, vasculites eosinofílicas e infiltrado eosinofílico.

A inexistência de tratamento para esta parasitose nos levou a tentar uma abordagem diferente. Uma das formas de apresentação da AA é a congestiva-isquêmica, onde são identificados trombozes arteriais, que levam ao infarto intestinal e até mesmo perfuração. O uso de enoxaparina em dose profilática não preveniu o óbito em camundongos com AA, comparando com placebo. Em teoria, isso pode ser devido à dose profilática de anticoagulante utilizada ou porque a vasculite e granulomas perivasculares poderiam ter um papel relevante na patogênese da isquemia.

Concluindo, neste estudo utilizamos a PCR para a identificação molecular do *Angiostrongylus* em uma série de casos humanos com AA tratados cirurgicamente. Esta técnica diagnóstica mostrou resultado positivo tanto nos locais com estruturas parasitárias (ovos, larvas ou vermes) quanto nas áreas com reação granulomatosa. O sucesso da PCR aqui relatado aponta a necessidade de novas pesquisas para estabelecer o desempenho da técnica em um estudo prospectivo na rotina de laboratórios de patologia.

O uso de enoxaparina não teve efeito na sobrevida ou padrão anatomo-patológico em camundongos com AA. Não houve diferenças entre os camundongos tratados com dose profilática de enoxaprina ou placebo. Deve-se ter cuidado na interpretação desses dados considerando-se que o estudo foi realizado em modelo experimental e com dose profilática. Um achado interessante foi a sepse como causa principal do óbito dos camundongos, levantando a hipótese que o diagnóstico precoce e o tratamento da sepse na AA possam ser alvo de pesquisas futuras.

13- REFERÊNCIAS

1. AGOSTINI, A.A.; MARCOLAN, A.M.; LISOT, J.M.C. & LISOT, J.U.F. Angiostrongilíase abdominal, estudo anátomo patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 79(4):443-445, 1984.
2. AYALA, M.A.R. Angiostrongiloidíase abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82:29-36, 1987.
3. BOHRER, MM.; DALLEGRAVE, E.; AGOSTINI, AA.; GRAEFF-TEIXEIRA, C Phenantroline, lovastatin, and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis* , Parasitol Res 100: 379-382, 2007.
4. CÉSPEDES, R.; SALAS, J.; MEKBEL, S.; TROPER, L.; MÚLLNER, F.; MORERA, P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilídeo (strongylata.). Acta méd . costaric., 10(3):235-255, 1967.
5. CHURG, A.; CHURG, J. Sistemic vasculitides: Igaku - Shoin, 1991.
6. da SILVA, A.C.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ZAHA, A.; Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 45:295-7. 2003.
7. de AZEVEDO, G.V.; RODRIGUEZ, R.; PORTO, S.M.; et al. Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. Parasitol Res; 108:537-40,2011.
8. EAMSOBHANA, P.; WANACHIWANAWIN, D.; DECHKUM, N. et al. Molecular diagnosis of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) by polymerase chain reaction-DNA sequencing of cerebrospinal fluids of patients. Mem Inst Oswaldo Cruz; 108:116-8, 2013.
9. FANTE, A.C.; DIETERISH, S. & RODRIGUEZ, R. Betametasona e extrato acuoso de *arctium lappa* no tratamento da angiostrongilíase. Rev. Soc. brs. Med. Trop. 41(6):654-657. 2008.
10. GUERRERO, R.B.; BATTS, K.P.; BRANDHAGEN, D.J. et al. Effects of formalin fixation and prolonged block storage on detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. Diagn Mol Pathol; 6:277-81. 1997.
11. GRAEFF-TEIXEIRA, C. Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil. Rio de Janeiro, 1986. 137p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- 12.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L. & LENZI, H.L. Abdominal angiostrongyliasis: an underdiagnosed disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82 (suppl.4): 353-354. 1987.
- 13.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOME, J.W.; PINTO, S.C.C.; CAMILLO-COURA, L. & LENZI, H.L. Phyllocaulis variegatus: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, 84:65-68. 1989.
- 14.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AVILA-PIRES, F.D.; MACHADO, R.C.C.; CAMILLO- COURA, L. & LENZI, H.L. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil .Rev. Inst.Med.trop.S.Paulo, 32:147-150. 1990.
- 15.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L. & LENZI, H.L. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in Southern Brazil. Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo,33:373-378. 1991.
- 16.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L. & LENZI, H.L. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. Parasit. Res., 77:606-611. 1991.
- 17.GRAEFF-TEIXEIRA, C., GOULART, A.H.; BRUM, C.O. et al. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. Rev Soc Bras Med Trop; 38(4):310-5. 2005.
- 18.GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AGOSTINI, A.A. & RODRIGUEZ,R. Angiostrongilíase abdominal. In: Tavares, W. & Marinho, L.A.C,ed. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. São Paulo, Aheneu. p.98-101. 2007
- 19.IABUKI, K. & MONTENEGRO, M.R. Apendicite por *Angiostrongylus costaricensis*.Apresentação de um caso. Rev. Inst. Med. trop.S. Paulo.,21:33-36. 1979.
- 20.LAZAREV, M.; HUANG, C.; BITTON, A. et al. Relationship between proximal Crohn's disease location and disease behavior and surgery: a cross-sectional study of the IBD Genetics Consortium. Am J Gastroenterol;108:106-12. 2013.
- 21.LOBO-SANAHUJA, F.; LORIA-CORTES, R. & GONZALEZ, G. Angiostrongilosis abdominal. Aspectos clínicos, tratamento y revisión de literatura.Bol.méd.Hosp.infant.(Méx.),44:4-9. 1987.
- 22.LORIA-CORTES, R. & LOBO-SANAHUJA, J.F. Clinical abdominal angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Amer.J.trop.Med.Hyg.,29:538-544. 1980.

23. MACABEO-ONG, M.; GINZINGER, D.G.; DEKKER, N. et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol*;15:979-87. 2002.
24. MENTZ, J.P.; DALVESCO, J.A.; AGOSTINI, A.A.; BONADEO, N.M. Manifestações de comprometimento hepático na angiostrongilíase abdominal e diagnóstico pelo encontro dos ovos do parasita. *Rev. AMRIGS*,37(4):289-290. 1993
25. MENTZ, MB; GRAEFF-TEIXEIRA, C. - Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. *Rev. Med. Trop. S. Paulo*, 45(4): 179-184. 2003.
26. MORERA, P. & CESPEDES, R. *Angiostrongylus costaricensis* n.sp. (Nematoda:Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev. Biol. trop.*.(S. José) 18:173-185,1970.
27. MORERA, P.; LAZO, R.; URQUIZO, J. & LLAGUNO, M. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971 in Ecuador. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*,32:1460-1461, 1983.
28. MORERA, P. & BONTEMPO, I. Accion de algunos antihelminticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños Costa Rica*, 20:165-174, 1985.
29. MOTA, E.M.; LENZI, H.L. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 90:707-709, 1995.
30. MOUSA ,SA. Heparin and low molecular weight in thrombosis, cancer and inflammatory diseases. *Methods Mol Med* 2004;93:35-48.
31. PAGNOUX, C.; MAHR, A.; COHEN, P. et al. Presentation and outcome of gastrointestinal involvement in systemic necrotizing vasculitides: analysis of 62 patients with polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, or rheumatoid arthritis-associated vasculitis. *Medicine (Baltimore)*;84:115-28. 2005
32. PENA, G.P.M.; ANDRADE FILHO, J.S.; ASSIS, S.C. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 37:369-374, 1995.
33. ROCHA, A.; MOSCARDINI SOBRINHO, J. & SALOMÃO, E.C. Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 24:265-268, 1991.
34. RODRIGUEZ, R. Anatomia patológica da angiostrongilíase abdominal. Rio de Janeiro, 1997. Dissertação de mestrado- Universidade Federal Fluminense.

35. RODRIGUEZ, R.; AGOSTINI, A.A.; PORTO, M.S.; et al. Dogs may be a reservoir for *Angiostrongylus costaricensis*. Rev. Soc. bras. Med. Trop., 44(I): 45-310. 2002.
36. RODRIGUEZ, R.; DEQUI, M.R.; PERUZZO, L.; MESQUITA, M.P.; GARCIA, E. & FORNARI, F. Abdominal angiostrongyliasis: Report of two cases with different clinical presentations. Rev. Soc. bras. Med. Trop., 50(6): 339-341. 2008.
37. RODRIGUEZ, R.; PORTO, S.M.; Dos SANTOS FERRARI, R. et al. Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. Parasitol Res; 109:787-92. 2011.
38. RUIZ, P.J. & MORERA, P. Spermatic artery obstruction caused by *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. Amer. J. trop. Med. Hyg., 32:1458-1459, 1983.
39. SIERRA, E. & MORERA, P. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). Acta méd. costarric., 15:95-99, 1972.
40. SILVA, A.C.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ZAHA, A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 45(5): 295-297. 2003
41. UBELAKER, J.E. & HALL, N.M. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes 1971 in the United States. J. Parasit., 65:307, 1979.
42. VAZQUEZ, J.J.; BOILS, P. L.; SOLA, J.J.; CARBONEL, F.; de-JUAN-BURGUENO, M.; GINER, V.; BERENGUER - LAPUERTA, J. Angiostrongyliase in a European patient: a rare case of gangrenous ischemic enterocolitis. gastroenterology., 105(5): 1544-9, 1993.
43. VELASQUEZ, J.Z.; BAQUEDANO, W.R.; PEREZ, A.R. & FLORES, M.B. Angiostrongilosis costaricensis. Primeros casos mexicanos. Rev. Invest. clin., 26:389-394, 1974.
44. VOLKENANDT, M.; DICKER, A.P.; FANIN, R.; et al. Polymerase chain reaction analysis of DNA from paraffin-embedded tissue. Methods Mol Biol; 15:81-8. 1993.
45. WAIBERG, J.; CORSI, C.E.; REBELO, M.V.; VIEIRA, V.T.; BROMBERG, S.H.; dos SANTOS, P.A.; MONTEIRO, R. Jejunal perforation caused by abdominal angiostrongyliasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 41: 325-328. 1999.
46. ZUCARO, A.M.; ZANI, R.; AYMORÉ, I.L. Abdominal angiostrongyliasis: Report of a potential autochthonous case from Rio de Janeiro. Arq. Gastroenterol. 35(1): 54-61. 1998

14- Anexo I

PCR for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis in formalin-fixed paraffin-embedded human tissue

Rubens Rodriguez^{1,2}; Ana Cristina Aramburú da Silva³, Carla Aristonara Müller³, Silvana Lunardini Alves³, Carlos Graeff-Teixeira³, Fernando Fornari^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS; ²Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS; ³Laboratórios de Biologia Parasitária e Parasitologia Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

Corresponding author: Rubens Rodriguez, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, 90035-001, Porto Alegre-RS, Tel/Fax: 55.51.33085616, e-mail: rubens.rodriques@terra.com.br

Short title: PCR for diagnosis of abdominal angiostrongyliasis

ABSTRACT

Background: The diagnosis of abdominal angiostrongyliasis (AA) depends on the histological identification of *Angiostrongylus costaricensis* (AC) structures in surgical specimens. However, microscopic evaluation is time consuming, observer dependent, and often fails in identifying the parasite. The polymerase chain reaction (PCR) technique might help in the diagnosis of AA by identifying parasite DNA in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. **Methods:** We employed PCR technique using primers based on DNA from *Angiostrongylus cantonensis*. Four groups of FFPE intestinal tissue from surgically treated patients were tested with PCR: (1) confirmed cases (n = 20), in which AC structures were present in the target tissue; (2) presumptive cases (n = 20), containing eosinophilic infiltrates and/or granulomatous reaction in the absence of AC structures; (3) negative controls (n = 3), consisting of normal colonic tissue surrounding resected colonic adenocarcinoma; and (4) tissue affected by other parasitosis (n = 7), including strongiloidiasis, ascariasis, schistosomiasis, and enterobiasis. **Results:** Most lesions of confirmed cases were located in small and/or large bowel (90%), as compared with presumptive cases, in which 70% of lesions were in the appendix (P = 0.0002). When confronted with cases of other parasitosis (n = 7), PCR showed sensitivity of 55%, specificity of 100% and positive predictive value of 100% for confirmation of AA. In presumptive cases (n = 20), PCR was positive in 4 (20%). All specimens from negative controls and other parasitosis were negative. **Conclusions:** The PCR technique showed intermediate sensitivity and optimal specificity, being clinically relevant when positive for abdominal angiostrongyliasis. There was a 20% gain in the diagnosis of presumptive cases. PCR might help in the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis, particularly in the setting of non-experienced pathologists.

Kew words: Abdominal angiostrongyliasis, PCR, *Angiostrongylus costaricensis*, formalin-fixed paraffin block

INTRODUCTION

Angiostrongylus costaricensis is an intra-arterial nematode harboring wild rodents as a definitive host, and mollusks as intermediate hosts ¹. Human infection may be accompanied by a clinical entity named abdominal angiostrongyliasis (AA). Several cases have been reported in the Americas ², particularly in southernmost State of Brazil ^{3,4}.

A definitive diagnosis of AA is made from surgical specimens in the pathological examination. For microscopic analysis it is necessary to include the specimens in paraffin block, attempting to find parasitic forms, which demands multiple histological sections and examiner expertise. However, in most cases the finding of parasitic structures such as worms, larvae and eggs is difficult, addressing to presumptive or misdiagnosis ³. The presumptive diagnosis is made in the presence of severe eosinophilic infiltration, granulomatous reaction and eosinophilic vasculitis ³.

Immunodiagnostic tests in serum have been developed for humans, but show limitations due to cross-reaction with other parasite-related antibodies⁵. Detection of nucleic acids amplified by polymerase chain reaction (PCR) in serum was recently tested in a series of patients with AA. In paraffin block from animal and human cases, PCR has been shown to be useful for identification of other parasitosis, such as *Ascaris* sp ⁶, *Trypanosoma cruzi* ⁷, *Neospora caninum* ⁸, and *Leishmania* spp ⁹. However, the utility of PCR for identification of *Angiostrongylus costaricensis* in paraffin block from surgical specimens is unknown ^{10, 11}. We therefore designed this

study to assess whether PCR can identify *A. costaricensis* DNA in paraffin block of human cases with AA.

METHODS

This study was conducted according with rules of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethical Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil (protocol nº 10/00174).

We used formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from 4 groups of patients: confirmed cases of AA (n = 20), presumptive cases of AA (n = 20), negative controls (n = 3), and cases with other parasitic diseases (n = 6). All samples were obtained from an archive of FFPE tissue, corresponding to the period between 1996 and 2012. Confirmed cases contained structures of *Angiostrongylus costaricensis* located in intestinal tissue, including worms, eggs and larvae. After identification of a parasitic structure in a standard staining section, a block of paraffin (5 x 5 x 5 mm) was cut with a scalpel, containing a minimum amount of paraffin and tissue with the target structure. Presumptive cases presented histological findings suggestive of AA, i.e. eosinophilic infiltration, granulomatous reaction and eosinophilic vasculitis, in the absence of parasitic structures. They were prepared as confirmed cases, considering eosinophilic infiltrates, vasculitis and granulomas as targets for PCR. Negative controls corresponded to normal colonic tissue obtained from surgical specimens of patients with adenocarcinoma, whereas cases with other parasitosis were patients incidentally treated with surgery, harboring *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma mansoni* and *Ascaris lumbricoides*. FFPE tissue from these patients was prepared as described for confirmed and presumptive cases. However, they contained parasitic structures as target. We also analyzed demographic and clinical features taken from medical records, as well as gross and histological findings. Eosinophilic infiltration and granulomatous reaction were both graded as mild, moderate and severe.

PCR

DNA of *Angiostrongylus costaricensis* was extracted from FFPE tissue with sections of 10 μm of thickness. This procedure was repeated three times, generating 3 subsamples for each case. A number of sections were conditioned in xylene for deparaffinization, in such way that approximately 25 mg of tissue were obtained. It was centrifuged and washed twice with 100% ethanol, and dried at room temperature. DNeasy Tissue kit (Qiagen) was employed for DNA extraction. The primers were designed based on published sequences from mRNA of *Angiostrongylus cantonensis* (Genbank, U17585). The amplification reaction was performed in a final volume of 25 μL of 0.4 mM of the primer R1 Angio Rev (5'-CTCGGCTTAATCTTTGCGAC-3') and Angio F1 For (5' AACGAGCGGCAGTAGAAAAA-3'), using AmpliTaq Gold PCR Master Mix, on the following conditions: 94 ° C for 4 min, 35 cycles of 94 ° C for 1 min, 58°C for 2 min and 72°C for 10 minutes in the thermocycler FTC405. For verification of amplicon with the expected product of 232 bp we used the horizontal electrophoresis in agarose gel with ethidium bromide. DNA bands visualization was performed in transilluminator. To quantify the DNA extraction we used a Kit QubitTM fluorometer, Invitrogen.

Statistical analysis

We used mean \pm SD for quantitative data and frequency and percentage for qualitative data. Student's *t* test and Fisher exact test were used when appropriate, with the help of Graph Pad Prism version 4. WinPepi software was used to calculate PCR performance. A P-value < 0.05 was assumed as indicative of statistical significance.

RESULTS

Demographics and clinical characteristics

Most patients with confirmed AA were adults (25th quartile: 21 years), and about two-thirds were men (Table 1). Presumptive cases also occurred in adults, affecting equally men and women. There was no statistical difference in age and gender distribution between confirmed and presumptive cases. Most cases of AA (65%) were diagnosed in summer and were located mainly in small and/or large bowel. The majority of presumptive cases occurred in the appendix.

Pathological findings

Among 20 confirmed cases, 8 had lesions in the small bowel (5 pseudotumoral and 3 infarction), 6 had involvement of large bowel (all pseudotumoral), 4 cases showed damage in both ileum and cecum (all pseudotumoral), and 2 cases presented as acute appendicitis. Perforations were found in the 3 cases with intestinal infarction. Out of 20 presumptive cases, 14 had acute appendicitis, 4 showed lesions in the large bowel (all pseudotumoral), and 2 cases had infarction located in the small bowel. One of these presented perforation.

Intra-arterial worms were found in 13 of the confirmed cases (Figure 1). The remaining 7 cases presented eggs and/or larvae in the mesenteric arteries (Figure 2). All patients of this group showed eosinophilic arteritis, as well as granulomatous reaction and eosinophilic infiltrates. This latter was severe in 75% of the cases. Eosinophilic arteritis was found in 75% of the presumptive cases, which also presented mild granulomatous reaction and moderate eosinophilic infiltrates (severe in less than 50%) (Figure3).

PCR findings

Amplification of DNA from *A. costaricensis* was positive in areas containing worms, eggs or larvae in a total of 11 (55%) out of 20 confirmed cases (Figure 4): 6 specimens with worms, and 5 containing larvae and/or eggs. Parasite DNA was also seen in FFPE material containing only granulomatous reaction from a confirmed case, in the absence of worms, larvae and eggs. The oldest case with positive PCR was from 1998.

In presumptive cases, PCR was positive in 4 (20%) out of 20, in areas containing granulomatous reaction or eosinophilic infiltration. In this group, the oldest case with positive PCR was from 2001. PCR was negative either in control cases or cases with other parasitosis.

When confronted to cases with other parasitosis (Table 2), PCR technique showed intermediate sensitivity (55%), high specificity (100%), high positive predictive value (100%), and intermediate negative predictive value (44%). The rate of true-positive and true-negative (accuracy) was 67%.

DISCUSSION

The diagnosis of AA is often difficult due to the scarce number of parasites in surgical specimens as well as limited pathological expertise. A definitive diagnosis of AA is based on the histopathological identification of parasitic structures such as worms, eggs and larvae in tissue. This process is time-consuming and costly due to the need of a high number of histological sections. When parasitic structures are not found, a presumptive diagnosis of AA may be assumed in cases of suggestive intestinal lesions characterized by a combination of eosinophilic infiltration, granulomatous reaction and eosinophilic vasculitis³. However, these features are not pathognomonic of AA and can be missed with conditions such as other parasitosis, Crohn's disease, eosinophilic gastroenteritis and Wegener's granulomatosis^{12, 13}. Therefore, new tools designed for parasite identification are necessary to help in the diagnosis of AA.

In this large surgical series of AA, the main findings were: (1) PCR technique using primers of *Angiostrongylus cantonensis* was able to identify genetic material of *Angiostrongylus costaricensis* in paraffin-embedded tissue of patients with AA, including specimens conserved for more than 10 years; (2) Although the sensitivity of PCR for detection of the disease in confirmed cases was intermediate (55%), the specificity was optimal (100%), since no case including negative controls and other parasitosis disclosed a positive test; (3) Despite the absence of parasitic structures in presumptive cases, PCR was positive in 20% of them, decreasing the rate of false negative findings of the histological workup.

The PCR technique here employed used two DNA sequences of the genus *Angiostrongylus* for confirmation of AA in human cases. Such DNA sequences were designed in our laboratory¹⁰ and were recently tested for identification of *Angiostrongylus* in cerebrospinal fluid of cases with *A. cantonensis* related

eosinophilic meningitis ¹¹. Although these DNA sequences of *Angiostrongylus* were able in diagnosing cases of either *A. cantonensis* or *A. costaricensis*, further studies for DNA sequencing of specific *Angiostrongylus* species are still warranted in order to increase diagnostic accuracy of such technique. However, such limitation does not rule out the utility of PCR in the clinical setting, since anatomical and clinical presentation of AA caused by *A. costaricensis* and eosinophilic meningitis related to *A. cantonensis* dictate the final diagnosis. PCR was able to detect parasitic DNA from old FFPE specimens, despite potential tissue degradation inherent to storage time. It raises the possibility of using PCR for diagnostic revision of old and unknown cases of tissue database ^{14, 15}. Nevertheless, it is not known whether PCR performance would increase when tested in fresh FFPE tissue, as used in the routine of a pathology laboratory. There is no clear explanation for a negative PCR in confirmed cases. A prolonged formalin fixation time could adversely affect the performance of PCR ¹⁶. PCR showed intermediate sensitivity and optimal specificity for detection of *Angiostrongylus* DNA in confirmed cases. In the clinical practice, it means that the test is particularly useful when positive, given its high specificity (low false positive rate) and high positive predictive value. Moreover, in presumptive cases the PCR was able to indicate the diagnosis of AA in 20% of patients. This could be explained by advanced destruction of parasitic structures in retention sites after strong immunologic response ¹⁷, precluding pathological identification. Nevertheless, a pathologist must be aware after a negative result from a case with high level of suspicion. Further studies in prospective cases are needed to confirm the accuracy of PCR in the diagnostic workup of AA.

In our series, confirmed cases of AA occurred mainly in adult men, in contrast with series from Costa Rica, where infants were mostly described ¹⁸. We also observed a

concentration of cases presenting during hot seasons, especially during summer. It likely reflects a higher activity of mollusks during hot and wet weather ¹⁹, increasing the risk of contamination. Finally, most of our cases compromised small and/or large bowel, particularly with the pseudotumoral form. It is characterized by severe eosinophilic infiltrate in the bowel wall, accompanied of perivascular granulomatous reaction, eventually with retention of parasitic structures such as eggs and larvae ²⁰. Curiously, cases of perforation were restricted to patients with small bowel lesions, as described by Graeff-Teixeira et al. ³, and few cases of AA presented as acute appendicitis. This contrasts with presumptive cases, in which the appendix dominated the anatomical presentation.

In conclusion, we report the molecular identification of *Angiostrongylus* in the largest series of human cases surgically treated for AA. The employed PCR used two DNA sequences of *Angiostrongylus* genus and resulted positive in the analysis of FFPE tissue either for specimens with parasite structures or granulomatous reaction. The successful utilization of PCR here reported points to the need of further studies to establish the diagnostic performance of this technique in a prospective study based on pathological routine.

REFERENCES

1. Morera P, Cespedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1970;18:173-85.
2. Pena GP, Andrade Filho J, de Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the State of Espirito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37:369-74.
3. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 1991;77:606-11.
4. Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JM, et al. [Abdominal angiostrongyliasis. Anatomico-pathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:443-5.
5. Geiger SM, Laitano AC, Sievers-Tostes C, et al. Detection of the acute phase of abdominal angiostrongyliasis with a parasite-specific IgG enzyme linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:515-8.
6. Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, et al. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 2004;92:50-2.
7. Alarcon M, Perez MC, Villarreal J, et al. [Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in the placenta and fetuses of mice with Chagasic acute infection]. *Invest Clin* 2009;50:335-45.
8. Sanchez GF, Banda RV, Sahagun RA, et al. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Vet Parasitol* 2009;164:328-32.

9. Muller N, Zimmermann V, Forster U, et al. PCR-based detection of canine Leishmania infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 2003;114:223-9.
10. da Silva AC, Graeff-Teixeira C, Zaha A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45:295-7.
11. Eamsobhana P, Wanachiwanawin D, Dechkum N, et al. Molecular diagnosis of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) by polymerase chain reaction-DNA sequencing of cerebrospinal fluids of patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108:116-8.
12. Lazarev M, Huang C, Bitton A, et al. Relationship between proximal Crohn's disease location and disease behavior and surgery: a cross-sectional study of the IBD Genetics Consortium. *Am J Gastroenterol* 2013;108:106-12.
13. Pagnoux C, Mahr A, Cohen P, et al. Presentation and outcome of gastrointestinal involvement in systemic necrotizing vasculitides: analysis of 62 patients with polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, or rheumatoid arthritis-associated vasculitis. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:115-28.
14. Guerrero RB, Batts KP, Brandhagen DJ, et al. Effects of formalin fixation and prolonged block storage on detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Diagn Mol Pathol* 1997;6:277-81.
15. Volkenandt M, Dicker AP, Fanin R, et al. Polymerase chain reaction analysis of DNA from paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol* 1993;15:81-8.

16. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol* 2002;15:979-87.
17. de Azevedo GV, Rodriguez R, Porto SM, et al. Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. *Parasitol Res* 2011;108:537-40.
18. Lobo Sanahuja F, Loria Cortes R, Gonzalez G. [Abdominal angiostrongylosis. Clinical aspects, treatment and review of the literature]. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1987;44:4-9.
19. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;33:373-8.
20. Rodriguez R, Porto SM, Dos Santos Ferrari R, et al. Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. *Parasitol Res* 2011;109:787-92.

TABLES

Table 1. Demographic and clinical characteristics of confirmed and presumptive cases of AA

	Confirmed cases	Presumptive cases	P-value
	(n = 20)	(n = 20)	
Age in years, mean \pm SD	38.8 \pm 18.5	36.8 \pm 13.4	0.371
Women, n (%)	7 (35)	11 (55)	0.203
Season of presentation, n (%)			0.203
Summer	13	9	
Other than summer*	7	11	
Anatomical location			0.0002
Small and/or large bowel	18	6	
Appendix	2	14	

*Autumn, winter and spring

Table 2. PCR performance in confirmed cases (n = 20) compared to cases with other parasitosis (n = 7).

Parameter	Performance
	% (0.95 CI)
Sensitivity	55 (34-74)
Specificity	100 (65-100)
Positive predictive value	100 (72-100)
Negative predictive value	44 (23-66)
Accuracy	67

FIGURE and LEGENDS

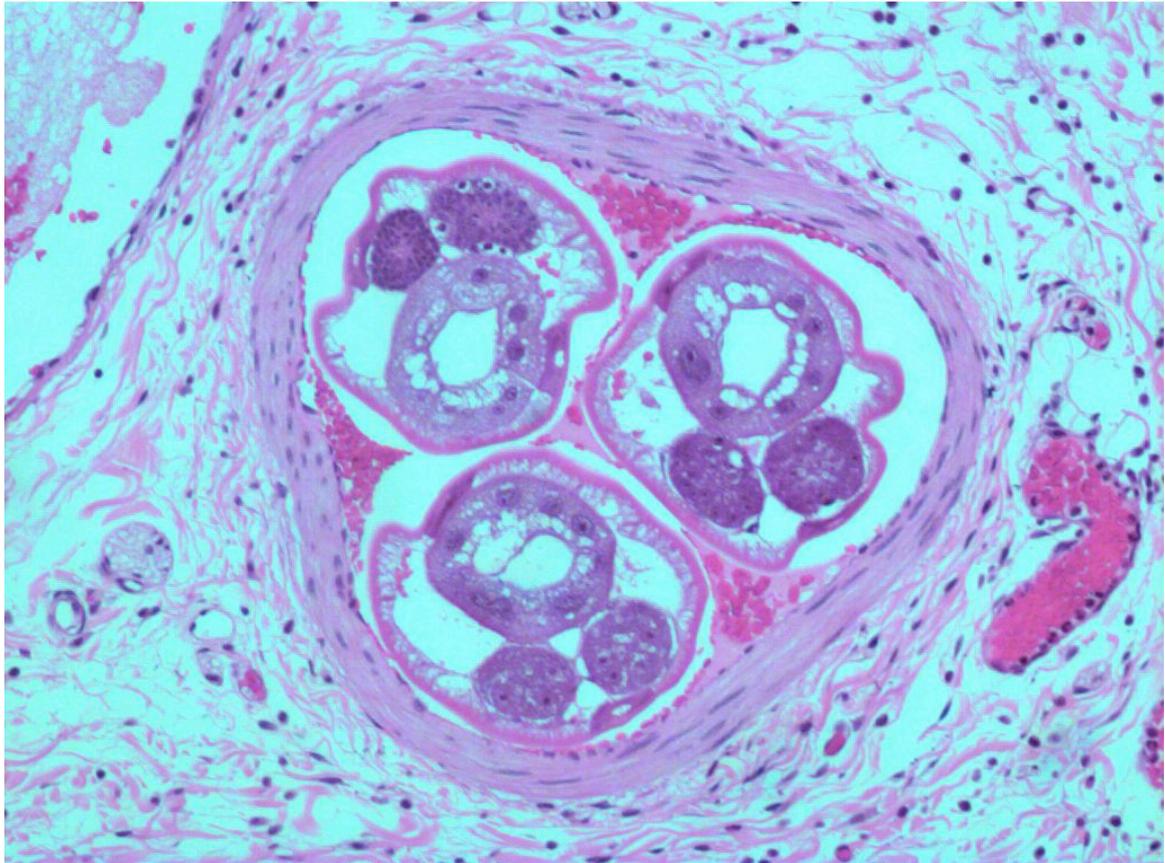


Figure 1. A confirmed case with worms of *Angiostrongylus costaricensis* inside mesenteric artery (H&E, 200X).

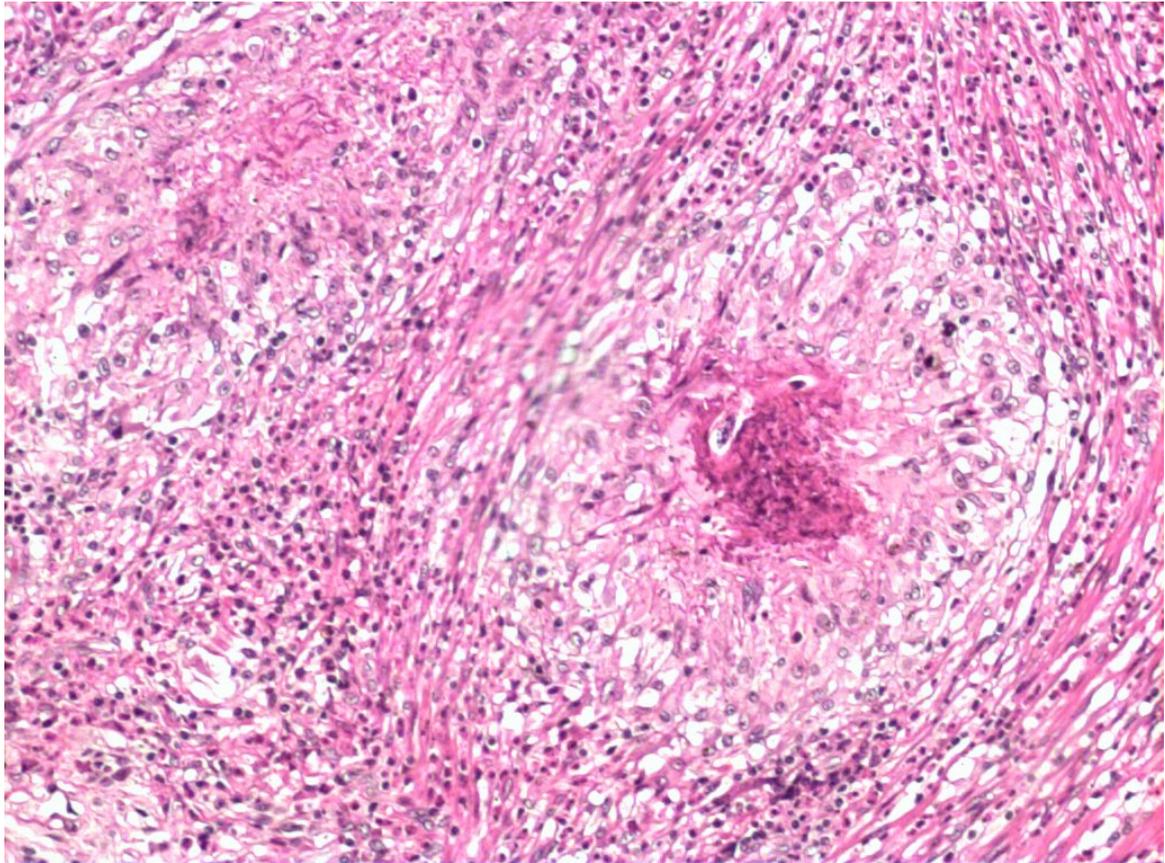


Figure 2. Larvae of *Angiostrongylus costaricensis* inside a granuloma in a confirmed case (H&E 100X).

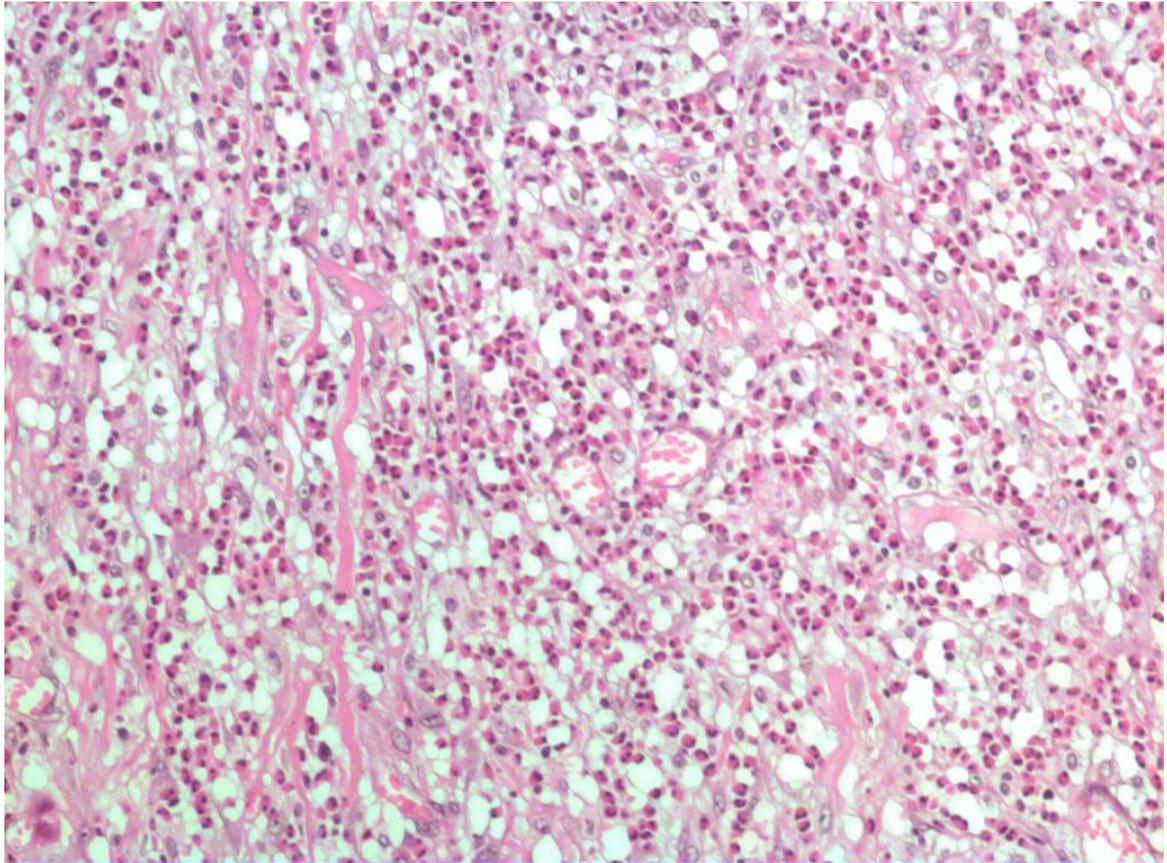


Figure 3. Eosinophilic infiltration in bowel wall (H&E 200X).

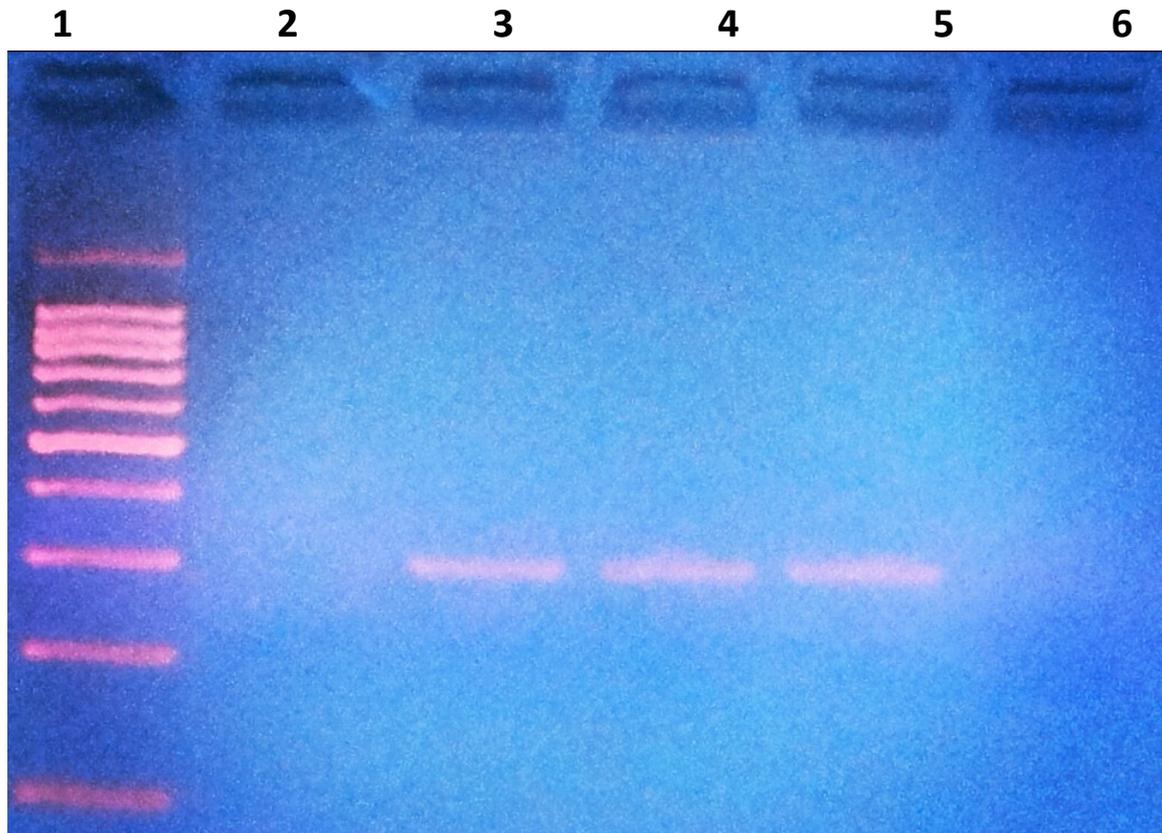


Figure 4. Amplification of DNA from *A. costaricensis* found inside the lumen of mesenteric artery: 1-Molecular marker; 2-Control negative in large bowel; 3-Control positive in Worm; 4- Positive case in granulomatous area; 5-Positive case in worm; 6-MIX.

15- Anexo II

(Publicado em março de 2011 no periódico Parasitology Research)

Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin

Rubens Rodriguez^{1,2,3}, Sérgio Machado Porto⁴, Rodrigo dos Santos Ferrari², Ana Maria Marcolan^{2,3}, Ana Cristina Arámburu da Silva⁵, Carlos Graeff-Teixeira⁵, Fernando Fornari^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre-RS; ²Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo-RS; ³Instituto de Patologia de Passo Fundo, ⁴Instituto de Ciências Biológicas, UPF; ⁵Laboratório de Biologia Parasitária, Faculdade de Biociências da PUCRS, Porto Alegre-RS, Brazil.

Corresponding author:

Fernando Fornari, PhD.

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rua Ramiro Barcelos, nº 2400, 2º andar, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55.51.33085603; fax: 55.51.33085616; e-mail: fernandofornari@gmail.com

Short title: Effect of enoxaparin in mice with abdominal angiostrongyliasis

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*. Parasite-associated thrombosis of mesenteric vessels may lead to intestinal infarction, which might be prevented with anti-thrombotic agents. This study assessed the effect of enoxaparin on survival and pathological findings in Swiss mice with AA. In this experiment, 24 mice were infected with *A.costaricensis* (10 L3 per animal) followed by treatment with subcutaneous enoxaparin (40 mg/kg/day) or water (sham), starting from 15 days post infection (dpi) and continued until animal death. Animals were monitored until death or sacrificed or sacrifice at 50th dpi. Ten mice (42%) were dead after 36 ± 8 dpi. Of these, 5 (50%) were treated with enoxaparin. Animals treated with enoxaparin and sham did not differ in terms of weight loss (median: 1.3 vs. 4.2 g; P = 0.303) and macroscopical findings. Microscopically, no difference was found in regard to vascular granuloma (median grade: 2 vs. 3; P = 0.293) and presence of either vasculitis (75% vs. 100%; P = 0.217), mesenteric thrombosis (33% vs. 50%; P = 0.680) or bowel necrosis (25% vs. 50%; P = 0.400). Mice dead before 50th dpi showed more pneumonia (90% vs. 21%; P = 0.002), bowel infarction (40% vs. 0%; P = 0.02) and purulent peritonitis (60% vs. 7%; P = 0.008) compared to survivors. Prophylactic enoxaparin in mice did not prevent tissue damage and mortality related with AA. It was notorious the lower prevalence of mesenteric thrombosis and bowel infarction regardless of treatment. Frequent septic complications suggest the need of studies addressing the effect of antibiotics in AA.

Key-words: *Angiostrongylus costaricensis*; abdominal angiostrongyliasis; mice; outcomes; pathological findings; enoxaparin.

INTRODUCTION

Abdominal angiostrongyliasis (AA) is caused by the nematode *Angiostrongylus costaricensis*, first described by Morera and Céspedes in 1970 (Morera and Céspedes 1970). The parasite lives inside the mesenteric arteries of rodents, having slugs as intermediated hosts (Morera 1970; Morera and Ash 1970). *Angiostrongylus costaricensis* may be found in stool of rodents as first stage larvae 1 (L1) and in mucous of slugs as third stage larvae (L3). This latter stage may infect humans after ingestion of contaminated foods, particularly vegetables (Morera and Céspedes 1971).

Infected humans may develop a clinical entity named abdominal angiostrongyliasis (Morera 1973), manifested mainly by infarct or pseudotumor-like lesions in the ileum-cecum segment of the bowel (Graeff-Teixeira et al. 1991). AA has been detected in many countries of Central and South America, like southern Brazil (Agostini et al. 1984; Graeff-Teixeira et al. 2005), Costa Rica (Morera 1985), and Ecuador (Morera et al. 1983). Probably imported cases were also detected in North America (Ubelaker and Hall 1979) and Europe (Vazquez et al. 1993). In Brazilian series, asymptomatic patients with positive serology for *Angiostrongylus costaricensis* are believed to be more common than patients with symptomatic disease (Graeff-Teixeira et al. 2005).

The pathogenesis of AA is not well understood. A major hypothesis includes mesenteric vessels damage characterized by eosinophilic infiltration and perivascular granulomas. Such lesions may be associated with thrombotic events, combined with the presence of parasitic eggs or larvae in the vascular lumen (Agostini et al. 1984; Graeff-Teixeira et al. 1991). In addition, recent evidence in mice indicate an inverse correlation between fecal elimination of *A. costaricensis* L1 and survival, suggesting the existence of immunotolerance in animals who did not develop the disease (de Azevedo et al. 2010). Nevertheless, the mechanism of mesenteric thrombosis and its contribution to tissue damage and survival is poorly defined in research models for AA.

Patients with AA have been managed with support therapy in uncomplicated presentations and with surgical treatment in cases of bowel obstruction or infarction (Rodriguez et al. 2008). Several studies have tested pharmacological approaches, including antihelmintics (Mentz and Graeff-Teixeira 2003; Morera and Bontempo 1985), oviposition blocking agents (Bohrer et al. 2007) and anti-inflammatory drugs (Fante et al. 2008), although with disappointing results. Theoretically, the use of anti-thrombotic agents such as enoxaparin might be benefic in preventing mesenteric thrombosis as observed in patients with AA. Therefore, the **aim** of this study was to assess the effect of enoxaparin

on survival and pathological features in a validated animal model for AA (de Azevedo et al. 2010).

For this purpose, a controlled trial with enoxaparin was performed in mice infected with

Angiostrongylus costaricensis.

METHODS

Animals

We studied 24 male Swiss mice, ten weeks old, weighing 25 to 38 g, obtained from the Universidade of Passo Fundo Animal House breeding stock (UPF, Passo Fundo, Brazil). The animals were housed under standard caging conditions, with *ad libitum* consumption of water and pellet chow (Nuvilab ®). The experiment was conducted in accordance with Brazilian law 11.794/08 and ethical principles from Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). The study was approved by the Ethical Committee - UPF (certificate nº 161/2008).

Acquisition of *A. costaricensis* larvae

Larvae L3 were obtained from *Biomphalaria glabrata* snails infected with *A. costaricensis* (Santa Rosa strain, PUCRS). After 20 days, the snails were killed and tissues were digested using a 0.03% solution of pepsin and 0.7% hydrochloride acid for 3 hours at 37°C.

Drugs

Enoxaparin for subcutaneous injection were acquired in bottles of 20 mg (Sanofi-Aventis, São Paulo, Brazil). The drug was diluted in sterile water and prepared in insulin like syringes, in doses ranging 0.16 to 0.25 ml, according to animal weight. Sterile water in identical preparation was used in the sham group. Inhalatory isoflurane (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brazil) was employed to sacrifice the animals.

Study protocol

Experiments with animals were performed by three authors (RR, SMP and RSF), always in the morning. In the first day, each mouse was infected with 10 L3 by oral gavage. Animals were kept in groups of 2 to 5 in appropriate cages, with free access to water and food. They were monitored daily to detect signs of pain, including piloerection, tremors and prostration. Animals were weighed weekly during the entire study. Feces eliminated during animal manipulation were examined to detect gross signs of blood. At the

15° day post infection (dpi), animals were randomized to receive enoxaparin 40 mg/kg or water subcutaneously. They were treated daily until death or 50° dpi, when survivors were sacrificed with isoflurane. All animals underwent to autopsy for characterization of macroscopic findings, followed by fixation of thoracic and abdominal organs in formalin 10%.

Pathological evaluation

Macroscopic findings were described as follows: (1) bowel lesions, including infarction, serosal granulations, peritoneal abscesses and other signs of peritonitis; (2) spleen infarction; (3) capsular liver abscesses; and (4) congestion and petechia in the lungs.

Microscopical findings were determined after analysis of slices from paraffin blocked tissue. For this purpose, the entire bowel and mesentery were rolled and fixed in such way to allow a complete view of the intestinal tract in a couple of paraffine blocks. The slices were stained with hematoxilin and eosin, and examined in optical microscopy (Axioplan 2 Zeiss, Germany) by two independent pathologists (RR and AMM). A consensus was reached in case of discordant analysis.

Statistical analysis

Data are presented as mean (\pm SD or range) or when otherwise stated. Student's *t* or Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used to analyze quantitative data according to variable distribution. Differences in proportions were tested with chi-square test or Fisher exact test. The analyses were carried out using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A P-value < 0.05 was assumed as indicative of statistical significance.

RESULTS

Animals

Ten mice (42%) died from AA after 36 ± 8 dpi on average. Of these, 5 (50%) were treated with enoxaparin and 5 (50%) participated in the sham group. Animals treated with enoxaparin and sham did not differ in terms of weight loss (median: 1.3 vs. 4.2 g; $P = 0.303$). Blood in feces was equally found in both comparisons: between enoxaparin and sham groups (25% vs. 50%; $P = 0.400$), and between survivors and non-survivors (43% vs. 30%; $P = 0.678$). Pain was similarly observed between enoxaparin and sham groups (58% vs. 58%; $P = 0.104$). It was more frequent in non-survivors compared to survivors, however with borderline significance (80% vs. 43%; $P = 0.068$).

Macroscopic findings

These include lesions in bowel, spleen, liver and lungs. Bowel lesions were: serosal granulations in 9 mice, adhesences of intestines with anterior abdominal wall in 8 (Figure 1A), fibropurulent deposit in the peritoneal surface in 7, pseudotumor-like ileocecal abscesses in 6 mice (Figure 1B), and others, including intestinal infarction in 4 animals (Figure 1C). Spleen infarction was identified in only one animal. Fibropurulent deposit in hepatic capsule was found in 3 mice, while signs of pneumonia were present in 6 animals. The comparison of mice treated with enoxaparin and sham revealed no statistical difference in regard to gross findings. However, the comparison of survivors ($n = 14$) and non-survivors ($n = 10$) revealed that the first showed significantly more pseudotumor-like ileocecal abscesses (43% vs. 0%; $P = 0.023$), more serosal granulations (57% vs. 10%; $P = 0.033$) and less fibropurulent deposit (7% vs. 60%; $P = 0.008$) in the peritoneal surface, as well as less bowel infarction (0% vs. 40%; $P = 0.019$). Survivors also tended to have less pneumonia than non-survivors (7% vs. 50%; $P = 0.050$).

Microscopic findings

In the comparison of groups treated with enoxaparin and sham, no difference was found in regard to pathological findings in the intestines, as follows: vascular granuloma [median grade (IQR25%-75%): 2 (1-3) vs. 3 (2-3); $P = 0.267$] (Figure 2A), eosinophilic vasculitis (75% vs. 100%; $P = 0.217$) (Figure 2B), thrombosis (42% vs. 58%; $P = 0.414$) (Figure 2C), bowel necrosis (42% vs. 58%; $P = 0.414$), and eosinophilic infiltrate [median grade (IQR25%-75%): 2 (1.5-2) vs. 2 (2-2); $P = 0.342$]. A characteristic

pattern of granulomatous reaction was observed in the bowel of most animals (92%), in which ova or larvae of *A. costaricensis* are retained into small vessels, particularly in submucosa and muscular layers (Figure 2D).

Lung damage was similar between mice treated with enoxaparin and sham, including pneumonia and granulomatous reaction. Ova and/or larvae of *A. costaricensis* were found in 42% of animals in both groups, as illustrated in Figure 2A. Splenitis was found in most mice treated either with enoxaparin (75%) or sham (83%). Ova and/or larvae of *A. costaricensis* in spleen were found in two animals treated with enoxaparin. Hepatic features in the enoxaparin and sham groups were as follows: granulomatous reaction (58% vs. 75%; $P = 0.666$), eosinophilic infiltrate (92% vs. 92%; $P = 0.999$), and reactive hepatitis (83% vs. 100%; $P = 0.478$). Ova and/or larvae of *A. costaricensis* in liver were found in 9 animals (75%) in each group. Infrequent findings included abscesses (7% in each group) and liver infarct (25% vs. 17%; $P = 0.999$).

The comparison of non-survivors and survivors revealed that the firsts showed more pneumonia (90% vs. 21%; $P = 0.002$), more bowel infarction (40% vs. 0%; $P = 0.02$), and more purulent peritonitis (60% vs. 7%; $P = 0.008$) than survivors.

DISCUSSION

Abdominal angiostrongyliasis (AA) has no specific treatment. Since mesenteric thrombosis associated with *A. costaricensis* likely participates on disease pathogenesis, the use of anti-thrombotic agents became a rational approach. In the light of this, the aim of the present study was to assess the effect of enoxaparin on survival and pathological features in mice with AA.

The main findings of our study were: (1) Survival rates did not differ between mice treated with prophylactic doses of subcutaneous enoxaparin and sham; (2) Macroscopic and microscopic features were both similar in the comparison of these treatment groups; and (3) In a separate analysis of survivors and non-survivors, the latter group showed more bowel infarction and septic complications, including pneumonia and purulent peritonitis.

To the best of our knowledge, this is the first study addressing the effect of an anti-thrombotic agent in AA. The rationale for its use is the involvement of thromboembolic events in the pathogenesis of AA, which may result in intestinal infarction, a major cause of AA related morbidity (Graeff-Teixeira et al. 1991; Waisberg et al. 1999). However, the use of enoxaparin in prophylactic doses in the present study

did not show benefit neither in mortality nor in tissue damage. The lack of benefit might be related to insufficient doses of enoxaparin or a decreased sample size (type II error).

Macroscopic features were similar in mice treated with enoxaparin and sham. Abdominal lesions included serosal granulations, adhesences of intestines with anterior abdominal wall, peritoneal fibropurulent deposit, and pseudotumor-like ileocecal abscesses. Noteworthy, intestinal infarction was found in a minority of animals. Based on literature and clinical experience, gross findings in humans with AA are usually limited to pseudotumor and/or ischemic-congestive lesions (Graeff-Teixeira et al. 1991;Rodriguez et al. 2008). Peculiar findings of AA in mice, such as severe peritoneal involvement resulting in adhesences and fibropurulent deposit, deserve further studies.

Microscopic findings also did not differ between treatment groups. Animals treated with enoxaparin and sham showed a similar scenario on microscopy, including vascular granuloma, eosinophilic vasculitis, thrombosis, bowel necrosis and eosinophilic infiltrate. Interestingly, most animals presented vascular lesions characterized by eosinophilic vasculitis and granuloma, particularly in places of AA ova and larvae retention. Such features were found mainly in the submucosa and muscular layer of the bowel wall, following the pathway of arterioles and capillaries (Rodriguez 1997). We are tempted to speculate that vasculitis and granuloma formation may culminate in vascular occlusion and tissue ischemia rather than thrombotic events. Further studies are needed to address the importance of these inflammatory reactions in the pathogenesis of AA.

We performed a separate analysis of mice categorized according to survival, regardless of treatment. Thus, non-survivors showed more bowel infarction and septic complications compared to those considered as survivors, i.e. mice suffering from AA who were sacrificed at the end of the study. A possible explanation for these outcomes may be related with findings of a recent study showing a correlation between survival and L1 elimination in feces from mice infected with *A. costaricensis* (de Azevedo et al. 2010). Such correlation suggests a phenomenon of tolerance between host and parasite, indicating that as less vascular inflammation as higher the amount of L1 elimination and longer the survival.

In conclusion, we assessed the effect of enoxaparin on survival and pathological features in mice with AA. We found that neither survival nor pathological features differed between mice treated with prophylactic doses of enoxaparin and sham. Caution should be assumed in the interpretation of these data, considering the study in an experimental scenario and with prophylactic doses of enoxaparin. An

interesting finding indicating septic complications as an important cause of death in our animal model points to the need of studies addressing a new approach with early diagnosis and treatment of sepsis as a complication of AA.

REFERENCES

- Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JM, Lisot JU (1984) [Abdominal angiostrongyliasis. Anatomicopathological study of 4 cases observed in Rio Grande do Sul, Brazil]. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 443-445.
- Bohrer MM, Dallegrave E, Agostini A, Graeff-Teixeira C (2007) Phenantroline, lovastatin, and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*. Parasitol Res 100: 379-382.
- de Azevedo GV, Rodriguez R, Porto SM, Graeff-Teixeira C, Fornari F (2010) Elimination of *Angiostrongylus costaricensis* larvae in feces from experimentally infected Swiss mice: circadian rhythm and correlation with survival. Parasitol Res DOI: 10.1007/s00436-010-2094-5.
- Fante CA, Dieterish S, Rodriguez R (2008) [Betamethasone and aqueous extract of *Arctium lappa* for treating angiostrongyliasis]. 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: 606-611.
- Graeff-Teixeira C, Goulart AH, Brum C de O, Laitano AC, Sievers-Tostes C, Zanini GM, Bered PL, Morassutti A, Geiger S, brahms-Sandi E, Oliveira FT, Maurer RL, Aguiar LF, Garrido CT, da Silva AC, Rodriguez R, Schulz-Key H (2005) Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guapore, southern Brazil, from 1995 to 1999. Rev Soc Bras Med Trop 38: 310-315.
- Mentz MB, Graeff-Teixeira C (2003) Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 45: 179-184.
- Morera P (1970) [Studies of the definitive host of *Angiostrongylus costaricensis*. (Morera and Cespedes, 1971)]. Bol Chil Parasitol 25: 133-134.
- Morera P (1973) Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971. Am J Trop Med Hyg 22: 613-621.

- Morera P (1985) Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitol Today* 1: 173-175.
- Morera P, Ash LR (1970) [Studies on the intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Cespedes, 1971)]. *Bol Chil Parasitol* 25: 135.
- Morera P, Bontempo I (1985) Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Méd Hosp Nac Niños (Costa Rica)* 20: 165-174.
- Morera P, Cespedes R (1970) *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 18: 173-185.
- Morera P, Céspedes R (1971) Angiostrongilosis Abdominal. *Acta Médica Cost* 14: 159-173.
- Morera P, Lazo R, Urquizo J, Llaguno M (1983) First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes, 1971 in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 32: 1460-1461.
- Rodriguez R (1997) Anatomia patológica da angiostrongilose abdominal. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Fluminense.
- Rodriguez R, Dequi RM, Peruzzo L, Mesquita PM, Garcia E, Fornari F (2008) Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 339-341.
- Ubelaker JE, Hall NM (1979) First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes 1971 in the United States. *J Parasitol* 65: 307.
- Vazquez JJ, Boils PL, Sola JJ, Carbonell F, de Juan Burgueno M, Giner V, Berenguer-Lapuerta J (1993) Angiostrongyliasis in a European patient: a rare cause of gangrenous ischemic enterocolitis. *Gastroenterology* 105: 1544-1549.
- Waisberg J, Corsi CE, Rebelo MV, Vieira VT, Bromberg SH, dos Santos PA, Monteiro R (1999) Jejunal perforation caused by abdominal angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41: 325-328.

FIGURE and LEGENDS

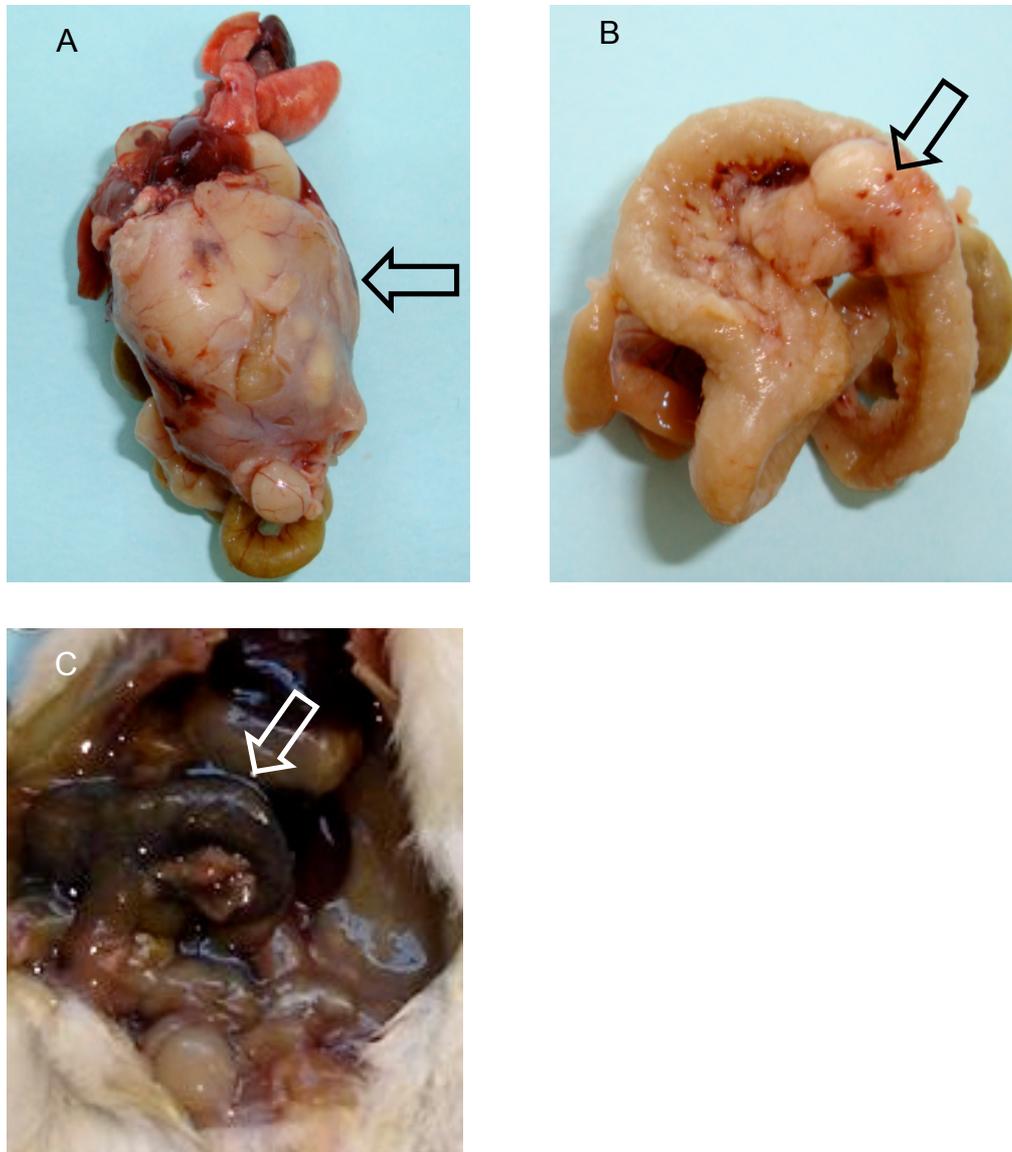


Figure 1. Macroscopic findings. In **A**, adhesions of intestines with anterior abdominal (arrow); in **B**, pseudotumor-like ileocecal abscesses (arrow); and in **C**, bowel infarction (arrow).

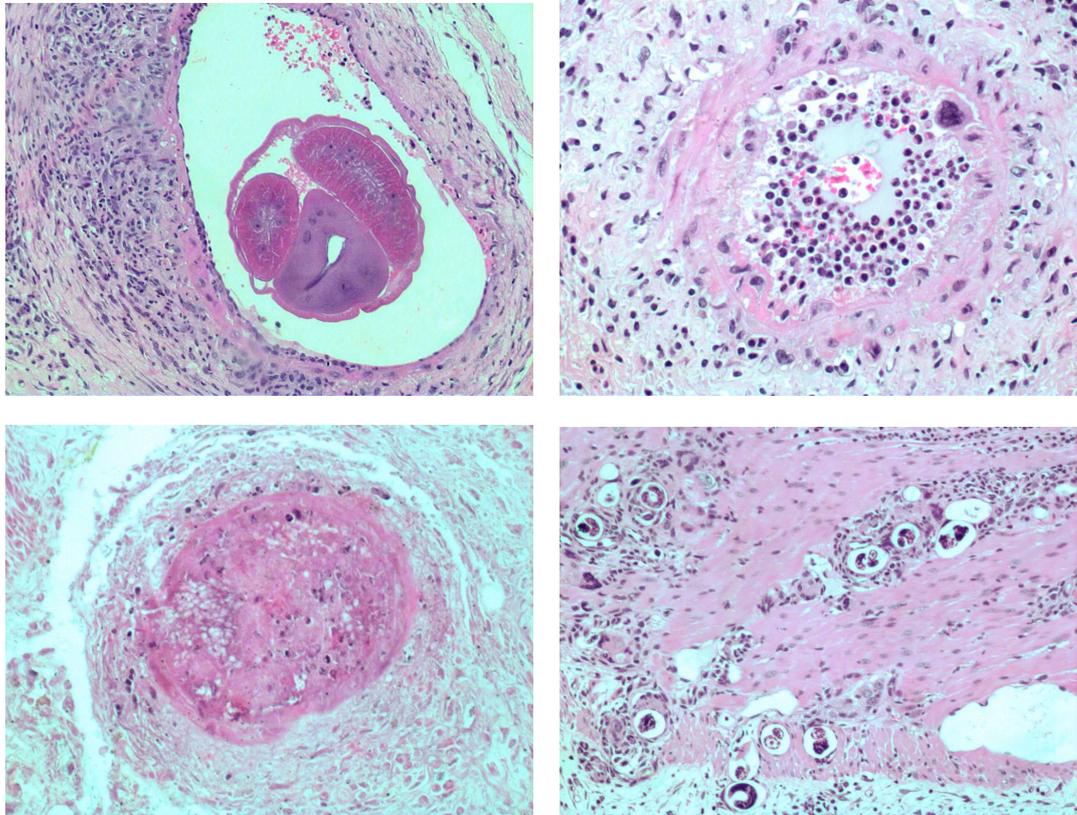


Figure 2. Microscopic findings. In **A**, a granulomatous reaction surrounding a large-size mesenteric artery (major arrow), which contains an adult worm of *A. costaricensis* (minor arrow). In **B**, vasculitis showing eosinophils infiltrating both muscle layer and vascular endothelium. In **C**, thrombosis in mesenteric artery of medium-size. In **D**, granulomatous reaction engulfing embryonated eggs of *A. costaricensis* (arrows), following small vessels in the muscular layer.