

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*DANIELLE INGRID BEZERRA DE VASCONCELOS*

Estudo da evolução das lesões vasculares presentes na angiostrongilíase abdominal experimental em *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

**Orientador (es):** Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

**RIO DE JANEIRO**  
2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V331 Vasconcelos, Danielle Ingrid Bezerra de

Estudo da evolução das lesões vasculares presentes na angiostrongilíase abdominal experimental em *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) / Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos. – Rio de Janeiro, 2016.

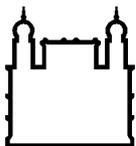
xvi, 87 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 71-83

1. *Angiostrongylus*. 2. Angiostrongilíase abdominal. 3. Sigmodontinae. 4. Arterite. 5. Aterosclerose. I. Título.

CDD 616.136



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos***

**Estudo da evolução das lesões vasculares presentes na angiostrongilíase abdominal experimental em *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae)**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Kátia da Silva Calabrese (IOC) - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Arnaldo Maldonado Junior (IOC)  
**Prof. Dr.** Renata Heisler Neves (UERJ)  
**Prof. Dr.** Aline dos Santos Garcia Gomes (IFRJ)  
**Prof. Dr.** Marcelo Alves Pinto (IOC)

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2016.

## AGRADECIMENTOS

**À minha mãe, Maria do Socorro Bezerra da Silva**, por sua presença (mesmo que distante), paciência, disponibilidade, amor, preocupação e dedicação todos esses anos. Mãe, obrigada por ter sido sempre tão especial e maravilhosa em minha vida, por sempre ter me dado tanta força e acreditado na possibilidade de todas as minhas realizações. Você é um grande exemplo de mãe a ser seguido. **Ao meu pai, Nildo Pedro de Vasconcelos** por apoiar e acreditar nessa minha realização.

**À minha família**, meu irmão, **David Ingsson Bezerra de Vasconcelos**, aos meus tios e tias, primos e primas, que tanto confiaram no meu potencial e fizeram o possível para manter meu bem-estar. Por aguentarem a grande saudade e me darem tanta força, mesmo sabendo o quanto foi difícil esse processo.

**A Márcio** meu marido e grande amor, pela paciência, cuidado, carinho e dedicação todos os dias. Você tornou minha vida mais suave e o trabalho mais leve.

**Aos meus orientadores Dr. Marcelo Pelajo Machado e Dra. Ester Maria Mota**, por terem me aceito em um momento tão delicado da minha carreira. Pela orientação próxima, atenciosa e dedicada, e por toda paciência e dedicação em me ensinar em uma área tão diferente, na qual não tinha nenhuma experiência. Por me ajudarem na minha formação técnica e científica, e de uma forma geral, na minha trajetória profissional. Muito obrigada pela confiança, apoio e disponibilidade sempre! Sem a ajuda de vocês, essa realização não seria possível! Muito obrigada!

**Aos meus colegas de pós-graduação**, por terem tornados todos os “árduos” momentos de disciplinas, em momentos descontraídos. Por serem sempre tão prestativos e por me proporcionarem o prazer de suas companhias, apesar de em um tão curto espaço de tempo.

**Aos meus companheiros de laboratório**, tanto alunos quanto técnicos. Agradeço em especial **aos que me ajudaram diretamente na bancada e na realização das pranchas. Andrea Natividade da Silva, Iolanda Deolinda de**

**Souza, Filomena Fátima Cruz, Igor José da Silva.** Obrigada pelo apoio, pela ajuda e pela disponibilidade. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos **amigos pessoais**. Obrigada a todos pelos conselhos, colaborações acadêmicas e científicas, pelo carinho, paciência, amizade, sorrisos e crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

À Dras. **Leila de Mendonça Lima e Helene dos Santos Barbosa**, pela ajuda no momento delicado de troca de projeto e orientação. Pelo apoio e disponibilidade.

Aos responsáveis pelos experimentos realizados na plataforma RPT 12C- Análises Clínicas de Animais de Laboratório em especial seu responsável, Cleber Hooper.

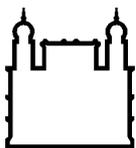
Às **secretárias de pós-graduação Danielle Lobato e Julimar Ferreira**, pela disponibilidade, atenção e resolutividade dos problemas relacionados à pós-graduação. Sua competência torna nosso trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Fiocruz; Instituto Oswaldo Cruz e Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro e por tornar possível essa realização.

A **todos** que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho: **MEU MUITO OBRIGADA!**

“Não esmorecer para não desmerecer”.

Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo da evolução das lesões vasculares presentes na angiostrongilíase abdominal experimental em *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae)

### RESUMO

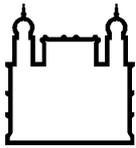
### TESE DE DOUTORADO

**Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos**

**Introdução:** O *Angiostrongylus costaricensis* é um nematódeo que causa a angiostrongilíase abdominal. O ciclo de vida deste parasita envolve um hospedeiro invertebrado (intermediário) e um hospedeiro vertebrado mamífero (definitivo). Na natureza, um dos principais hospedeiros definitivos deste parasita é o roedor *Sigmodon hispidus*. O nematódeo instala-se na artéria mesentérica superior do hospedeiro definitivo, causando inicialmente uma periarterite eosinofílica e posteriormente um trombo. Histopatologicamente, uma tríade de achados fundamentais define esta patologia: massivo infiltrado eosinofílico; vasculite eosinofílica e reação granulomatosa. Apesar da importância clínica, pouco se sabe acerca dessa patologia. **Objetivos:** Caracterizar as lesões histopatológicas do território vascular e intestinal; acompanhar a dinâmica hematológica periférica e central; avaliar colesterolemia total e a presença de bactérias na lesão de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis*. **Material e Métodos:** *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* foram eutanasiados em 30, 50, 90 e 114 dpi e foram coletados o intestino e mesentério (incluindo a artéria cecal). Os tecidos foram fixados em formalina Millonig de Carson e, histologicamente processados para microscopia de luz ou imunohistoquímica. O sangue também foi coletado através de punção cardíaca ou do plexo braquial e utilizado para realização de hemograma e análise da colesterolemia total e análise microbiológica. A lesão local também foi coletada para análise microbiológica. **Resultados e discussão:** Em tempos precoces (30 e 50 dpi), uma grande quantidade de larvas e ovos viáveis foram encontrados na *vasa vasorum* da artéria cecal levando a um intenso infiltrado eosinofílico na adventícia do vaso, formando granulomas. Os parasitas associados ao infiltrado inflamatório promoveram uma vasculite eosinofílica centrípeta com destruição das lâminas elásticas. A íntima perdeu as características celulares básicas, tornando-se desorganizada ou até mesmo desaparecendo. Com a evolução temporal da doença, há um aumento da severidade em tempos tardios (90 e 114 dpi), onde um processo aterosclerótico instala-se. O trombo é composto majoritariamente por fibrina, além de ferro e uma substância xantomatosa, positiva para Vermelho do Congo. Neste momento, o infiltrado eosinofílico cessa e há uma predominância de macrófagos carreadores dessa substância xantomatosa e ferro. As lâminas elásticas de artérias com vermes estão destruídas, havendo uma grande desestruturação do vaso. No sangue, em 90dpi há um aumento do número de leucócitos totais, diminuição do

número e aumento do tamanho das plaquetas. Nesse ponto, a colesterolemia total dos animais não tem modificação em relação aos controles. Nesses tempos tardios, observa-se um nítido aumento da atividade da medula, com predominante eosinofilia e aumento do número de megacariócitos. É possível que o desenvolvimento dessas lesões esteja relacionado à presença de bactérias grampositivas presentes no *A. costaricensis*. **Conclusões:** Nossos dados sugerem que o modelo de infecção do *S. hispidus* pelo *A. costaricensis*, pode ser útil no estudo de vasculites autoimunes, bem como aterosclerose.

**Palavras- chave:** *Angiostrongylus* - angiostrongilíase abdominal – Sigmodontinae – arterite - aterosclerose



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Study of the vascular lesions evolution which present in experimental abdominal angiostrongyliasis in *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae)

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

**Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos**

**Introduction:** *Angiostrongylus costaricensis* is a roundworm which causes the abdominal angiostrongyliasis. This parasite's life cycle involves an invertebrate host (intermediary) and a vertebrate host (definitive). In nature, the usual definitive host for this parasite is the rodent *Sigmodon hispidus*. Adult worms install in the upper mesenteric artery of the definitive host, causing in the beginning an eosinophilic polyarteritis and then a thrombus. Histopathologically, a triad of essential finding defines this pathology as: massive eosinophilic infiltrate; eosinophilic vasculitis and the granulomatous reaction. Despite the clinical importance, we know just a few about this pathology. **Objectives:** To characterize the histopathological lesions of the vascular and intestinal territories; to follow the peripheral and central hematologic dynamics; to evaluate the total cholesterol and the bacteria presence in the lesion on the infected *S. hispidus* by *A. costaricensis*. **Material and Methods:** *S. hispidus* infected by *A. costaricensis* were euthanized in 30, 50, 90 and 114 dpi and were collected the intestine and mesentery (including the cecal artery). Tissues were fixed in Carson's Millonig formalin and, histopathologically processed to light microscopy or immunohistochemistry. The blood was also gathered through the cardiac puncture or from the brachial plexus and used to the CBC conduction and analysis of total cholesterol and microbiological analysis. The local lesion was also gathered to microbiological analysis. **Results and discussion:** In early times (30 and 50 dpi), a big quantity of larvae and viable eggs were found at the vasa vasorum of the cecal artery leading to an intense eosinophilic infiltrate at the adventitious vessel, forming granulomas. The parasites associated to the inflammatory infiltrate promote an eosinophilic vasculitis centripetal with the elastic blades destruction. The inner loses the basic cell characteristics, becoming disorganized or even vanishing. With the disease's temporal evolution, there is an increase at the disease severity in later times (90 and 114 dpi), when an atherosclerotic process gets installed. A thrombus composed mainly by fibrin, iron and a xanthomatous substance, positive to Red Congo. At this moment, the eosinophilic infiltration ceases and there is a predominance of macrophage carriers of this xanthomatous substance and iron. The elastic arteries blades with worms are destroyed bringing a big vessel disruption. In the blood, in 90dpi there is an increasing on the total leukocytes number, decreasing on the platelets number and an increasing on their size. At this point, the animal total cholesterol has no change in relation to the controls. At those later moments, it is observed a clear increase on the marrow activity, with predominant eosinophilia and

megakaryocytes number increasing. It is possible that those lesions development may be related to the gram positive bacteria present at *A. costaricensis*. **Conclusions:** Our data suggest that the model of the *S. hispidus* I infected by *A. costaricensis* can be usual by the atherosclerosis study.

**Key-words:** *Angiostrongylus*- abdominal angiostrongiliasis - Sigmodontinae- arterite- atherosclerosis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Ciclo de vida natural do <i>Angiostrongylus costaricensis</i> .....	6
<b>Figura 1.2</b>	Distribuição geográfica de casos humanos e animal do <i>A. costaricensis</i> no mundo.....	7
<b>Figura 1.3</b>	Infecção do homem por <i>Angiostrongylus costaricensis</i> .....	9
<b>Figura 4.1</b>	Alterações macroscópicas e histopatológicas intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> aos 30 dpi.....	30
<b>Figura 4.2</b>	Aspectos intestinais na infecção do <i>S. hispidus</i> por <i>A. costaricensis</i> , com 30 dpi.....	31
<b>Figura 4.3</b>	Alterações macroscópicas e histopatológicas intestinais na infecção do <i>S. hispidus</i> por <i>A. costaricensis</i> com 50 dpi.....	32
<b>Figura 4.4</b>	Aspectos histopatológicos intestinais na infecção do <i>S. hispidus</i> por <i>A. costaricensis</i> com 50 dpi.....	33
<b>Figura 4.5</b>	Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 90 dpi.....	34

<b>Figura 4.6</b>	Aspectos histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 90 dpi.....	35
<b>Figura 4.7</b>	Aspectos histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 90 dpi.....	36
<b>Figura 4.8</b>	Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> com 114 dpi.....	37
<b>Figura 4.9</b>	Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 114 dpi.....	38
<b>Figura 4.10</b>	Aspectos histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 114 dpi.....	39
<b>Figura 4.11</b>	Aspectos histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 114 dpi.....	40
<b>Figura 4.12</b>	Aspectos histopatológicos intestinais de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> com 114 dpi.....	41
<b>Figura 4.13</b>	Ausência de lesões ateroscleróticas na histologia das artérias coronárias de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> .....	42
<b>Figura 4.14</b>	Ausência de lesões ateroscleróticas na histologia das artérias coronárias de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> .....	43

<b>Figura 4.15</b>	Alterações imunohistoquímicas intestinais e vasculares de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> aos 114 dpi.....	45
<b>Figura 4.16</b>	Alterações imunohistoquímicas intestinais e vasculares de <i>S. hispidus</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> aos 114 dpi.....	46
<b>Figura 4.17</b>	Análise bioquímica do colesterol total de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> aos 90 dpi dias.....	48
<b>Figura 4.18</b>	Hemograma de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> com 30 dpi.....	51
<b>Figura 4.19</b>	Hemograma de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> aos 50 dpi.....	52
<b>Figura 4.20</b>	Hemograma de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> aos 90 dpi.....	53
<b>Figura 4.21</b>	Esfregaço sanguíneo de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> aos 90 dpi.....	54
<b>Figura 4.22</b>	Hemograma de <i>S. hispidus</i> infectados por <i>A. costaricensis</i> aos 114 dpi.....	55
<b>Figura 4.23</b>	Bactérias presentes na lesão aterosclerótica de <i>Sigmodon hispidus</i> infectados com <i>Angiostrongylus costaricensis</i> aos 90 dpi.....	59

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Quadro comparativo das características macroscópicas e histológicas da infecção de <i>S. hispidus</i> com <i>A. costaricensis</i> .....	24
<b>Quadro 2</b>	Quadro representativo dos números absolutos dos dados do hemograma.....	50

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>EPIGRAFE.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 <b>Aspectos gerais.....</b>	<b>1</b>
1.2. <b>Morfologia do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Verme adulto.....	2
1.2.2. Ovo .....	3
1.2.3. Estágios larvários.....	4
1.3. <b>Ciclo de vida.....</b>	<b>5</b>
1.4. <b>Epidemiologia .....</b>	<b>7</b>
1.5. <b>Patologia humana.....</b>	<b>8</b>
1.6. <b>Patologia de roedores.....</b>	<b>10</b>
1.7. <b>Tratamento e prevenção.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. <b>Objetivo geral.....</b>	<b>12</b>
2.2. <b>Objetivos específicos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1. <b>Animais.....</b>	<b>13</b>
3.2. <b>Eutanásia e coleta de sangue.....</b>	<b>13</b>
3.3. <b>Destinação dos tecidos.....</b>	<b>14</b>

<b>3.4.</b>	<b>Imunomarcação.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5.</b>	<b>Colorações.....</b>	<b>15</b>
3.5.1.	Hematoxilina-eosina (HE).....	15
3.5.2.	Sirius Red pH 10.2 .....	15
3.5.3.	Método de Perls .....	16
3.5.4.	Resorcina- Fucsina de Weigert .....	16
3.5.5.	Tricrômica de Azan.....	16
3.5.6.	Vermelho do Congo e análise em microscópio de luz polarizada.....	17
<b>3.6.</b>	<b>Estudo da dinâmica hematológica.....</b>	<b>18</b>
3.6.1.	Hemograma.....	18
3.6.2.	Distensão sanguínea.....	18
<b>3.7.</b>	<b>Estudo bioquímico para mensuração da colesterolemia total...</b>	<b>18</b>
<b>3.8.</b>	<b>Estudo microbiológico.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<b>4.1.</b>	<b>Análise histopatológica do intestino e da circulação intestinal.</b>	<b>20</b>
4.1.1	Achados histopatológicos em 30 dpi .....	20
4.1. 2.	Achados histopatológicos em 50 dpi .....	20
4.1.3.	Achados histopatológicos em 90 dpi .....	21
4.1.4.	Achados histopatológicos em 114 dpi .....	22
<b>4.2.</b>	<b>Histopatologia das artérias coronárias.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.</b>	<b>Análise histológica da medula óssea.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.</b>	<b>Animais controle normais.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5.</b>	<b>Ausência de lesões ateroscleróticas na artéria cecal de animais idosos não infectados.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Detecção imunohistoquímica da presença da desmina tecidual.....</b>	<b>44</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise bioquímica para mensuração da colesterolemia total</b>	<b>47</b>

<b>4.8.</b>	<b>Estudo da dinâmica hematológica periférica.....</b>	<b>49</b>
4.8.1.	Hemograma em 30 dpi e 50 dpi.....	49
4.8.2.	Hemograma em 90 dpi .....	49
4.8.3.	Hemograma em 114 dpi .....	50
4.9.	<b>Estudo microbiológico.....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
	Esquema simplificado dos resultados da tese.....	70
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1: LICENÇA CEUA CRIAÇÃO**

**Anexo 2: LICENÇA CEUA EXPERIMENTAÇÃO**

**Anexo 3: SUBMISSÃO DO ARTIGO**

**Anexo 4: CAPA DO ARTIGO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais

Em 1952, foi realizada uma ressecção ileocecal em uma menina de sete anos, devido a uma síndrome abdominal dolorosa, associada a estado infeccioso e uma massa palpável no quadrante inferior direito do abdômen. Inicialmente, acreditava-se tratar de um tumor, porém os resultados histopatológicos demonstraram um espessamento da parede intestinal com intenso infiltrado eosinofílico, além de uma estrutura de aspecto hialino, interpretada como um helminto.<sup>1</sup>

Durante um período de 16 anos, um estudo foi realizado por Céspedes e colaboradores<sup>1</sup> utilizando 230 mil biópsias humanas. Verificou-se através de análises anatomopatológicas a presença de ovos e vermes adultos nos tecidos, bem como um infiltrado eosinofílico em pacientes com sintomas semelhantes (31 casos). Este último achado pode estar associado ou não à presença do parasita.<sup>1</sup>

No mesmo ano do artigo que descrevia a patologia, foi publicado um artigo que descreveu morfologicamente o parasita e sua localização.<sup>2</sup> Um estudo realizado em 1970 por Morera<sup>3</sup> descreveu os hospedeiros definitivos do ciclo deste parasita. Os hospedeiros intermediários foram citados no mesmo ano, em outro artigo.<sup>4</sup>

A espécie deste parasita foi descrita em 1971, por Morera e Céspedes<sup>5</sup> com características morfológicas distintas das outras espécies do gênero *Angiostrongylus* e foi sugerido o nome *Angiostrongylus costaricensis*.

A angiostrongilíase abdominal é uma doença tipicamente americana. A distribuição geográfica deste helminto vai desde a América do Norte (Estados Unidos) até a América do Sul (Argentina), porém a maioria dos casos de infecção ocorre na América Central. No Brasil foram diagnosticados, até o ano de 1995, 42 casos desta doença em humanos, sendo 27 no Rio Grande do Sul.<sup>6-11</sup>

Sabe-se que o ciclo de vida envolve um hospedeiro intermediário, geralmente lesmas da família *Veronicellidae*<sup>12</sup> e hospedeiros definitivos vertebrados, incluindo o *Sigmodon hispidus*<sup>3,13-14</sup> utilizado em nosso estudo. Neste contexto o homem insere-se como hospedeiro acidental, visto que se infecta através da ingestão de frutas e verduras contaminadas por larvas de terceiro estágio.<sup>15</sup>

A angiostrongilíase abdominal chegou a ser considerada um problema de saúde pública na década de 80<sup>16</sup>, porém nunca houve um interesse em aumentar o investimento em sua detecção clínica, ou na produção de conhecimento científico acerca desta patologia, visto que além de ser pouco conhecida é usualmente bem tolerada pelos pacientes.<sup>17</sup>

## **1.2. Morfologia do *Angiostrongylus costaricensis***

### 1.2.1. Verme adulto

O *Angiostrongylus costaricensis* (Morera, Céspedes, 1971)<sup>5</sup> faz parte da superfamília Metastrongyloidea, e do gênero *Angiostrongylus*, o qual inclui 21 espécies infectantes para pequenos mamíferos.<sup>18</sup> Dentre estas, somente duas, o *A. cantonensis* (Chen 1935)<sup>19</sup> e o *A. costaricensis*, são patogênicas para o homem, o qual se tornou um hospedeiro acidental.

As formas adultas instalam-se majoritariamente no interior das arteríolas da parede intestinal ou em outros ramos arteriais do mesentério, incluindo linfonodos, provocando arterites e fenômenos trombóticos.<sup>2</sup>

Machos e fêmeas possuem corpo filiforme, afilado nas extremidades. A cutícula é transparente, lisa, e estriada transversalmente, com extremidades ligeiramente espessas. A extremidade anterior é arredondada e não possui cápsula bucal. Ao redor da boca, em formato de círculo, estão dispostas seis papilas sensoriais. O anel nervoso está situado na metade superior do esôfago. O poro excretor é imediatamente posterior à base do esôfago claviforme.<sup>5, 12, 20</sup>

Os machos medem entre 15 - 19,9 mm e tem largura máxima de 0,31 mm. A largura esôfago-intestinal é 0,079 - 0,093 mm e o comprimento do esôfago é 0,160 - 0,180 mm. O esôfago claviforme tem 0,203 mm de comprimento e 0,126 mm de largura na base. Um par de espículas de tamanho e formas iguais, delgados e estriados, mede 0,267 - 0,297 mm de comprimento. O gubernáculo (estrutura quitinizada da cloaca que serve de apoio à movimentação dos espículos em alguns

nematódeos do sexo masculino) consiste em duas estruturas paralelas em forma de lança que se juntam e terminam na cloaca, mede 0,045 mm.

O macho tem a extremidade caudal curvada ventralmente com uma bursa copulatória bem desenvolvida, a qual possui raios ventrais que se fundem em terminações em forma de botão (com exceção da quinta parte distal), sendo o tronco ventro-lateral mais delgado que o ramo ventro-ventral).<sup>5</sup> Os raios laterais surgem de um tronco comum e são similares em tamanho. Os raios postero-lateral e médio-lateral que se fundem à metade proximal enquanto que o antero-lateral é mais largo e está destacado dos demais. O raio externo-dorsal surge próximo a base lateral e estão separadas da base dorsal. A base dorsal é longa, fina, tornando-se mais larga na extremidade distal. O raio dorsal é fino, curto e finaliza-se com três terminações: a central curta e em forma de botão, e as laterais de forma afilada.<sup>5</sup>

O aparelho reprodutor consiste em um único tubo diferenciado dentro dos testículos livres (o qual se inicia posteriormente a junção esôfago-intestinal) que terminam dentro de um tubo recurvado, que leva à vesícula seminal e a um ducto muscular ejaculatório que desemboca na cloaca.<sup>21</sup>

A fêmea é maior e mais robusta que o macho, tendo seu comprimento entre 26,9 - 42 mm e uma espessura de 0,336 mm. O esôfago claviforme mede entre 0,165 - 0,245 mm e a largura de sua base varia de 0,108 a 0,143 mm. Possui a extremidade caudal levemente cônica e ligeiramente curvada. O aparelho genital enrola-se no intestino. Possui dois ovários, conectados cada um a um oviduto, os quais desembocam em dois úteros. Esses úteros juntam-se formando a vagina, que se abre na vulva. A vulva está situada a 0,175 - 0,265 mm do ânus e a 0,053 mm da ponta da cauda. A extremidade caudal tem forma de cone e finda em um pequeno espinho refringente.<sup>5,21</sup>

### 1.2.2. Ovo

Morera<sup>2</sup> descreveu que os ovos medem aproximadamente 90µm em seu eixo maior e possuem uma casca fina e formato oval. Mesmo após atingir o estado larvar, a larva permanece envolvida pela casca do ovo. Os ovos imaturos possuem caráter citoplasmático acidofílico, granular ou claro e núcleo ovoide.<sup>5,22</sup>

Hata<sup>23</sup> mostrou que é possível cultivar estes ovos, *in vitro*, utilizando meio enriquecido (Ham's F12). Foi visto que os ovos crescem significativamente de 63,6 µm x 37,5 µm para 67 µm x 42 µm, seis dias após o cultivo.

Os ovos, coletados até 3h após a oviposição, desenvolvem-se normalmente em L1, que são infectivos para moluscos. A única diferença detectada é que houve um atraso na eclosão das larvas. *In vivo*, utilizando *Sigmodon hispidus* Morera (1973) demonstrou que a eclosão ocorre em cinco dias de desenvolvimento desses parasitas, enquanto que *in vitro* o mesmo processo tarda sete dias.<sup>23</sup>

### 1.2.3. Estágios larvários

As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas pelo hospedeiro vertebrado através das fezes. Esta possui formato cilíndrico (14-15 µm de espessura) e mede entre 0,26 - 0,29 mm. Sua extremidade anterior é arredondada e a posterior gradualmente atenuada. Na porção dorsal e ventral do corpo situam-se duas cristas nas laterais do corpo que o dividem em porção dorsal e ventral. Seu corpo é revestido por cutícula estriada com um curto sulco longitudinal. Possui abertura bucal na extremidade anterior, onde é possível visualização do lúmen do esôfago. Este último possui formato claviforme e mede 0,128 mm, com anel nervoso na metade anterior, distante 40 µm da extremidade cefálica. O intestino é tubular, repleto de material granular.<sup>12,20</sup>

O primórdio genital está localizado a 85 µm da face posterior. O poro excretor situa-se na porção ventral a aproximadamente um quarto da extremidade posterior. O orifício anal está localizado do lado ventral a 26 µm da extremidade da cauda.<sup>12,20</sup>

As larvas de segundo estágio (L2) desenvolvem-se dentro do hospedeiro invertebrado (molusco) e são mais espessas que a L1, além de serem imóveis.<sup>12,24</sup> Nesse estágio também há um grande número de grânulos de natureza lipídica e tamanho variável, em todo o corpo do parasita, especialmente localizados na transição esôfago-intestinal. Esses grânulos desaparecem gradualmente durante a transição até a L3. Outros grânulos de natureza glicídica também estão presentes, porém com um padrão granular, fino e difuso e estão situados nos terços proximal e medial da larva.<sup>24</sup>

As larvas de terceiro estágio (L3) são mais espessa e maiores que as duas formas iniciais, medindo 0,46 - 0,482 mm de comprimento e 0,28 µm de largura. Tem forma do corpo similar aos demais estágios, porém a extremidade posterior difere e as asas laterais são mais espessas. O esôfago claviforme mede 0,164 mm, seguido por um intestino tubular com abertura anal que dista 32 µm da extremidade posterior. O primórdio genital está localizado a 0,164 mm da extremidade distal. A cauda apresenta uma endentação do lado dorsal, associada a um alargamento ventral, com a superfície coberta de minúsculas projeções em forma de bolhas.<sup>12,20</sup>

No estágio de L4 já há um dimorfismo sexual entre as larvas, associados a uma diferença de tamanho. As fêmeas medem 0,925 mm enquanto que os machos 0,875mm. L4 evolui para L5 no quinto dia pós-infecção, e ao sétimo dpi todos os parasitas já são adultos jovens.<sup>12</sup>

### 1.3. Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasita envolve um hospedeiro intermediário invertebrado e um hospedeiro definitivo vertebrado<sup>25</sup> (Figura 1.1).

Os hospedeiros intermediários mais importantes são moluscos terrestres sem concha, da família *Veronicellidae*, conhecidos vulgarmente como lesmas, tais como *Phyllocaulis variegatus* e *P. soleiformis*.<sup>12</sup> Em modelos experimentais é possível conseguir o desenvolvimento do *A. costaricensis* também em *Sarasinula marginata*<sup>26</sup>, *Achatina fulica*<sup>27</sup> e planorbídeos<sup>28</sup>.

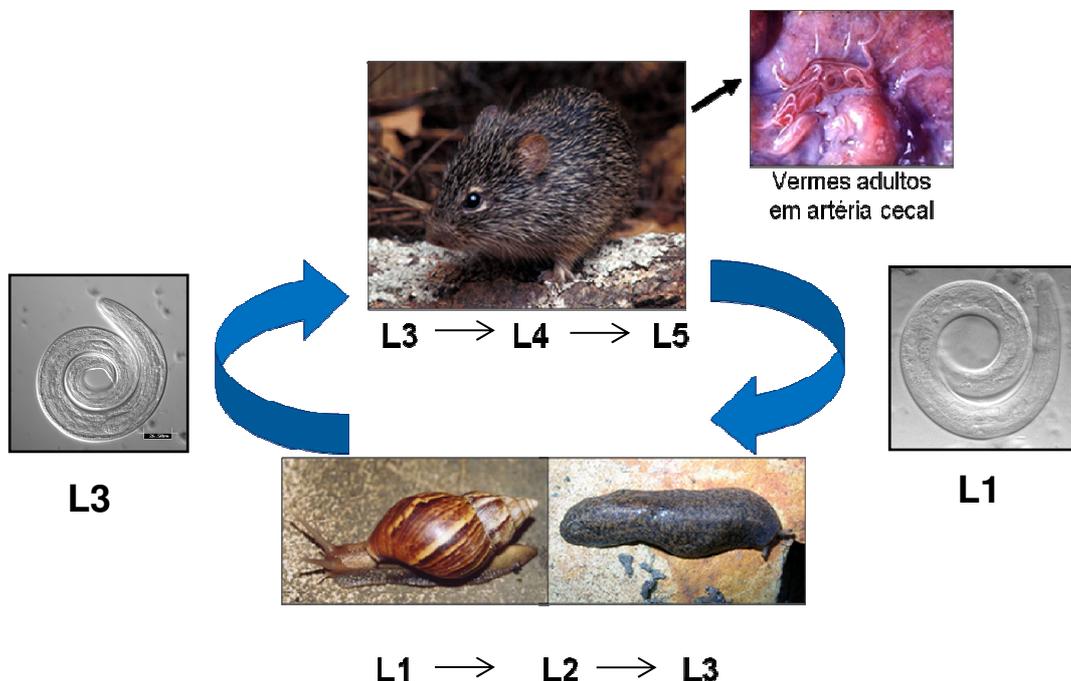
Os hospedeiros intermediários infectam-se através do tegumento ou alimentação com L1. No interior do molusco, essas larvas sofrem mudas e passam pelo estágio de L2, permanecendo em L3, tornando-se infectantes e chegam aos hospedeiros definitivos, seja através da ingestão de alimentos contaminados ou do próprio molusco.<sup>29</sup>

Os hospedeiros definitivos naturais do *A. costaricensis* são: *Sigmodon hispidus*<sup>3,13-14</sup>, *Rattus rattus*<sup>3,13</sup>, *Zygodontomys microtinus*<sup>13</sup>, *Liomys adspersus*<sup>13</sup>, *Oligoryzomys fulvescens*<sup>13</sup>, *O. caliginosus*<sup>30</sup>, *O. nigripes*<sup>30</sup>, *O. ratticeps*, *Proechimys sp.*<sup>31</sup> e outros mamíferos como *Saguinus mystax*<sup>32</sup> e *Nasua narica bullata*<sup>33</sup>.

Mota e Lenzi<sup>15</sup> descreveram as vias migratórias do *Angiostrongylus costaricensis*, utilizando *S. hispidus*, e, como outros metastrongilídeos, ele utiliza a circulação pulmonar para passar da via linfática para a venosa/arterial (circulação sistêmica).

Uma vez instalados no sistema arterial do hospedeiro definitivo os vermes adultos instalam-se na artéria mesentérica superior e as fêmeas liberam os ovos, os quais evoluem para L1. Algumas desses ovos/larvas são liberadas no intestino e são eliminados junto com as fezes, infectando os hospedeiros intermediários e mantendo assim o ciclo.<sup>15</sup>

Em humanos, a reação inflamatória consegue destruir os ovos e como a larvogênese é eventual não há eliminação de L1 pelas fezes e consequente fechamento do ciclo. Desta maneira, por não eliminar larvas nas fezes, o homem é considerado hospedeiro acidental.<sup>29</sup>

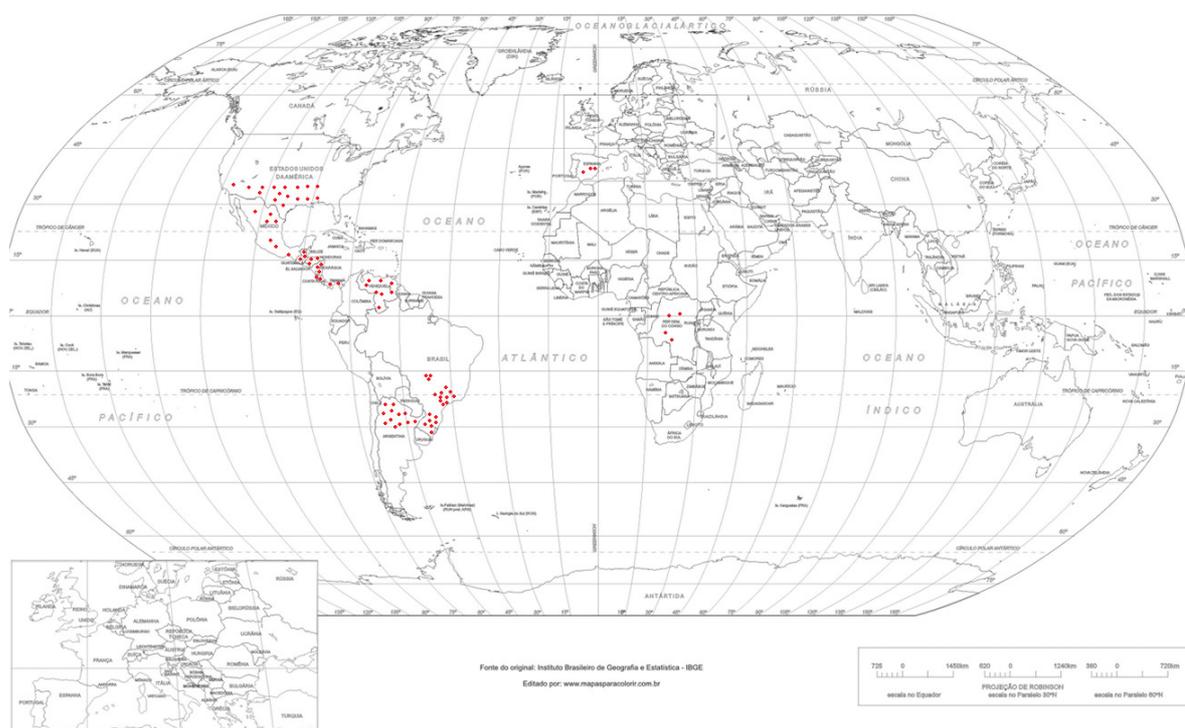


**Figura 1.1:** Ciclo de vida natural do *Angiostrongylus costaricensis*.

**Fonte:** Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ

## 1.4. Epidemiologia

A ocorrência deste parasita foi detectada desde os Estados Unidos até a Argentina, mas a maioria dos casos ocorreu na América Central (Figura 1.2). Roedores naturalmente infectados foram encontrados no Panamá (*Sigmodon hispidus*<sup>3,13-14</sup>, *Rattus rattus*<sup>3,13</sup>, *Zygodontomys microtinus*<sup>13</sup>, *Liomys adpersus*<sup>13</sup> *Oligoryzomys fulvescens*<sup>13</sup>), Colômbia (*Oryzomys caliginosus*<sup>30</sup>), Venezuela (*Proechimys* sp<sup>31</sup>) e Brasil (*Oligoryzomys nigripes* e *Phyllocaulis variegatus*<sup>29</sup>) enquanto que casos humanos foram encontrados nos Estados Unidos<sup>34-36</sup>; México<sup>37</sup>; Honduras<sup>38</sup> e Nicarágua<sup>39</sup>. No Brasil foram diagnosticados, até o ano de 1995, 42 casos humanos desta doença nos estados de São Paulo<sup>6</sup>, Distrito Federal<sup>7</sup>, Minas Gerais<sup>10</sup> e Espírito Santo<sup>11</sup>, mas a área endêmica é a região Sul do país<sup>8-9</sup>, em especial o Rio Grande do Sul. Este estado apresentou 27 casos no período de 1975 a 1984<sup>29</sup>.



**Figura 1.2:** Distribuição geográfica de casos humanos e animal do *A. costaricensis* no mundo.

**Fonte:** Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ

## 1.5. Patologia humana

A espécie (*A. costaricensis*) foi descrita na Costa Rica, por Moreira e Céspedes em 1971, como sendo o agente causador de uma patologia que afetava principalmente crianças e causava espessamento e edema da parede intestinal.<sup>5</sup>

Os primeiros estudos, realizados logo após a descrição do primeiro caso, em 1952, demonstravam como principais sintomas: dor abdominal (geralmente localizada na fossa ilíaca direita); febre alta por até dois meses; anorexia (com vômito em alguns poucos casos).<sup>1</sup>

Ao exame físico era percebida uma massa abdominal, o que provocava uma dificuldade no diagnóstico, visto que os casos poderiam ser confundidos com apendicite ou câncer. Os achados laboratoriais apontavam eosinofilia intensa, que chegava a alcançar 81%.<sup>1</sup>

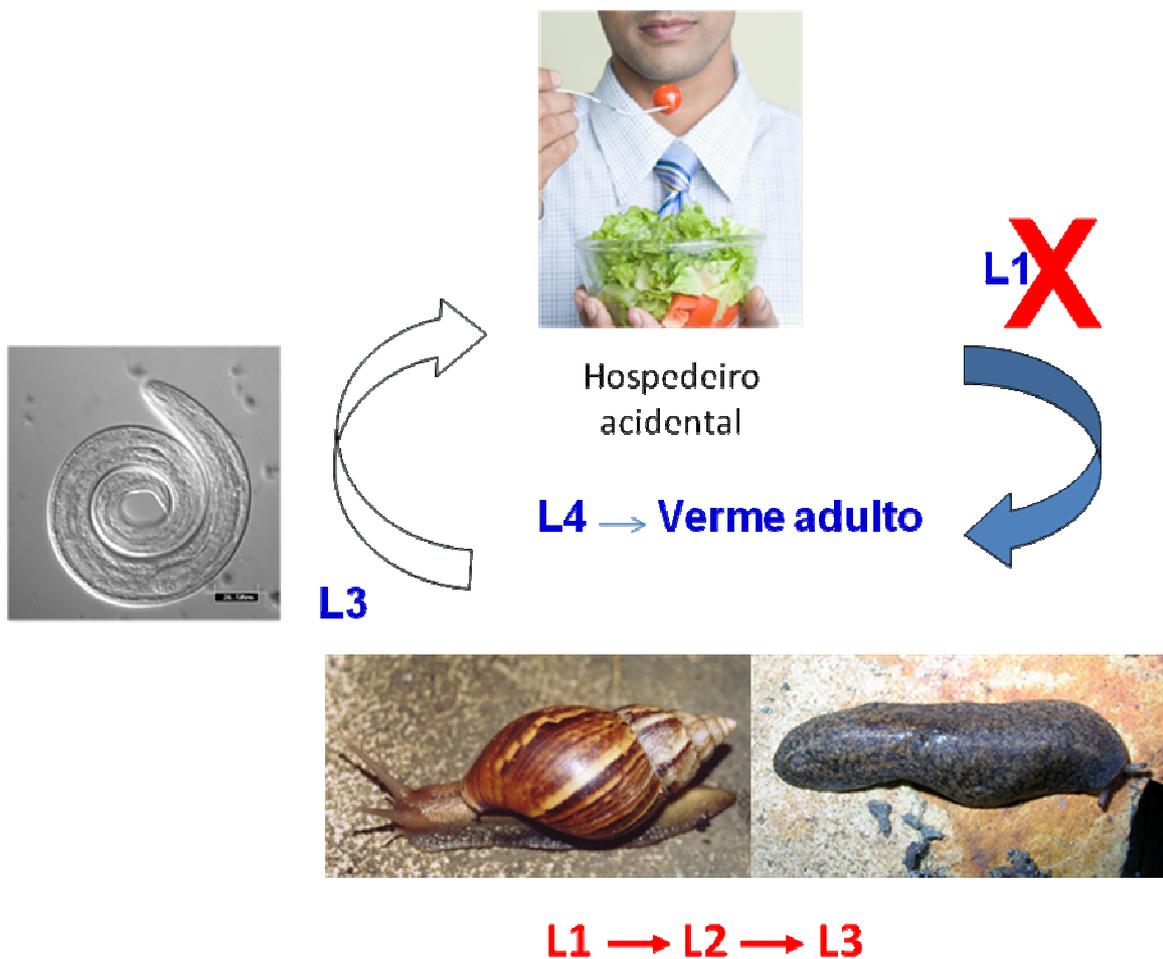
Os estudos anatomopatológicos revelavam que as lesões eram em geral, localizadas no apêndice, mas, em alguns casos eram afetados, o íleo, o ceco, a primeira porção do cólon ascendente e os linfonodos regionais. Em tempos mais tardios de infecção, alguns ovos apareciam dentro de células gigantes. Em cortes histológicos, vermes adultos apareciam localizados dentro da artéria mesentérica e seus ramos intramurais. Estes vermes algumas vezes podiam também causar arterite e trombose.<sup>1</sup>

Os ovos postos pelas fêmeas nas artérias e arteríolas são levados pelo fluxo sanguíneo até os capilares para onde embolizam. Na descrição inicial da doença, eles não foram encontrados na luz do intestino, e quando o processo inflamatório está crônico, observam-se ovos envolvidos por células gigantes do tipo corpo estranho.<sup>2</sup>

O diagnóstico é baseado em uma tríade histopatológica que descreve a doença: reação granulomatosa; infiltrado eosinofílico na parede intestinal e vasculite eosinofílica, que afeta vasos linfáticos, capilares, veias e artérias, mesmo na ausência de vermes adulto.<sup>29</sup>

Sempre se observou a angiostrongilíase abdominal como uma patologia muito bem localizada, conforme supracitado. Porém, em alguns casos isolados, é possível constatar uma instalação ectópica do parasita, incluindo seu estabelecimento em arteríolas hepáticas. Em alguns destes vasos é possível observar trombos com material semelhante a fibrina junto com estruturas do nematódeo.<sup>40</sup>

Descobriu-se, portanto, que humanos participavam do ciclo, porém eram hospedeiros acidentais, visto que não eliminavam larvas nas fezes (Figura 3). Adquiriam a doença através da ingestão de vegetais ou frutas cruas contaminados com muco do molusco contendo L3.<sup>15</sup>



**Figura 1.3:** Infecção do homem por *Angiostrongylus costaricensis*.

**Fonte:** Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ

## 1.6. Patologia de roedores

Mota e Lenzi<sup>15</sup>, utilizando *Sigmodon hispidus*, demonstraram que L3 utilizam as vias linfática e venoso / arterial, para migração, desenvolvimento e instalação do verme adulto na artéria cecal. Da mesma forma que outros metastrongilídeos o *A. costaricensis* utiliza a circulação pulmonar para migrar da via linfática para a via arterial, onde circula por alguns dias até chegar ao seu hábitat definitivo. Em roedores, a postura de ovos inicia-se por volta do décimo quinto dia de infecção e os ovos e larvas são encontrados principalmente no trato intestinal, rodeado por uma reação inflamatória. O citado infiltrado é constituído principalmente por monócitos/macrófagos e eosinófilos. É possível também a detecção desses elementos nos pulmões, linfonodos mesentéricos, pâncreas, baço e rins. Alguns vermes adultos desenvolvidos na via intrahepática, migram para os vasos mesentéricos e, nesse trajeto, depositam ovos que embolizam para o sistema porta-hepático.

A utilização do *Sigmodon hispidus* deu-se devido ao mesmo conseguir manter a infecção, visto que é um hospedeiro natural do *A. costaricensis*, o qual desenvolve a patologia conforme é vista na natureza. Associada a esse fato, a manutenção desse animal em laboratório, bem como sua procriação é fácil, tornando exequível a realização de experimentos com essa espécie.

Modelos experimentais murinos, especialmente camundongos (Swiss Webster), apresentam letalidade que pode chegar a até 80% em quatro meses e os animais que sobrevivem tem baixíssima parasitemia.<sup>41</sup> Não há diferenças estatisticamente significativas entre gêneros do camundongo e a relação da susceptibilidade e mortalidade perante a infecção pelo parasito, porém os vermes desenvolvidos em camundongos machos, apresentam um maior comprimento quando comparados com o das fêmeas.<sup>42</sup>

## **1.7. Tratamento e prevenção**

Não existe um tratamento específico para pacientes com angiostrongilíase abdominal. Os anti-helmínticos usuais não são efetivos e podem agravar o quadro clínico.<sup>43</sup> O tratamento com mebendazol não diminui o número de vermes adultos

recuperados e nem a taxa de mortalidade total dos animais, porém reduz significativamente a eliminação de L1 pelos roedores.<sup>44</sup>

Um estudo comparou o efeito da lovastatina, mebendazol e fenantrolina na oviposição e não houve diferença significativa nas médias dos controles e infectados tratados com lovastatina e mebendazol. No tratamento com fenantrolina, houve uma menor média relacionada à eliminação larvária e uma redução significativa da mortalidade.<sup>45</sup>

O tratamento com enoxaparina (heparina de baixo peso molecular) também foi testado por via subcutânea. Iniciando-se na fase precoce da infecção, não apresenta melhoria na taxa de mortalidade nem sobre dano tissular do hospedeiro definitivo.<sup>46</sup>

Um modelo de vacina foi proposto, utilizando um peptídeo sintético e outro recombinante da região serina/treonina fosfatase do parasita e foi testado utilizando camundongos C57BL/6. A inoculação foi feita de forma intranasal em duas doses e posteriormente foi realizado o desafio. Demonstrou-se que houve proteção entre 60% e 100%, nos diferentes grupos inoculados e, onde houve 100% de proteção verificou-se um aumento significativo de IFN-gama e IL-17. Confirmou-se, portanto, que uma vacinação através da mucosa oral pode ser um método aplicado para criação de uma resposta imunoprotetora contra o *A. costaricensis*.<sup>47</sup>

Diante do exposto, verificamos que apesar da importância clínica da angiostrongilíase abdominal, ainda há pouco conhecimento científico acerca dessa doença. Evidencia-se, portanto, a importância de um melhor entendimento da patologia produzida pelo parasita. Baseados na tríade histopatológica que descreve a doença: reação granulomatosa; infiltrado eosinofílico na parede intestinal e vasculite eosinofílica, que afeta vasos linfáticos, capilares, veias e artérias, mesmo na ausência de vermes adulto, neste trabalho buscamos dar um detalhamento histopatológico das lesões localizadas, com foco nas lesões vasculares, e promover uma análise sistêmica das modificações hematológicas sofridas pelo animal infectado, visto que a intensa eosinofilia é essencial no desenvolvimento deste quadro.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo geral

Estudar a evolução das lesões vasculares da angiostrongilíase abdominal experimental em cricetídeos *Sigmodon hispidus* correlacionando-a com parâmetros hematológicos, bioquímicos e microbiológicos.

## 2.2. Objetivos específicos

Em *Sigmodon hispidus* infectados experimentalmente por *Angiostrongylus costaricensis*:

- Caracterizar macroscopicamente e histopatologicamente as alterações vasculares do território intestinal aos 30, 50, 90 e 114 dias pós-infecção;
- Acompanhar a dinâmica hematológica periférica, a partir de análises de hemograma nos mesmos momentos de infecção;
- Analisar alterações morfológicas dos elementos celulares circulantes no sangue periférico de animais com 90 e 114 dpi, através de hematoscopia e dos elementos centrais a partir de análises da medula óssea;
- Medir a colesterolemia de animais infectados com 90 dpi, comparando-a com a de animais não infectados de mesma idade;
- Verificar a existência de bactérias na circulação regional do ceco e sistêmica em animais com 60 dpi, que possam ser correlacionadas às lesões vasculares observadas nos pontos posteriores.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

Foram utilizados roedores *Sigmodon hispidus*, oriundos de colônia estabelecida no Biotério do Laboratório de Patologia-IOC, a partir da aquisição comercial de matrizes junto à empresa Virion Systems (USA), em 1994. Os animais estão instalados do Pavilhão Lauro Travassos, na FIOCRUZ- RJ. A aprovação de criação dos animais pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) está regida pelo protocolo CEUA-LW43/13 e licença do IBAMA 34095. O racional experimental foi adicionado em adendo e aprovado no Comitê de Ética de Utilização Animal da Fiocruz (CEUA), sob licença número LN 26/15. Os animais foram mantidos a temperatura entre 21 / 22°C, umidade entre 55 e 56% no ciclo de luz de 12 horas, com livre acesso a água e ração do tipo *pellets*.

O ciclo do *Angiostrongylus costaricensis* foi mantido administrando-se individualmente, a caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), 1200 L1, obtidas através de coleta de fezes de *S. hispidus* infectados. Aproximadamente 30 dias pós-infecção (dpi), os caramujos foram eutanasiados e as L1 coletadas conforme o método de Baermann-Moraes, utilizando um funil com uma peneira na borda e gase para ajudar na filtragem. As L1 foram contadas e administradas por gavagem em *S. hispidus* (50 larvas por animal). Foram infectados animais adultos jovens (com cerca de 90 dias de nascidos) e os controles utilizados tinham a mesma faixa etária, a fim de minimizar os riscos de resultados diferentes devido à idade. Para o controle de alterações histopatológicas degenerativas espontâneas, animais não infectados também foram analisados.

### 3.2. Eutanásia e coleta de sangue

Os animais foram anestesiados em 30,50, 90 e 114 dpi utilizando cloridrato de quetamina (10%) (Syntec) associados a cloridrato de xilazina (2%) (Syntec) na proporção de 1:1 e injetados 0,5 mL intraperitoneal + 0,02 mL intramuscular (50mg de quetamina e 1,4 mg de xilazina / animal). Após o desaparecimento total dos reflexos de pata e palpebral, o plexo braquial direito dos animais foi cortado para a

coleta de sangue (com o auxílio de uma pipeta Pasteur) para realização de hemograma e esfregaço (descrita abaixo no item 3.6) e para a quantificação da colesterolemia (item 3.7).

Foi feito o registro macroscópico do intestino, baço, fígado, pulmões, bexiga e útero ou vesícula seminal com câmera Nikon D60 (lente 50 mm). Foram coletados: intestino, artéria cecal, coração, vértebras, fêmur, tíbia e fíbula e fixados em Formalina Millonig de Carson.

### **3.3. Destinação dos tecidos**

Após o mínimo de 24 h de fixação os ossos foram transferidos para solução de EDTA, visando a descalcificação. Todo o material foi clivado e processado em processador automático de tecidos Shandon Citadel 2000 em parafina.

A inclusão foi feita em inclusor (Shandon Histocentre 2) e os blocos cortados em micrótomo na espessura de 5 µm. Os mesmos foram corados em Hematoxilina – eosina (HE); Sirius Red 10.2 (eosinófilos); Perls (Ferro); Resorcina-Fucsina (Fibras musculares); Tricrômica de Azan (Fibrina) e Vermelho do Congo (Substância amilóide). As colorações específicas foram feitas conforme os achados histológicos em HE, a fim de que fossem compatíveis. Os ossos foram corados com HE e Sirius Red 10.2.

### **3.4. Imunomarcação**

Para a realização da imunohistoquímica os blocos foram cortados entre duas e 24h antes da realização da marcação, em lâminas sialinizadas. Para recuperação antigênica foi utilizada a Pascal no tampão citrato pH 6,0 ( ciclo 121 °C- 3min e 90°C- 10 segundos). A artéria cecal com trombo foi marcada com desmina (rabbit anti human, mouse and rat IgG-RB9014-P1/ Lot 9014P909H) e foi utilizado como anticorpo secundário Alexa 488 (goat anti-rabbit IgG- A 11008/ Lot 712170).

### **3.5. Colorações**

#### **3.5.1. Hematoxilina-eosina (HE)**

O objetivo da utilização desta técnica foi fornecer a visualização do aspecto morfológico geral dos órgãos estudados. Para realização da técnica, inicialmente os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3); etanol (100 %; 95 % e 70 %) e água destilada durante 3 minutos, em cada um. Posteriormente os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer por 20 minutos e lavados por 25 minutos em água corrente para diferenciação. Em seguida os mesmos foram desidratados em Etanol 70 % por 3 minutos e corados com eosina por 2 minutos. Por último os cortes foram desidratados em bateria de Etanol (70 %, 95 %, 100 %); clarificados com xilol (1,2,3), permanecendo durante 3 minutos em cada um dos reagentes anteriormente citados, e montados em Goma de Damar e lamínulas de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome (Zeiss) equipado com câmera AxioCam HRc.

#### **3.5.2. Sirius Red pH 10.2**

O objetivo da utilização desta técnica foi a marcação de eosinófilos teciduais. Os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3); etanol (100%; 95 % e 70 %) e água destilada. Posteriormente os cortes foram corados durante 5 minutos em Hematoxilina de Mayer; lavada em água corrente por mais 5 minutos e em água destilada por 2 minutos. As amostras foram deixadas em Etanol 70 % por 3 minutos e corados pela solução de Sirius Red 10.2 por uma hora. Em seguida os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados em bateria de Etanol (70 %, 95 %, 100 %), clarificados em xilol (1,2,3), e montados em Goma de Damar e lamínula de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome (Zeiss) equipado com câmera AxioCam HRc.

### 3.5.3. Método de Perls

O objetivo da utilização desta técnica foi a marcação de ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) nos tecidos. Os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3) e etanol (100 %; 95 % e 70 %), durante 3 minutos em cada reagente. As lâminas foram colocadas em solução estoque de ferrocianeto 5 % durante 5 minutos. Os cortes foram postos em ferrocianeto de potássio em ácido clorídrico durante 20 minutos e em seguida lavados 3 vezes em água destilada por 3 minutos. Imediatamente os cortes foram corados com vermelho rápido nuclear durante 1 minuto. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em bateria de Etanol (70 %, 95 %, 100 %), clarificados em xilol (1,2,3), e montados em Goma de Damar e lamínula de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome (Zeiss) equipado com câmera AxioCam HRc.

### 3.5.4. Resorcina- Fucsina de Weigert

O objetivo da utilização desta técnica foi marcar as fibras do sistema elástico (elásticas, oxitalânicas e elaunínicas) nos tecidos. Os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3) e etanol (100 %; 95 % e 70 %), durante 3 minutos em cada reagente. Posteriormente, as lâminas foram coradas durante uma hora com Resorcina-Fucsina. Imediatamente foram feitos seis banhos de Etanol 95 %, 100 % e isopropílico rapidamente em borreis (lâminas individualmente) para retirar o excesso de corante e desidratá-los. Os cortes foram clarificados em três banhos de xilol, durante 3 minutos cada um e montados em Goma de Damar e lamínulas de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome (Zeiss) equipado com câmera AxioCam HRc.

### 3.5.5. Tricrômica de Azan

O objetivo da utilização desta técnica foi visualizar depósitos de fibrina no tecido. Os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3);

etanol (100 %; 95 % e 70 %) e água destilada. Inicialmente os cortes foram coradas em solução de azocarmin (em água destilada e ácido acético) durante 30 minutos a 60°C. Em seguida as lâminas foram bem lavadas em água destilada e colocadas em solução mordente de ácido fosfotúngstico 5 % durante 3 horas. Posteriormente, estas foram novamente lavadas em água destilada e coradas em solução de Azul de Anilina- Orange G por um período de 1 hora. Os cortes foram lavados em água corrente durante 3 minutos, desidratados em bateria de Etanol (70 %, 95 %, 100 %), clarificados em xilol (1,2,3), e montados em Goma de Damar e lamínula de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome (Zeiss) equipado com câmera AxioCam HRc.

### 3.5.6. Vermelho do Congo e análise em microscópio de luz polarizada

O objetivo da utilização desta técnica foi visualizar amilóide. Os cortes foram desparafinados e hidratados em bateria de xilol (1,2,3); etanol (100 %; 95 % e 70 %) e água destilada. Em seguida, as lâminas foram coradas em hematoxilina de Mayer durante 10 minutos e lavadas em água destilada 3 vezes. Posteriormente as lâminas foram transferidas para solução alcalina de cloreto de sódio (1 %) por 20 minutos. Subsequentemente os cortes foram corados em solução de Vermelho do Congo alcalinizada. Logo depois os cortes foram desidratados em bateria de Etanol (70 %, 95 %, 100 %), clarificados em xilol (1,2,3), e montados em Goma de Damar e lamínula de vidro. As análises foram feitas em microscópio Axiohome da Carl Zeiss.

A fim de verificar se as amostras polarizavam à análise de luz polarizada as lâminas coradas em Vermelho do Congo foram visualizadas em microscópio de luz polarizada modelo Axio Observer Z1 da Carl Zeiss.

## **3.6. Estudo da dinâmica hematológica**

### 3.6.1. Hemograma

O volume de sangue coletado (entre 250 µl e 500 µl) foi enviado para a plataforma RPT12C- Análises Clínicas de Animais de Laboratório- Fiocruz e utilizando o Sistema Hematológico – contagem de WBC, RBC, PLT, HGB, MCV, MCH e MCHC foi feita a contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas; dosagem de hemoglobina e hematócrito; medida volume corpuscular médio; hemoglobina corpuscular média e concentração da hemoglobina corpuscular média, utilizando o Analisador hematológico (Sysmex, Kobe, Japão).

### 3.6.2. Distensão sanguínea

No momento da realização do experimento, uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de vidro e realizada uma distensão sanguínea. Posteriormente as lâminas foram coradas com panótico.

### 3.7. Estudo bioquímico para mensuração da colesterolemia total

Em experimento independente, três animais com 90 dpi foram anestesiados, conforme descrito anteriormente item 3.2, e foi feita punção cardíaca. Aproximadamente 1,5 mL de sangue foi coletado com seringa de 3 mL e posto em repouso em *Eppendorf*, a fim de separar a fase plasmática das células sanguíneas. As amostras foram enviadas para a plataforma RPT12C-Análises Clínicas de Animais de Laboratório e utilizando o soro no Sistema de Química Seca Johnson & Johnson foi dosado o colesterol total sérico dos animais.

### 3.8. Estudo microbiológico

Dois animais com 60 dpi foram sedados com 2 mg / kg de diazepam em água destilada. Em seguida, foram anestesiados utilizando cloridrato de quetamina (10%) (Syntec) associado a cloridrato de xilazina (2%) (Syntec) (1:1) injetando-se 0,4mL intramuscular, dividido nas duas coxas. A partir deste momento do experimento,

todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar, com material cirúrgico estéril. Ao desaparecerem os reflexos palpebrais e de pata, os animais foram submetidos à punção cardíaca. Após a coleta de sangue os animais foram submetidos à injeção de 10 mg / kg de tramadol, para manutenção do nível anestésico. Os animais tiveram a região abdominal tricotomizada (24 h antes do procedimento). Realizou-se a assepsia no abdômen foi cuidadosamente aberto (laparotomia) e a artéria cecal com a lesão foi retirada de forma estéril e coletada num tubo de transporte.

Com o auxílio de um Swab, uma amostra do meio de transporte carregando amostra foi transferida para o meio de cultura. Após 24 h desse procedimento, os meios que ficaram turvos foram plaqueados em Agar nutriente, Agar sangue e Agar Sabourand.

A amostra sólida foi homogeneizada em Stomacher e o macerado foi plaqueado em Agar sangue, Agar nutriente e Agar Sabourand. As colônias que cresceram em Agar sangue, foram passadas para o meio BHI. As colônias foram analisadas quanto à coloração de Gram e em seguida foram plaqueadas no meio Baird Parker.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. Análise histopatológica do intestino e da circulação intestinal

### 4.1.1. Achados histopatológicos em 30 dpi

Aos 30 dpi, o aumento do ceco foi discreto, com acúmulo significativo de líquido e aparente início da instalação de congestão de vasos que irrigam o ceco. A artéria cecal apresentou aspecto escurecido e dilatado (Figura 4.1A).

À microscopia, verificou-se a presença de larvas e ovos nas camadas mucosa, submucosa e muscular do intestino grosso e ceco (Figura 4.1B), ao redor dos quais havia um modesto acúmulo de ferro (Figura 4.1D) e um intenso infiltrado eosinofílico, quando estavam na submucosa (Figura 4.1C). Na muscular, a presença das fases iniciais deste parasita causou o divulsionamento das fibras (Figura 4.1B).

Nos ramos da artéria mesentérica superior e cecal, nicho do parasita adulto, observou-se um acúmulo de larvas e ovos na *vasa vasorum*, acompanhados de um infiltrado eosinofílico e macrofágico (estes últimos contendo uma substância amarelo-amarronzada) (Figura 4.2A). Ainda na região perivascular, encontraram-se granulomas periovulares/ perilarvares (Figura 4.2B) e uma discreta quantidade de ferro (Figura 4.2C). Nessas artérias contendo parasitas adultos, foi vista uma desorganização da lâmina elástica externa, porém estava mantida a estrutura da lâmina elástica interna (Figura 4.2D) de modo distinto, ao que foi observado nos pequenos vasos visualizados na área intestinal os quais mantiveram sua estrutura íntegra (Figura 4.1E; Figura 4.1F). À análise de outras estruturas constatou-se a presença de ovos e larvas em placa de Peyer (Figura 4.2E) e no pâncreas, estando estes no último caso, associado a um infiltrado eosinofílico (Figura 4.2F).

### 4.1.2. Achados histopatológicos 50 dpi

Aos 50 dpi, foi visível o aumento do ceco e um aspecto escurecido e enrugado, sugestivo de sofrimento de alça. A artéria cecal apresentou-se bastante espessa, escura e congesta, e observou-se também a congestão de vasos menores que nutrem o ceco (Figura 4.3A).

Em relação ao parasitismo, observou-se um aspecto muito semelhante ao de 30 DPI. Um grande número de ovos embrionados e larvas (Figura 4.3B), com um discreto acúmulo de ferro ao redor (Figura 4.3F), associados a um intenso infiltrado eosinofílico na mucosa, submucosa e muscular do intestino grosso e ceco (Figura 4.3D). A inflamação estendeu-se em direção ao mesentério (Figura 4.3E).

Na região perivascular da artéria mesentérica superior e cecal, observou-se um acúmulo de ovos e larvas na *vasa vasorum*, além de um infiltrado eosinofílico (Figura 4.4B) e acúmulo discreto de ferro (Figura 4.4D). Esses fatores provocaram um alargamento da adventícia, resultando na protusão de todas as camadas da artéria, para dentro da luz do vaso (Figura 4.4A). O endotélio perdeu sua estrutura pavimentosa e de monocamada, tornando-se desorganizado (Figura 4.4C). As lâminas elásticas, tanto interna quanto externa, foram destruídas, em segmentos da artéria cecal onde parasitas adultos estavam presentes (Figura 4.4E) ou ausentes (Figura 4.4F). De modo distinto, as lâminas elásticas de vasos de pequeno calibre presentes no intestino, possuíam integridade de suas lâminas elásticas preservadas (Figura 4.3C).

#### 4.1.3. Achados histopatológicos 90 dpi

Macroscopicamente foram observados o aumento do tamanho do ceco e dilatação dos vasos, assim como, congestões vasculares de aspecto trombótico e xantomatoso na artéria cecal (Figura 4.5A).

Microscopicamente, observamos a presença de ovos embrionados, não embrionados e larvas na mucosa, submucosa (Figura 4.5B) e muscular do intestino grosso e ceco, associados a um intenso infiltrado eosinofílico (Figura 4.5C) e ausência de ferro tanto no interior, quanto ao redor (Figura 4.5D).

Na patologia vascular verificou-se um grande número de ovos/larvas na *vasa vasorum da* artéria mesentérica superior (Figura 4.6A), porém na ausência de infiltrado eosinofílico (Figura 4.5F). A protusão das camadas da artéria para o interior do vaso (que já havia se iniciado no ponto de 50 dpi) parece mais proeminente, demonstrando um estreitamento do vaso, com instalação do processo trombótico (Figura 4.6A). As lâminas elásticas (interna e externa) estavam quase que completamente destruídas, com frequência (Figura 4.6B). Em vasos mesentéricos,

observou-se a presença de uma substância xantomatosa dentro do trombo, tanto livre, quanto no interior de células fagocíticas (Figura 4.6C), ausência de infiltrado eosinofílico (Figura 4.6D), e presença de ferro (Figura 4.6E), porém estes mantiveram a integridade de suas lâminas elásticas (Figura 4.5E; Figura 4.6F).

Foi possível observar a presença de vermes adultos vivos (Figura 4.7A) e mortos na artéria cecal. Um intenso acúmulo de ferro (Figura 4.7C) foi observado associado aos parasitos mortos, o que não ocorre na presença de parasitas vivos (Figura 4.7B). Este acúmulo de ferro também se estende para a região perivascular (Figura 4.7F), junto com a substância amarelada que está presente livre ou carregada por macrófagos, independente da condição de vida do parasita (Figura 4.7D). Não foi visualizado infiltrado eosinofílico nessa região (Figura 4.7E).

#### 4.1.4. Achados histopatológicos 114 DPI

Verificou-se um nítido aumento do tamanho do ceco com acúmulo significativo de líquido (Figura 4.8A) e congestão da artéria cecal e suas ramificações (Figura 4.8C), além de bridas entre as alças intestinais (Figura 4.8B).

À microscopia, com relação ao parasitismo, foram observados ovos (embrionados e não embrionados, estes últimos em maior proporção) e larvas na mucosa (Figura 4.8D), submucosa (Figura 4.8E) e muscular (Figura 4.8F) do ceco e intestino grosso.

Junto com os ovos embrionados e larvas, verificou-se um intenso infiltrado eosinofílico (Figura 4.9A). Diferentemente, quando a maioria dos ovos era não embrionado, não havia infiltrado eosinofílico (Figura 4.9B), e havia um intenso acúmulo de ferro ora dentro (Figura 4.9C), ora ao redor (Figura 4.9D) desses ovos.

Na patologia arterial houve congestão de vasos, de pequeno e médio calibres, por vezes acompanhada por trombos e lesões ateromatosas. Macroscopicamente, observou-se a formação de trombo acompanhado ou não da substância xantomatosa (Figura 4.9E), que microscopicamente apresentava uma formação lamelar composta majoritariamente por fibrina (Figura 4.10A), com a substância xantomatosa invadindo-o de forma centrípeta (Figura 4.9F). Esta substância ora estava livre, ora sendo carregada por macrófagos (Figura 4.11A). Colocalizada com ela, muitas vezes havia ferro, livre (Figura 4.10C) ou carregado por macrófagos

(Figura 4.11B), e isto também ocorreu nas artérias contendo parasitas mortos tanto em relação à substância amarelada (Figura 4.11C), quanto ao ferro (Figura 4.11D), porém não havia acúmulo de nenhum dos dois quando o parasita estava vivo (Figura 4.11E). A substância amarelada corou-se com Vermelho do Congo (Figura 4.10B), porém não polarizou à análise de luz polarizada. Não foi observado infiltrado eosinofílico na artéria cecal contendo trombo com substância amarelada (Figura 4.10D).

A estrutura da artéria cecal está desorganizada tanto em trechos contendo vermes adultos (Figura 4.10E; Figura 4.11F), quanto em trechos onde os vermes não estão presentes (Figura 4.10F).

Em alguns sítios, foi possível observar estruturas isoladas que podem dar um indicativo de detalhes da progressão do desenvolvimento da doença arterial. Observaram-se locais onde o trombo foi recanalizado (Figura 4.12A); um espessamento da íntima com presença de substância xantomatosa (Figura 4.12B); obstrução purulenta de vasos (Figura 4.12C); células gigantes do tipo Langhans na proximidade de macrófagos xantomatosos (Figura 4.12D); pseudopólipos (Figura 4.12E); vasos completamente obstruídos pela presença de células carregando substância xantomatosas (Figura 4.12F).

Os achados histopatológicos dos quatro grupos infectados estudados encontram-se sistematizados no quadro 4.1.

4.1. Quadro comparativo das características macroscópicas e histológicas da infecção de *S. hispidus* com *A. costaricensis*

TEMPO DE INFECÇÃO	MACROSCOPIA	HISTOLOGIA
30 dpi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento discreto do ceco;</li> <li>- Acúmulo de líquido;</li> <li>-Início de congestão de circulação regional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Presença de ovos e larvas em todas as camadas do intestino grosso e na <i>vasa vasorum</i> da artéria mesentérica superior;</li> <li>-Divulsionamento de fibras musculares;</li> <li>-Intenso infiltrado eosinofílico no intestino e na região periarteriais;</li> <li>-Presença de substância amarelo-amarronzada dentro de células fagocíticas;</li> <li>- Ausência de ferro no interior dos ovos/larvas e discreta ao redor dos ovos/ larvas;</li> <li>- Discreta quantidade de ferro ao redor das artérias com parasitas adultos;</li> <li>-Granulomas periovulares-perilarvares;</li> <li>-Desorganização da lâmina elástica externa das artérias com vermes adultos;</li> <li>-Manutenção da integridade da muscular interna;</li> </ul>

TEMPO DE INFECÇÃO	MACROSCOPIA	HISTOLOGIA
50 dpi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do ceco com aspecto escurecido e enrugado (sofrimento de alça);</li> <li>- Artéria cecal espessa, escura e congesta com congestão de vasos menores que nutrem o ceco;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de ovos e larvas em todas as camadas do intestino e na <i>vasa vasorum</i> da artéria mesentérica superior;</li> <li>-Intenso infiltrado eosinofílico em todas as camadas do intestino e mesentério e região perivascular;</li> <li>- Presença de quantidade discreta de ferro ao redor dos ovos/ larvas e ao redor das artérias com parasitas adultos;</li> <li>- Presença de parasitas em desenvolvimento em artérias de pequeno calibre, sem destruição da camada muscular;</li> <li>- Alargamento da adventícia e protusão de todas as camadas para o interior do vaso, devido a presença de ovos e larvas na <i>vasa vasorum</i>;</li> <li>-Destruição das lâminas elásticas interna e externa.</li> </ul>

TEMPO DE INFECÇÃO	MACROSCOPIA	HISTOLOGIA
90 dpi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do ceco;</li> <li>- Dilatações vasculares que nutrem o ceco;</li> <li>- Congestão da artéria cecal, com aspecto trombótico e presença macroscópica de substância xantomatosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de ovos embrionados e surgimento de ovos não embrionados;</li> <li>- Ausência de infiltrado eosinofílico na região perivascular e presença de células fagocíticas, carreando substância xantomatosa, geralmente associada ao acúmulo de ferro;</li> <li>- Presença de ferro dentro da artéria cecal, associado ao verme adulto morto;</li> <li>- Protusão das camadas da artéria para dentro de si mesma, devido ao acúmulo de ovos/larvas na <i>vasa vasorum</i>;</li> <li>- Destruição total das lâminas musculares interna e externa da artéria cecal</li> </ul>

<b>TEMPO DE INFECÇÃO</b>	<b>MACROSCOPIA</b>	<b>HISTOLOGIA</b>
114 dpi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do tamanho do ceco com acúmulo significativo de líquido em seu interior;</li> <li>- Presença de bridas entre as alças intestinais;</li> <li>- Aspecto congesto da artéria cecal e dos demais vasos do ceco;</li> <li>- Presença de substância xantomatosa na artéria cecal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intenso infiltrado eosinofílico na presença de ovos embrionados e larvas</li> <li>- Ausência de infiltrado eosinofílico associado à presença de ovos não-embrionados;</li> <li>- Intenso acúmulo de ferro em ovos não-embrionados;</li> <li>- Presença de ateromas em vasos de pequeno e médio calibre;</li> <li>- Composição majoritária do ateroma: fibrina;</li> <li>- Intenso acúmulo de ferro associado ao trombo e à substância amarelada;</li> <li>- Destruição das camadas muscular interna e externa.</li> </ul>

## **4.2. Histopatologia do coração e das artérias coronárias**

A lesão aterosclerótica foi aparentemente restrita à artéria cecal e alguns vasos mesentéricos. Com o intuito de observar a eventual presença de lesões ateroscleróticas coronarianas, analisamos a histologia cardíaca de animais infectados com 90 e 114 dpi. Verificou-se que, em ambos os tempos de infecção, momentos em que a lesão aterosclerótica estava bem estabelecida na artéria cecal, não houve nenhuma evidência de qualquer lesão cardíaca ou murais ou nas artérias coronárias desses animais (Figuras 4.13B e 4.13C), nem houveram lesões em animais utilizados como controle (Figura 4.13A).

## **4.3. Análise histológica da medula óssea**

A fim de verificar as modificações sistêmicas ocasionadas pela angiostrongilíase abdominal, decidimos estudá-las na medula óssea.

Em 90 dpi, verifica-se que há um evidente aumento da atividade hematopoiética da medula, expresso pela diminuição do volume ocupado por adipócitos nos animais infectados (Figura 4.14B), em relação ao controle não infectado (Figura 4.13A).

Neste ponto, observou-se predomínio de eosinófilos (Figura 4.14B), com proporção significativa de células imaturas. Além disso, também foi possível observar uma maior quantidade de megacariócitos (Figura 4.14B) em animais infectados com 90 dpi. Todas as comparações foram feitas em relação ao controle não infectado (Figura 4.14A).

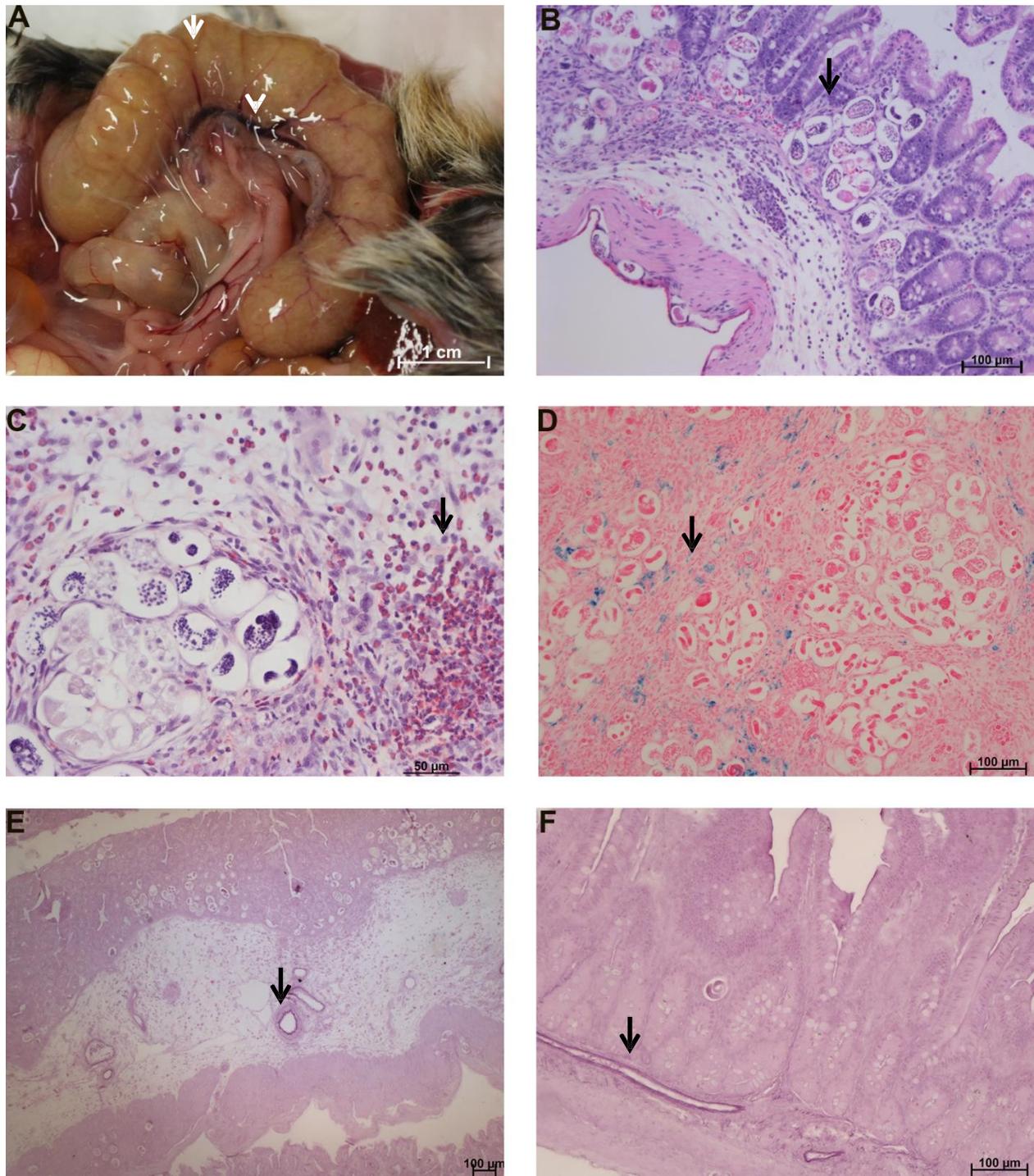
Aos 114 dpi, a atividade da medula óssea dos animais infectados, estava praticamente igual a dos animais controle (Figura 4.14C) não infectados, tanto em relação à atividade (Figuras 4.14D) quanto em relação aos tipos celulares, principalmente eosinófilos (Figura 4.14 C e D).

#### **4. 4. Animais controle normais**

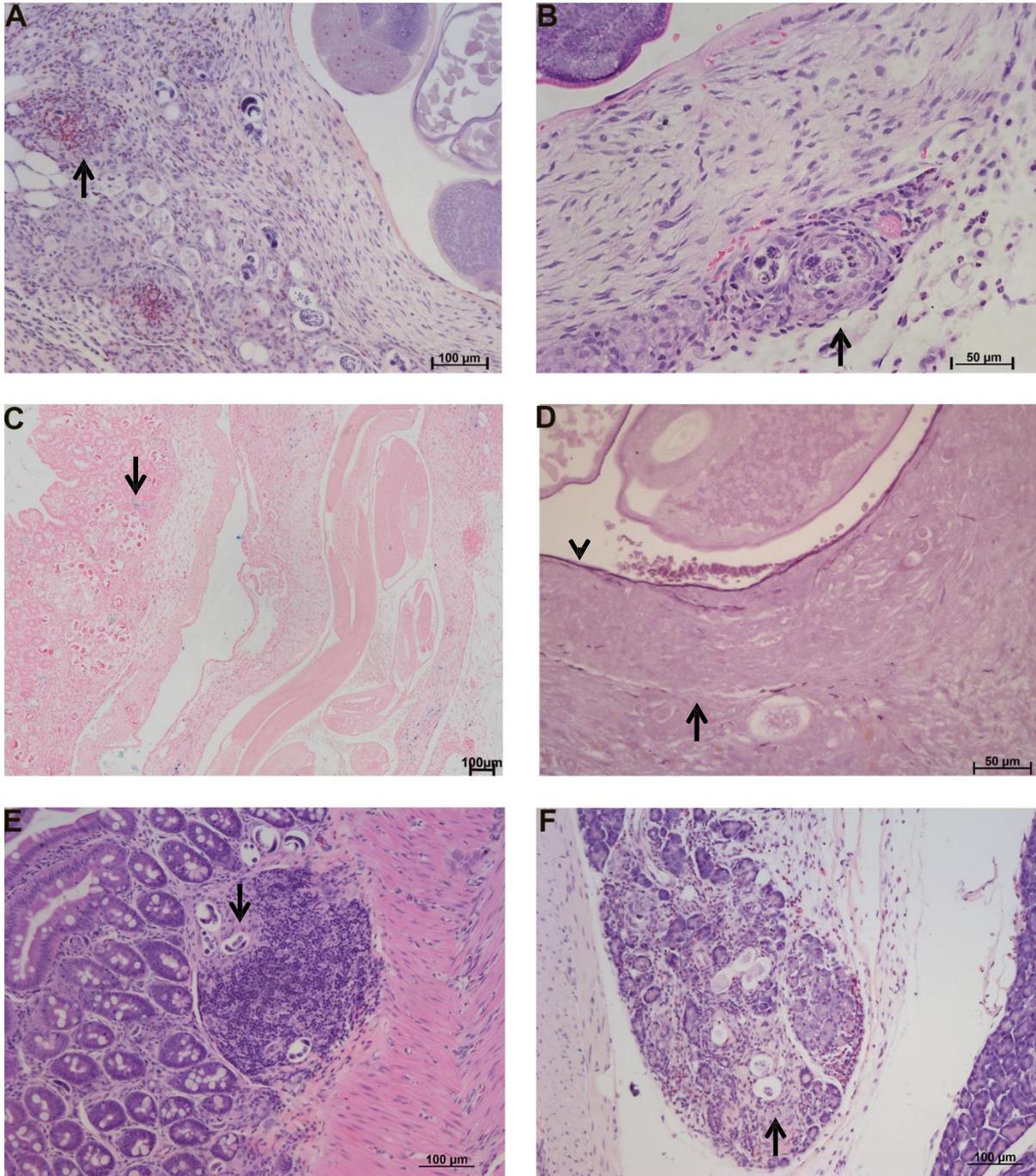
Foram utilizados animais não infectados com idade semelhante aos dos animais infectados, a fim de excluir lesões espontâneas. Conforme esperado, os animais controle não tiveram nenhuma lesão nem no intestino, nem na teria cecal, nem nas coronárias.

#### **4.5. Ausência de lesões ateroscleróticas na artéria cecal de animais idosos não infectados**

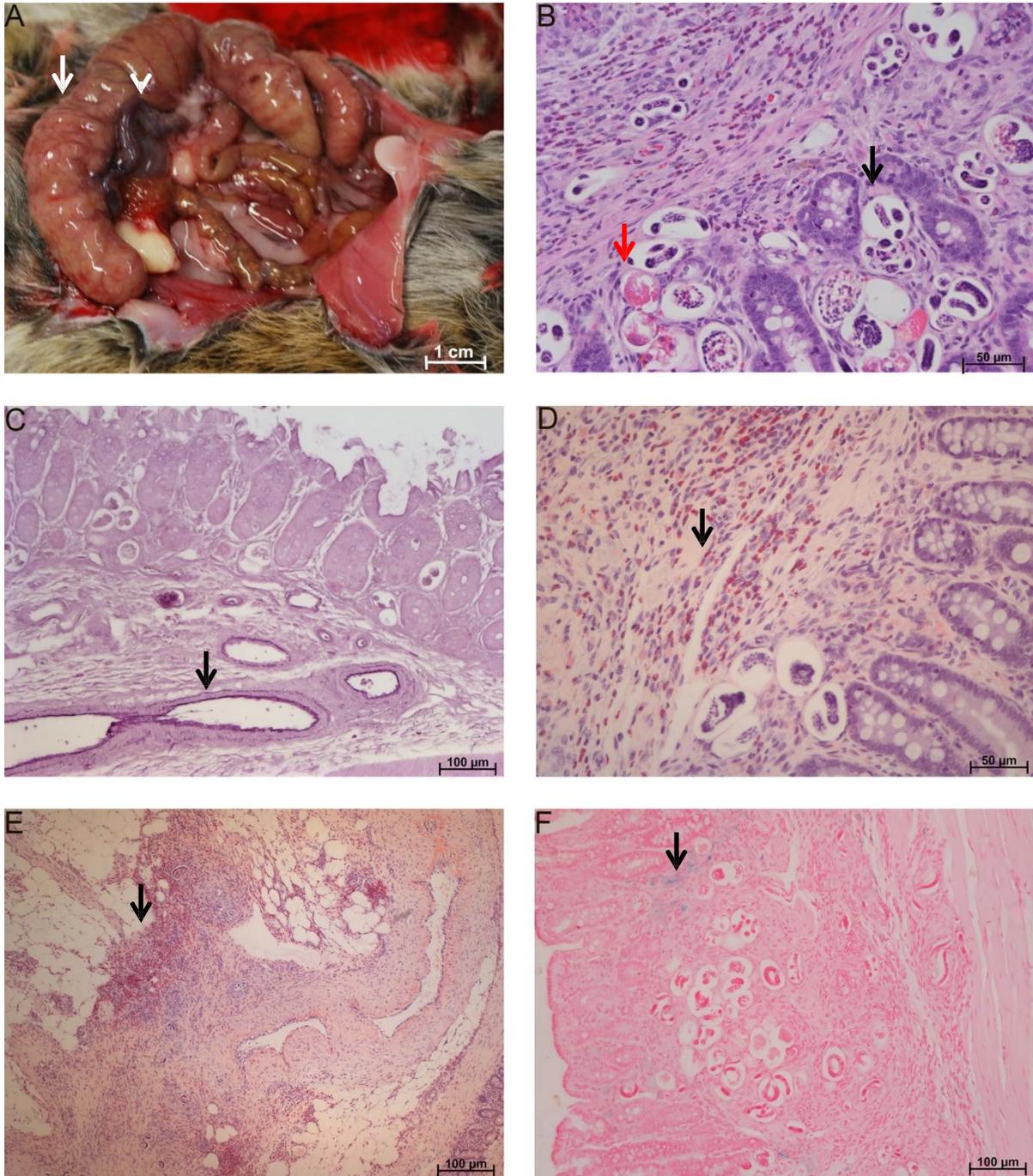
A fim de excluir que a aterosclerose pudesse ser uma lesão desencadeada em virtude da senilidade, avaliamos animais com idade entre 18 e 24 meses. Observou-se que animais idosos não infectados não apresentaram nenhum tipo de lesão aterosclerótica na artéria cecal (Figura 4.13D).



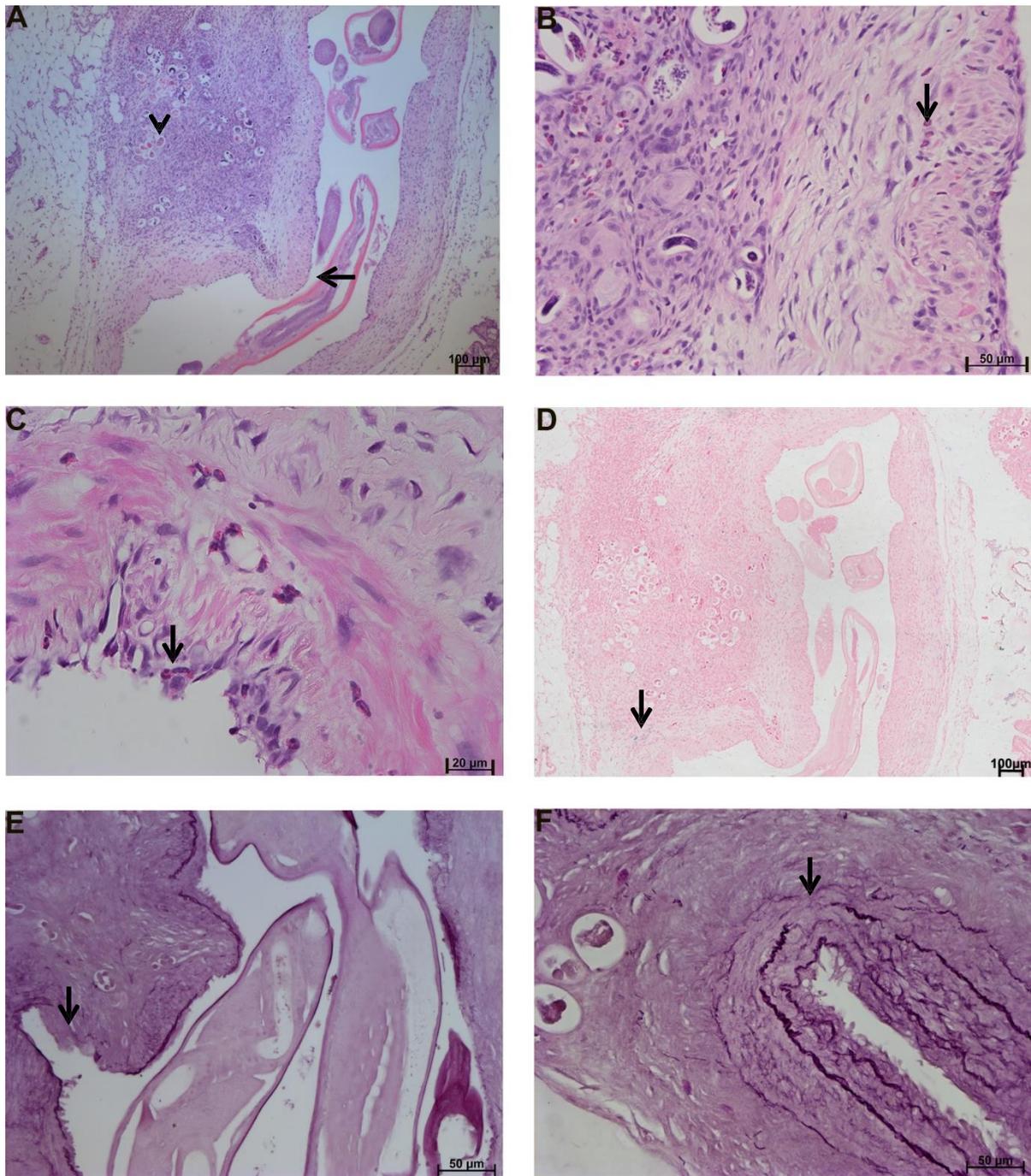
**Figura 4.1: Alterações macroscópicas e histopatológicas intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* aos 30 dpi.** A) Aumento do tamanho do ceco com acúmulo de líquido (seta) e início da instalação da congestão dos vasos (cabeça de seta) (Macroscopia). B) Presença de ovos e larvas (seta) na mucosa, submucosa e muscular do intestino (divulsão das fibras na muscular) (HE). C) Infiltrado eosinofílico no intestino grosso (seta) (Sirius Red 10.2). D) Presença de ferro (azul) ao redor de ovos embrionados no intestino grosso (seta) (Perls). E-F) Lâminas elásticas das pequenas artérias do intestino com estrutura organizada (seta) (Resorcina-Fucsina).



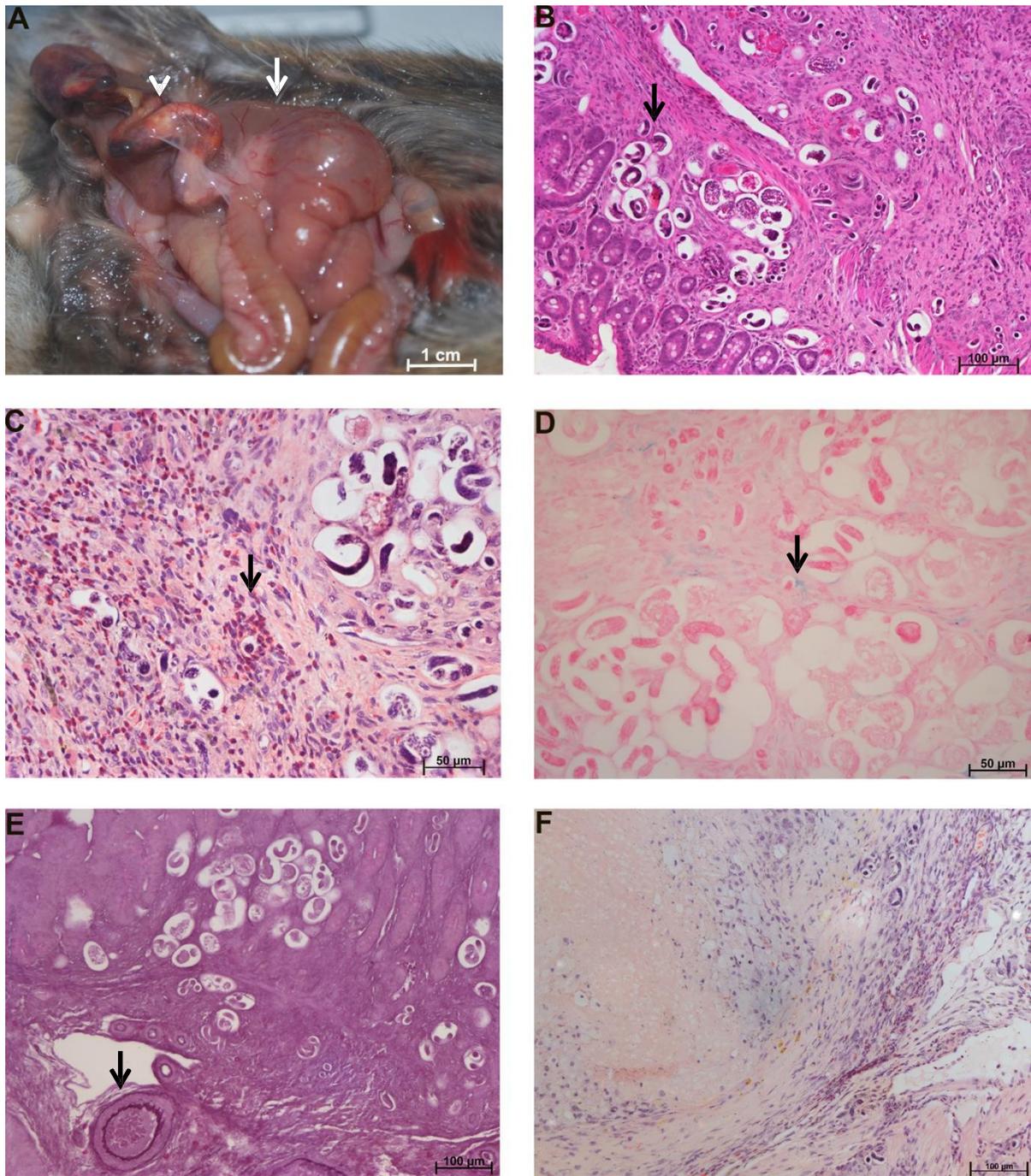
**Figura 4.2: Aspectos intestinais na infecção do *S. hispidus* por *A. costaricensis*, com 30 dpi.** A) Presença de vermes adultos no interior das artérias e de ovos e larvas na *vasa vasorum* da artéria cecal com presença de infiltrado eosinofílico (seta) e macrófagos carregando substância amarelada na região perivascular (Sirius Red 10.2). B) Granuloma na região perivascular da artéria cecal (seta) (HE). C) Presença de ferro (seta) na região perivascular da artéria cecal contendo parasitas adultos (Perls). D) Manutenção da lâmina elástica interna (cabeça de seta) e destruição da lâmina elástica externa (seta) da artéria cecal onde se observa a presença de vermes (Resorcina-Fucsina). E) Presença de larvas em placa de Peyer (seta) (HE). F) Presença de ovos e larvas, com infiltrado eosinofílico, no pâncreas (seta) (Sirius Red 10.2).



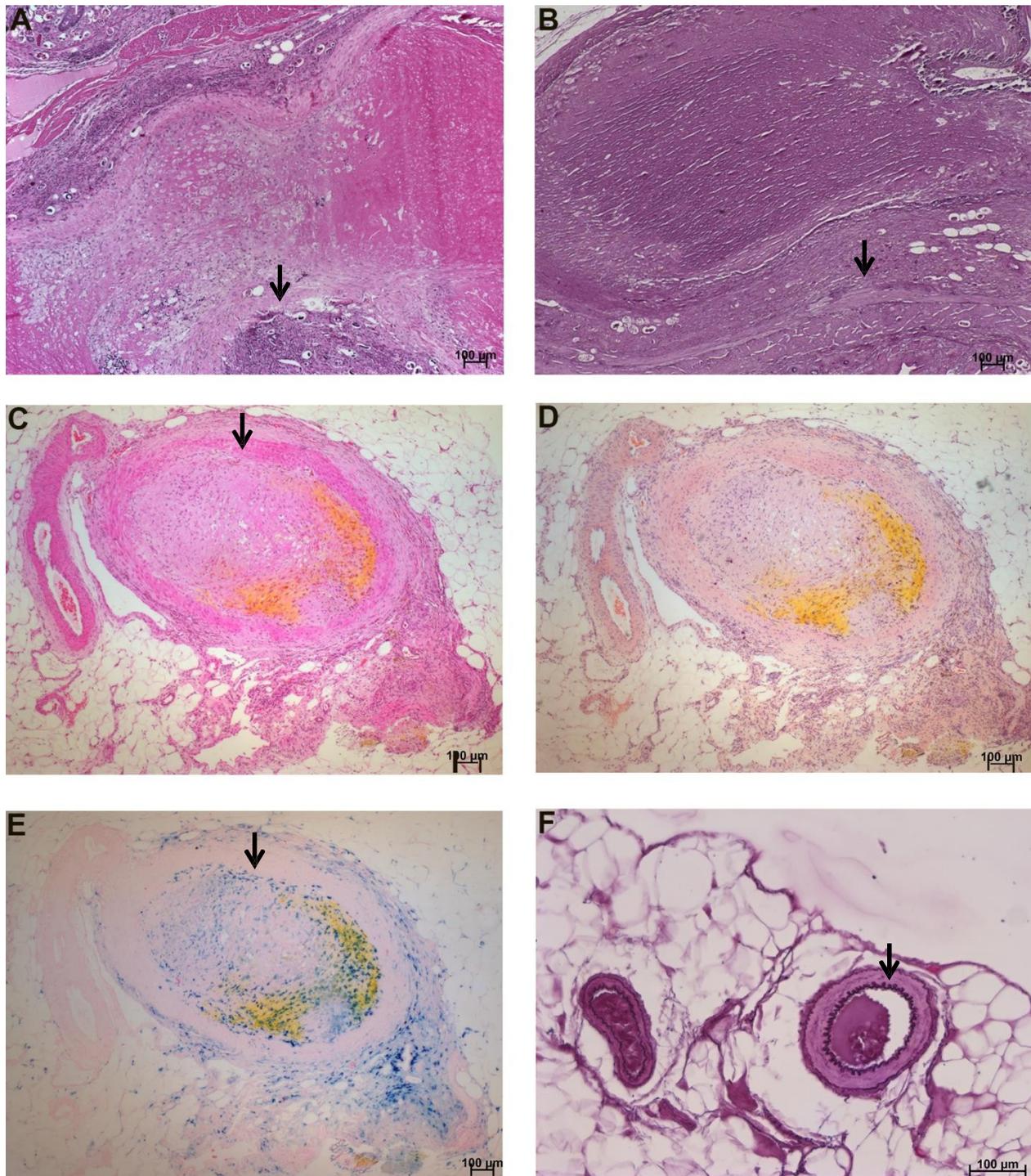
**Figura 4.3: Alterações macroscópicas e histopatológicas intestinais na infecção do *S. hispidus* por *A. costaricensis* com 50 dpi.** A) Ceco em sofrimento (seta) com sinais de congestão vascular e coágulos na artéria cecal (cabeça de seta) (Macroscopia). B) Ovos e larvas (seta) na mucosa, submucosa e muscular do intestino grosso (HE). C) Manutenção da estrutura das lâminas elásticas dos vasos intestinais (seta) (Resorcina-Fucsina). D) Infiltrado eosinofílico perilarvar/ periovarlar no intestino grosso (seta) (Sirius-Red 10.2). E) Infiltrado eosinofílico em direção ao mesentério (seta) (Sirius Red 10.2). F) Acúmulo discreto de ferro ao redor dos ovos e larvas (seta) (Perls).



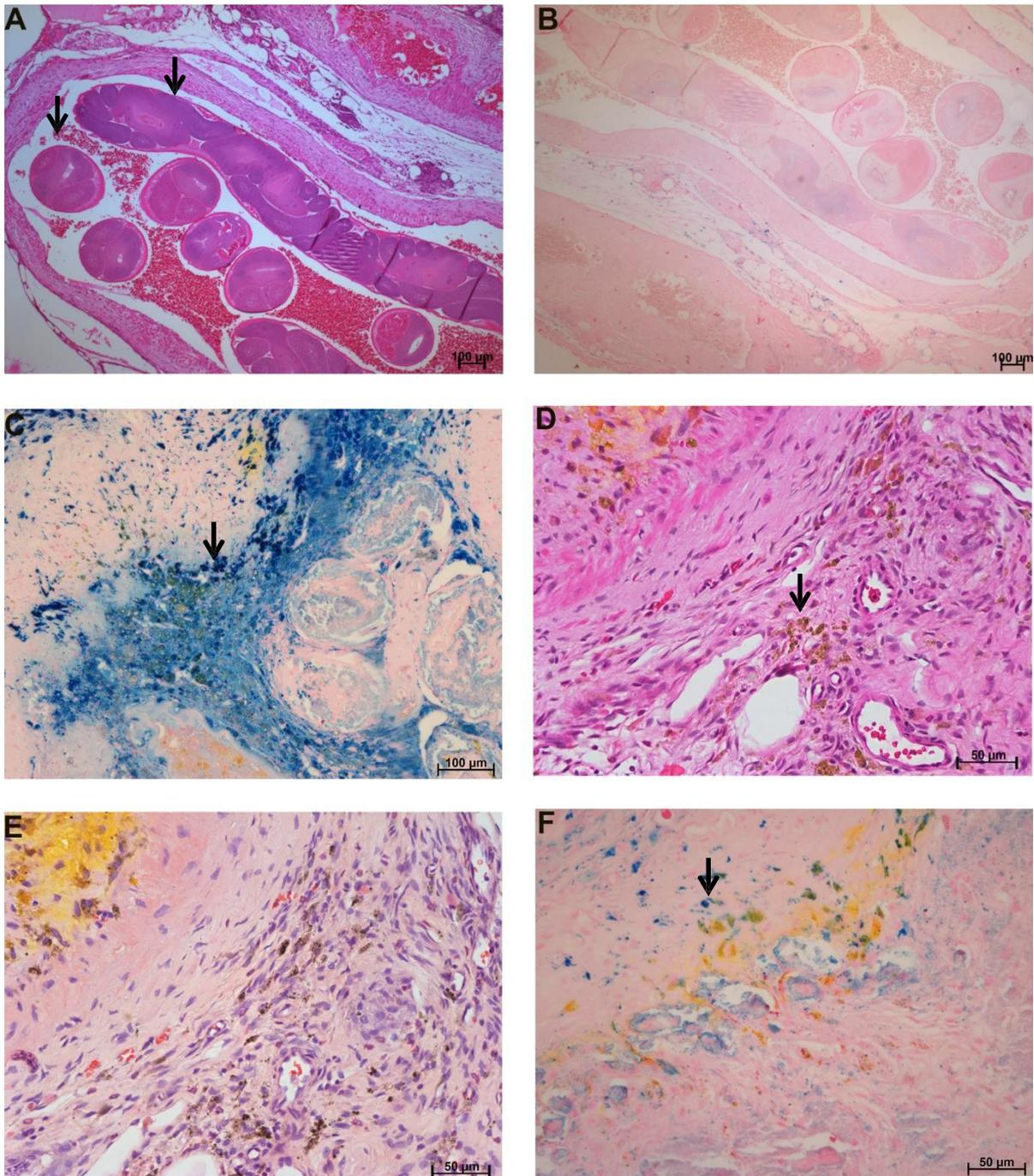
**Figura 4.4: Aspectos histopatológicos intestinais na infecção do *S. hispidus* por *A. costaricensis* com 50 dpi.** A) Protusão da parede da artéria cecal (seta) com acúmulo de larvas e ovos na *vasa vasorum* (cabeça de seta) (HE). B) Infiltrado eosinofílico na adventícia arterial (seta) (HE). C) Desorganização do endotélio arterial com presença de eosinófilos (seta) (HE). D) Presença de discreto acúmulo de ferro (seta) ao redor dos ovos e larvas em artérias contendo parasitas adultos (Perls). E) Descontinuidade das lâminas elásticas interna (seta) e externa em vaso com verme adulto (Resorcina- Fucsina). F) Descontinuidade das lâminas elásticas (seta) em vaso com parasitas na *vasa vasorum* (Resorcina-fucsina).



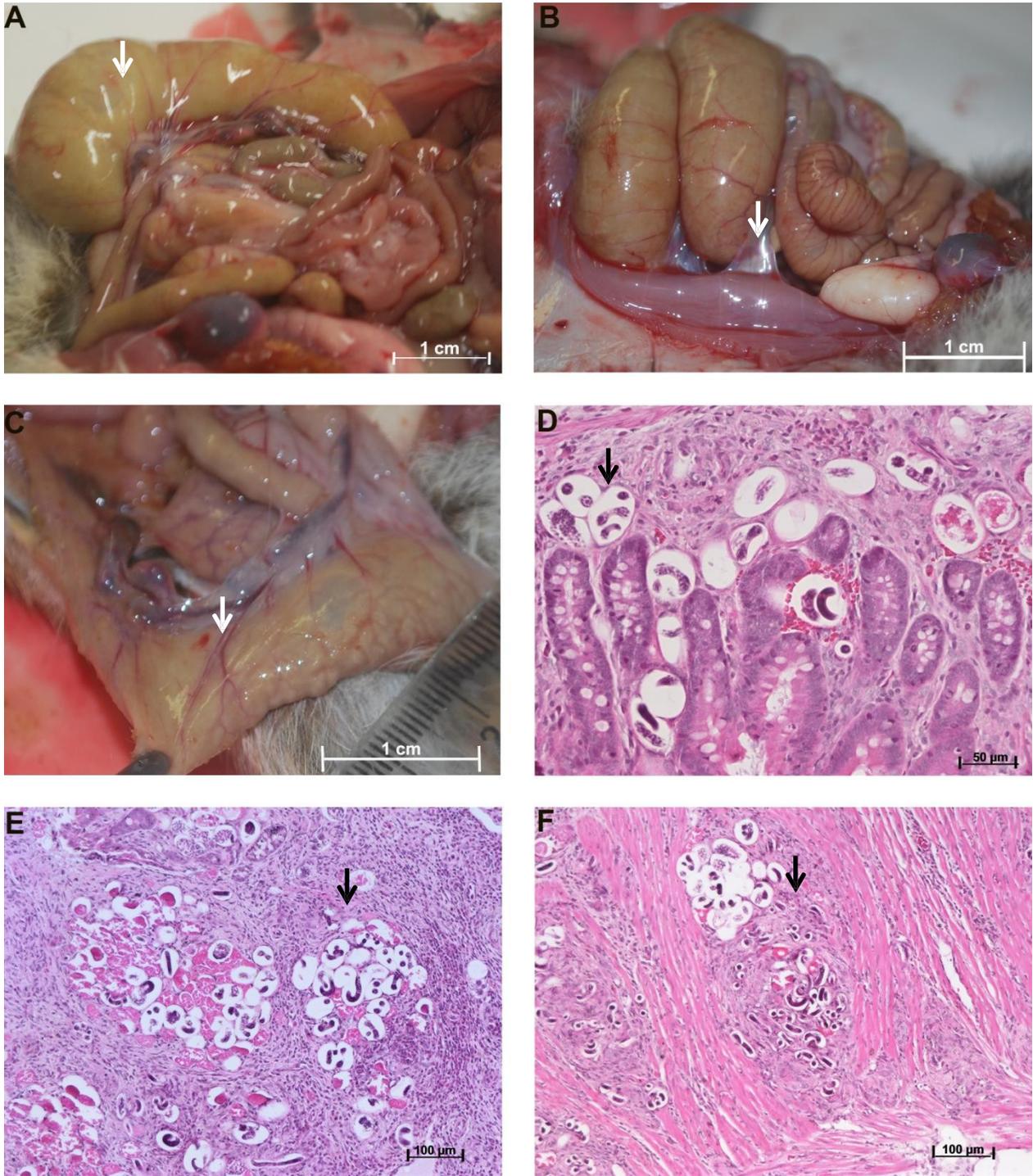
**Figura 4.5: Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 90 dpi.** A) Distensão do ceco (seta) e lesão com aspecto xantomatoso e coágulos na artéria cecal (cabeça de seta) (Macroscopia). B) Infiltrado de ovos e larvas (seta) na mucosa e submucosa do intestino grosso (HE). C) infiltrado eosinofílico na submucosa do intestino grosso (seta) (Sirius Red 10.2). D) Presença discreta de acúmulo de ferro dentro de ovos embrionados na submucosa do intestino grosso (seta) (Perls). E) Manutenção da estrutura das camadas elásticas de vasos intestinais (seta) (Resorcina-Fucsina). F) Ausência de infiltrado eosinofílico na região perivascular da artéria cecal (Sirius Red 10.2).



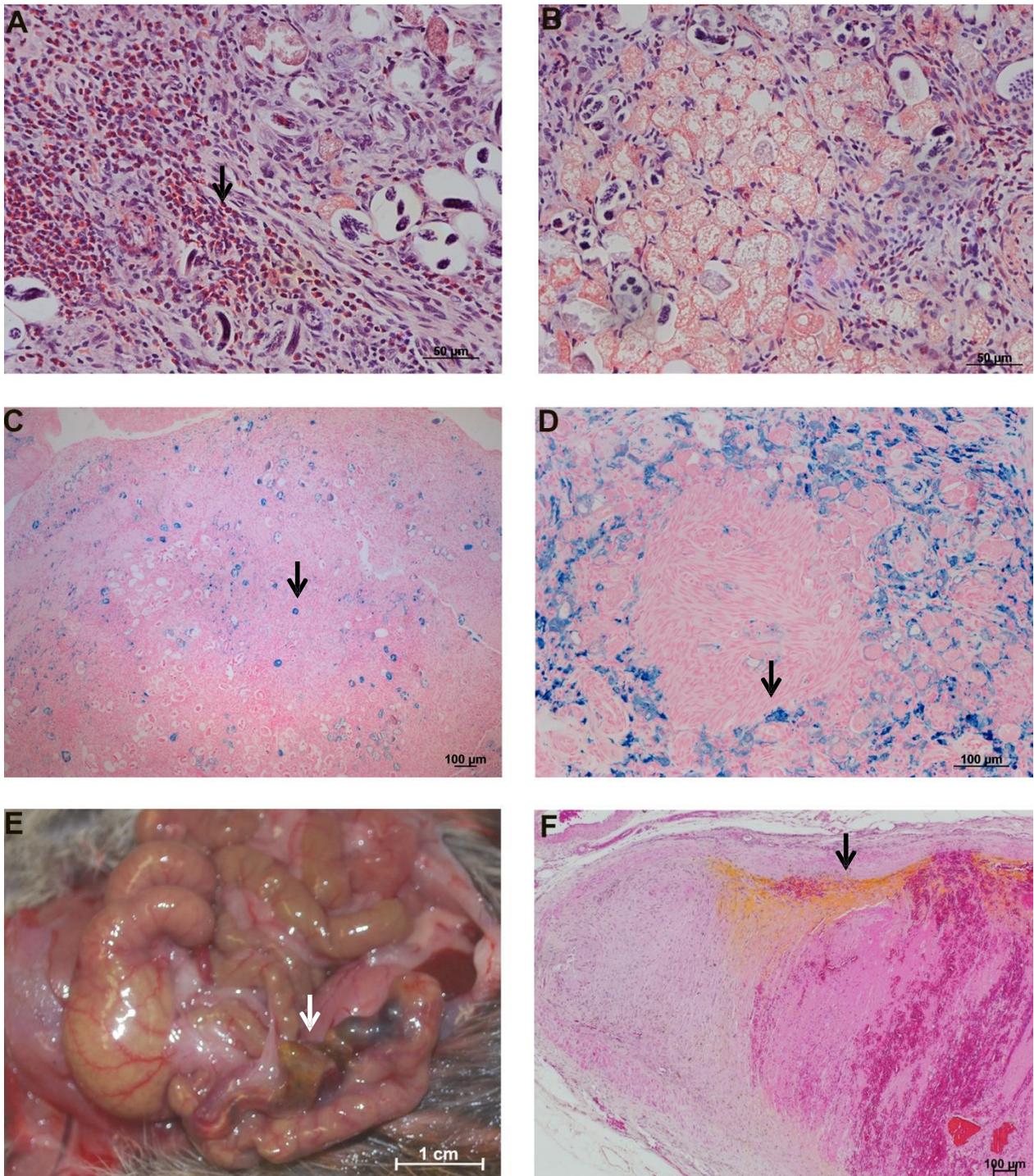
**Figura 4.6: Aspectos histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 90 dpi.** A) Diminuição da luz da artéria cecal devido à protusão de suas camadas para o interior do vaso (seta) (HE). B) Destruição das lâminas elásticas da artéria cecal com trombo (seta) (Resorcina-Fucsina). C) Trombo com aspecto clássico e xantomatoso em vaso mesentérico (seta) (HE). D) Ausência de infiltrado eosinofílico em trombo de vaso mesentérico com aspecto xantomatoso (Sirius Red 10.2). E) Presença de ferro (seta) em trombo com aspecto xantomatoso de vaso mesentérico (Perls). F) Integridade das lâminas elásticas (seta) de vasos mesentéricos (Resorcina-Fucsina).



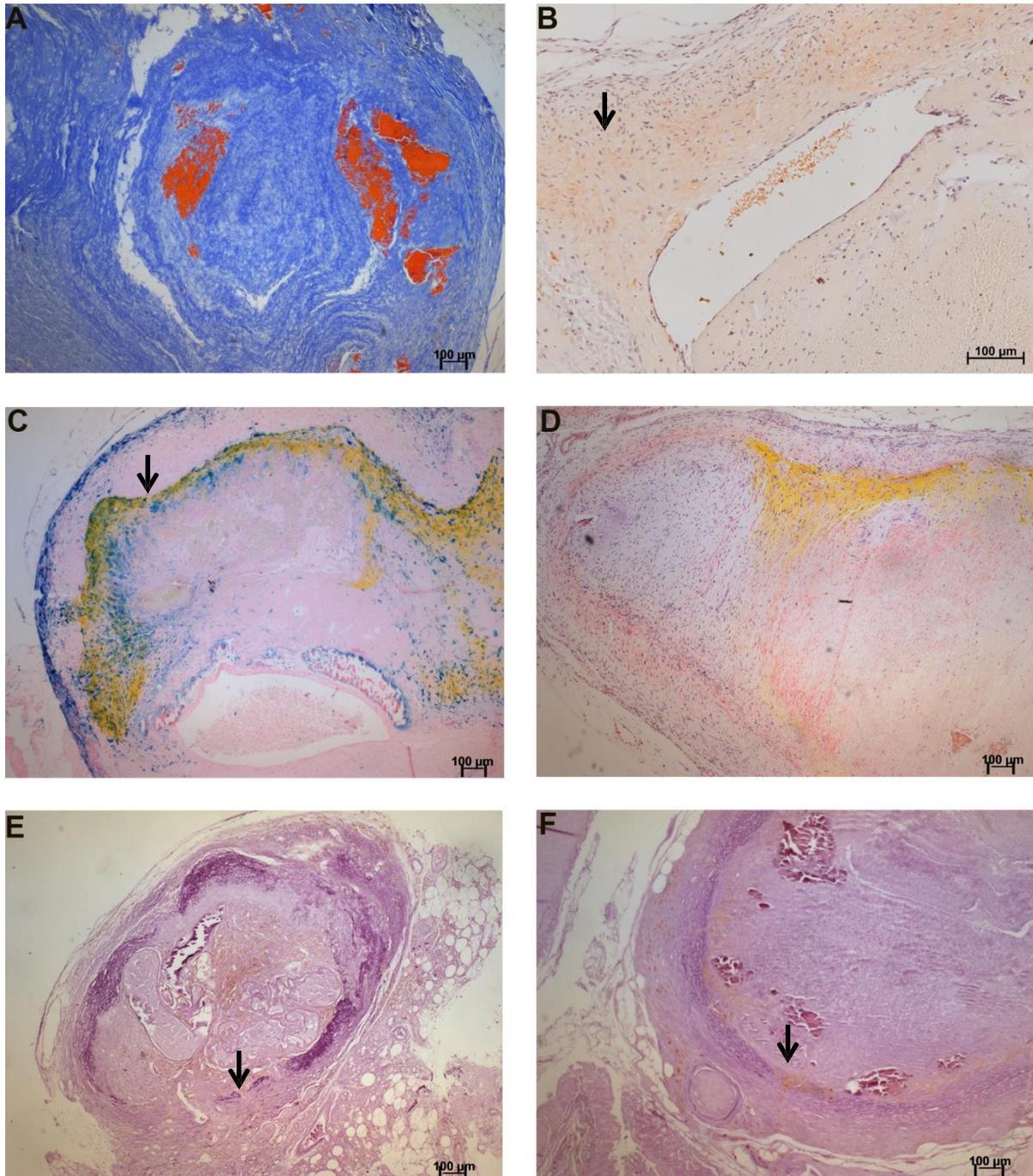
**Figura 4.7: Aspectos histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 90 dpi.** A) Vermes na artéria cecal observados transversal (seta) e longitudinalmente (seta) (HE). B) Ausência de ferro na presença de verme vivo na artéria cecal (Perls). C) Presença de ferro (seta/ azul) na artéria cecal com verme morto (Perls). D) Células carreando substância xantomatosa na região perivascular (seta) (HE). E) Células carreando substância xantomatosa na região perivascular na ausência de eosinófilos (Sirius Red 10.2). F) Acúmulo de ferro associado à substância xantomatosa (seta) (Perls).



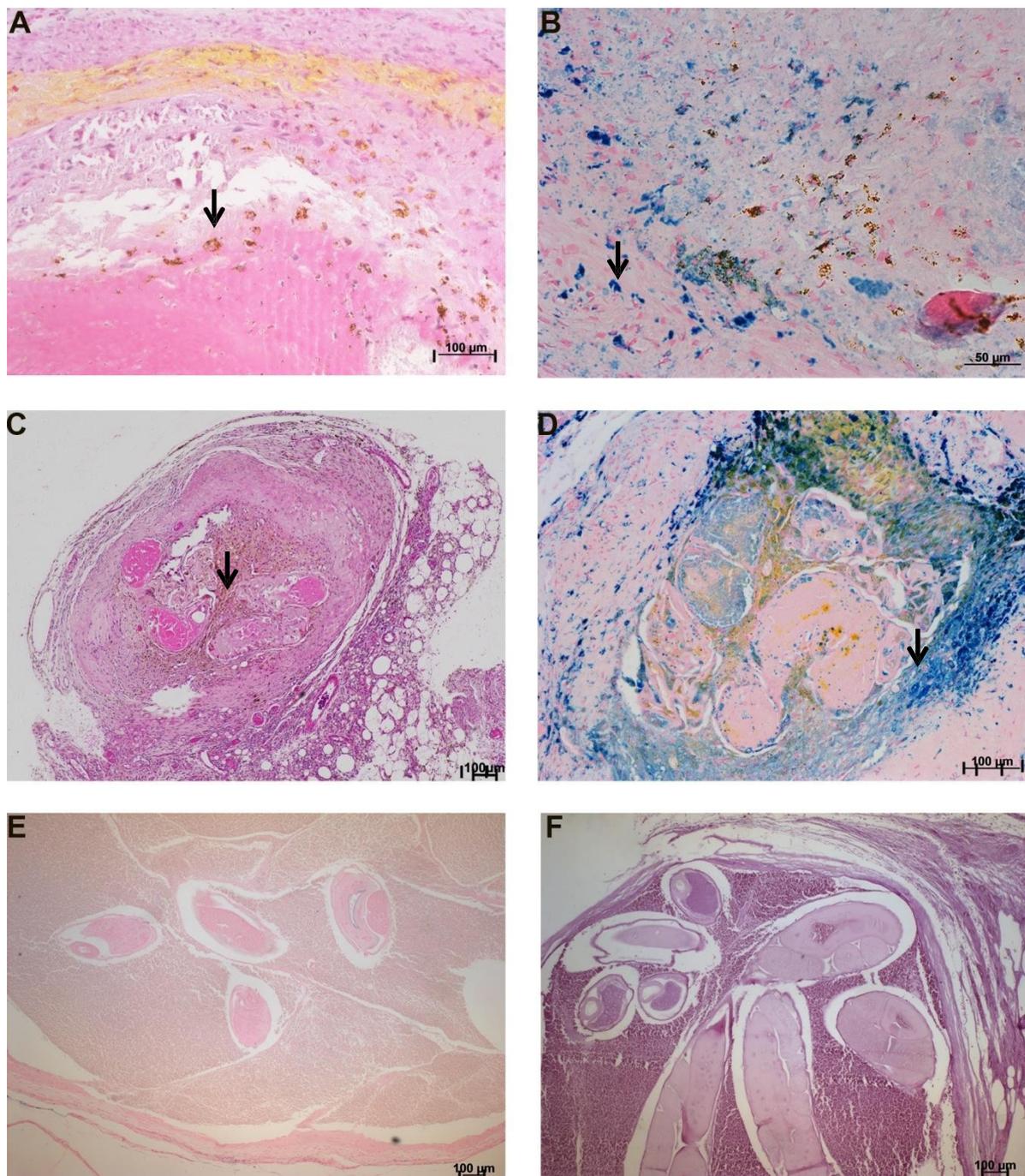
**Figura 4.8: Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* com 114 dpi. A) Distensão do ceco e acúmulo de líquido (seta) (Macroscopia). B) Bridas (seta) (Macroscopia). C) Congestão de vasos cecais (seta) (Macroscopia). D) Ovos e larvas na mucosa (seta) (HE). E) Ovos e larvas na submucosa (seta) (HE). F) Ovos e larvas na camada muscular do ceco (seta) (HE).**



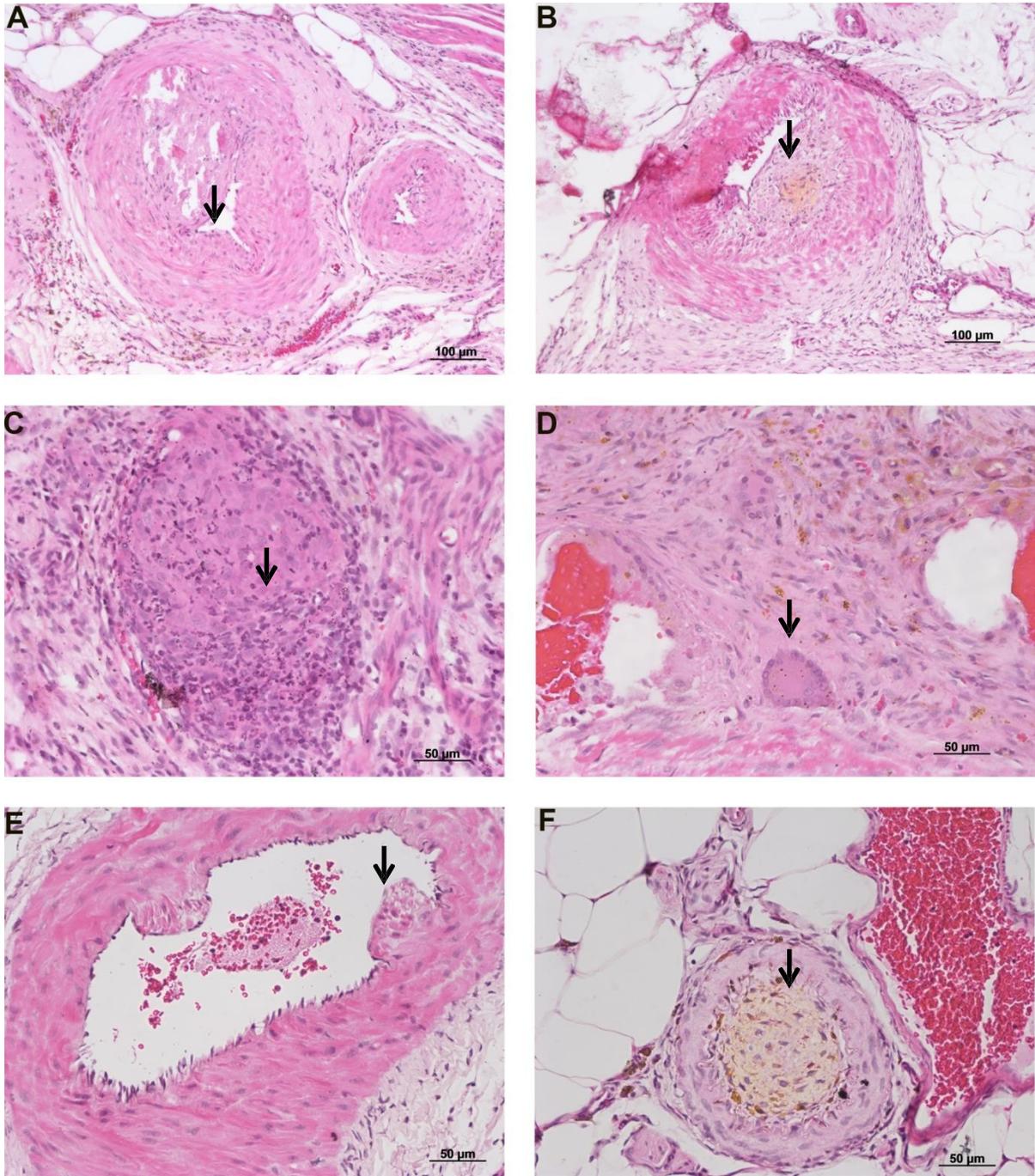
**Figura 4.9: Aspectos macroscópicos e histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 114 dpi. A) Infiltrado eosinofílico perilarvar na submucosa do ceco (seta) (Sirius Red 10.2). B) Rarefação do infiltrado eosinofílico ao redor de ovos não embrionados na submucosa do intestino grosso (seta) (Sirius Red 10.2). C) Presença de ferro dentro de ovos não embrionados (seta) (Perls). D) Presença de ferro ao redor de ovos não embrionados (seta) (Perls). E) Trombo com aspecto xantomatoso e coágulos na artéria cecal (seta) (Macroscopia). F) Trombo com aspecto clássico e xantomatoso na artéria cecal (seta) (HE).**



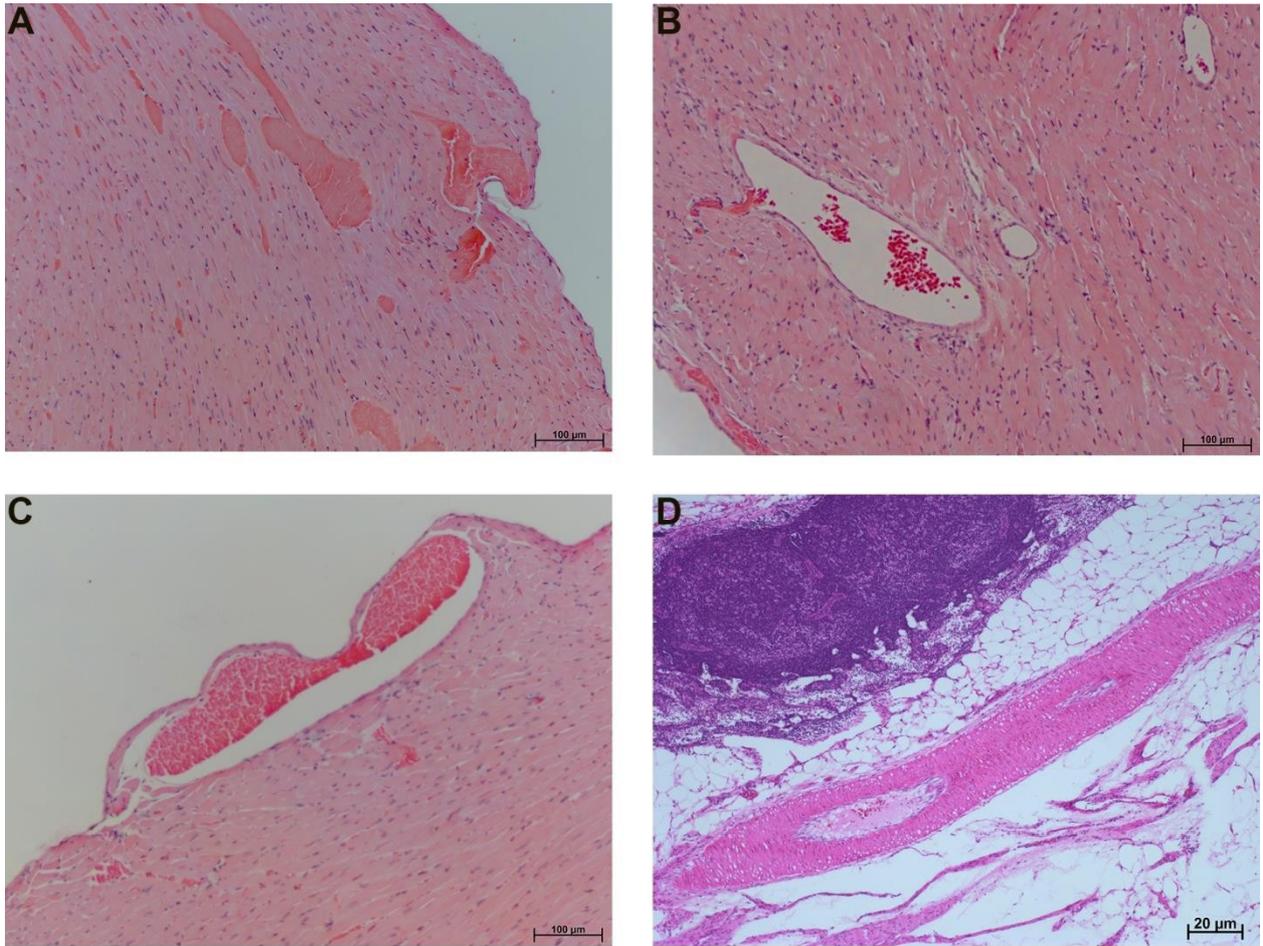
**Figura 4.10: Aspectos histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 114 dpi.** A) Composição do trombo rica em fibrina (azul) (HE). B) Substância xantomatosa corada para vermelho do congo (seta), a qual não mostrou especificidade para amilóide à microscopia de polarização (Perls). C) Acúmulo de ferro colocalizado com substância xantomatosa (seta) (HE). D) Ausência de infiltrado eosinofílico em trombo da artéria cecal (Perls). E) Trombo extenso da artéria cecal contendo vermes adultos, com destruição das lâminas elásticas (seta) (Perls). F) Trombo extenso com destruição das lâminas elásticas da artéria cecal (seta) (Resorcina-Fucsina).



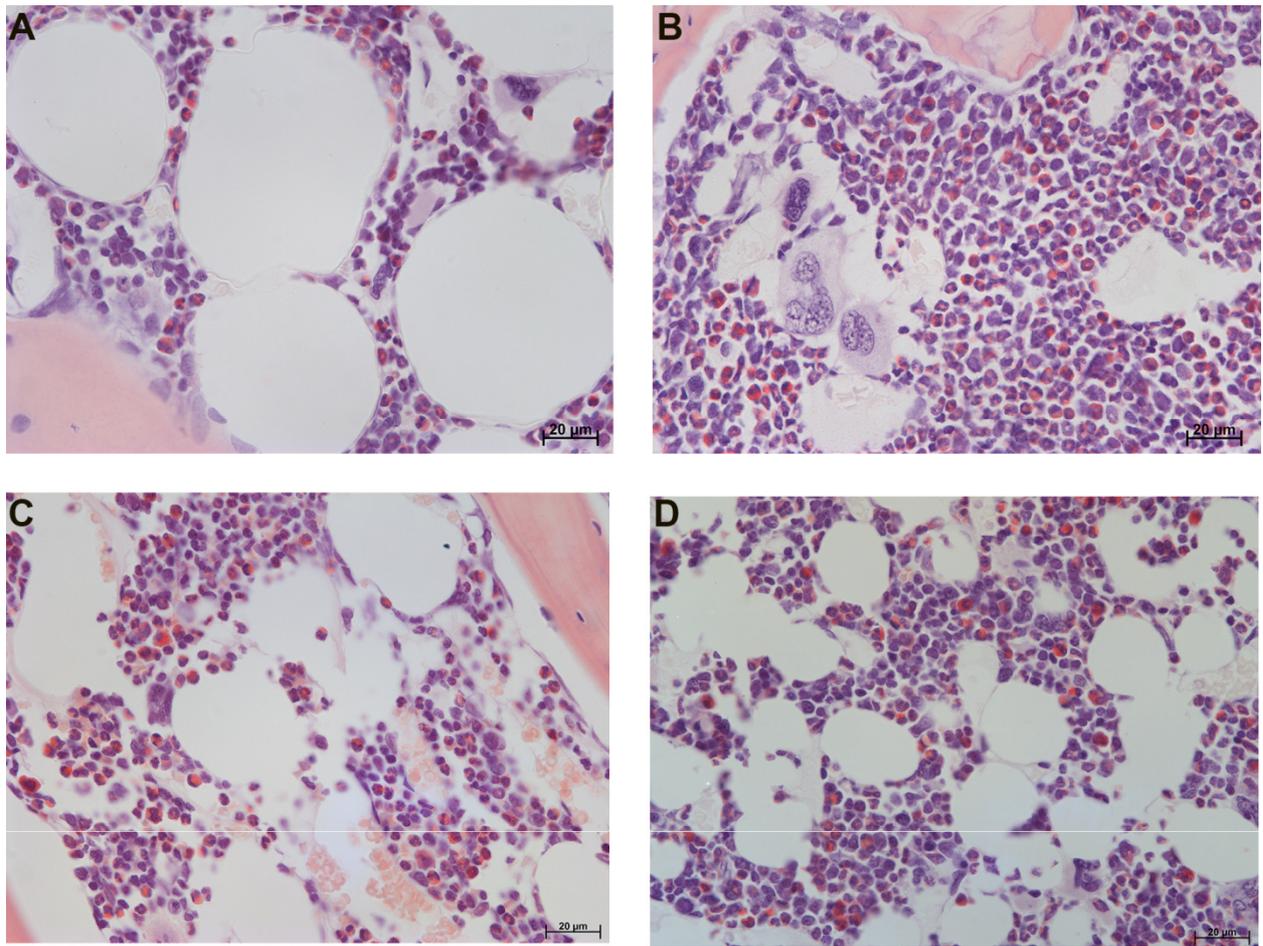
**Figura 4.11: Aspectos histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 114 dpi.** A) Macrófagos carregando substância xantomatosa na periferia da artéria cecal (seta) (HE). B) Macrófagos carregando substância xantomatosa e ferro dentro do trombo (seta) (Perls). C) Macrófagos carregando substância xantomatosa em trombo contendo vermes adultos (seta) (HE). D) Acúmulo de ferro em artéria cecal contendo parasitas mortos (seta) (Perls). E) Ausência de acúmulo de ferro em artérias contendo parasitas vivos (Perls). F) Destruição da camada muscular da artéria cecal (Resorcina-Fucsina).



**Figura 4.12: Aspectos histopatológicos intestinais de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* com 114 dpi.** (A) Recanalização de trombo (seta) (HE). (B) Espessamento de íntima com lesão xantomatosa (seta). (C) Vaso obliterado com infiltrado rico em piócitos (seta) (HE). (D) Célula gigante na região perivascular da artéria cecal (seta) (HE). (E) Pseudopólipos em vaso mesentérico (seta) (HE). (F) Vaso mesentérico obstruído por células com conteúdo xantomatoso (seta) (HE).



**Figura 4.13: Ausência de lesões ateroscleróticas na histologia das artérias coronárias de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis*.** Histologia normal das artérias coronárias em: A) Animal controle não infectado (HE), B) Animal infectado com 90 dpi e C) Animal infectado com 114 dpi. D) Animal idoso normal não-infectado mostrando ausência de lesões ateroscleróticas na artéria cecal(HE).



**Figura 4.14: Ausência de lesões ateroscleróticas na histologia das artérias coronárias de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis*** A e C) Animais controle não infectados mostrando morfologia normal da medula óssea. B) Animal infectado com 90 dpi mostrando um aumento do número de eosinófilos e megacariócitos em relação ao controle não infectado. D) Medula óssea de animal infectado com 114 dpi mostrando aspecto semelhante à dos animais não infectados.

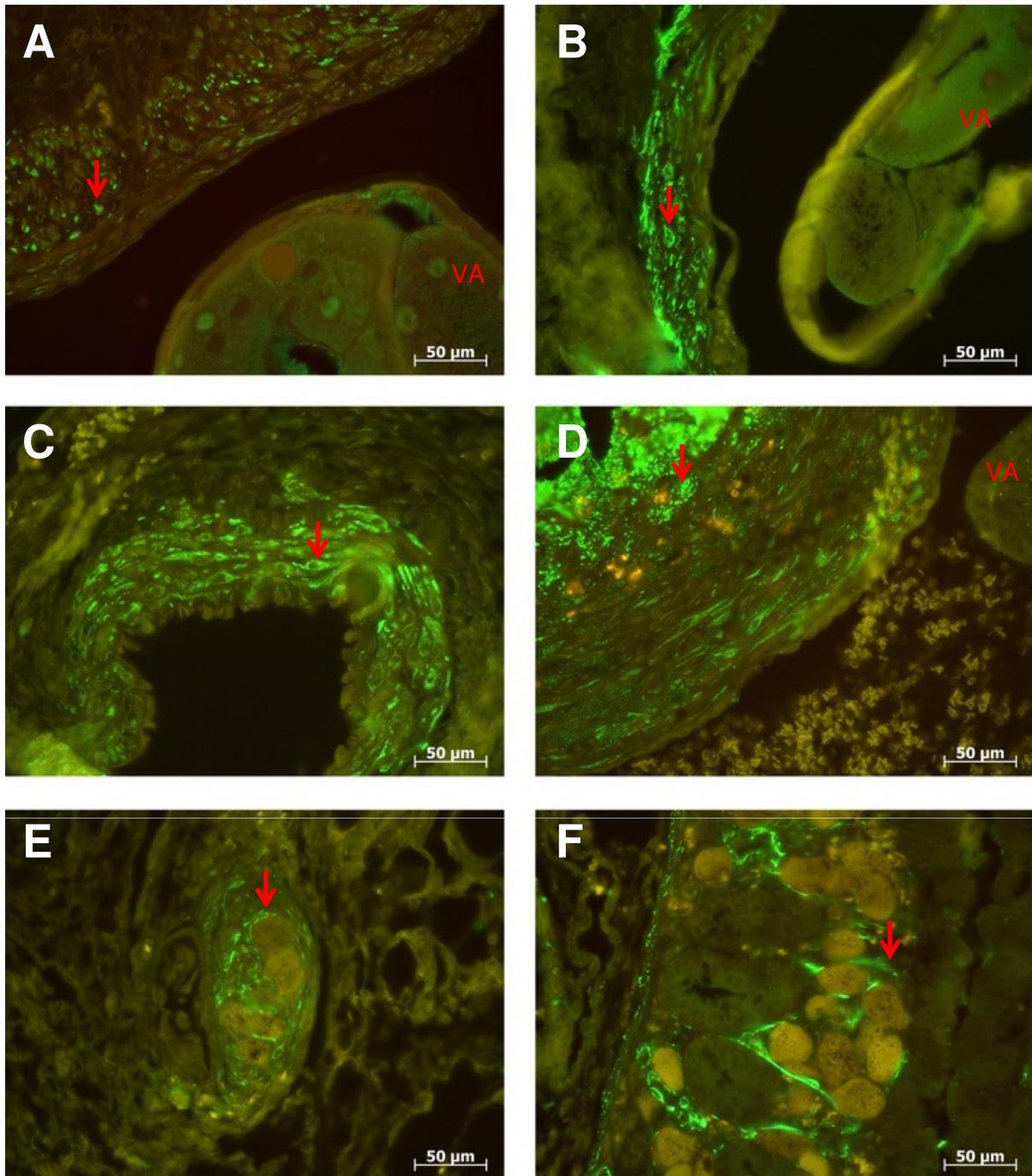
#### **4.6. Detecção imunohistoquímica da presença da desmina tecidual**

Com o objetivo de avaliar a estrutura da camada de músculo liso da artéria, perante a instalação do trombo, realizou-se a marcação de desmina tecidual aos 114 dpi.

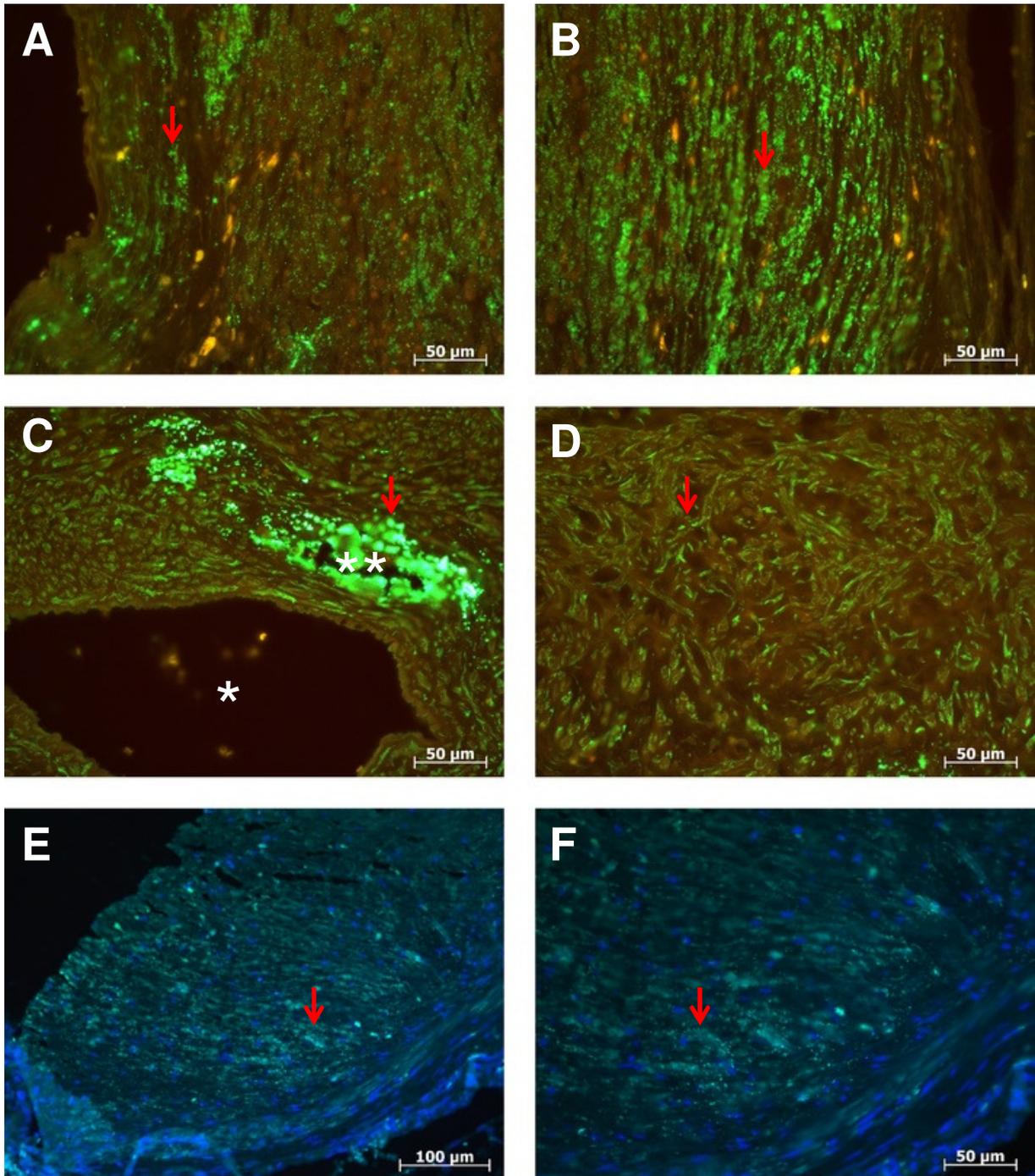
Aos 114 dpi, no trecho arterial contendo vermes adultos, observou-se na túnica média uma marcação das células musculares com seu formato fusiforme usual (Figura.4.15B), porém em alguns trechos, a desmina apareceu com formato puntiforme, representando resquícios de células musculares mortas (Figura 4.15A).

Nas regiões com ausência de vermes adultos, porém com trombo arterial presente, observou-se uma intensa ativação do endotélio e um padrão fusiforme das células musculares (Figura 4.15C) associado à presença de um acúmulo de desmina puntiforme em alguns sítios (Figura 4.15D). As células musculares estão desorganizadas (Figura 4.16D) e invadem de forma centrípeta o trombo. O fenômeno de desmina pontilhada intensificou-se em artérias contendo trombos extensos como mostrado nas figuras 4.16A e 4.16B, a luz do vaso é observada na figura A e como correspondente a outra porção do vaso, mais próxima à adventícia, na Figura B.

Foi encontrada a relação da desmina com elementos parasitários em desenvolvimento. Em vasos de menor calibre, observou-se a presença de ovos em seu interior circundados por desmina (Figura 4.15E), assim como em ovos mortos na parede intestinal (Figura 4.15F). A desmina também foi encontrada obstruindo pequenas artérias trombosadas (Figura 4.16C).



**Figura 4.15: Alterações imunohistoquímicas intestinais e vasculares de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* aos 114 dpi.** A) Desmina pontilhada, resultante do acúmulo de células musculares mortas na túnica média da artéria mesentérica superior e vermes adultos (VA) em seu interior (seta). B) Desmina em formato fusiforme representativo de células musculares com morfologia normal (seta). C) Células musculares com morfologia normal na túnica média e endotélio ativado (seta). D) Acúmulo de desmina pontilhada (seta). (E) Ovos em vaso de pequeno calibre envolto por desmina (seta). F) Ovos mortos na parede do intestino (seta). **Verde:** Marcação com desmina.



**Figura 4.16: Alterações imunohistoquímicas intestinais e vasculares de *S. hispidus* infectados com *A. costaricensis* aos 114 dpi.** A) Artéria com trombo proeminente e desmina pontilhada (seta) na túnica média. B) Continuação da artéria com trombo proeminente e desmina pontilhada (seta) na túnica média em A. C) Veia (\*) mais abaixo e acima artéria trombosada (\*\*) com desmina em seu interior (seta). D) Desorganização das células musculares da túnica média no interior de trombo arterial (seta). E e F) Desmina em forma pontilhada distribuída ao longo do trombo de forma centrípeta (seta). **Verde:** Desmina

#### **4.7. Análise bioquímica para mensuração da colesterolemia total**

A fim de avaliar se houve envolvimento do colesterol sérico total no desenvolvimento da lesão aterosclerótica em nosso estudo, fizemos uma mensuração dos níveis séricos de colesterol em animais infectados aos 90 dpi e controles não infectados.

Os resultados demonstram que não existem diferenças significativas entre os níveis de colesterol total de animais infectados com 90 dpi quando comparados com animais controle não infectados (Figura 4.17A).

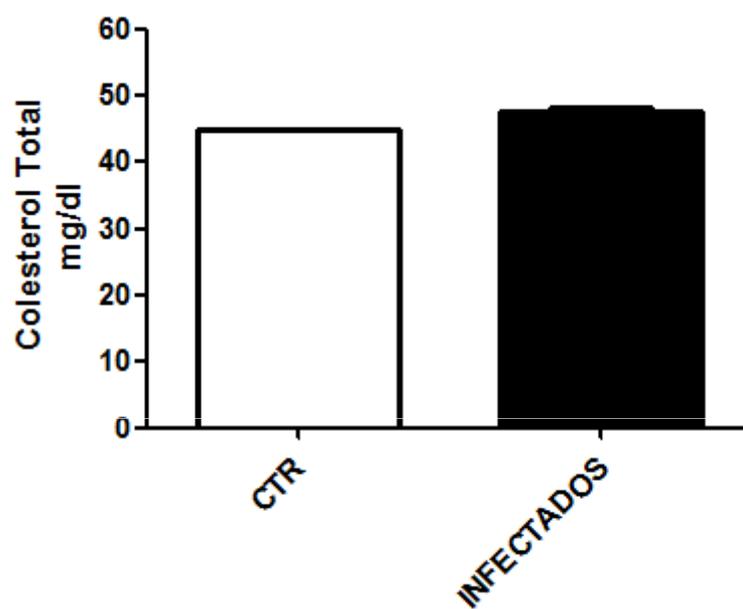


Figura 4.17: Análise bioquímica do colesterol total de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 90 dpi. Os dados foram expressos em média  $\pm$  S.D. utilizando o programa GraphPad Prism. n= 3. CTR = Controles não infectados.

## 4.8. Estudo da dinâmica hematológica periférica

Objetivando descrever as características hematológicas em diferentes pontos da infecção do *S. hispidus* por *A. costaricensis*, foram avaliados parâmetros como número total de leucócitos, plaquetas; volume corpuscular médio e a concentração da hemoglobina corpuscular média.

### 4.8.1. Hemograma aos 30 dpi e 50 dpi

Verificou-se que com 30 e 50 dpi não houve modificação hematimétrica comparativa entre os animais infectados e controles não infectados, nem relação ao número total de leucócitos (Figura 4.18A; Figura 4.19A), nem ao número total de plaquetas (Figura 4.18B, Figura 4.19B), tampouco em relação aos parâmetros das hemácias (Figura 4.18C; Figura 4.19C; Figura 4.18D, Figura 4.19D), que, os animais não apresentaram anemia.

### 4.8.2. Hemograma aos 90 DPI

Aos 90 dpi, embora tenha sido observada leucocitose, não houve diferença estatisticamente significativa da leucometria entre os animais controle e infectados (Figura 4.20A). Em relação ao número total de plaquetas houve uma diminuição significativa nos animais infectados (Figura 4.20B), ao mesmo tempo que estes apresentaram numerosas macroplaquetas e grumos plaquetários (Figura 4.21).

Verificou-se que em relação aos parâmetros das hemácias não existiram modificações estatisticamente significativas, o que indicou que aos 90 dpi, os animais não apresentaram anemia (Figura 4.20C; Figura 4.20D). Por outro lado, os animais infectados apresentaram hemácias em alvo (Figura 4.21).

#### 4.8.3. Hemograma aos 114 dpi

Verificou-se que não houve diferença entre os animais controle e infectados, em relação ao número total de leucócitos (Figura 4.22A), ao número total de plaquetas (Figura 4.22B), e ao volume corpuscular médio das hemácias (Figura 4.22C). Porém de modo distinto aos demais pontos avaliados, há uma diferença significativa na concentração da hemoglobina corpuscular média (Figura 4.22D).

Os achados hematológicos dos quatro grupos infectados estudados e seus controles encontram-se sistematizados no quadro 4.2.

**Quadro 4.2:** Quadro representativo dos números absolutos dos dados do hemograma (média  $\pm$  erro padrão).

	<b>VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (fm<sup>3</sup>)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO HEMOGLOBINA CORPUSCULAR (g/dL)</b>	<b>LEUCOGRAMA (mil/ mm<sup>3</sup>)</b>	<b>PLAQUETAS (mil/ mm<sup>3</sup>)</b>
<b>30 DPI</b>	63.93 $\pm$ 3.641	31.37 $\pm$ 0.4333	4233 $\pm$ 1093	762700 $\pm$ 104900
<b>50 DPI</b>	56.65 $\pm$ 1.650	32.40 $\pm$ 0.2000	3200 $\pm$ 1100	609500 $\pm$ 218500
<b>90 DPI</b>	69.50 $\pm$ 1.800	32.30 $\pm$ 0.6000	11250 $\pm$ 1550	336000 $\pm$ 64000
<b>114 DPI</b>	69.13 $\pm$ 4.501	32.05 $\pm$ 0.2533	5275 $\pm$ 1383	501000 $\pm$ 60090
<b>CTR 30/ 50 DPI</b>	62.00 $\pm$ 0.1000	32.20 $\pm$ 0.5000	4450 $\pm$ 2250	573500 $\pm$ 133500
<b>CTR 90/114 DPI</b>	62.35 $\pm$ 0.8500	33.25 $\pm$ 0.2500	4950 $\pm$ 450	775500 $\pm$ 68500

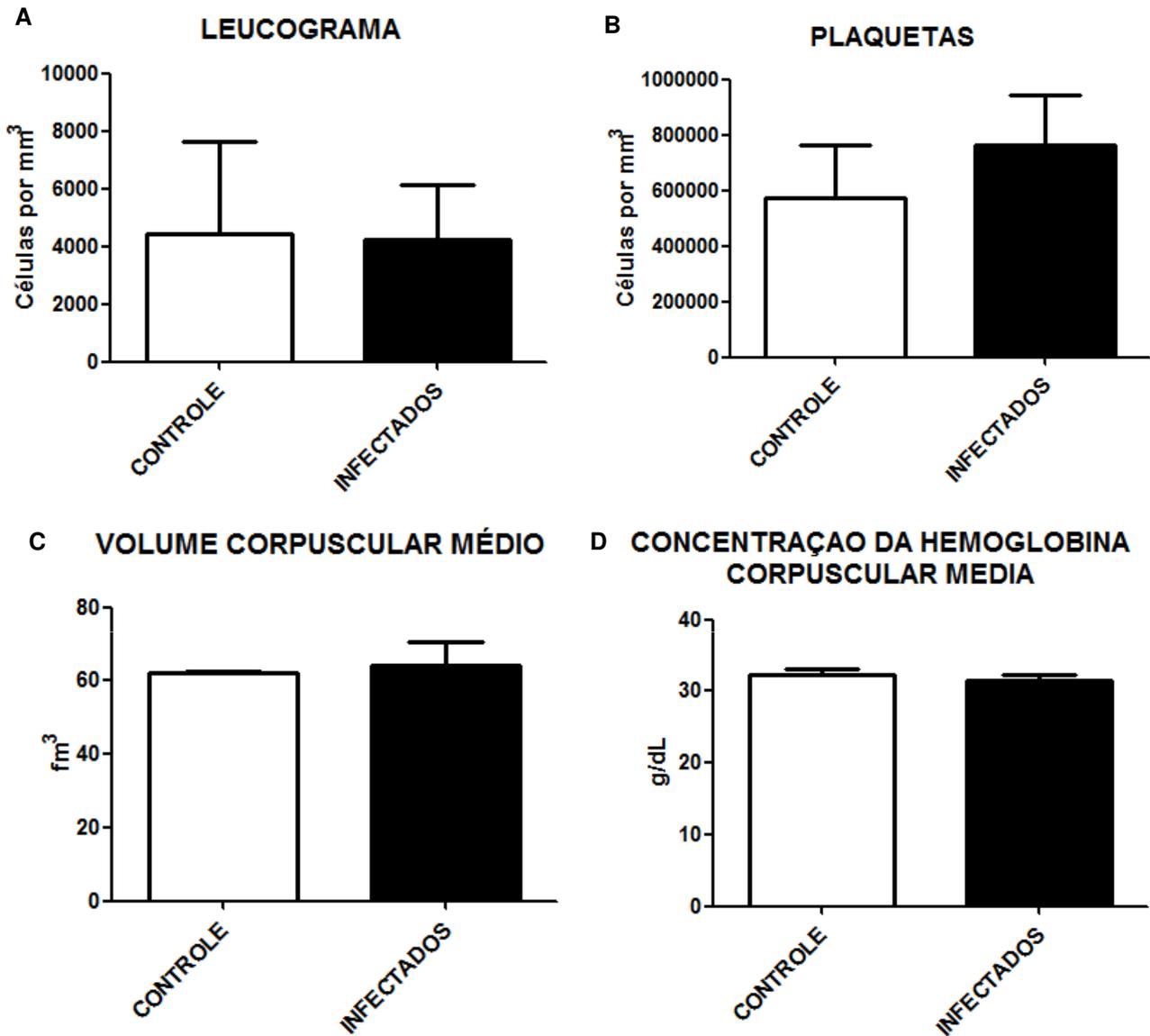


Figura 4.18: Hemograma de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 30 dpi. A) Leucograma; B) Plaquetas; C) Volume corpuscular médio; D) Concentração da hemoglobina corpuscular média. Os dados foram expressos em média  $\pm$  S.D. n= 2 CONTROLE; n=3 INFECTADOS.

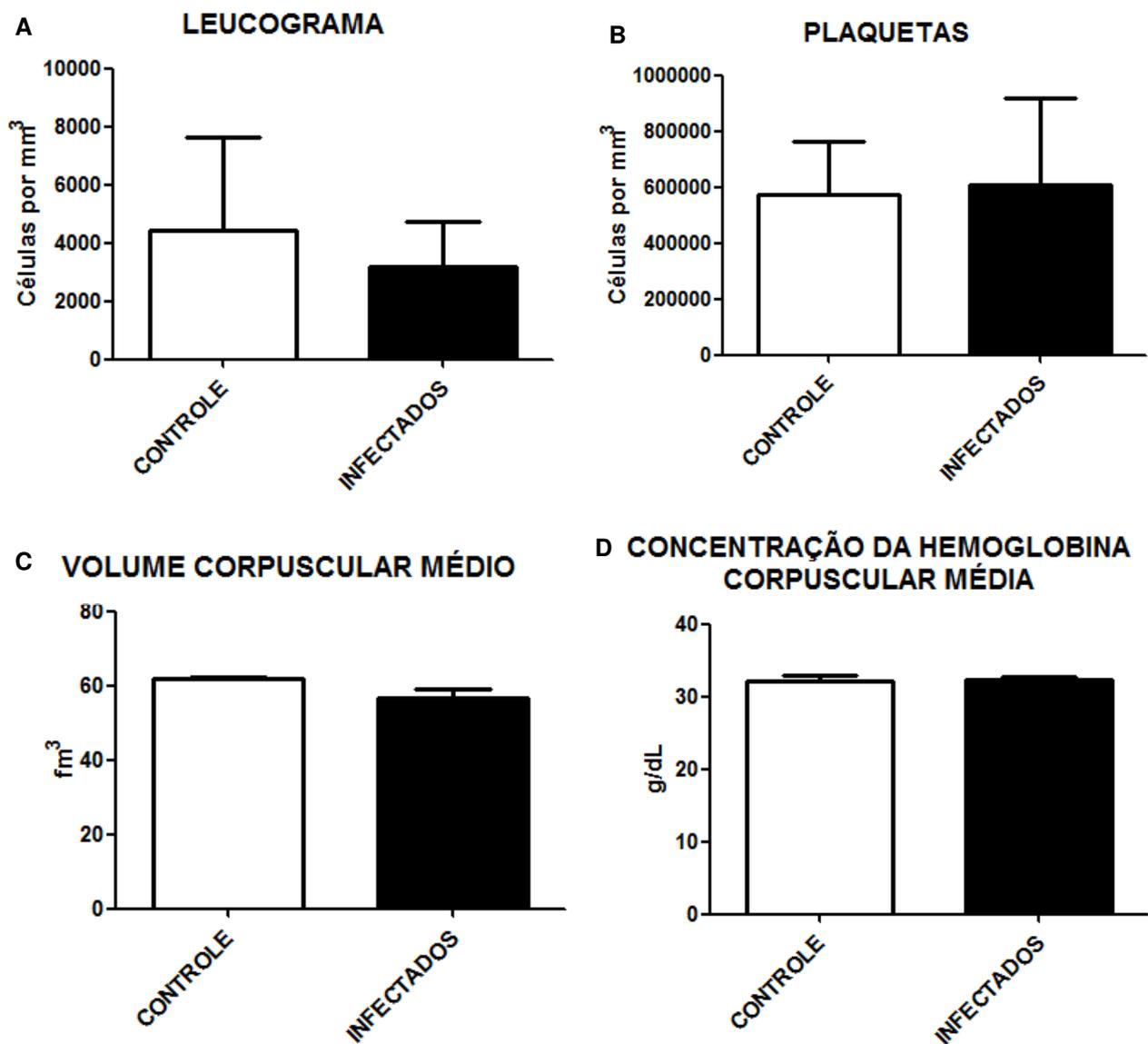


Figura 4.19 : Hemograma de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 50 dpi. A) Leucograma; B) Plaquetas; C) Volume corpuscular médio; D) Concentração da hemoglobina corpuscular média. Os dados foram expressos em média  $\pm$  S.D. n= 2 CONTROLE; n=2 INFECTADOS.

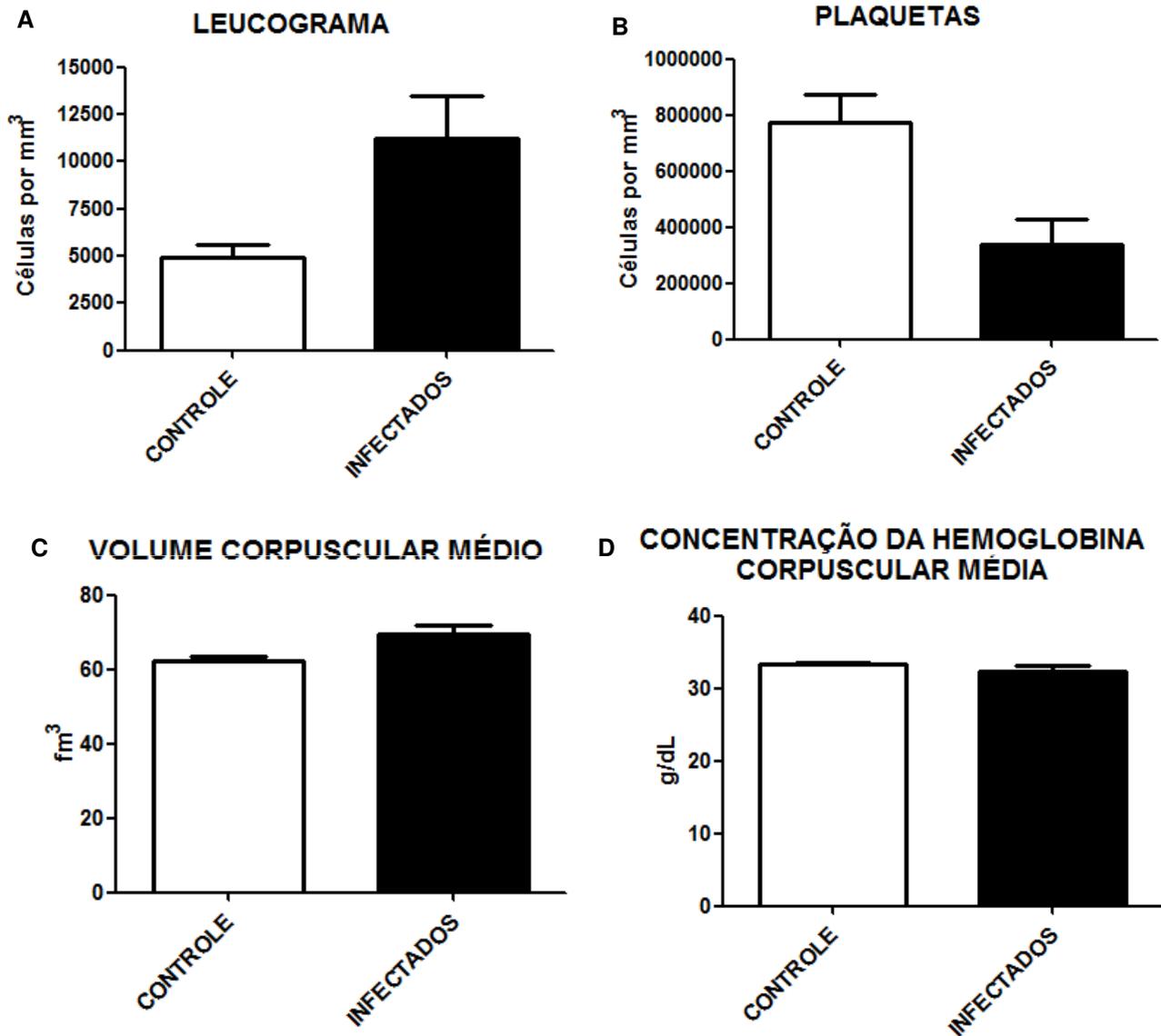


Figura 4.20: Hemograma de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 90 dpi. A) Leucograma; B) Plaquetas; C) Volume corpuscular médio; D) Concentração da hemoglobina corpuscular média. Os dados foram expressos em média  $\pm$  S.D. n= 2 CONTROLE; n=2 INFECTADOS

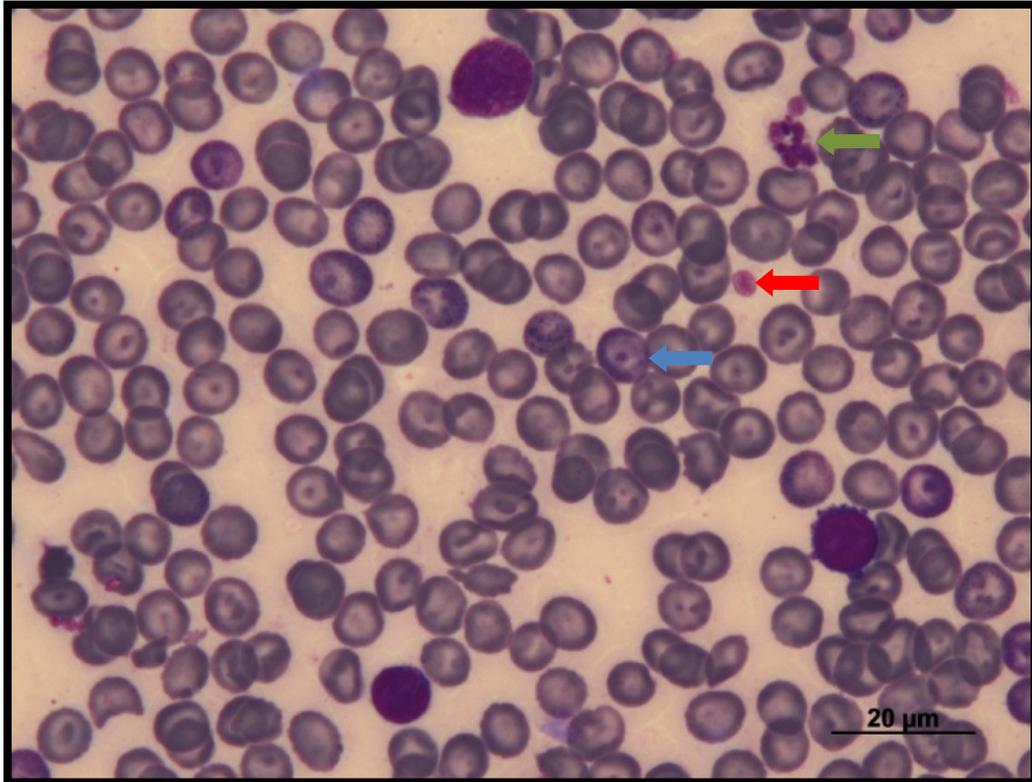


Figura 4.21: Esfregaço sanguíneo de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 90 dpi. A imagem apresenta hemácias em alvo e macroplaquetas. 63x/1.4NA. **Seta vermelha:** Macroplaquetas; **Seta azul:** Hemácia em alvo; **Seta verde:** grumo de plaquetas

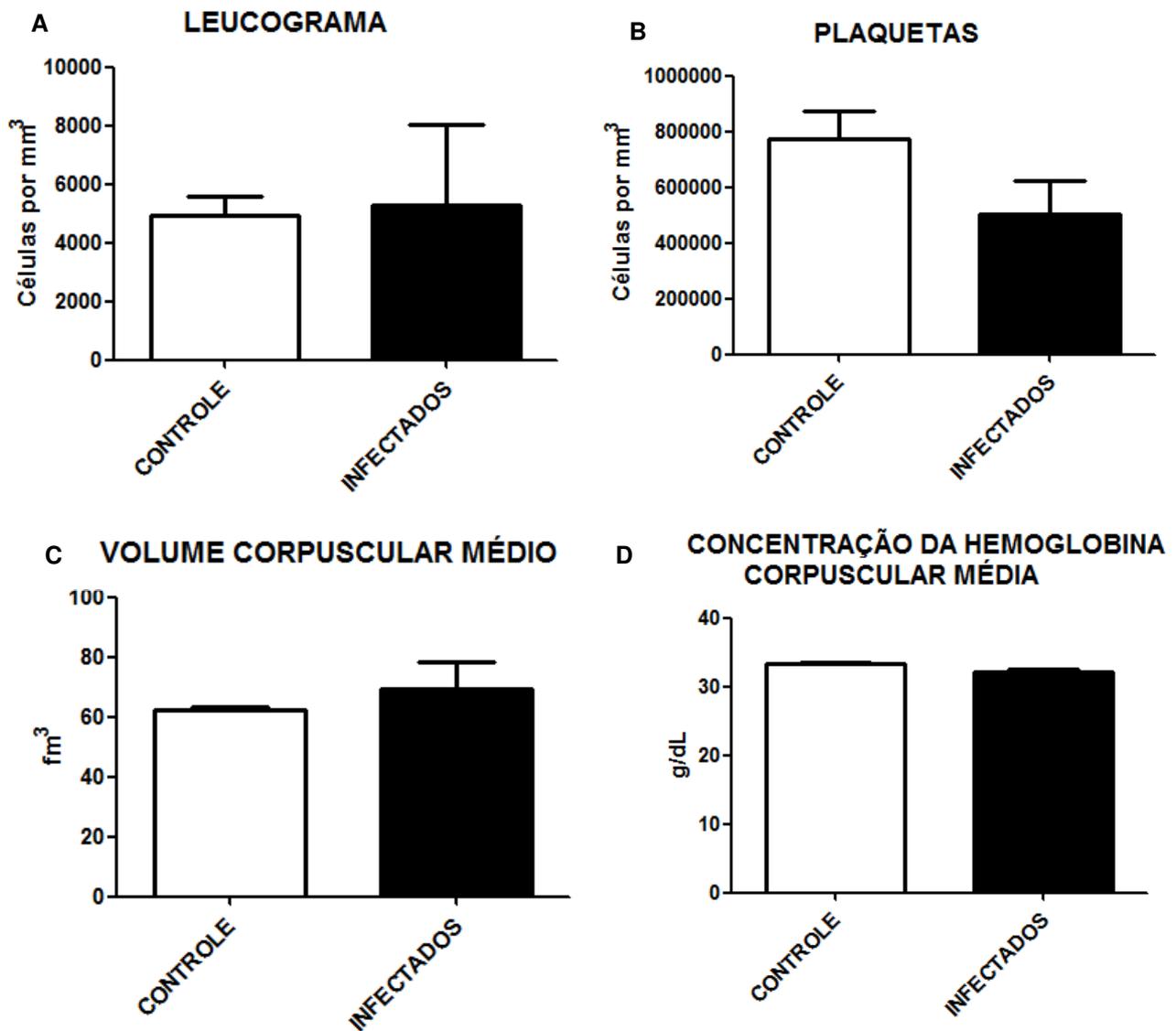


Figura 4.22: Hemograma de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 114 dpi. A) Leucograma; B) Plaquetas; C) Volume corpuscular médio; D) Concentração da hemoglobina corpuscular média. Os dados foram expressos em média  $\pm$  S.D. n= 2 CONTROLE; n=4 INFECTADOS.

#### 4.9. Estudo microbiológico

A fim de melhor entender a patogenia da infecção por *A. costaricensis* associada a aterosclerose, procuramos estudar a microbiota cultivável, associada a este helminto no local da lesão. Para iniciar este estudo, realizamos a coleta da lesão de animais com 60DPI com subsequente isolamento microbiano em vários meios de cultura. A lesão foi ressecada através de cirurgia asséptica e mantida em meio de transporte até a inoculação em diferentes meios de cultura para isolamento.

A análise dessas amostras de lesão, mostraram a presença de cocos (Figura 4.22A) e bacilos (4.22B) gram-positivos das amostras coletadas aos 60dpi, embora os animais não apresentassem bacteremia verificada pelo cultivo de sangue, obtidos por punção cardíaca. Dentre as bactérias da lesão aterosclerótica encontramos colônias hemolíticas e não hemolíticas. No sangue coletado através de punção cardíaca, não foram encontradas bactérias. Em animais controles foram coletadas amostras das mesmas áreas das quais não foi isolado nenhum microorganismo.

Após a obtenção dos resultados destas primeiras análises bioquímicas para caracterização dos cocos gram-positivos descartou-se a presença de *Staphylococcus aureus*.

Esses isolados foram conservados por congelamento de forma a permitir, posteriormente, a análise molecular por sequenciamento do RNA 16S para classificação dos isolados a nível de espécie.

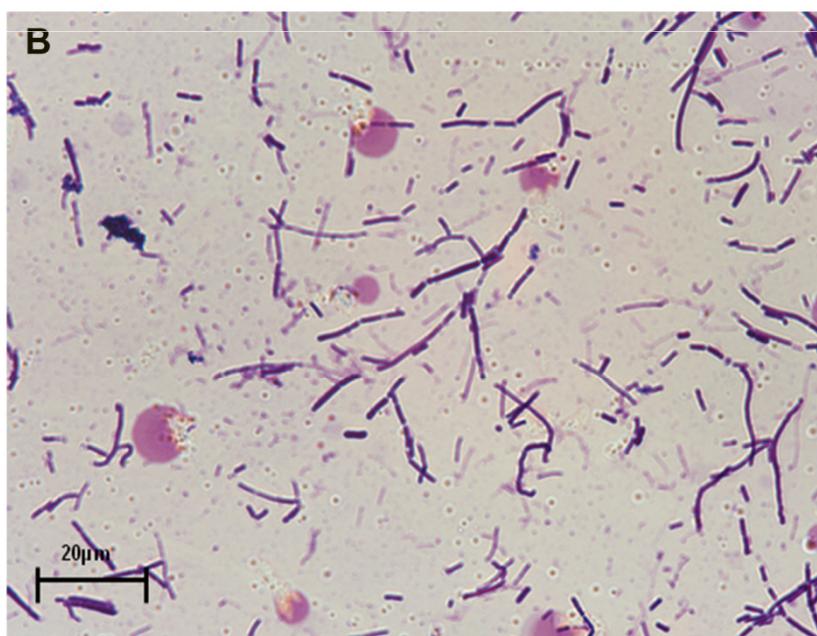
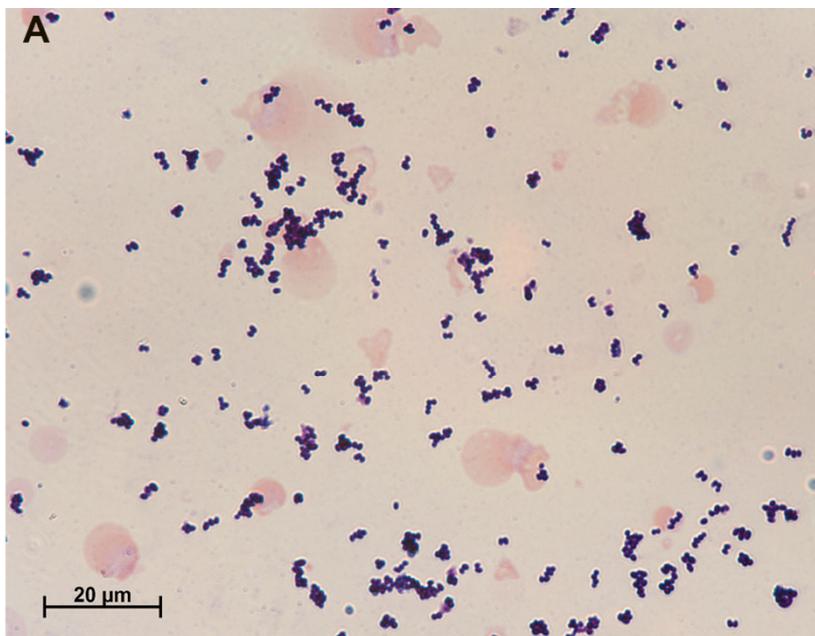


Figura 4.23 : A) Cocos Gram positivos encontrados na lesão aterosclerótica de *S. hispidus* infectados por *A. costaricensis* aos 60 dpi. B) Bacilos Gram positivos encontrados na lesão aterosclerótica de animais infectados com 60 dpi.

## **5. DISCUSSÃO**

No presente estudo descrevemos as alterações vasculares de cricetídeos *Sigmodon hispidus* infectados por *Angiostrongylus costaricensis* e evidenciamos que este pode ser um modelo importante para o estudo de vasculites e doenças ateroscleróticas de uma maneira geral, contudo é importante que estudos posteriores sejam realizados para a avaliação do mecanismo dessa patogênese e, compará-lo às doenças humanas.

A angiostrongilíase abdominal é uma doença de descrição relativamente recente (década de 1960). É causada pelo nematódeo *A. costaricensis* e, apesar de ser considerada um problema de saúde pública, principalmente na Costa Rica, poucos são os estudos que tratam acerca dessa patologia.<sup>1,2,16</sup>

Devido ao fato do homem ser um hospedeiro acidental e não eliminar larvas ou ovos nas fezes, o diagnóstico da doença humana é baseado em uma tríade histopatológica: intenso infiltrado eosinofílico em todas as camadas da parede intestinal, reação granulomatosa e vasculite eosinofílica que afeta artérias, veias, linfáticos e capilares.<sup>29</sup>

A utilização de apenas esta abordagem para o diagnóstico deve ser questionada. Evidenciamos o fato de que, em casos humanos crônicos é possível que no momento de realização da biópsia, o infiltrado eosinofílico tenha diminuído ou até mesmo cessado, e sejam encontrados outros achados que não condigam com a tríade, porém são característicos de tempos tardios da doença (como melhor descrito posteriormente). Portanto, é importante atentar para o fato de que a utilização apenas da tríade histopatológica, muitas vezes, falseia o diagnóstico final e pode apontar para outra patologia, o que leva a um subdiagnóstico da angiostrongilíase abdominal, levando a uma subquantificação da incidência da doença.

A utilização de modelos experimentais murinos, especialmente camundongos, para o estudo da angiostrongilíase abdominal não é viável. A letalidade em Swiss Webster chega a 80% em quatro meses e os animais que sobrevivem tem parasitismo baixíssimo.<sup>41</sup> Portanto, o modelo murino, não é interessante para a manutenção do ciclo nem para o estudo da patogenia tardia desta infecção.

Como alternativa, e com o objetivo de entender a patogenia da angiostrongilíase abdominal, nosso grupo vem utilizando como modelo o roedor *Sigmodon hispidus*, o qual vem ajudando a esclarecer alguns aspectos importantes

do desenvolvimento dessa doença.<sup>15,48</sup> O *S. hispidus* foi escolhido por ser o principal hospedeiro natural, e, portanto, mais adaptado ao parasito que outros modelos, além de adaptar-se muito bem ao laboratório. A partir do estudo cinético realizado por Mota e Lenzi<sup>15</sup> foram escolhidos os tempos para este estudo (30, 50, 90, 114 dpi).

O desenvolvimento do parasito foi o fator primordial a ser considerado para o estabelecimento da cinética, visto que o momento de vida em que ele se encontra, modifica a resposta do hospedeiro definitivo. Aos 30 e 50 dpi os vermes estão adultos e o processo de larvogênese é intenso, além da tríade histopatológica estar bem estabelecida. Em tempos mais tardios, 90 e 114 dpi já há o declínio da quantidade de vermes adultos e da larvogênese, e exacerbação das alterações vasculares.

O verme adulto do *A. costaricensis* instala-se na artéria cecal de mamíferos, obstruindo o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, causando um aumento da pressão intravascular. A adaptação deste parasita a esse ambiente provavelmente está relacionada à produção de moléculas anticoagulantes, as quais favorecem o retorno à homeostase, o que já foi descrito em outros helmintos, a exemplo da clonagem e realização de testes funcionais com moléculas do *S. mansoni*, a exemplo do SmKI-1.<sup>49</sup>

Apesar da oviposição ocorrer na artéria cecal, de modo que os ovos possam seguir o fluxo sanguíneo e desembocar no intestino, Mota e Lenzi<sup>15</sup> verificaram a presença de ovos e larvas em capilares da parede intestinal e na *vasa vasorum*. Em nosso trabalho confirmamos este achado através da presença de muitos ovos e larvas na *vasa vasorum* de grandes artérias da região cecal. Uma explicação para que esses ovos embolizem na *vasa vasorum*, pode estar baseada no mecanismo utilizado pelo *Schistosoma mansoni* onde fêmeas fecundadas migram contra a corrente sanguínea para efetuar a postura na submucosa do intestino em vasos de menor calibre da parede intestinal. Com isso, alguns ovos caem no intestino e outros embolizam para capilares.<sup>50</sup> Outra possibilidade é que a pressão causada pelo acúmulo de vermes adultos na artéria cecal, cause uma obstrução mecânica e uma intensa pressão contra o fluxo sanguíneo normal, o que faria com que os ovos encontrassem os capilares mais próximos e embolizassem.

Dentro e ao redor dos ovos não embrionados, observa-se um acúmulo de ferro. Como se trata de um helminto intravascular e hematófago, o metabolismo do *A. costaricensis* é baseado na utilização de ferro. Em helmintos como o *S. mansoni*,

a recaptação do grupamento heme é necessária para a oogênese.<sup>51</sup> Dessa maneira, é possível que o *A. costaricensis* tenha um mecanismo similar de recaptação do grupo heme para a maturação dos oócitos, e isso justificaria a presença do ferro apenas em ovos não embrionados.

De modo distinto aos ovos não embrionados, os ovos embrionados não apresentam ferro, mas apenas um intenso infiltrado eosinofílico ao seu redor. Este achado está em consonância com o estudo de Mota<sup>48</sup> que sugeriu uma relação entre a presença de ovos embrionados, L1 e o infiltrado eosinofílico. Apesar da relação entre helmintos e eosinofilia sanguínea já ser bem conhecida e parecer estar relacionada à migração larvária ou à liberação de antígenos por parasitas mortos<sup>52</sup>, não se sabe exatamente qual o papel dos eosinófilos em infecções por helmintos. Acredita-se que esteja relacionado à produção de citocinas (IL4 e IL-13)<sup>53</sup>, e principalmente ao remodelamento tecidual e limpeza de restos celulares devido à lesão tecidual por causa da invasão parasitária<sup>54</sup>.

Ao investigar a origem desses eosinófilos, chegamos à medula óssea aonde vimos que há uma hiperatividade, com predomínio de eosinófilos (em 90 dpi). Sabe-se que o estímulo à produção de eosinófilos em infecções parasitárias está relacionado a citocinas do tipo Th2 como IL-5, IL-3 e GM-CSF.<sup>55</sup>

Os mecanismos de chegada desses eosinófilos no tecido podem ser semelhantes aos utilizados por outros helmintos. Utilizando modelo murino demonstrou-se que ovos de *S. mansoni* promovem o aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 na superfície de células endoteliais, associada à presença de TNF-alfa, o que auxilia na migração de linfócitos e formação dos granulomas.<sup>56</sup> Em nosso modelo, observamos que é possível que os ovos viáveis e a L1 induzam a expressão de moléculas de adesão para eosinófilos no endotélio ou a liberação de mediadores químicos, possivelmente IL5 ou eotaxina, o que provocaria a eosinotaxia e a transmigração intensa de eosinófilos.

Na artéria, o infiltrado eosinofílico inicia-se na adventícia e segue em direção à íntima provocando uma redução do lúmen arterial. As células inflamatórias invadem o tecido, destruindo as lâminas elásticas e causando uma arterite centrípeta. Essa destruição das lâminas elásticas causa uma completa desestruturação e enrijecimento da artéria. Esta destruição das lâminas elásticas do vaso pode estar relacionada a um aumento da metaloproteinase 12, que está positivamente correlacionada à presença de eosinófilos. Este fenômeno foi descrito

em modelo experimental de meningite eosinofílica, causada pela infecção por *Angiostrongylus cantonensis*.<sup>57</sup> O elevado número de eosinófilos em nosso modelo de infecção de *S. hispidus* por *A. costaricensis*, pode estar associado a uma alta concentração de proteinases, as quais promovem a destruição da parede vascular, principalmente da artéria cecal, mas também de outras artérias intestinais e mesentéricas.

Em humanos, há correlação entre periarterite eosinofílica, associada à infiltrado na íntima e na média, lesões das lâminas elásticas e fibrose na média e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, sugerindo que, no caso de lesões coronarianas, ambas atuem em conjunto.<sup>58</sup>

Nesse contexto fisiopatológico, discute-se em que momento as lesões ocorrem na íntima. Sendo uma lesão centrípeta, é possível que o infiltrado que invade o tecido comece a destruir desde a adventícia, promovendo uma lesão invasiva que perpassa a média e provoque a lesão de íntima. Porém, uma hipótese diferente, embora não excludente, é que o parasita adulto dentro do vaso, por uma lesão mecânica ou mesmo através de substâncias excretadas, desestabilize a homeostase, e promova as modificações na íntima. Nada impede que ambas as hipóteses atuem em paralelo.

Fazendo um paralelo com doenças humanas, encontramos algumas doenças reumatológicas, as quais envolvem o desenvolvimento de periarterites autoimunes como a artrite reumatoide, arterite de Takayasu e o lúpus eritematoso sistêmico.<sup>59-60</sup>

Nossos resultados mostram que em 90 dpi, há um grande número de ovos não viáveis e a maioria dos parasitas estão mortos. Observa-se uma piora da evolução da doença vascular com a presença de trombo e um processo aterogênico instalado, com depósito de uma substância xantomatosa e macrófagos, geralmente carreando esta substância e ferro. Há uma lesão muito bem definida na artéria cecal; porém a doença é bastante localizada e autolimitada, visto que, à análise de artérias coronárias, não foi vista nenhuma lesão aterosclerótica e nem xantomatosa.

Fazendo uma associação da literatura com os nossos dados, concluímos que é possível que, enquanto o verme esteja vivo (na fase inicial da infecção), este produza certa quantidade de fatores anticoagulantes, para poder manter-se no interior da artéria cecal, como já descritos para outros helmintos como o *S. mansoni*, que produz SmKI-1.<sup>49</sup> A produção desses supostos fatores de coagulação causa um

contra equilíbrio com a obstrução mecânica do fluxo sanguíneo pela presença dos vermes adultos, retornando a homeostase de maneira geral. Conforme mais vermes adultos vão morrendo, há uma diminuição da produção desses fatores de coagulação.

Após a análise da medula óssea, em 90 dpi, verificou-se um aumento quantitativo dos megacariócitos. Comumente, modificações na proliferação e diferenciação anormal de megacariócitos são comuns em pacientes com síndromes mielodisplásicas. Também é descrito na literatura que após um período de trombocitopenia, a medula óssea começa a produzir megacariócitos gigantes, com ploidia superior e aumento da atividade de síntese proteica. Como resultado, as plaquetas produzidas oriundas desses megacariócitos são maiores em volume e têm uma maior atividade.<sup>62</sup> Isso explicaria, a instalação do trombo apenas em tempos mais tardios, visto que haveria morte dos vermes adultos e uma mudança de uma fisiopatologia anti-trombogênica, para pró-trombogênica.

No sangue periférico, a contagem de plaquetas revelou trombocitopenia, porém acreditamos que isso seja um reflexo de uma leitura dessas células pelo contador como se as mesmas não se tratassem de plaquetas, visto que foram verificadas muitas macroplaquetas, o que gera uma contagem diferente da realidade. Martin e Trowbridge<sup>62</sup> na década de 80, utilizando coelhos, mostram que macroplaquetas são produzidas após trombocitopenia, devido a um maior número de ploidia, um aumento da síntese proteica e são mais reativas que as pequenas, devido a uma maior produção de tromboxano.<sup>62</sup>

Adicionalmente um grande número de hemácias em alvo foi encontrado. Essas células são encontradas em algumas hemoglobinopatias e, nesses casos, são resultado de uma diminuição do conteúdo citoplasmático, sem proporcional redução da quantidade de lipídios da membrana e geralmente estão associadas a microcitose e hipocromia.<sup>63</sup>

Foi descrito que os eosinófilos também estão envolvidos como participantes da formação do ateroma. Na aterosclerose humana foi demonstrado que a eotaxina e seu receptor (CCR3) estão superexpressos e contribuem com a inflamação vascular no desenvolvimento da aterosclerose.<sup>64</sup> Em um estudo utilizando camundongos ApoE KO, a administração de anticorpos monoclonais e policlonais bloqueadores para a eotaxina 2 causam a redução do ateroma precoce e o

tratamento contínuo promove a posterior estabilização da placa.<sup>65</sup> Esses achados reforçam a possibilidade do envolvimento de proteínas quimiotáticas de eosinófilos na fisiopatologia da aterogênese, a qual pode ser liberada por células inflamatórias ou estar relacionada à presença de elementos parasitários.

Seguindo o raciocínio de elementos parasitários, um estudo realizado com células endoteliais humanas mostrou que antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* estimulam a formação de estruturas semelhantes a vasos em “*tube formation assay*” e diminui a apoptose, provavelmente via aumento de fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF).<sup>66</sup> Como supracitado, nosso modelo mostra que, na presença de ovos e do infiltrado inflamatório, há um espessamento da adventícia e modificação da íntima, e posteriormente uma proliferação da camada muscular do vaso. Fazendo um paralelo da literatura com nossos achados, é possível que os ovos do *A. costaricensis* possuam algum antígeno que cause não só uma ativação e modificação das células endoteliais, provocando desorganização da íntima, como também um gatilho para estímulo à proliferação de células musculares anormais (marcação puntiforme de desmina, o que representa restos de células musculares mortas). Adicionalmente o acúmulo de matriz extracelular na adventícia, pode ser resultante da atuação de antígenos dos ovos de forma direta ou devido ao intenso infiltrado inflamatório instalado no local.

Tratando-se de dois parasitas intravasculares obrigatórios, as transformações que o *S. mansoni* e o *A. costaricensis* causam no vaso parecem ser semelhantes quando estão vivos. A literatura cita os efeitos antiaterogênicos do *S. mansoni*. Em modelos murino ApoE KO a infecção por *S. mansoni* reduziu em até 50% a aterogênese nas artérias aorta e braquicefálica<sup>67</sup> e isto está relacionado a uma diminuição dos triacilgliceróis e colesterol neste modelo.<sup>68</sup> Desta forma, se esse for um dos mecanismos, exclui-se a participação direta dos eosinófilos no desenvolvimento da aterosclerose. Dislipidemia e o desenvolvimento de aterosclerose estão, na maioria das vezes, intrinsecamente relacionadas.

O depósito de ferro encontrado em nosso trabalho de forma colocalizada com as lesões xantomatosas, também pode estar envolvido neste processo de modificação do LDL, transformando-o em oxi-LDL (LDL oxidado). A ferritina do soro é um fator indicador de alto risco para a progressão de aterosclerose de carótida. Os primeiros passos da aterosclerose estão relacionados à capacidade da ferritina em promover a modificação do potencial aterogênico do LDL<sup>69</sup>, e esta pode ser a

responsável por liberar o ferro resultante da conversão de  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$ .<sup>70,71</sup> O ferro livre está envolvido na produção de altas quantidades de radicais livres e isto facilitaria a peroxidação dos lipídios.

Em nosso modelo, foi observado um intenso acúmulo de ferro dentro das artérias com parasitas mortos, ao redor e dentro da substância xantomatosa. É possível que a presença deste ferro encontrado em nosso modelo, possa ser resultado da ferritina liberada das microhemorragias ocasionadas pela obstrução dos capilares ou resultado do ferro não metabolizado dos ovos não-embriados, nos quais há acúmulo de ferro interno e periférico, ou ambos.

Toda esta questão de envolvimento de macrófagos e lipídios na patogênese da aterosclerose envolve a modificação e retenção de LDL na íntima. A fisiopatologia envolve a retenção de LDL na íntima da artéria, sua oxidação, bem como outros tipos de modificações nas partículas de LDL que o fazem adquirir epítomos (padrões moleculares associados a patógenos) que ativam o sistema imunológico.<sup>72</sup>

Sinteticamente, a presença do LDL oxidado recruta monócitos para a parede da artéria através da indução de fatores quimiotáticos para monócitos como o MCP1. Essas células migram, junto com células T, para a íntima, transformando-se em macrófagos.<sup>73,74</sup> Quando os macrófagos iniciam a lesão e esta é sustentada, as modificações arteriais tornam-se irreversíveis, e há uma migração e proliferação das células do músculo liso, deposição de matriz no tecido fibroso, calcificação, angiogênese e formação do núcleo necrótico, o que culmina com a formação de um ateroma estável.<sup>75</sup> Durante o desenvolvimento deste processo, as células da adventícia respondem à lesão, primeiramente aumentando sua proliferação e, posteriormente, migrando para fora da adventícia, promovendo significativas contribuições para reparar a média e promover a formação das lesões da neointima.<sup>76</sup>

A presença de macrófagos com características de células espumosas (do inglês: "foam cells"), os quais são carreadores de lipídios e estão relacionados ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, é um achado comum no desenvolvimento da aterosclerose.<sup>75</sup> A recaptação do colesterol está relacionada aos receptores do tipo *scavenger*, especialmente SR-A e CD36, os quais estão presentes em macrófagos. Juntos, estes receptores chegam a ser responsáveis por 90% da internalização do LDL oxidado.<sup>77</sup>

A aterosclerose humana classicamente está relacionada a uma lesão inflamatória crônica acompanhada de disfunção endotelial e tem envolvimento de células de músculo liso, macrófagos espumosos e linfócitos T.<sup>78</sup> Em nosso modelo, foram encontrados esses achados clássicos; porém a investigação de alguns mecanismos ainda controversos fez-se necessária, como por exemplo o envolvimento de bactérias as quais estão envolvidas tanto na inflamação xantogranulomatosa, quanto no desenvolvimento da aterosclerose.

Inflamação xantogranulomatosa é um processo descrito nos rins e na vesícula biliar, sendo raros os relatos do envolvimento do cólon. Um estudo descrito na literatura de um caso de uma mulher de 38 anos mostrou uma massa submucosa, que poderia estar relacionada a uma infecção bacteriana.<sup>79</sup> Em nosso trabalho, a inflamação do intestino e da artéria com a presença de lesões xantomatosas, pode estar relacionada à presença de bactérias presentes no tubo digestivo do *A. costaricensis*, visto que alguns estudos já mostraram que o tubo digestivo de helmintos não é estéril, conforme já bem descrito para *S. mansoni*, desde a década de 1940 por Krakower<sup>80</sup> e colaboradores (1940), que mostraram que bactérias Gram-positivas estavam presentes no intestino do *S. mansoni*. Posteriormente, Young e colaboradores<sup>81</sup> (1973) mostraram também a presença de bactérias (*Salmonella typhimurium*) associadas ao tegumento do *Schistosoma*. Conforme revisado, no caso da salmonelose septicêmica prolongada, há translocação bacteriana do parasita para o hospedeiro, através do lançamento de forma recorrente dos microorganismos na circulação, provocando a bacteremia recorrente.<sup>82</sup>

Na literatura, o envolvimento de bactérias com o desenvolvimento da aterosclerose já foi descrito, como, por exemplo, para a *Clamidia pneumoniae* a qual desencadeia a aterogênese mesmo sem dislipidemia.<sup>83</sup> Um dos mecanismos utilizados pela bactéria é a produção de fatores pró-coagulantes e aumento da expressão de citocinas inflamatórias.<sup>84</sup>

Diante dessas descrições na literatura, somado a associação de algumas bactérias com a formação de trombos, especialmente na ausência de dislipidemia (o que vimos em nosso modelo), decidimos realizar um estudo microbiológico (mesmo que inicial), a fim de investigar o possível envolvimento de bactérias no desenvolvimento da vasculite e lesão aterosclerótica do *S. hispidus*. Confirmamos, que no ambiente intra-arterial, o qual deveria ser estéril, de animais infectados há

presença de bactérias Gram-positivas, embora a caracterização bioquímica ainda não nos tenha permitido chegar à conclusão de qual espécie bacteriana se trata.

Nossos achados sugerem que não somente o verme em si deva ser mais bem investigado, mas também bactérias que ele carrega, as quais podem ser as responsáveis pelo desenvolvimento de lesões ateroscleróticas observadas em nosso modelo, ou pelo menos auxiliem no início e/ou evolução deste processo.

É possível que, em nosso modelo, no momento em que os parasitas começam a morrer, estes liberem bactérias na corrente sanguínea. A bacteremia modificaria a homeostase do vaso, com a produção de fatores coagulantes e inflamatórios, e auxiliaria no desenvolvimento da aterosclerose. Apesar de estar na corrente sanguínea, a bacteremia não foi alta, não sendo suficiente para causar sepse.

Traçando um paralelo entre nosso modelo e o as doenças humanas salientamos que a arterite desenvolvida pelo *S. hispidus* infectado por *A. costaricensis*, assemelha-se à histopatologia da tromboangiíte obliterante, a qual é uma doença inflamatória segmentada, que afeta vasos de pequeno e médio calibre. Ocorre um envolvimento da *vasa vasorum* que evolui de forma centrípeta, estando relacionada ao desenvolvimento de trombose arterial.<sup>85</sup>

A questão das células da adventícia envolvidas nesse processo é demonstrada por um experimento utilizando células da adventícia marcadas com  $\beta$ -galactosidase. Este ensaio mostra que entre sete e 14 dias após a lesão por balão-catéter, as células marcadas são encontradas na neoíntima. Sugere-se, portanto, que há migração de células da adventícia para a neoíntima, auxiliando no espessamento da íntima, pelo menos na artéria de roedores. Sabe-se que o fator de crescimento  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) é importante neste processo.<sup>86</sup> O experimento descrito por esses autores pode explicar a lesão centrípeta de nosso modelo, mostrando como a lesão inicial de adventícia interfere na modificação estrutural e organizacional da íntima.

Os animais acometidos pela angiostrongilíase, apesar do grande trombo e possível isquemia intestinal, sobrevivem e, depois de passar da fase crônica, onde os vermes adultos morrem, se curam. Nossos achados demonstraram que há sinais de recanalização inicial do trombo e esse mecanismo é essencial para o entendimento dos achados patológicos do nosso modelo. Em humanos, o processo

de recanalização é frequente, podendo ser verificado dentro do trombo, canais vasculares revestidos de endotélio, suportados por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo e neovascularização de tamanhos variáveis.<sup>87-91</sup> Em nosso modelo não foi possível ver esse nível de organização na recanalização no tempo mais tardio

estudado (114 dpi).

Verificou-se que apesar de ser uma doença de grande expressão clínica, ainda faltam elementos na literatura que auxiliem no entendimento da fisiopatologia da aterosclerose. Uma das limitações importantes em relação à pesquisa básica é a falta de modelos experimentais de pequeno porte que possam auxiliar neste estudo. Camundongos selvagens não expressam a proteína de transferência de ésteres de colesterol, uma importante proteína plasmática provavelmente envolvida em processos aterogênicos em humanos. Apesar do baixo custo, facilidade de criação, e manipulação genética, poucos são os modelos de camundongos utilizados no estudo da aterosclerose, os quais são habitualmente nocaute.<sup>92</sup>

Camundongos ApoE correspondem ao modelo murino mais usual no estudo da aterosclerose. Isto se deve ao fato de que eles desenvolvem ateromas utilizando uma dieta de ração normal e é o modelo que mais se assemelha à doença humana. Esses animais não possuem uma glicoproteína que participa do “*clearance*” de colesterol. São marcados por hipercolesterolemia (colesterol total >500 mg/dL) devido aos elevados níveis de lipoproteínas de baixa e intermediária densidades. As lesões ateroscleróticas iniciam-se em torno de 10 semanas, com a presença de macrófagos espumosos e dentro de 20 semanas já é percebida a presença de placa fibrosa<sup>93</sup> na aorta, coronária e artérias pulmonares.<sup>94</sup>

O modelo correspondente à hipercolesterolemia familiar LDLR<sup>-/-</sup>, requer para o desenvolvimento de uma lesão significativa a administração de uma dieta aterogênica hiperlipídica e a lesão só é evidente em animais idosos.<sup>95</sup>

Outro modelo menos usual pode ser obtido através da lesão arterial mecânica, induzida por angioplastia por balão-cateter em carótida de ratos. Este modelo causa uma lesão precoce envolvendo a contração da musculatura lisa e, em tempos tardios, provoca o espessamento da íntima.<sup>96</sup>

Não existe um modelo ideal para o estudo da aterosclerose e todos têm vantagens e limitações. Diante da urgência no estudo desta patologia, percebe-se a

necessidade de criação de alternativas de modelos de pequeno porte para o aprofundamento do estudo das lesões ateroscleróticas.

Em nosso estudo, descrevemos um modelo de lesão aterosclerótica induzida por helminto em cricetídeo. Apesar da lesão aterosclerótica ser macroscopicamente e, em alguns aspectos histológicos, semelhante à lesão desenvolvida em humanos, não podemos precisar até que ponto a fisiopatologia desenvolvida guarda similaridades. Há uma possibilidade de esse modelo possuir a proteína de transferência de ésteres de colesterol ou mesmo o desenvolvimento da lesão estar relacionada a microorganismos presentes no *Angiostrongylus costaricensis*.

Baseados na literatura, constatamos que a maioria dos hospedeiros naturais do *A. costaricensis* é da família Cricetidae. Isso pode estar relacionado ao fato de que outros animais que se infectam, morrem e não completam o ciclo. Além disso, os cricetídeos devem possuir algum mecanismo que os façam sobreviver à infecção por *A. costaricensis*. Adicionalmente, no caso do *S. hispidus*, consegue desenvolver ateromas sem dieta hiperlipídica.

Algumas dificuldades em relação a ampla utilização desse modelo dizem respeito à comercialização do *S. hispidus*. Adicionalmente, encontrar anticorpos específicos para o estudo mais aprofundado deste modelo, não é simples, visto que a maioria dos produtos comerciais é destinada à modelo murino, e nem sempre os epítomos são semelhantes.

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que a infecção experimental de *S. hispidus* por *A. costaricensis* provocou uma periarterite eosinofílica inicial instalada no intestino, especialmente intestino grosso e ceco, e em vasos intestinais, principalmente na artéria mesentérica superior e outros vasos mesentéricos. Essa periarterite evoluiu para a instalação de um processo aterosclerótico composto majoritariamente por fibrina e uma substância xantomatosa com macrófagos espumosos. Houve uma invasão centrípeta do trombo por células musculares, enrijecimento da artéria (diante da destruição das lâminas elásticas). No sangue, observou-se a presença de macroplaquetas e plaquetas grumadas, além de hemácias em alvo, associadas a um aumento de eosinófilos e megacariócitos na medula óssea.

## **6. CONCLUSÃO**

Com base nos nossos resultados, concluímos que:

1) O modelo de *S. hispidus* infectado por *A. costaricensis* apresenta inicialmente uma intensa inflamação eosinofílica que provoca uma vasculite de vasos intestinais de pequeno e médio calibre, a qual evolui para uma lesão aterosclerótica instalada majoritariamente na artéria cecal e composta principalmente por fibrina e uma substância xantomatosa, macrófagos carreadores desta substância e ferro.

2) Durante o desenvolvimento do ateroma, as lâminas elásticas são destruídas e a camada média prolifera de forma desordenada e contendo células com características não usuais invadindo o lúmen do vaso e constituindo uma parte importante do trombo. Todo esse processo culmina com a desorganização da estrutura da artéria.

3) No intestino, na fase inicial da infecção verifica-se um intenso infiltrado eosinofílico que involui em tempos tardios.

4) O aumento do infiltrado inflamatório é resultado de uma hiperatividade da medula óssea com aumento principalmente de eosinófilos e megacariócitos.

5) Aos 90 dpi, esse aumento de megacariócitos reflete-se na produção de macroplaquetas.

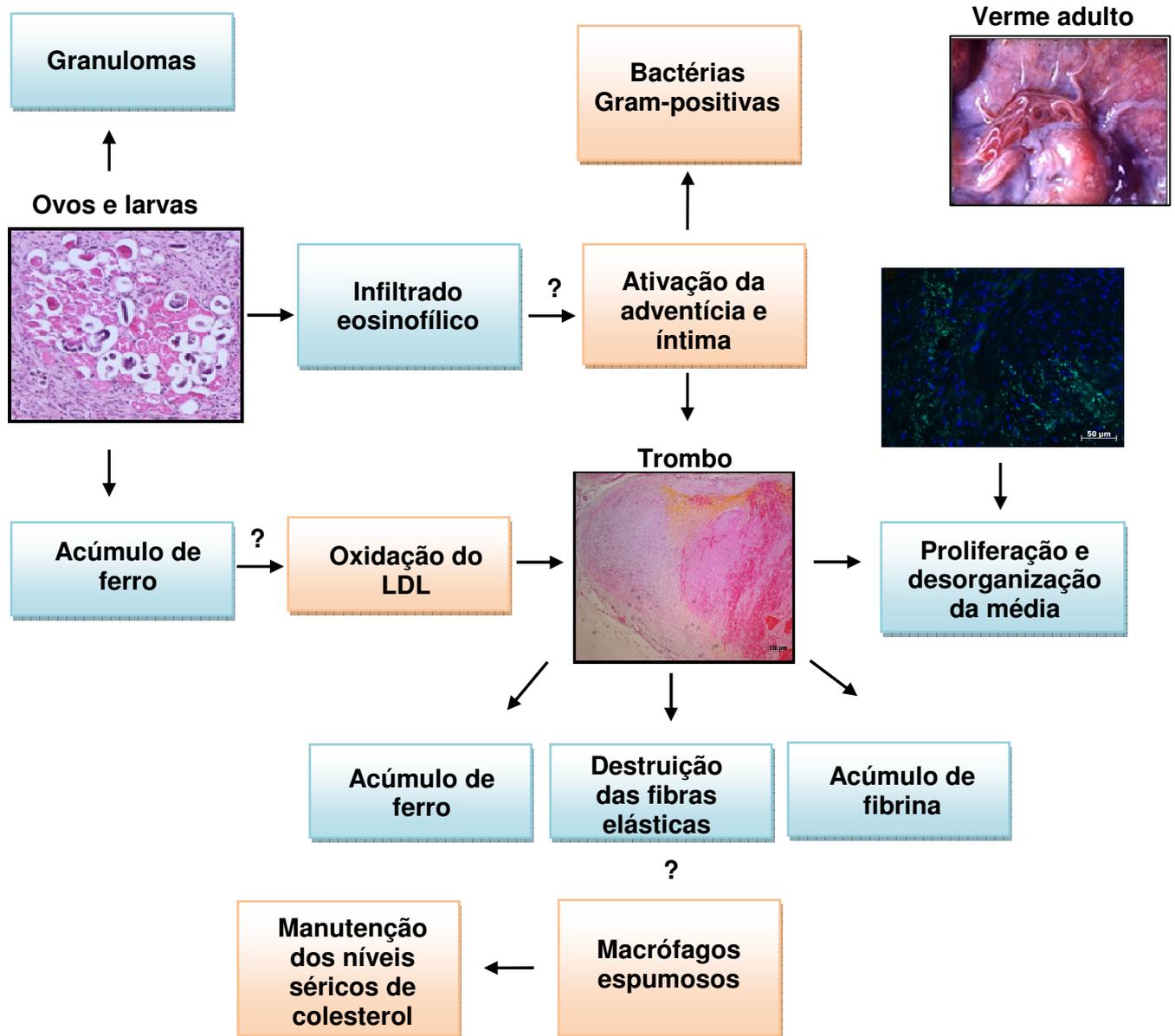
6) Apesar de não haver modificações no número ou conteúdo de ferro das hemácias, aos 90 dpi são encontradas hemácias em alvo.

7) Apesar da análise histopatológica mostrar várias células carreando material xantomatoso, as lesões ateroscleróticas dos animais infectados não estão relacionadas ao aumento dos níveis séricos de colesterol.

8) É possível, que as lesões ateroscleróticas estejam relacionadas à presença de bactérias Gram-positivas presentes no *A. costaricensis* que desencadeiam as lesões ateroscleróticas nos tempos tardios da infecção.

9) Apesar do desenvolvimento da lesão aterosclerótica pelo *S. hispidus* infectado por *A. costaricensis*, não ter os mecanismos patogênicos esclarecidos, e principalmente não ser possível precisar até que ponto são semelhantes às doenças humanas, o modelo de estudo descrito neste trabalho pode ser muito importante para auxiliar no aprofundamento do estudo de vasculites e lesões ateroscleróticas.

## Esquema simplificado dos resultados da tese



Esquema simplificado dos resultados da tese (em azul) e possíveis situações desencadeadas pelo mecanismo fisiopatológico (laranja).

## **7. REFERÊNCIAS**

1. Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Müllner F, Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un estrombilídeo (Strongylata). Acta Médica Cost [Internet]. 1967[acesso em 2016 jan 28];10 (3):235-255. Disponível em:<http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v10n3/art2.pdf>
2. Morera P. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un estrombilídeo (Strongylata; Railliet y Henry, 1913) II. Aspecto parasitológico (nota previa). Acta Médica Cost [Internet]. 1967 [acesso em 2015 jun 28];10 (3):257-265. Disponível em: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v10n3/art3.pdf>
3. Morera P. Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chil Parasit. 1970; 25: 1.
4. Morera P, Ash LR. Investigación del huésped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). Bol Chil Parasitol. 1970; 25: 135.
5. Morera P, Céspedes R. *A. costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. Rev Biol Trop [Internet]. 1971 [acesso em 2014 out 24];18 (1- 2):173-185. Disponível em: <http://www.ots.ac.cr/rbt/attachments/volumes/vol18-1/15-Morera-Angiostrongylus.pdf>
6. Zillio Jr A, Kunzle JE, Rus Fernandes LA, Prates-Campos JC, Britto-Costa R. Angiostrongilíase: apresentação de um provável caso. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1975; 17: 312-318.
7. Barbosa H, Raick AN, Magalhães AV, Otero PMF. Angiostrongilose abdominal. Rev Ass Med Bras. 1980; 26: 178- 180.
8. Agostini AA, Peixoto A, Caleffi AL, Dexhaimer A, Camargo RR. Angiostrongilíase abdominal: três casos observados no Rio Grande do Sul. Rev Ass Med Rio Gr Sul. 1983; 27: 200-203.
9. Ayala MAR. Angiostrongiloidíase abdominal. Seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82: 29-36.

10. Rocha A, Moscardini-Sobrinho J, Salomão EC. Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24: 265-268.
  
11. Pena MGP, Andrade FJS, Assis CS. Angiostrongylus costaricensis: First record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brasil, and a review of its geografic distribution. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 3: 369-374.
  
12. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. The American Journal Tropical Medicine Hygiene [Internet]. 1973 [acesso em 2016 mar 12];22:613-621. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4729741>
  
13. Tesh RB, Ackerman LJ, Dietz WH, Williams JA. Angiostrongylus costaricensis in Panamá. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. Amer J Trop Med Hyg. 1973; 22: 348-356.
  
14. Ubelaker JE, Hall NM. First report of Angiostrongylus costaricensis Morera & Céspedes 1971 in the United States. J Parasit. 1979; 65: 307.
  
15. Mota EM, Lenzi HL. *A. costaricensis*: complete redescription of the migratory pathways based on experimental *Sigmodon hispidus* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2005 [acesso em 2014 out 20];100(4):407-420. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v100n4/v100n4a12.pdf>
  
16. Morera P. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. Parasitol Today [Internet]. 1985 [acesso em 2015 jun 19];1:173-175. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475885901772>
  
17. Romero-Alegría A, Belhassen-García M, Velasco-Tirado V, Mingo AG, Alvela-Suárez L, Javier Pardo-Lledias *et al.* Angiostrongylus costaricensis: Systematic Review of Case Reports. Advances in Infectious Diseases. [Internet]. 2014 [acesso em 2016 mar 18];4(1):36-41. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=43443>
  
18. Spratt DM. Species of Angiostrongylus (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. Int J Parasitol Parasites Wildl [Internet]. 2015

[acesso em 2016 mai 04];4(2):178-189. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25853051>

19. Chen HT. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g.n. sp. des rats de Canton. Ann Parasitol Hum Comp. 1935;13: 312-317.
20. Ishih AI, Rodriguez BO, Sano M. Scanning electron microscopic observations of first and third stage larvae and adult of *Angiostrongylus costaricensis*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1990; 21(4): 568-572.
21. Rebello KM, Menna-Barreto RF, Chagas-Moutinho VA, Mota EM, Perales J, Neves-Ferreira AG *et al.* Morphological aspects of *A. costaricensis* by light and scanning electron microscopy. Acta Trop [Internet]. 2013 [acesso em 2015 jun 11];127(3):191-198. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685002>
22. Rodriguez R. Anatomia Patológica e da Angiostrongilose Abdominal [Tese de Mestrado]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 1997.
23. Hata H. In vitro cultivation of *Angiostrongylus costaricensis* eggs to first stage larvae in chemically defined medium. Int J Parasitol [Internet]. 1996 [acesso em 2015 jun 11]; 26(3): 281-286. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786217>
24. Mendonça CLGF. Angiostrongylus costaricensis no hospedeiro intermediário *Sarasinula marginata* (Mollusca: Soleolifera): vias de infecção, migração e eliminação larvar [Tese de Mestrado]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz;1999.
25. Abraham ES, Schulz-Key H, Ginger SM. Caracterización de antígenos de bajo peso molecular de *A. costaricensis*, reconocidos durante una infección experimental en roedores. Parasitol Latinam [Internet]. 2004 [acesso em 2015 jan 22];59:8-13. Disponível em: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-77122004000100002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122004000100002)
26. Mendonça CL, Carvalho OS, Mota EM, Lenzi HL. Development of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 (Nematoda: Angiostrongylidae) larvae in the intermediate host *Sarasinula marginata* (Semper 1885) (Mollusca: Soleolifera). Parasitol Res [Internet]. 2008

[acesso em 2015 jan 12];102 (5):861-865. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18293010>

27. Carvalho OS, Teles HMS, Mota EM, Mendonça CLGF, Lenzi HL. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* (Online) [Internet]. 2003 [acesso em 2016 jan 29];36(6):743-745. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003786822003000600017&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003786822003000600017&script=sci_arttext)
28. Banevicius NMS, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães L A, Linhares AX. Behavior of *Angiostrongylus costaricensis* in planorbids. *Braz J Biol.* [Internet]. 2006 [acesso em 2015 set 21];66(1B):199-204. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v66n1b/a03v661b.pdf>
29. Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (Online) [Internet]. 1991 [acesso em 2015 jun 19];33:373-378. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46651991000500006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46651991000500006&script=sci_arttext)
30. Malek EA. Presence of *A. costaricensis* Morera and Céspedes 1971 in Colombia. *Amer J Trop Med Hyg* [Internet]. 1981 [acesso em 2016 jan 25] 30: 81-83. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7212175>
31. Santos CP. Redescritção de *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre. *Proechimys* sp. Na Venezuela (*Metastrongyloidea Angiostrongyloidea*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1985; 80: 81-83.
32. Sly DL, Toft JD 2nd, Gardiner CH, London WT. Spontaneous occurrence of *A. costaricensis* in marmosets (*Saguinus mystax*). *Lab anim Sci* [Internet]. 1982 [acesso em 2016 jan 28];32:286-288. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6808242>
33. Monge E, Arroyo R, Solano E. A new definitive natural host of *A. costaricensis* (Morera and Céspedes 1971). *J. Parasitol.* 1978; 64(1): 34.

34. Hulbert TV, Larsen RA, Chandrasoma PT. Abdominal angiostrongyliases mimicking acute apendicitis and Meckel's diverticulum: report of a case in the United States and review. Clin Infect Dis [Internet]. 1992 [acesso em 2014 nov 13];14:836-840. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576277>
35. Liacouras, CA, Bell LM, Aljabi MC, Piccoli DA. *Angiostrongylus costaricensis* enterocolitis mimics Crohn's disease. J Pediatr Gastroent Nutr. 1993; 16: 203-207.
36. Silveira CT, Ghali VS, Rovens S, Heimann J, Gelb A. Angiostrongyliasis: a rare cause of gastrointestinal hemorrhage. Am J Gastroenterol. 1989; 84: 329-332.
37. Velasquez JZ, Ramirez-Baquedano W, Pérez Ar, Flores MB. *Angiostrongylosis costaricensis*. Primeiros casos mexicanos. Rev Invest Clin. 1974; 26: 389-394.
38. Sierra E, Morera P. Angiostrongyloses abdominal. Primer caso humano encontrado em Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). Acta med costarric.1972; 15:95-99.
39. Duarte Z, Morera P, Vuong PN. Abdominal angiostrongyliasis in Nicaragua: a clinical pathological study on a series of 12 cases reports. Ann Parasit hum comp1991: 259-262.
40. Quirós JL, Jiménez E, Bonilla R, Arce I, Hernández C, Jiménez Y. Abdominal angiostrongyliasis with involvement of liver histopathologically confirmed: a case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo (Online) [Internet]. 2011[acesso em 2014 nov 13];53(4):219-222. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v53n4/08.pdf>
41. Santos FT. Estudo da sobrevivência de camundongos infectados pelo *Angiostrongylus costaricensis*, Morera & Céspedes,1971 [resumo]. Salão de Iniciação Científica. 1994.
42. Mentz MB, Dallegrove E, Graeff-Teixeira C. Susceptibility and morbidity between male and female Swiss mice infected with *Angiostrongylus costaricensis*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo (Online). [Internet]. 2010 [acesso em 2014 nov 20]; 52: 267-268. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0036-46652010000500008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0036-46652010000500008)

43. Morera P, Bontempo I. Ação de alguns antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. Rev Méd Hosp Nac Niños Costa Rica [Internet]. 1985; 20(2):165-174. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=38057&indexSearch=ID>
44. Mentz MB, Graeff-Teixeira C, Garrido CT. Treatment with mebendazole is not associated with distal migration of adult *A. costaricensis* in the murine experimental infection. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2004; 46(2): 73-75.
45. Bohrer Mentz M, Dallegrave E, Agostini A, Graeff-Teixeira C. Phenantroline, lovastatin, and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *A. costaricensis*. Parasitol Res [Internet]. 2007 [acesso em 2015 set 21];100(2):379-382. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Phenantroline%2C+lovastatin%2C+and+mebendazole+do+not+inhibit+oviposition+in+the+murine+experimental+infection+with+A.+costaricensis>
46. Rodriguez R, Porto SM, Dos Santos Ferrari R, Marcolan AM, da Silva AC, Graeff-Teixeira C et al Outcomes in mice with abdominal angiostrongyliasis treated with enoxaparin. Parasitol Res [Internet]. 2011 [acesso 2016 jan 13]; 109(3) 787-792. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21400113>
47. Solano-Parada J, Gonzalez-Gonzalez G, Torró LM, dos Santos MF, Espino AM, Burgos M *et al*. Effectiveness of intranasal vaccination against *A. costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens. Vaccine [Internet]. 2010 [acesso em 2015 out 28];28 (32):5185-5196. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effectiveness+of+intranasal+vaccination+against+A.+costaricensis+using+a+serine%2Fthreonine+phosphatase+2+A+synthetic+peptide+and+recombinant+antigens>.
48. Mota EM. *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Metastrongylidae) no modelo *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae): redescritção da via migratória e características histopatológicas da hepatite e das fases pré-ovular e ovular da infecção [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2001.

49. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Parasit Vectors [Internet]. 2015 [acesso em 2015 nov 09];8:408. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238343>
50. Souza FPC, Vitorino RR, Costa AP, Faria Júnior FC, Santana LA, Gomes AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Rev Bras Clin Med [Internet]. 2011 [acesso em 2015 out 11]; 9 (4): 300-307. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2011/v9n4/a2190.pdf>
51. Toh SQ, Gobert GN, Malagón Martínez D, Jones MK. Haem uptake is essential for egg production in the haematophagous blood fluke of humans, *Schistosoma mansoni*. FEBS J [Internet] 2015. [acesso em 2016 mar]; 282: 3632-3646. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26153121>
52. Butterworth, J. I. Thorne. Eosinophils and parasitic diseases. In: H. Smith and R. M. Cook. Immunopharmacology of eosinophils. London: Academic Press; 1993.119-150.
53. Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. J Exp Med [Internet]. 1996 [acesso em 2015 jan 22]; 184: 1871-1878. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/184/5/1871.full.pdf>
54. Lee JJ, Lee NA. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? Clin Exp Allergy [Internet]. 2005 [acesso em 2016 jan 13]; 35: 986-994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120079>
55. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2007 [acesso em 2015 dez 06]; 119: 1303-1310. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17481712>
56. Ritter DM, Mckerrow JH. Intercellular Adhesion Molecule 1 is the Major Adhesion Molecule Expressed during Schistosome Granuloma Formation. Infect Immun [Internet]. 1996 [acesso em 2015 out 13]; 64(11): 4706-4713. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890229>

57. Wei PC, Tsai CH, Chiu PS, Lai SC. Matrix metalloproteinase-12 leads to elastin degradation in BALB/c mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Int J Parasitol* [Internet]. 2011 [acesso em 2016 jan 10];41:1175–1183. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856305>
58. Kobayashi M, Cohle SD. A case of sudden cardiac death due to eosinophilic coronary periarteritis: possible significance of coexisting atherosclerosis and eosinophilic inflammation of the esophagus. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2016 [acesso em 2015 nov 09];25:67-71. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385173>
59. Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM, Young SP, Kitas GD. Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity Rev* [Internet]. 2002 [acesso em 2015 jan 22];1: 338-347. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848989>
60. Rav-Acha M, Plot L, Peled N, Amital H. Coronary involvement in Takayasu's arteritis. *Autoimmunity Rev* [Internet];6(8): 566-571. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854750>
61. Hofmann WK, Kalina U, Koschmieder S, Seipelt G, Hoelzer D, Ottmann OG. Defective megakaryocytic development in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2000 [acesso em 2015 dez 12];38:13-19. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811444>
62. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon G, Plumb J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res*[Internet]. 1983 [acesso em 2015 de out 03];32:443-460. Disponível em: [http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848\(83\)90255-4/abstract](http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848(83)90255-4/abstract)
63. Bain BJ. *Blood Cells: A Practical Guide*. 5th edition, Chinchester; 2015.
64. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG *et al*. Overexpression of Eotaxin and the CCR3 Receptor in Human Atherosclerosis: Using Genomic Technology to Identify a Potential Novel Pathway of Vascular Inflammation. *Circulation*[Internet]. 2000. [acesso

em 2016 mar 18];102: 2185-2189. Disponível em:  
<http://circ.ahajournals.org/content/102/18/2185.full>

65. Mor A, Afek A, Entin-Meer M, Keren G, George J. Anti eotaxin-2 antibodies attenuate the initiation and progression of experimental atherosclerosis. *World Journal of Cardiovascular Diseases* [Internet]. 2013 [acesso em 2015 out 13]; 3: 339-346. Disponível em:  
<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=34775>
66. Loeffler DA, Lundy SK, Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL. Soluble Egg Antigens from *Schistosoma mansoni* Induce Angiogenesis-Related Processes by Up-Regulating Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2002 [acesso em 2015 jan 13];185(11):1650-1656. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/content/185/11/1650.full.pdf+html>
67. Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* [Internet]. 2002 [acesso em 2015 out 18];125:415-421. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458825>
68. Stanley RG, Jackson CL, Griffiths K, Doenhoff MJ. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice. *Atherosclerosis* [Internet]. 2009 [acesso em 2015 set 17];207:131-138. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464685>
69. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body Iron Stores and the Risk of Carotid Atherosclerosis. Prospective Results From the Bruneck. *Circulation* [Internet]. 1997 [acesso em 2015 out 26 de outubro];96:3300-3307. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396420>
70. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* [Internet]. 1993 [acesso em 2015 out 02];23(1): 118126. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8495863>
71. Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 [acesso em 2015 set 30];147(3): 782-789. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677189>

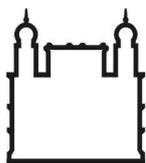
72. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K *et al.* Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* [Internet]. 2011 [acesso em 2016 mar 10];108:235-248. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252151>
73. Weber C, Erl W, Weber PC. Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1995 [acesso em 2015 out 15];206: 621-628. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X85710881>
74. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1996 [acesso em 2015 out 15];16: 831-842. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+Yin+and+Yang+of+oxidation+in+the+development+of+the+fatty+streak.+A+review+based+on+the+1994+George+Lyman+Duff+Memorial+Lecture>.
75. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*[Internet]. 2014 [acesso em 2016 mar];114:1852-1866. Disponível em: <http://circres.ahajournals.org/content/114/12/1852.abstract>
76. Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Mahoney Jr WM, Daum G. The Adventitia:A Dynamic Interface Containing Resident Progenitor Cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2011 [acesso em 2016 mar 3];31:1530-1539. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382115/>
77. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 [acesso em 2015 set 25];277:49982- 49988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376530>
78. Melián A, Geng YJ, Sukhoya GK, Libby P, Porcelli AS. CD1 Expression in Human Atherosclerosis. *Am J Pathol* [Internet]. 1999 [acesso em 2016 mar 20];155:775-786. Disponível em: [http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(10\)65176-0/pdf](http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(10)65176-0/pdf)

79. Oh YH, Seong SS, Jang KS, Chung YW, Paik CH, Park YW *et al.* Xanthogranulomatous inflammation presenting as a submucosal mass of the sigmoid colon. *Pathol Int* [Internet]. 2005 [acesso em out 01];55:440-444. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982221>
80. Krakower C, Hoffman WA, Axtmayer JH. The fate of schistosomes (*S. mansoni*) in experimental infections of normal and vitamin A deficient white rats. *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* [Internet]. 1940 [acesso em 2015 out];16 [76]. Disponível em: <file:///C:/Users/Danielle/Downloads/Experimental%20Schistosomiasis.pdf>
81. Young SW, Higashi G, Kamel R, Abdin AZ, Mikhail IA. Interaction of salmonellae and schistosomes in host-parasite relations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 979-802, 1973.
82. Muniz-Junqueira MI, Tosta CE, Prata A. Salmonelose septicêmica prolongada associada à esquistossomose: evolução do conhecimento e mecanismos imunopatogênicos. *Rev Soc Bras Med Trop*[Internet]. 2009 [acesso em 2015 mar 19];42 (4):[10]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n4/a15v42n4.pdf>
83. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. De Novo Induction of Atherosclerosis by *Chlamydia pneumoniae* in a Rabbit Model. *Infect Immun.* [Internet]. 1999 [acesso em 2015 nov 18];67:6048–6055. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96992/>
84. Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* [Internet]. 1999 [acesso em 2015 nov 02 de novembro de];100:1369-1373. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500035>
85. Vijayakumar A, Tiwari Raul, Prabhuswamy VK. Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease). *International Journal of Inflammation* [Internet]. 2013 [acesso em 2015 dez 05];1:1-9. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/iji/2013/156905/>

86. Mallawaarachchi CM, Weissberg PL, Siow RCM. Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*[Internet]. 2005 [acesso em 2016 jan 22]; 25:1383-1387. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860740>
87. Friedman M. The coronary canalized thrombus: provenance, structure, function and relationship to death due to coronary artery disease. *Br J Exp Pathol*. [Internet]. 1967[acesso em 2016 jan 10];48:556–567. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2093807/>
88. Friedman M. The coronary thrombus: its origin and fate. *Hum Pathol*[Internet]. 1971 [acesso em 10 de janeiro de 2016];2:81-128. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4255337>
89. Spring DA, Thomsen JH. Recanalization in a coronary artery thrombus: Case report with cineangiographic and hemodynamic findings. *JAMA* [Internet]. 1973 [acesso em 11 de janeiro de 2016];224:1152-1155. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4739861>
90. Ridolfi RL, Hutchins GM. The relationship between coronary artery lesions and myocardial infarcts: ulceration of atherosclerotic plaques precipitating coronary thrombosis. *Am Heart J* [Internet]. 1977 [acesso em 2016 jan];93:468-486. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002870377804109>
91. Levin DC, Fallon JT. Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: histopathologic correlations. *Circulation* [Internet]. 1982 [acesso em 2016 jan 11];66:316-320. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/66/2/316.abstract>
92. Getz GS, Reardon CA. Animal Models of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012 [acesso em 2015 out 13];32:1104-1115. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383700>
93. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* [Internet]. 1992 [acesso em 2016 mar 9];258:468-471. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1411543>

94. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell Press* [Internet]. 1992 [acesso em 2016 jan 09];71:343-353. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423598>
95. Baract D, Amadio A, Palos-Pinto A, Daret D, Benlian P, Darmon M, Bérard AM. Combined hyperlipidemia/hyperalphalipoproteinemia associated with premature spontaneous atherosclerosis in mice lacking hepatic lipase and low density lipoprotein receptor. *Atherosclerosis* [Internet]. 2006 [acesso em 2016 jan 09];188:[8]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384559>
96. Clowes AW, Reidy MA, Clowes, MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* [Internet]. 1983 [acesso em 2016 jan 15];49:208-215. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6876748>

## **ANEXO 1**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

**LW-43/13**

Certificamos que o protocolo (P-45/12-4), intitulado "Manutenção de colônia de *Sigmodon hispidus* Say & Ord para estudo da angiostrongilíase abdominal", sob a responsabilidade de MARCELO PELAJO MACHADO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/10/2017 e inclui o uso total de :

***Sigmodon hispidus***

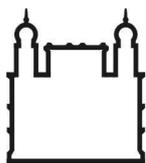
- 1940 Machos, Peso: 159,0000 Grama(s).

- 1940 Fêmeas, Peso: 159,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 7 de outubro de

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA

## **ANEXO 2**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

**LW-26/15**

Certificamos que o protocolo (P-58/13-8), intitulado "Angiostrongylus costaricensis: relação parasito-hospedeiros, estudo proteômico e morfológico.", sob a responsabilidade de MARCELO PELAJO MACHADO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 04/08/2018 e inclui o uso total de :

### *Mus musculus*

- 60 Machos de A, Idade: 3 Mes(es), Peso: 25,0000 Grama(s).
- 60 Fêmeas de A, Idade: 3 Mes(es), Peso: 30,0000 Grama(s).

### *Rattus norvegicus*

- 18 Machos de Wistar, Idade: 3 Mes(es), Peso: 500,0000 Grama(s).
- 18 Fêmeas de Wistar, Idade: 3 Mes(es), Peso: 300,0000 Grama(s).

### *Sigmodon hispidus*

- 480 Machos, Peso: 130,0000 Grama(s).
- 480 Fêmeas, Peso: 110,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 4 de agosto de

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA

## **ANEXO 3**



# Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to**

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

**Manuscript ID**

MIOC-2016-0124

**Title**

Characterization of the vascular pathology developed by *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) upon experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Metastrongylidae)

**Authors**

Vasconcelos, Danielle Ingrid

Mota, Ester

Pelajo Machado, Marcelo

**Date Submitted**

26-Mar-2016

[Author Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

## **ANEXO 4**



**Characterization of the vascular pathology developed by  
*Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) upon  
experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*  
(Nematoda: Metastrongylidae)**

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Vasconcelos, Danielle Ingrid; Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Laboratory of Pathology Mota, Ester; Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Laboratory of Pathology Pelajo Machado, Marcelo; Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Laboratory of Pathology
Keyword:	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>, abdominal angiostrongyliasis, Sigmodontinae, vasculitis, atherosclerosis
Theme:	Helminthiasis, Parasitology, Pathology