

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BÁRBARA RODRIGUES ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS DE
CAMUNDONGOS FIXADOS EM FORMALINA E EMBEBIDOS EM
PARAFINA (FFPE) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM**
Angiostrongylus costaricensis

PORTO ALEGRE

2013

BÁRBARA RODRIGUES ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS DE
CAMUNDONGOS FIXADOS EM FORMALINA E EMBEBIDOS EM
PARAFINA (FFPE) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*Angiostrongylus costaricensis***

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção
do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: DR. CARLOS GRAEFF TEIXEIRA

PORTO ALEGRE

2013

RESUMO

Angiostrongilíase abdominal é uma infecção zoonótica causada por *Angiostrongylus costaricensis*, um nematódeo com localização intravascular no mesentério. O homem se infecta acidentalmente ao ingerir alimentos ou água contaminados com larvas de terceiro estágio presentes no muco secretado por moluscos terrestres, hospedeiros intermediários. O diagnóstico confirmado da infecção humana é feito pelo exame histopatológico de biópsias ou segmentos ressecados durante o tratamento cirúrgico de casos complicados. Há muitos casos em que a histopatologia é muito sugestiva, porém sem evidenciarem-se estruturas do parasito nos cortes. Desse modo, o objetivo foi padronizar a extração de DNA em tecidos embebidos em parafina em modelo murino visando à detecção de ácidos nucleicos e posterior utilização no estudo de casos suspeitos a partir do exame histopatológico em humanos. **Materiais e Métodos:** 45 amostras de cada tecido de fígado, pulmão, mesentério e intestino, totalizando 180 amostras de 15 camundongos infectados com *Angiostrongylus costaricensis*; e vermes de *Angiostrongylus cantonensis* foram embebidos separadamente em parafina e nesses blocos contendo os tecidos foram realizados cortes histológicos de 3 µm para coloração por Hematoxilina-Eosina, e confirmado a presença de estruturas parasitárias, foram coletados de 24 a 31 cortes de 10 µm em um microtubo para a extração de DNA. Para a padronização do método, vermes foram embebidos em parafina em diferentes condições tais como o tipo de fixador, tempo de fixação e marcas comerciais de parafina. A partir dos cortes foram realizadas as extrações de DNA com o Kit Quiagen DNEasy tissue. Para a detecção de DNA específico de *Angiostrongylus* foi utilizado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação de uma sequência de 232pb, previamente desenhada para ensaios de detecção em soro humano. Em 33 amostras de fígado, 12 de pulmão, 45 de mesentério e 36 da parede intestinal houve amplificação do segmento de 232pb. Para as diferentes condições de embocamento, as amplificações do DNA das amostras a partir do fixador formalina tamponada foram mais frequentes quando comparado com a formalina não tamponada; o tempo de fixação e o tipo de parafina não interferiram na detecção de ácidos nucleicos, entretanto, a quantidade de parafina no tecido parece influenciar no desempenho do método, pois nas amostras onde havia excesso de parafina não houve amplificação. O segmento de 232pb também não foi visualizado nas amostras onde não foi evidenciada a presença de estruturas parasitárias, sugerindo que a informação provinda da histopatologia deve orientar a retirada da amostra para extração de DNA, como aquelas de maior probabilidade de possuir estruturas parasitárias nas proximidades da lesão, mesmo que degradadas. A descrição do desempenho da PCR como recurso diagnóstico da infecção humana, em material embebido em parafina, depende da avaliação detalhada dos critérios de suspeita na histopatologia correlacionada com a frequência e reprodutibilidade do resultado da extração de DNA e sua amplificação.

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis*. Angiostrongilíase abdominal. PCR. Tecido embebido em parafina.

ABSTRACT

Abdominal angiostrongyliasis is a zoonotic infection caused by *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with intravascular location in the mesentery. Humans become accidentally infected by ingesting food or water contaminated with third stage larvae present in mucus secreted by intermediate hosts, terrestrial mollusks. The confirmed diagnosis of human infection is made only through histopathology of biopsies or mesenteric tissues removed during surgical treatment. There are many cases in which the pathology is very suggestive however there is no evidence of parasite structures in the sections. Thus, the goal of this study was to standardize the extraction of DNA from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues from mice experimentally infected with *Angiostrongylus costaricensis* for DNA detection and future study of human angiostrongyliasis suspected cases. Materials and methods: 45 samples of each tissue of liver, lung, intestine and mesentery, totalizing 180 samples from 15 infected mice with *A.costaricensis*. Worms of *Angiostrongylus cantonensis* were separately embedded in paraffin as controls. From embedded tissues, histological sections of 3 µm were performed and stained with HE to confirm the presence of parasite structures under the microscope. Approximately 24 to 31 sections of 10 µm were used for DNA extraction. Worms were embedded in paraffin under different conditions such as fixative chemicals, time of fixation and types of paraffin. Specific DNA of *Angiostrongylus* was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify a sequence of 232bp, previously designed for detection in human serum assays. There was a positive amplification in 33 samples from liver, 12 from lung, 45 from mesentery and 36 from intestine wall. For different conditions of embedment, the amplification of the DNA with the buffered formalin fixative was more efficient compared to the unbuffered one; the time of fixation and the commercial brand of wax did not affect the detection of nucleic acids, however, the ratio of paraffin to tissue appears to influence the performance of the method since samples with residual paraffin no amplification was obtained. The 232bp segment also was not visualized in samples where there was no evidence of presence of parasite structures, suggesting that histopathology findings should guide the choice of the samples for DNA extraction, and those most likely to have parasite structures surrounding the lesion, even if degraded. The description of the performance of PCR in paraffin embedded tissues as a diagnostic tool in human abdominal angiostrongyliasis depends on the detailed evaluation criteria in histopathology and their association with a positive amplification of the specific probe.

Keywords: *Angiostrongylus costaricensis*. Abdominal angiostrongyliasis. PCR. Tissue embedded in paraffin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Revisão Bibliográfica.....	6
1.1.1 Parasito.....	6
1.1.1.1 Classificação.....	6
1.1.1.2 Ciclo Evolutivo do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	7
1.1.1.3 Patologia no Hospedeiro Acidental.....	10
1.1.1.4 Prevenção.....	13
1.1.2 Métodos utilizados no diagnóstico.....	13
1.1.3 O uso da PCR em tecido emblocado em parafina.....	15
1.1.4 Fixadores.....	16
1.2 Justificativa.....	18
1.3 Objetivos.....	19
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Angiostrongylus costaricensis (MORERA & CÉSPEDES, 1971), é um nematódeo que vive nas arteríolas mesentéricas da região íleo-cecal de roedores silvestres, tais como: *Sigmodon hispidus*, na América Central, *Oligoryzomys ratticeps* e *Oligoryzomys nigripes*, no sul do Brasil (MORERA, 1970; TESH et al., 1973; MONGE; ARROYO & SOLANO, 1978; SANTOS, 1985; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1990). Os hospedeiros intermediários são moluscos terrestres, principalmente da família Veronicellidae, popularmente conhecidos como lesmas (MORERA & ASH, 1970; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1993; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1994).

O homem infecta-se, acidentalmente, pela ingestão de alimento contaminado com o muco das lesmas, contendo as larvas infectantes, de terceiro estágio, ou mesmo ingerindo as lesmas contaminadas (MORERA, 1986). A distribuição geográfica da parasitose inclui os países das Américas, do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e o estado do Rio Grande do Sul (UBELAKER & HALL, 1979; MORERA; ANDREWS & RUEDA, 1988; DEMO & PESSAT 1986; AGOSTINI et al., 1984). O Rio Grande do Sul é o estado do Brasil que apresenta o maior número de ocorrências, principalmente na sua metade norte, onde foram registrados e diagnosticados o maior número de casos (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b).

Os casos costumam ocorrer no final da primavera, verão e início do inverno, mostrando uma aparente sazonalidade (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b). As baixas temperaturas possivelmente inibam a evolução das larvas nos moluscos (ISHII, 1984) e, por outro lado, o calor e a umidade na primavera e verão coincidem com a reprodução e maior atividade das lesmas. A sazonalidade de transmissão do *A. costaricensis* no Rio Grande do Sul talvez se deva a estes aspectos ecológicos e da relação parasito-hospedeiro intermediário (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b).

No homem, o parasito causa uma doença abdominal de variada gravidade que compromete a região da válvula íleo-cecal, apêndice (CÉSPEDES et al., 1967; LORIAN-CORTES & LOBO-SANAHUJA, 1980) e intestino delgado (GRAEFF-TEIXEIRA, 1986). A administração de drogas anti-helmínticas deve ser evitada, pois podem induzir migração

errática dos vermes e agravamento das lesões. Estudos em roedores indicam que isto pode ocorrer quando se emprega Tiabendazol, Levamisol e Dietilcarbamazina (MORERA & BONTEMPO, 1985). Entretanto, recentes estudos utilizando Lovastatina, Fenantrolina e Mebendazole em roedores, não confirmaram a migração errática ou o agravamento das lesões nos modelos experimentais (MENTZ; AGOSTINI & GRAEFF-TEIXEIRA, 2007). De qualquer forma, a contradição de diferentes resultados dos estudos de infecção experimental não permite modificar a recomendação de evitar o uso de antihelmínticos na angiostrongilíase abdominal (AA).

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Parasito

1.1.1.1 Classificação

Várias classificações têm sido propostas por diversos autores. Abaixo é apresentada a sistemática, proposta por Morera (1973).

Sub-reino: Metazoa

Filo: Nematelminthes

Classe: Nematoda

Ordem: Metastrongylida

Superfamília: Metastrongyloidea

Família: Angiostrongylidae

Subfamília: Angiostrongylinae

Gênero: *Angiostrongylus*

Espécie: *Angiostrongylus costaricensis*

1.1.1.2 Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis*

Todos os parasitos da subfamília Angiostrongylinae têm um ciclo evolutivo indireto obrigatório e utilizam moluscos como hospedeiros intermediários. Apesar de muitas espécies do gênero *Angiostrongylus* terem sido descritas, somente duas espécies – *A. cantonensis* (CHEN, 1935) e *A. costaricensis* (MORERA & CÉSPEDES, 1971), são parasitos importantes de seres humanos, sendo geralmente transmitidas por interações inusitadas molusco-homem (STEWART; UBELAKER & CURTIS, 1985; BHAIBULAYA, 1991).

A Figura 1 mostra, esquematicamente, o ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis*, tema deste trabalho.

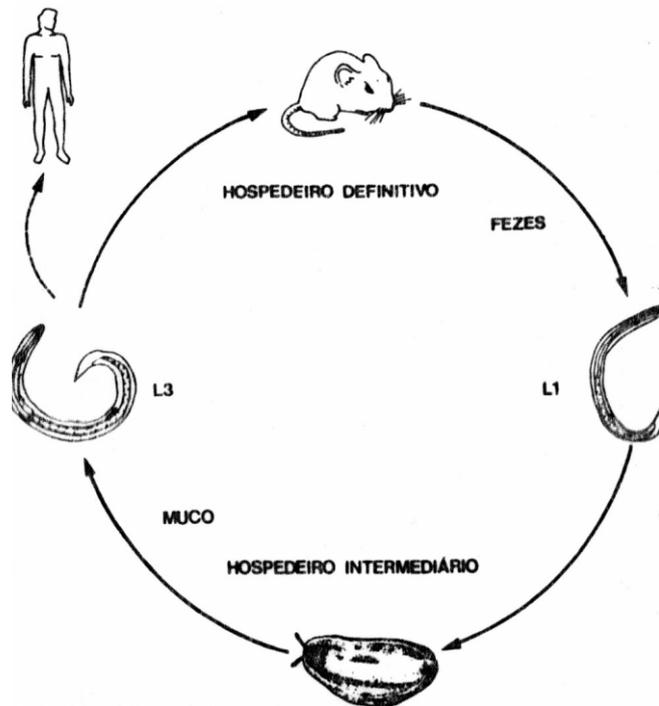


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis* (REY, 2001).

Na espécie *A. costaricensis* os hospedeiros intermediários são, em sua maioria, moluscos terrestres da família Veronicellidae como a *Sarasinula plebeia* ocorrente na Costa Rica (MORERA & ASH, 1970), Equador (MORERA et al., 1983), Honduras (KAMINSKY; ANDREWS & MORERA, 1987; MORERA; ANDREWS & RUEDA, 1988) e Nicarágua (DUARTE et al., 1992). *Phyllocaulis variegatus* é outra espécie bem adaptada e encontrada no Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (MORERA, 1987) e também no Brasil (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989; RAMBO; AGOSTINI & GRAEFF-TEIXEIRA, 1997).

Outras espécies de moluscos, testadas experimentalmente, como *Phyllocaulis soleiformes*, *P. boraceiensis* e *Sarasinula marginata*, bem como os planorbídeos transmissores da esquistossomose, *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, mostraram-se susceptíveis à infecção pelo *A. costaricensis* (LIMA et al., 1992). Esses achados com relação à susceptibilidade, principalmente da espécie *B. glabrata*, corroboram com outros autores como Ubelaker; Bullick & Caruso (1980), demonstrando que este planorbídeo pode ser utilizado para a manutenção do ciclo do referido parasito em laboratório. Maurer et al. (2002), realizando um inquérito epidemiológico na região oeste do Estado de Santa Catarina, Brasil, registraram, pela primeira vez, moluscos da espécie *Deroceras laeve* naturalmente parasitados com larvas do

metastrongilídeo, uma lesma de diminutas dimensões e que frequentemente é encontrada entre as dobras de folhas de verdura, representando um risco da ingestão acidental e estabelecimento da angiostrongilíase no homem.

Morera (1971) publicou a primeira descrição do ciclo de vida do *A. costaricensis* indicando dois principais hospedeiros definitivos naturais, *Sigmodon hispidus* e *Rattus rattus* e um hospedeiro intermediário, *Sarasinula plebeia*. Nos roedores silvestres, os parasitos adultos localizam-se predominantemente nos ramos da artéria mesentérica da região íleo-cecal. Os ovos são carreados pela corrente sangüínea até os tecidos da parede intestinal, desde a serosa à mucosa. Nestes locais, os ovos embrionam e formam larvas de primeiro estágio (L1), que atravessam a parede intestinal e caem na luz do órgão, para depois serem expelidas ao exterior com as fezes. Morera (1987) também verificou que, em condições naturais, os roedores infectam-se, por via oral, pela ingestão de moluscos infectados com a L3 ou de algo previamente contaminado com o muco, completando assim, o ciclo desta parasitose. Em roedores herbívoros, a infecção ocorre provavelmente pela ingestão de vegetais contaminados pelo muco dos moluscos contendo as formas infectantes (TESH et al., 1973; MORERA, 1986). Ubelaker; Caruso & Peña (1981) e Morera (1986) testaram, ainda, a eficiência de outras vias de infecção como intraperitoneal, subcutânea, pele lesada e pele íntegra, confirmando a via oral como sendo a única na manutenção do ciclo natural em roedores.

Mota & Lenzi (1995) propuseram um ciclo que difere do anterior pela existência de uma via pulmonar para a passagem da circulação linfática venosa para o sistema arterial e de uma via venosa portal, baseados em estudos da infecção experimental em camundongos e *Sigmodon hispidus*. Desse modo, as L3, através da mucosa intestinal, atingem os vasos linfáticos do córion ou vasos venosos da submucosa e mudam para L4 nos linfonodos mesentéricos. Pelos vasos aferentes dos linfonodos, as larvas chegam ao ducto torácico e deste, ao sistema venoso, coração direito e circulação pulmonar. Retornam ao coração esquerdo, de onde são levados pelo sistema arterial a vários órgãos, (cérebro, rins, ovários, baço e estômago). Os vermes fazem a maturação nas artérias mesentéricas pancreáticas e íleo-cecólicas. Aproximadamente após 14 dias, é possível encontrar ovos embrionados nos ramos da artéria mesentérica. As L1 foram observadas a partir do 22º dia após a infecção.

Pela via venosa-portal, as larvas que penetraram nas veias da submucosa intestinal, chegam à veia porta, quando sofrem a terceira e a quarta muda. As formas adultas, desenvolvidas no sistema venoso hepático, depositam ovos que podem ficar retidos nos tecidos do fígado ou causar embolia pulmonar.

Para o hospedeiro acidental, o homem, a infecção por água ou alimentos (frutas ou verduras), das mãos ou manipulação de instrumentos contendo a secreção de moluscos infectados, possibilita a ingestão das L3, que penetram a parede do íleo terminal, migram pelos linfáticos mesentéricos e evoluem para o quarto, e posteriormente, quinto estágio. Após uma semana, aproximadamente, os vermes adultos jovens retornam ao intestino, se alojam nas artérias mesentéricas e, após quatro semanas, adquirem a maturidade sexual. A fêmea inicia a oviposição e os ovos são levados pela corrente sanguínea arterial até a parede intestinal, esta última etapa do ciclo não se completa, devido à intensa reação inflamatória que retém os ovos no tecido (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991a). Não existe até o momento, relato da presença de ovos ou larvas desse nematódeo no exame parasitológico de fezes (MOJON, 1994; PENA; ANDRADE FILHO & ASSIS, 1995).

1.1.1.3 Patologia no Hospedeiro Acidental

A doença foi inicialmente descrita na Costa Rica, como “granuloma parasitário intestinal” por Céspedes et al. (1967), sendo o grupo composto por 31 casos. Nesses pacientes, os autores destacaram a dor abdominal como eixo clínico principal da doença, que variava de leve a acentuada, podendo evoluir para um quadro de abdômen agudo, obrigando à cirurgia de urgência. Entretanto, a dor, na maioria dos casos era leve, mas recorrente, durante semanas ou meses, mesmo com os diferentes tipos de tratamentos sintomáticos.

Graeff-Teixeira (1986) também salientou a presença de episódios recorrentes de dor abdominal, possivelmente como forma comum de apresentação da doença. Na maior parte das vezes, a dor era difusa, podendo localizar-se posteriormente no quadrante inferior direito, flanco direito, hipocôndrio direito, epigástrico ou mesogástrico. Havia, ainda, outros sintomas que acompanhavam a dor, isolada ou conjuntamente, como a febre, náuseas, vômitos, anorexia, alteração do hábito intestinal (diarréia ou constipação), urticária e perda de peso (CÉSPEDES et al., 1967; MORERA & CÉSPEDES, 1971; DEMO & PESSAT, 1986; GRAEFF-TEIXEIRA;

CAMILO-COURA & LENZI, 1987; LOBO-SANAHUJA; LORIA-CORTES & GONZALES, 1987; LUZZI & NEWMANN, 1989; FAUZA; MAKSOUD FILHO & EL IBRAHIM, 1990; GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b).

Os sinais clínicos relatados foram distensão abdominal, palpação dolorosa do abdômen com resistência muscular ou irritação peritonial, toque retal doloroso e rigidez abdominal (MORERA & CÉSPEDES, 1971; SIERRA & MORERA, 1972; VELÁSQUEZ et al., 1974; LORIA-CORTEZ & LOBO-SANAHUJA, 1980; MAGALHÃES et al., 1982; MORERA, 1985; LOBO-SANAHUJA; LORIA-CORTES & GONZALES, 1987; GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b). A presença de massa tumoral palpável, localizada preferencialmente no quadrante inferior direito ou mesogástrico, tornava-se um dado extremamente importante no diagnóstico. A massa poderia apresentar-se volumosa, dolorida e palpável ao toque retal, confundindo-se com plastrão apendicular ou com tumor maligno (CÉSPEDES et al., 1967; MORERA & CÉSPEDES, 1971; VELÁSQUEZ et al., 1974; NUNEZ & MIRAMBELL, 1981; MAGALHÃES et al., 1982; MORERA, 1985; AYALA, 1987; GRAEFF-TEIXEIRA, CAMILO-COURA & LENZI, 1987; LIACOURAS et al., 1993). Lobo-Sanahuja; Loria-Cortes & Gonzalez, (1987) constataram a presença de massa palpável, em 50% de um grupo de 194 pacientes infantis estudados no Hospital Nacional de Niños da Costa Rica. Morera, Andrews & Rueda (1988) relataram a presença de aproximadamente 300 novos casos diagnosticados anualmente, na Costa Rica, o que daria uma incidência média de 12 casos por 100 mil habitantes/ano, alertando que, nesse país, a doença poderia ser considerada um problema de saúde pública.

No exame radiológico, observaram-se dificuldade de enchimento intestinal, espasticidade, irritabilidade, distensão de alças do intestino delgado, com níveis hidroaéreos e espessamento da parede intestinal. O lúmen do íleo terminal e o do ceco estavam reduzidos, velamento do quadrante inferior direito e pneumoperitônio, nos casos de perfuração (MORERA & CÉSPEDES, 1971; MORERA, 1973; VELÁSQUEZ et al., 1974; BARBOSA et al., 1980; LORIA-CORTEZ & LOBO-SANAHUJA, 1980; NUNEZ & MIRAMBELL, 1981; MAGALHÃES et al., 1982; AGOSTINI et al., 1983; MORERA, 1985; AYALA, 1987; LOBO-SANAHUJA; LORIA-CORTES & GONZALEZ, 1987; FAUZA; MAKSOUD FILHO & EL IBRAHIM, 1990; GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991b).

Os dados hematológicos evidenciaram a presença de leucocitose, com índices que variavam de 10.000 a 52.000 mm³ e eosinofilia de 11% a 81% (CÉSPEDES et al., 1967; LORIA-CORTEZ & LOBO-SANAHUJA, 1980; MORERA; ANDREWS & RUEDA, 1988).

Agostini et al. (1984) salientaram, em um estudo anatomopatológico de 4 casos, o aspecto segmentar das lesões, denominando a infiltração arterial por eosinófilos, de arterite eosinofílica. Afirmaram, ainda, que o aspecto granulomatoso encontrado em cortes transversais, originava-se da hipertrofia das células musculares lisas das artérias, somada à hiperplasia endotelial, com ou sem infiltrado eosinofílico. Os granulomas tuberculóides característicos foram observados apenas na luz arteriolar, destacando a arterite eosinofílica e os granulomas intravasculares, como alterações morfológicas peculiares desta parasitose.

Graeff-Teixeira (1986) observou, em segmentos do intestino delgado, espessamento da parede, por vezes, formando lesão nodular. Classificou as lesões macroscópicas em dois padrões: isquêmico-congestivo e hipertrófico-pseudotumoral. Ao exame microscópico, verificou vasculites eosinofílicas, infiltrado eosinofílico intenso e granulomas.

Mentz et al. (1993) relataram um caso de angiostrongilíase que inicialmente apresentou um quadro clínico sugestivo de comprometimento hepático. O diagnóstico anatomopatológico foi realizado pelas lesões anatômicas habituais da doença e o achado de ovos do parasito na parede intestinal mostrou tratar-se de AA.

Rodriguez (1997) estudou 22 casos da doença em seres humanos com o objetivo de descrever aspectos macro e microscópicos que identificassem aspectos morfológicos próprios dessa parasitose. Na análise macroscópica, encontrou lesões com aspecto de infarto-enteromesentérico, espessamento difuso da parede intestinal e formação de nódulos em cecocolon. As áreas necróticas da parede eram murais ou trans murais e foram responsáveis por perfuração, principalmente em crianças, em 7 casos. A presença de hemorragia na luz intestinal foi encontrada em 2 casos. Na análise microscópica, identificaram-se vermes adultos, ovos ou larvas, que permitiram confirmar o diagnóstico. Destacaram-se ainda a arterite eosinofílica, o infiltrado eosinofílico acentuado, granulomas perivasculares e intravasculares. Concluiu que a arterite eosinofílica, associada ao infiltrado eosinofílico ou aos granulomas vasculares, indicaria o diagnóstico dessa parasitose.

O tratamento da doença, nos casos de abdômen agudo ou obstrutivo, é cirúrgico, ressecando-se o segmento abdominal ou o apêndice cecal, seguido de reconstituição do trânsito intestinal (LOBO-SANAHUJA; LORIA-CORTES & GONZALEZ, 1987; HIRSCHFELD, 1993).

1.1.1.4 Prevenção

As medidas profiláticas, por sua vez, assumem uma grande importância, pois o homem pode adquirir a infecção pela ingestão de frutas e verduras contaminadas e também porque trata-se de uma infecção sem tratamento medicamentoso eficaz (MENTZ, M. B.; AGOSTINI, A. A. & GRAEFF-TEIXEIRA, 2007). Demo & Pessat (1986) sugeriram cuidados como o de lavar cuidadosamente as verduras e as mãos após trabalhos de jardinagem, bem como o de abster-se de manipular e/ou consumir moluscos. Morera (1986) propôs o resfriamento de verduras como medida profilática. No entanto, Richinitti, Fonseca & Graeff-Teixeira (1999) incubando L3 do nematódeo em água, em temperatura ambiente, observaram a motilidade por até 17 dias, demonstrando que apesar da diminuição da atividade ao terceiro dia, algumas permaneceram viáveis até o final do experimento. Através de um modelo matemático, os autores concluíram que o tempo necessário para reduzir a probabilidade da infecção seria de 80 dias, inviabilizando a proposta de refrigeração de vegetais consumidos, como forma de profilaxia.

Zanini & Graeff-Teixeira (1995) incubaram larvas infectantes a 5 °C por 12 horas em hipoclorito de sódio 1,5%, solução saturada de cloreto de sódio e vinagre. Obtiveram uma viabilidade de 0%, 1,8% e 2,4%, respectivamente, mostrando que essas substâncias podem ser úteis na descontaminação de alimentos com vistas à profilaxia da AA.

1.1.2 Métodos utilizados no diagnóstico

Na Costa Rica, é utilizado teste de aglutinação de partículas de látex recobertas com antígenos totais de vermes adultos, para diagnóstico da infecção, porém sem uma padronização

e avaliação de desempenho (LOBO-SANAHUJA; LORIA-CORTES & GONZALEZ, 1987; MORERA, ANDREWS & RUEDA, 1988; SCHERER et al, 1976).

Sauerbrey (1977) padronizou um teste de precipitação com gel de dupla difusão, utilizando como antígeno, fêmeas de *A. costaricensis*. No entanto, o teste apresentou reação cruzada quando testado para outras parasitoses.

Graeff-Teixeira et al. (1997) padronizaram ELISA para detecção de IgG, utilizando antígenos totais de fêmeas do parasito. O teste apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 83%, documentando reatividade cruzada com outros nematódeos. Inquéritos soros-epidemiológicos em populações de zona endêmica detectaram a presença de anticorpos denotando infecção, 30% em zona urbana e 60% em zona rural.

Geiger et al. (2001) mostraram que a titulação de anticorpos por ELISA é um método útil para o diagnóstico da fase aguda da AA, utilizando soros de pacientes com diagnóstico histopatológico entre 1 e 15 meses após o tratamento cirúrgico. Obtiveram uma especificidade e sensibilidade de 76,2% e 91,15%, respectivamente.

Silva, Graeff-Teixeira & Zaha, (2003) propuseram a detecção de ácidos nucleicos em soro de pacientes infectados utilizando a técnica de PCR, para amplificar uma seqüência de 232pb, desenhada a partir de seqüência genômica da outra espécie importante na patologia humana, *A. cantonensis*, (GenBank U17585). A detecção de DNA pela PCR no soro em humanos foi possível até a terceira semana pós-infecção, negatizando a partir deste momento (Silva, Graeff-Teixeira & Zaha, 2003).

Bender et al. (2003) empregaram o método de imunofluorescência indireta e observaram maior intensidade na superfície dos ovos inteiros e nos fragmentos de L1, utilizando soros humanos de fase aguda, sugerindo o tubo reprodutor como importante fonte de antígenos para diagnóstico, porém sem padronizar nenhum teste. Posteriormente os ovos foram utilizados como antígeno (Abrahams et al, 2005; Abrahams et al., 2011).

Estes estudos sugerem que os testes sorológicos desenvolvidos até hoje necessitam de padronização e análise com relação a especificidade e sensibilidade, pois o único diagnóstico confirmatório da AA até o momento é pelo exame anatomopatológico de peças cirúrgicas ou de biópsias (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991).

1.1.3 O uso da PCR em Tecido Embebido em Parafina

Muitos autores têm proposto o diagnóstico molecular em tecido embocado em parafina. Nos últimos anos ficou evidente que DNA extraído de tecido parafinado fixado em formalina pode ser utilizado para diagnóstico pela PCR, e existem vários estudos baseado em análises de sequências genômicas ou mitocondriais utilizando tecidos estocados em blocos de parafina (WILKINSON & HENDRICKS, 1995; REN et al., 2000; RUDZKI; ZAZULA & STACHURA, 2001; ROURA et al., 1999).

Os avanços tecnológicos e metodológicos permitiram a utilização de blocos de parafina na área de biologia molecular. A evolução do diagnóstico molecular faz com que esse tipo de material que inicialmente era apenas fonte de estudos histomorfológicos seja requisitado como fonte de estudos moleculares. A obtenção de macromoléculas de amostras biológicas incluídas em parafina possibilita estudos de genes terapêuticos e estudos retrospectivos de inúmeras doenças. A partir dos testes de patologia molecular, valiosas informações clínicas são adquiridas (SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E., 2011)

A PCR permite uma amplificação rápida e específica de sequência de ácidos nucleicos de uma variedade de materiais, incluindo sangue, cabelo e tecidos frescos ou congelados (INNIS et al, 1990).

Vários autores relatam a técnica em seus estudos, como a amplificação de DNA a partir de placenta de roedores infectados com *Trypanosoma cruzi* com o objetivo de comparar com os métodos convencionais (ALARCÓN et al., 2009). Outro estudo também comparou o método molecular com outro, para a pesquisa do parasito *Neospora caninum* em tecido cerebral de fetos bovinos previamente fixados em formalina e embebidos em parafina (SÁNCHEZ et al., 2009). Também há relatos de diferentes métodos de extração a partir de fígado e coração fixados em formalina e embebidos em parafina (FARRUGIA; KEYSER & LUDES, 2009).

Tecidos como fígado e pulmão de pacientes com AIDS que faleceram de tuberculose, foram fixados em diferentes fixadores e embebidos em parafina a fim de avaliar a aplicação do método molecular da PCR para o diagnóstico da tuberculose (BARCELOS; FRANCO & LEÃO, 2008). Outro estudo também avaliou a aplicabilidade de uma PCR para diagnóstico do protozoário *Leishmania ssp* em espécimes de biópsias da pele de cães, fixados em formalina e

embebidos em parafina (MÜLLER et al, 2003). A mesma aplicabilidade para a bactéria *Helicobacter pylori* foi testada em amostras de fígado fixadas em formalina e embebidas em parafina de pacientes com diversas doenças hepato-biliares (PIROUZ et al., 2009). Para verificar se a metodologia poderia ser útil em estudos sobre a epidemiologia de fasciolose, permitindo o uso de material de coleções histológicas, foi testada a PCR-multiplex na amplificação de DNA do parasito *Fasciola hepatica* em *Lymnaea viatrix* infectadas. Segundo os autores, a técnica mostrou-se rápida, específica e sensível, pois foi capaz de detectar DNA de tecidos embebidos em parafina apesar da pouca quantidade de DNA, da sua degradação causada pelo processo de fixação e ainda, específica, pois não houve amplificação de outros trematódeos testados. Além disso, *F. hepatica* não foi identificada nas secções histológicas de *L. viatrix* depois de 15 dias de infecção, enquanto que com a PCR-multiplex foi possível identificar (MAGALHÃES et al., 2008).

Um estudo para estabelecer um novo protocolo da PCR para a detecção e distinção dos parasitos *Echinococcus granulosus* e *E. multilocularis* foi realizado em tecidos de pacientes fixados em formalina e embebidos em parafina, confirmados histologicamente para esta parasitose (SCHNEIDER et al., 2008).

Uma PCR para detectar DNA de larvas do parasito *Ascaris* em fígados suínos fixados em formalina e embebidos em parafina foi desenvolvida para a possível identificação das espécies já que é difícil a identificação da espécie apenas pela observação morfológica típica nas secções (ISHIWATA et al., 2004).

Apesar de amplamente empregada, a PCR deve sempre passar por padronização prévia para adequação às condições de amplificação de dado material. Em tecidos embebidos em parafina, deve ser dada atenção especial aos fatores endógenos e exógenos à reação, desde os métodos de fixação, os quais podem afetar a integridade do tecido, método de extração e o tempo de vida útil do bloco de parafina (AN & FLEMING, 1991).

1.1.4 Fixadores

A expansão da utilização da PCR para análise de diagnósticos em blocos de parafina aumentou a necessidade de se conhecer os fixadores que mantêm a integridade e preservação do DNA e RNA (FLORELL et al., 2001). Diferentes técnicas de fixação e fixadores vêm sendo desenvolvidos e testados para produtos da PCR de até 500 pb, onde obtêm-se amplificação de DNA a partir do fixador formalina (YAGI et al., 1996; NOGUCHI et al., 1997). Outros fixadores como o glutaraldeído, metanol, etanol e acetona também preservam a integridade do DNA (SRINIVASAN; SEDMAK & JEWELL, 2002).

Recentemente, um novo método de fixação de tecido, o Sistema de Tecido PAXgene® (PAXgene) foi desenvolvido pela PreAnalytiX GmbH (Hombrechtikon, Suíça). O sistema consiste de dois reagentes de fixadores de ligação não cruzada com estabilizador de reagentes, onde as amostras de tecido fixadas e estabilizadas com PAXgene podem ser utilizadas com colorações histológicas convencionais, tais como hematoxilina-eosina (H & E) ou imunohistoquímica (Kap et al., 2011). Outros estudos têm mostrado que o PAXgene preserva RNA, miRNA e DNA (Viertler et al., 2012) em amostras clínicas.

A eficiência da fixação depende do coeficiente de difusibilidade do fixador e da taxa em que reage com o tecido. Em geral, quanto maior o coeficiente de fixação, melhor é o fixador. O coeficiente de difusibilidade em 1 hora é a distância em milímetro que o fixador difunde no tecido e é inversamente proporcional à raiz quadrada do tempo (START et al., 1992).

A velocidade de fixação depende da taxa de difusão do fixador no tecido e das reações químicas entre vários componentes (START et al., 1992). Na prática, assume-se que esses processos exigem pelo menos uma hora por mm de espessura do tecido, mas normalmente os tecidos são fixados de 24 a 48 horas. Embora o intervalo de tempo de fixação relativamente amplo, parece não ter efeito sobre a histopatologia, esse longo tempo de fixação afeta negativamente a qualidade do DNA do tecido (FOSS et al., 1994). O tamanho médio de DNA extraído de tecidos fixados em formalina tamponada diminui com o aumento do tempo de fixação. A extração de DNA em tecidos fixados em formalina tamponada por 3 a 6 horas têm maior rendimento na recuperação de DNA de maior peso molecular (DOUGLAS & ROGERS, 1998).

Tecidos obtidos para o diagnóstico de pacientes são rotineiramente armazenados em arquivos de patologia. Os blocos de parafina armazenados constituem um valioso recurso que permite aos investigadores aplicar a tecnologia moderna para verificar hipóteses plausíveis em diversas populações o que não seria possíveis com tecidos frescos ou congelados. No entanto, existem poucos estudos abordando as preocupações relativas ao controle de qualidade e as

práticas específicas de garantia de qualidade para o armazenamento adequado dos blocos de parafina (SRINIVASAN; SEDMAK & JEWELL, 2002). Contudo, não se sabe se o armazenamento de blocos de parafina e / ou seções histológicas sob diferentes condições de temperatura poderia impedir a degradação de ácidos nucleicos.

1.2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico para a AA no homem pelo exame parasitológico de fezes não é possível, pois ocorre retenção da maior parte dos ovos na parede intestinal devido a uma intensa reação inflamatória, não havendo a presença de ovos ou larvas desse nematódeo nas fezes. Os vários métodos imunológicos podem apresentar reatividade cruzada com outras infecções, não sendo nem um método definitivo isoladamente, nem um método confirmatório. Já a detecção de ácidos nucleicos por PCR no sangue só é possível até a terceira semana pós-infecção, negatizando a partir desse período.

Desse modo, apenas a detecção de estruturas parasitárias presentes em cortes histológicos, provenientes de biópsias ou peças cirúrgicas podem confirmar a presença do parasito. Apesar disso, em muitos casos estas estruturas podem já ter sofrido degradação e perda das características diagnósticas ou estarem ausentes daquele segmento de tecido escolhido para o exame anatomopatológico. Nestes casos a detecção do material genético do parasito pode ser de grande valia no diagnóstico. Além disso, ao longo de seu desenvolvimento e permanência nos tecidos os parasitos secretam e excretam produtos metabólicos que podem estimular o sistema imune e ocasionar reação inflamatória local. Dentre estes rastros fisiológicos, células mortas, hormônios, enzimas antioxidantes e eventualmente DNA também podem estar presentes (GRAEFF-TEIXEIRA; CAMILO-COURA & LENZI, 1991a). Com isso, o uso de material embebido em parafina, para extração de DNA representa um importante recurso para os estudos prospectivos e devido à possibilidade de longo tempo de estocagem também poderá ser usado em estudos retrospectivos.

Este trabalho visa à padronização da extração e amplificação de DNA de blocos parafinados em modelo experimental murino para que possa ser depois ser aplicada aos materiais humanos emblocados em parafina para o diagnóstico da AA, uma vez que o Instituto de Patologia de Passo Fundo, colaborador deste projeto, possui um banco de blocos de tecidos humanos proveniente de peças cirúrgicas com suspeita da infecção por *Angiostrongylus costaricensis*.

1.3 OBJETIVO

Geral: Ensaiar e padronizar a extração de DNA a partir de tecidos de camundongos infectados experimentalmente, fixados e emblocados em parafina para utilizar na detecção de ácidos nucleicos como uma alternativa para o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal.

Específicos:

1. Verificar se o tipo de fixador (formalina tamponada ou não) prejudica a extração e detecção do DNA.
2. Verificar se diferentes marcas comerciais de parafina produzem diferentes resultados na extração e detecção do DNA.
3. Verificar o efeito do tempo de fixação na extração e detecção do DNA.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

[Parasitology Research]

Standardization of DNA extraction in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from mice experimentally infected with *Angiostrongylus costaricensis*

Bárbara Rodrigues Alves¹, Silvana Lunardine Alves¹, Ana Cristina Arámburu da Silva¹, Rubens Rodriguez², Alessandra Loureiro Morassutti¹, Carlos Graeff-Teixeira¹

¹Grupo de Parasitologia Biomédica, Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas e Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Instituto de Patologia de Passo Fundo e Universidade de Passo Fundo.

Correspondence should be addressed to Bárbara R. Alves; babi_sjc@hotmail.com

Abstract

The confirmed diagnosis of human angiostrongyliasis is made only through histopathology of biopsies or mesenteric tissues removed during surgical treatment. Sometimes pathological findings are very suggestive and no parasite structures are detected. Our aim is to standardize the extraction of DNA from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues from mice experimentally infected with *Angiostrongylus costaricensis*. Samples (45) of each tissue of liver, lung, intestine and mesentery, totalizing 180 samples from 15 infected mice. *A. cantonensis*' worms were separately also embedded as controls. Approximately 24 to 31 sections of 10 µm were used for DNA extraction. A 232bp genus *Angiostrongylus* specific probe was employed for the PCR. There was a positive amplification in 33 samples from liver, 12 from lung, 45 from mesentery and 36 from intestine wall. For different conditions of embedment, the amplification of the DNA with the buffered formalin fixative was more efficient. Time of fixation and the commercial brand of wax did not affect the results, but no amplification was obtained from samples with residual paraffin. PCR was also negative when there was no evidence of parasite structures, suggesting that histopathology

findings should guide the choice of the samples for DNA extraction. Performance of PCR in paraffin embedded tissues as a diagnostic tool in human infection with *A.costaricensis* depends on the detailed evaluation criteria in histopathology and their association with a positive amplification of the probe.

Introduction

Abdominal angiostrongyliasis is a zoonotic infection caused by *Angiostrongylus costaricensis* (Aco), a nematode with an intravascular location in the mesentery, which is present in an endemic region in Brazil, the State of Rio Grande do Sul (Ubelaker and Hall 1979; Morera et al. 1988; Demo and Pessat 1986; Agostini et al. 1994). Confirmed diagnosis of human infection is made by histopathological examination of biopsies or segments removed during surgical treatment of complicated cases (Graeff-Teixeira et al. 1991). There are many cases where the histopathology is very suggestive, where the parasite forms are not detected in the sections.

PCR (Polimerase Chain Reaction) allows rapid and specific amplification of nucleic acid sequences from a variety of biological materials including blood, hair and fresh or frozen tissues (Innis et al. 1990). Many authors have tried PCR in FFPE (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded) tissue. However, the efficiency of PCR can be influenced by various endogenous and exogenous factors such as the integrity of the tissue, the fixation and time of the paraffin embedding (An and Fleming 1991).

FFPE samples may be stored and represent an important source for prospective and retrospective studies. PCR has a very high analytical sensitivity what is a requisite for detection of DNA in small amounts of tissues sent for pathological examination. Also, the parasites eliminate cells and secretions causing inflammatory reaction what provide a clue for optimizing extraction and detection of DNA at these sites. The analytical sensitivity is the ability to recover nucleic acid molecules tested in laboratories, by addition controlled of known amounts of DNA or other molecules, e.g. antigens in immunodiagnostics; it differs from epidemiological sensitivity, determined by the ability to detect infection in a population,

without being directly related to assessing the amount of the target molecule or indicator (Schmidt et al. 2010).

The diagnosis for abdominal angiostrongyliasis in man by stool examination is not possible, due to retention of eggs in the intestinal wall amid an intense inflammatory reaction. Immunodiagnosis methods are indirect, not confirmatory tests besides the huge problems of cross-reactivity, especially in helminth infections. The detection of nucleic acids in blood by PCR is only possible up to the third week post-infection, being afterwards negative. Thus, this study aims to test and explore different conditions of fixation and embedding in FFPE tissues from mice experimentally infected, in order to detect Aco DNA as an initial step to standardize a DNA detecting procedure in human samples.

Materials and Methods

2.1 The parasites and rodent tissues. *A.costaricensis* (Aco, Santa Rosa strain) and *A.cantonensis* (Aca, Akita strain) are maintained in the laboratory through passages in *Oligoryzomys nigripes* (Aco), *Rattus norvegicus* (Aca) and *Biomphalaria glabrata* as intermediate host (Aco and Aca). DNA extracted from worms and worms embedded in paraffin were used as positive controls. Tissues (lungs, mesentery, intestinal wall and liver) from 3 uninfected mice were used as negative controls.

2.2 Experimental infection. Under isoflurane anesthesia, 19 mice were infected with an aqueous suspension of 10 third stage larvae (L3) through gavage. After 28 days, the infection in 15 out of inoculated animals was confirmed by the presence of first-stage larvae (L1) in feces. After anesthesia with isoflurane animals were sacrificed by cervical dislocation and samples were collected of lungs (hilum) (T1, tissue 1), the root of the mesentery with mesenteric vessels (T2, tissue 2), the intestinal wall (distal jejunum and large intestines) (T3, tissue 3) and liver (T4, tissue 4).

2.3 Embedding protocol. Intestine, mesentery, lungs and liver were fixed with buffered formalin (DinâmicaTM, Brazil) for 24 hours and then submitted to embedding in an automatic

processor (Leica TP 120, Germany) with paraffin Pró-cito™ (TBS88 Paraffin Embedding System Thermal Unit, Medite).

2.4 Sectioning and sub-sampling. From each of the tissue samples (T1 to T5, see above) sections were sequentially obtained in a micrometer cutter (Olympus Cut4060, America INC): a 3 µm section for HE staining (see below) followed by 24 to 31 sections of 10 µm for DNA extraction and this procedure was repeated three times (3 sub-samples for each tissue sample).

2.5 Hematoxylin-Eosin staining. Tissue sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) to verify the presence of parasite structures and the inflammatory reaction indicative of *A. costaricensis* induced lesions: eosinophilic infiltration, granulomatous reaction and eosinophilic vasculitis. Briefly, HE staining was performed as follows: 3 baths of xylene 100% for 2 min, 4 baths in ethanol 100% (Zeppelin™) for 2 min, 2 min in ethanol 70% (Zeppelin™), 2 min in distilled water, 1 min in Hematoxylin of Harris (Pró-cito™), 20 min at flowing water, 30 sec in ethanol 100%, 1 min in eosin yellowish 2% (Top Glass Vidraria e Soluções™), 4 baths in ethanol 100%, for 2 min; 2 min in 50% xylene with 50% of ethanol 100%, 2 times in xylene for 2 min. For mounting the slide 1-2 drops of Canada balsam (Pró-cito™) was added before covering with a coverslip.

2.6 DNA deparaffinization and rehydration. For paraffin removal each batch of 10 µm sections (see above, “sectioning and sub-sampling) was dissolved in 1 mL of xylene for 2 minutes at room temperature. Material was then centrifuged, washed two times with absolute ethanol and dried at room temperature. The samples were resuspended in 180 µL of buffer and 20 µL of Proteinase K and incubated for 12 hours at 55 ° C in TFB 35 – (Flotation Tissue Streckbad Paraffin-Bath).

2.7 DNA extraction and purification. The extraction and purification of DNA was performed according to the manufacturer’s instructions (DNEasy Tissue Kit, Quiagen). DNA was eluted in 50 µL and quantified by Qubit Fluorometer™ 2.0.

2.8 Polymerase Chain Reaction. PCR reaction was performed using 200 ng of extracted total DNA in 25 µL reaction volume (10x buffer: 100 mM Tris HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂), 200 µM of each desoxinucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol each

oligonucleotide: Reverse (5'-CTCGGCTTAATCTTTGCGAC-3') and Forward (5'-AACGAGCGGCAGTAGAAAAA-3') of Integrated DNA Technologies IDT™ and 1U of *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™). For the reaction were used 2 min at 94 °C and 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C; 10 min at 72°C in the PTC -™ 100 (Programmable Thermal Controller). The sequences of the genus-specific primers were originally drawn from deposited genomic sequences from *Aca* (Silva et al. 2003).

2.9 Electrophoresis. To evaluate the result of extraction of DNA and gene amplification by PCR technique, horizontal electrophoresis was used. Samples were loaded in 2% agarose gel (Ultra Pure™, Invitrogen) in 1x TBE buffer (Tris base 2.24 M, boric acid 2.25 M and EDTA 1M pH 8.0) at 100 Volts for 30 minutes. The gels were stained with ethidium bromide and subjected to UV-B radiation transilluminator FBTI-88-Fischer Scientific for DNA fluorescent visualization.

2.10 Assays with different types of paraffins and variation of the fixation time. Three different brands of paraffin commonly used in laboratories were tested: a block of Merck™, Pró-Cito™ and Pró-Cito™ with honey. For these experiments, two worms of *Aca* were fixed in buffered and non-buffered formalin at different times: 24, 48 and 72 hours, in order to verify a possible effect of the wax on DNA extraction, optimization of the fixture time. Merck™ paraffin was also tested in the fixing times 2, 4, 6, 8 and 12 hours. These tests were done in triplicate. After worms were embedded in paraffin at each condition, DNA extraction, amplification and detection through agarose gel electrophoresis were performed as previously described.

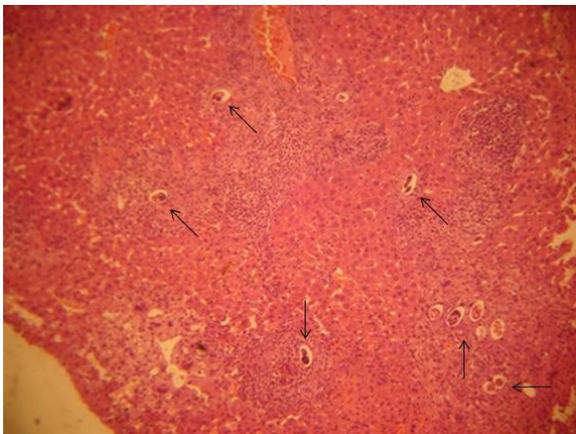
Results

Fifteen out of 19 animals acquired the infection and had their tissues included in the present study. The presence of parasite structures in the HE sections of each sample was confirmed by visualizing eggs, larvae, worms, accompanied by granulomatous inflammatory reaction (Figure 1). Several parasite structures were identified in the different tissues: lungs, larvae and eggs; in the mesentery, degenerated eggs, eggs, larvae, worms; in the intestinal wall:

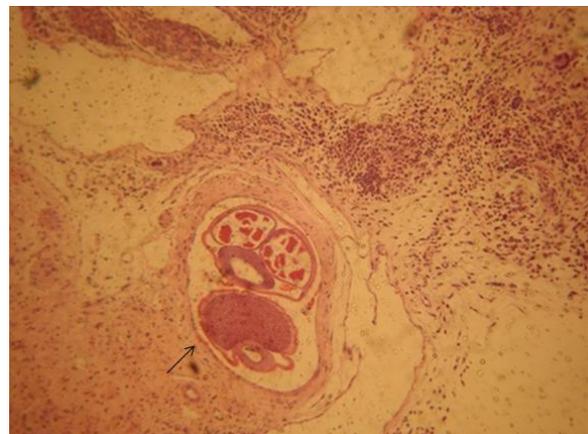
eggs, larvae, worms; and in the liver: larvae, eggs, worms. We also tested 5 kidneys from different animals, but found neither parasitic structures nor inflammatory reaction or amplification of parasite's DNA.

A general total of 180 tissue sub-samples embedded in paraffin had DNA extraction and amplification by PCR: 3 repeats of each tissue and 4 tissues from each of 15 infected animals. There was a sub-total of 45 sub-samples per tissue (45 from each tissue category: lungs, mesentery, intestinal wall and liver). The expected 232bp sequence was amplified from 126 sub-samples, 33 from liver; 12 from lungs; 45 from mesentery and 36 from intestinal wall (Table 1). Amplification was also consistently positive among the same FFPE fragment.

There was no difference in extraction and amplification of DNA from tissues with the different tested paraffin brands, at 24, 48 and 72h of fixation time, while the buffered formalin produced better results (Table 2). A similar outcome with different fixation times was obtained when the experiment was repeated with the Merck™ paraffin, chosen because of its easiest dissolution in the DNA extraction step and after the demonstration of similar results from all the brands tested (Table 3).



(a)



(b)

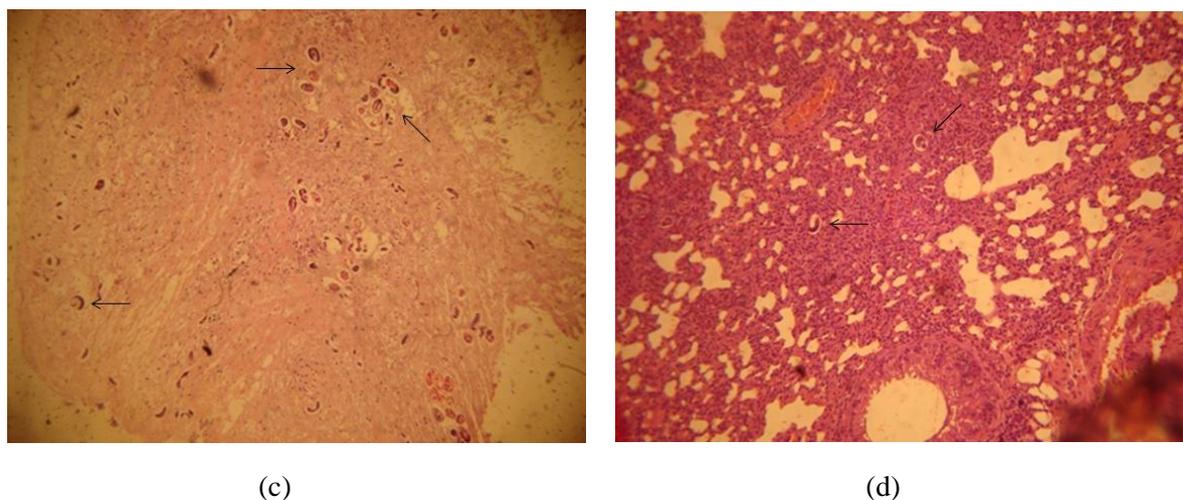


Fig. 1 (a) Histological sections of liver; (b) mesentery; (c) intestinal wall; (d) lung; (a), (c) and (d) showing eggs and larvae; (b) intra-arterial transversal section of worms (Hematoxylin-Eosin x10)

Table 1 The detection of a 232 bp amplicon from paraffin-embedded murine tissues at experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*. Distribution of positive amplification according to tissue sub-samples.

Tissues	Number of tested Sub-samples	Number of sub-samples with a positive 232bp amplification
Liver	45	33 (73%)
Lung	45	12 (27%)
Mesentery	45	45 (100%)
Intestinal wall	45	36 (80%)
Total	180	126 (70%)

Table 2 The detection of a 232 bp amplicon from paraffin-embedded adult worms, *Angiostrongylus cantonensis*. Distribution of positive amplification according to different paraffin brands and different fixation times: 24, 48 and 72 h.

Paraffin	Formalin	Fixation time (hours)		
		24	48	72
Merck™	Buffered	+++	++-	+++
	Unbuffered	++-	+-	++-
Pró-cito™	Buffered	+++	++-	+++
	Unbuffered	+-	+-	+-
Pró-cito™+honey	Buffered	++-	+++	+++
	Unbuffered	+-	+-	+-

Table 3 The detection of a 232 bp amplicon from paraffin-embedded adult worms, *Angiostrongylus cantonensis*. Worms were either fixed with buffered or unbuffered formalin and embedded in Merck™ paraffin. Distribution of positive amplification according to different fixation times: 2, 4, 6, 8, 12 hours.

Formalin	Time (hours)				
	2	4	6	8	12
Buffered	++-	+-	++-	+-	++-
Unbuffered	++-	+-	++-	+-	++-

Discussion

PCR has been employed for several pathogens' DNA detection of from different tissues: *Trypanosoma cruzi* from rodent placenta (Alárcon et al. 2009), *Neospora caninum* from bovine fetal brain tissues (Sanches et al. 2009), *Mycobacterium tuberculosis* from human tissues (Barcelos et al. 2008); *Leishmania* spp from skin biopsies of dogs (Müller et al. 2003); *Helicobacter pylori* from patients with various liver diseases (Pirouz et al. 2009) and *Ascaris* spp. larvae in swine liver (Ishiwata et al. 2004).

DNA detection was more frequent in mesentery and intestine wall sub-samples. This is due to the fact that in rodents the adult parasites are predominantly located in the branches of the mesenteric artery of the ileocecal region. The eggs are carried through the bloodstream to the intestinal wall, eventually with the full development of L1 (Morera and Céspedes 1971). This study also demonstrates the circulation of the parasite and/or its molecules in the venous mesenteric circulation, through the liver (73% of liver sub-samples were positive) and finally reaching the lungs (27% of lung sub-samples were positive). These data give support to the proposition of a venous route for the parasite, besides the classical lymphatic-arterial route (Mota and Lenzi 1995). Another previous study also demonstrated the presence of L1 in the systemic circulation; although in a much lesser extent than in the mesenteric tissues (Fontoura et al. 2007). It is important to consider that organisms or molecules are usually trapped in the capillary hepatic bed what qualifies the liver as an anatomic barrier associated with its well-known complex set of metabolic detoxification functionalities. Lungs' and kidney's capillary bed are two other anatomical barriers potentially able to trap organisms or molecules. This study was done with one fundamental and general hypothesis: capillary beds are areas where parasite's molecules may be trapped and eventually detected. The data now reported do allow neither confirmation nor refusal of such a hypothesis since there was not *in situ* demonstration of DNA. But these data and the failure to detect DNA from kidney tissues (an inter-arterial capillary bed) besides supporting the venous-hepatic-pulmonary pathway for the parasite, indicate the efficacy of the sequential filtering function of two capillary beds: hepatic (venous-venous) and pulmonary (venous-arterial).

Considering the highly heterogeneous and scarce tissular distribution of parasite structures in angiostrongyliasis, one main factor for the success of molecular diagnosis probably is the choice of the fragment for examination at macroscopy. The pathologist usually selects the most diseased fragments, but with *A.costaricensis* infection this procedure not always leads to an area where parasite structures will be found, but it may only represent reactive inflammation distal to the actual location of the worms (Graeff-Teixeira et al. 1991b). This is especially true for the lesions macroscopically characterized by thickening of the mesentery or intestinal wall, where is unusual to find the parasites. This diagnostic problem will probably not be solved by application of a molecular test, like PCR in tissues.

Another factor for PCR success in detecting DNA in FFPE tissues is the proportion of the mass of paraffin to the amount of tissue. Excess of paraffin possibly negatively influences the outcome, because it interferes in DNA extraction therefore preventing amplification of

nucleic acids by PCR. Therefore it is recommended to use a scalpel to remove paraffin excess, or select the tissue with minimum possible paraffin around before performing microtome slices. Tissue excess may represent the same problem of dilution of the target DNA, since for a large amount of material, extraction reagents might be insufficient and may cause column collapse in the extraction step.

Fixatives reagents may negatively affect the outcome of PCR. Formalin is widely used as a fixative solutions in routine tissue processing for pathological examination and its lack of deleterious effects on DNA has been demonstrated with amplification of DNA segments up to 500bp (Yagi et al. 1996; Noguchi et al. 1997). Better results on preservation of DNA were achieved with a buffered formalin solution as shown in Tables 2 and 3. Pathology laboratories generally use the fixture time of 24 to 48 hours. Although relatively wide, this period of time seems to have no effect on histopathology. However it has been reported that the fixative and fixation time might negatively affect the quality of the DNA extraction from tissues (Gilbert et al. 2007; Rish et al. 1996; Srinivasan et al. 2002). Here we tested fixative times from 24 to 72 hours. No differences in DNA detection was found, as shown in Table 1. We further investigated the influence of shorter fixative times 2, 4, 6, 8 and 12 hours with Merck™ paraffin and no major differences were observed. The choice of a single brand is due to the fact that no difference was found with the Pró-cito™, and the choice of Merck™ is due to its easy of working, i.e., paraffin dissolves more quickly and easily in the step of extraction of DNA.

Different fixing reagents are largely used such as formalin, glutaraldehyde, methanol, ethanol and acetone. Recently, a new tissue fixation method, the PAXgene™ Tissue System (PAXgene) was developed by PreAnalytiX GmbH (Hombrechtikon Switzerland). The two-reagent system consists of non-crosslinking fixative and stabilizer reagents and the aim to standardize and improve generic pre-analytical tools and procedures for in vitro molecular diagnostics. Studies have demonstrated that tissue samples fixed and stabilized with PAXgene can be used with conventional histological stains such as hematoxylin and eosin (H&E) or immunohistochemical staining (Kap et al. 2011). Other studies have shown that PAXgene preserves RNA, miRNA and DNA in clinical samples (Viertler et al. 2012). So, development of new fixing reagents is a perspective for future studies in detecting parasite structures in tissues.

FFPE tissues are routinely stored in pathology laboratories. The stored paraffin blocks constitutes a valuable material for studies only possible after the initial description of the macro and microscopic lesions testing diagnostic hypotheses driven by the pathologists' initial evaluation. Not only at individual basis but retrospective studies of given categories of

inflammatory lesions, like the eosinophilic and granulomatous enteritis typical for angiostrongyliasis (Céspedes et al. 1967; Graeff-Teixeira et al. 1991a). PCR-based assays are important because of potentially high analytical sensitivity and specificity, although the several interference variables as those herein reported.

In conclusion, buffered formalin is recommended for processing tissues since this fixative solution is associated with better results in detecting DNA through PCR. Fixation time from 2 to 72 hours and the use of two most used brands of paraffin in Brazil (Merck and Pro-Cito) were considered to give very similar results of DNA extraction and amplification, while the study confirms the importance of an optimized removal of embedding paraffin and a careful identification of diseased tissues for the DNA extraction trials. The description of the performance of PCR as a diagnostic tool in paraffin material depends on a detailed evaluation of the several histological diagnostic criteria and the associated analytical recovery of DNA. Improvements on fixative solutions, types of paraffin and techniques for its complete removal will probably result in optimized PCR for extraction of parasite's DNA from tissues. Even so, this study indicates a promising role of DNA detection in tissues in diagnostic evaluation of human tissues suspected of infection with *Angiostrongylus costaricensis*. After proper validation of this new diagnostic method in tissues for abdominal angiostrongyliasis, it would be also applicable in cerebral angiostrongyliasis, since the probe was originally designed from a deposited sequence of *A.cantonensis*, although biopsies are not a common procedure in eosinophilic meningoencephalitis.

References

- Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JMC, Lisot JUF (1994) Angiostrongilíase abdominal, estudo anatomopatológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 79 (4): 443-445.
- Alarcón M, Pérez MC, Villarreal J, Araujo S, Gonçalves L, González A, Moreno E, Lugo-Yarbuh A (2009) Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* em la placenta y fetos de ratones com infección chagásica aguda. Invest Clin 50 (3): 335-345.
- An SF, Fleming KA (1991) Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. J Clin Pathol 44: 924-927.

- Barcelos D, Franco MF, Leão SC (2008) Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin- embedded samples. *Rev Inst Med trop S Paulo* 50 (6): 321-326.
- Céspedes R, Salas J, Mekbe S, Troper L, Müllner F, Morera P (1967) Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por um strongilídeo (strongylata). *Acta Médica Cost* 10 (3): 235-255.
- Demo OJ, Pessat OAN (1986) Angiostrongilosis abdominal. Primer caso human encontrado en Argentina. *Prensa Médica Argentina* 73: 732-738.
- Fontoura GDR, Maurer RL, Oliveira CM, Graeff-Teixeira C (2007) Abdominal angiostrongyliasis in rodent experimental infection: Evidence for systemic circulation of first stage larvae. *Parasitology International* 56 (3): 227-229.
- Gilbert MTP, Haselkorn T, Buna M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Marck EV, Worobey M (2007) The isolation of nucleid acids from fixed, paraffin-embedded tissues – which methods are useful when?. *PLoS ONE* 2(6): e537.
- Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL (1991) Angiostrongilíase abdominal - uma nova parasitose no sul do Brasil. *Rev AMRIGS* 35: 91-98.
- Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL (1991) Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77:606-611.
- Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL (1991b) Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77:606-611.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) PCR protocols: Principles and applications. Academic Press, New York.
- Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K, Nawa Y (2004) Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 92: 50-52.
- Kap M, Smedts F, Oosterhuis W, Winther R, Christensen N, Reischauer B, Viertler C, Groelz D, Becker KF, Zatloukal K, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bodo K, Jong B, Oelmuller U, Riegman P (2011) Histological assessment of PAXgene tissue fixation and stabilization reagents. *PLoS ONE* (6) 11: e27704.
- Morera P, Andrews PKL, Rueda D (1988) The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. *Rev Biol Trop* 36: 575-576.
- Morera P, Céspedes R (1971) *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol trop (S José)* 18: 173-185.
- Mota EM, Lenzi HL (1995) *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90(6): 707-709.

- Müller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M (2003) PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Veterinary Parasitology* 114: 223-229.
- Noguchi M, Furuya S, Takeuchi T, Hirohashi S (1997) Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int* 47:685–691.
- Pirouz T, Zounubi L, Keivani H, Rakhshani N, Hormazdi M (2009) Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* 54: 1456-1459.
- Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Reddy MV, Gangadharam PR, Bates JH (1996) Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1419-1423.
- Sánchez GF, Banda RVM, Sahagun RA, Ledesma MN, Morales SE (2009) Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Veterinary Parasitology* 164: 328-332.
- Schmidt P J, Emelko M B, Reilly P M (2010) Quantification of Analytical Recovery in Particle and Microorganism Enumeration Methods. *Environ Sci Technol* 44: 1705–1712.
- Silva AC da, Graeff-Teixeira C, Zaha AA (2003) Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45(5): 295-297.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161 (6): 1961-1974.
- Ubelaker J E, Hall M (1979) First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971 in the United States. *J Parasitol* 65: 307.
- Viertler C, Groelz D, Gündisch S, Kashofer K, Reischauer B, Riegman PHJ, Winther R, Wyrich R, Becker KF, Oelmüller U (2012) A New Technology for Stabilization of Biomolecules in Tissues for Combined Histological and Molecular Analyses. *J Mol Diag* 14 (5).
- Yagi N, Satonaka K, Horio M, Schimogaki H, Tokuda Y, Maeda S (1996) The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotech Histochem* 71:123–129.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As manifestações clínicas da AA, como costumam ser os sintomas e sinais de outras patologias abdominais, especialmente aquelas que afetam os intestinos e o mesentério, são inespecíficas. A dor abdominal, a presença de massa palpável, os vômitos, as alterações do trânsito intestinal (diarreia e constipação), podem ser manifestações de muitas outras patologias do abdômen. A eosinofilia no sangue periférico, em patamares de até 80% é um achado laboratorial muito sugestivo da AA, porém esta alteração pode estar ausente (GRAEFF-TEIXEIRA et al, 1991b). Todos estes elementos, incluindo os resultados de testes imunológicos para detecção de anticorpos (sorologia), ajudam a compor o diagnóstico da suspeita de AA.

O diagnóstico confirmado, com a identificação do parasito ou de seus ovos, somente é possível através do exame anatomo-patológico de fragmentos obtidos em biópsias e ressecções cirúrgicas, tendo em vista que a eliminação de larvas ou outras estruturas nas fezes, não o faz em quantidade que permita o emprego de um simples exame de fezes (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1991a). Muitas vezes o patologista de imediato identifica o verme intra-arterial ou seus ovos embrionados, em cortes na coloração de rotina. Outras vezes, especialmente quando predomina intenso infiltrado inflamatório eosinofílico, é difícil encontrar estruturas parasitárias, exigindo até mesmo o esgotamento completo do bloco e o estudo extenso de novos fragmentos. Quando não se observam parasitos, uma alternativa sempre pensada foi a detecção de DNA do parasito. A detecção de ácidos nucleicos em soro foi estudada por Silva e colaboradores (2003), sugerindo que o PCR no soro pode ser um método complementar aos demais recursos de diagnóstico, faltando apenas uma mais extensa avaliação de desempenho.

São vários os relatos do uso da técnica da PCR em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP) em diversas infecções, tais como na tripanosomíase americana (ALARCÓN et al., 2009), neosporíase (SÁNCHEZ et al., 2009), tuberculose (BARCELOS; FRANCO & LEÃO, 2008), leishmanioses (MÜLLER et al., 2003), *Helicobacter pylori* (PIROUZ et al., 2009), ascaríase (ISHIMATA et al., 2004).

O estudo experimental em modelo murino ora relatado foi planejado como um passo inicial, antes de prosseguir para avaliar o desempenho do PCR em fragmentos de biópsia ou

ressecções cirúrgicas em seres humanos, estocados emblocados em parafina, no Instituto de Patologia de Passo Fundo, o centro de diagnóstico histopatológico da AA mais ativo no momento e situado na principal área endêmica desta parasitose no Brasil.

Os resultados confirmam que pode ser usado a formalina como fixador (PASKA et al., 2004), porém também sugerem o uso da formalina em solução tamponada. Há relatos e opiniões de que o tempo de fixação deveria ser o menor possível para garantir o êxito da extração do DNA (FOSS et al., 1994). Porém isto não foi verificado nos atuais experimentos, em tempos entre 2 e 72 horas. Se a extração de DNA fosse possível apenas com tempos de fixação muito pequenos, isto seria impraticável, tendo em vista a dificuldade de mudar a rotina de encaminhamento dos fragmentos para o exame anatomo-patológico, especialmente considerando que a necessidade de tomar estes cuidados somente seria estabelecida após a o processamento de rotina e a leitura das primeiras lâminas. Normalmente o médico retira os fragmentos, os coloca na formalina e o encaminhamento ao laboratório segue um procedimento rotineiro, em que geralmente o exame macroscópico, emblocamento e cortes vão ser feitos no mínimo após 24 horas.

Também não foram detectadas diferenças entre as diferentes marcas comerciais mais usadas de parafina. O resultado um pouco pior de uma preparação de parafina com mel poderia estar relacionado à maior dificuldade de remover completamente a parafina após a obtenção dos cortes. Uma recomendação geral para escolha da marca, a partir deste resultado, é atentar para a característica de que a parafina seja fácil e totalmente removida. Novamente, esta recomendação potencialmente não tem influência na rotina do laboratório de patologia, na consideração de uma qualidade da parafina que eventualmente não é crítica para a maioria dos materiais em análise. Porém esta recomendação poderia ser útil, em centros de referência, como o Instituto de Patologia de Passo Fundo, e na re-inclusão de novos fragmentos, feita a partir da suspeita histológica do exame inicial.

As frequências de amplificação de DNA do *A. costaricensis* entre os diferentes tecidos estão de acordo com o que se conhece das vias migratórias e locais de estabelecimento dos vermes adultos, como originalmente descrito por MORERA (1971) e por MOTA e LENZI (1995). Desta forma, parede intestinal e mesentério são os principais sítios de positividade, secundariamente fígado e pulmão. É muito interessante a ausência de detecção no tecido renal, mesmo que o exame deste órgão não tenha sido sistemático, porque isto demonstra a efetividade dos dois leitos capilares (hepático e pulmonar) como barreira para reter parasitos e moléculas, antes do fluxo circulatório atingir a rede capilar arteriolar dos glomérulos renais.

A ideia de que a proporção de parafina para massa de tecido pode influenciar negativamente na extração e consequente desempenho do PCR resultou das observações feitas durante as inúmeras repetições e ensaios prévios ao experimento agora relatado. Por isso, surgiu a recomendação de promover ao máximo a remoção da parafina. Isto inclui o uso de um bisturi para selecionar o tecido com mínimo de parafina possível ao seu redor antes de realizar os cortes no micrótomo. A escolha do fragmento alvo deve ser feita em corte histológico e com a participação de patologista experiente. A mesma ideia se seguiu quanto a excesso de tecido, pois quanto maior a quantidade de material, maior o efeito de diluição dos reagentes de extração. Se empregado um kit comercial, não há como garantir a adequada concentração diante da heterogeneidade e/ou raridade das estruturas parasitárias, seguindo-se as instruções do fabricante, sem este cuidado de promover a “concentração” de tecidos muito suspeitos da presença do parasito. Desta forma, enquanto ensaiamos um método de diagnóstico molecular, mostramos também a necessidade da conjugação de competências, cabendo um papel fundamental ao patologista, de orientar pelo estudo morfológico ao microscópio, o esforço de identificação das moléculas do parasito. Na AA, não parece ter bom custo-benefício a busca de DNA em tecido sem orientação vinda do exame histopatológico. Já são bem conhecidas as alterações sugestivas que fornecem esta orientação: áreas com infiltrado eosinofílico intenso, granulomas com eosinofilia, granulomas intra-arteriais e vasculites (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1990; RODRIGUEZ, R., comunicação pessoal).

Áreas de autólise ou degeneração dos tecidos são comuns na AA, devido ao componente de isquemia por trombose arterial ou comprometimento da rede capilar. Algumas das amostras testadas apresentavam estas alterações e isto aparentemente não afetou a detecção de DNA, o que necessita ser mais extensamente estudado. As tentativas de identificação de parasitos em tecidos através de imunohistoquímica, empregando anticorpos para detecção de antígenos e revelação através de modificação de substratos da peroxidase, tem uma grande limitação exatamente quando ocorrem áreas de necrose tecidual, fontes inespecíficas de atividade oxidativa.

Estabelecidas as condições básicas iniciais para a detecção de ácidos nucleicos em tecidos na AA, com demonstração da utilidade da sonda de 232bp, da possibilidade de empregar formalina como fixador, dando-se preferência para a formalina tamponada, com a descrição dos tecidos e as frequências de amplificação em cada um deles e o detalhe importante da remoção mecânica de parafina e tecidos menos prováveis de conter alvos, torna-se urgente a avaliação do PCR em tecidos humanos.

Há uma perspectiva boa de que o PCR seja um recurso diagnóstico útil na avaliação de lesões suspeitas da AA. Por outro lado, reforça-se a importância da composição de diferentes competências, mostrando-se que o método molecular deve ser empregado com a orientação do patologista, em mútua complementação.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, E.S. et al. Specific antibody production against different life cycle stages during an experimental *A. costaricensis* infection in mice. **Rev. Biomed.** 16:239-246, 2005.

ABRAHAMS, E.S. et al. An indirect immunofluorescence antibody test employing whole eggs as the antigen for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 106 (4): 390-393, 2011.

AGOSTINI, A. A. et al. Angiostrongilíase abdominal: três casos observados no Rio Grande do Sul. **Rev. AMRIGS** 27 (2): 200-203, 1983.

AGOSTINI, A. A. et al. Angiostrongilíase abdominal, estudo anatomopatológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79 (4): 443-445, 1984.

ALARCÓN, M. et al. Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* em La placenta y fetos de ratones com infección chagásica aguda. **Invest. Clin.** 50 (3): 335-345, 2009.

AN, S.F & FLEMING, K.A. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. **J. Clin. Pathol.** 44: 924-927, 1991.

AYALA, M. A. R. Angiostrongiloidíase abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82: 29-36, 1987.

BARBOSA, H. et al. Angiostrongilose abdominal. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 26:178-180, 1980.

BARCELOS, D.; F.FRANCO, M. & LEÃO, S.C. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 50 (6): 321-326, 2008.

BAILLET, C.C. Strongle des vaisseaus et du coeur du chein *Strongylus vasorum*. **N. Dict. Paract. Med. Vet.** 8:587–588, 1866.

BENDER, A. L. et al. Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensively recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36 (4): 449-454, 2003.

BHAIBULAYA, M. Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis. In: Emerging problems in Food-Borne Zoonosis: Impact on agriculture and Public Health. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 22: 189-193, 1991.

CESPEDES, R. et al. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por um strongilídeo (*Strongylata*). **Acta Med. Costaric.** 10 (3): 235-255, 1967.

CHEN, H. T. Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g. n. sp. des rats de Canton. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 13: 312- 317, 1935.

DEMO, O. J. & PESSAT, O. A. N. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso human encontrado en Argentina. **Prensa Med. Argent.** 73: 732-738, 1986.

DOUGLAS, M.P. & ROGERS, S.O. DNA damage caused by common cytological fixatives. **Mutat. Res.** 401: 77–88, 1998.

DUARTE, Z. et al. *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 67: 94-96, 1992.

FARRUGIA, A.; KEYSER, C. & LUDES, B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. **Forensic Sci. Int.** 2009.

FAUZA, D. O.; MAKSOUD FILHO, J. G. & EL IBRAHIM, R. Abdome agudo na infância por angiostrongilíase abdominal intestinal. Relato de um caso. **Rev. Ass. Med. Bras.** 36: 150-152, 1990.

FLORELL, S.R. et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. **Mod. Pathol.** 14: 116-128, 2001.

FOSS, R.D. et al. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. **Diagn. Mol. Pathol.** 3:148–155, 1994.

GEIGER, S. M. et al. Detection of the acute phase of abdominal angiostrongyliasis with a parasitic-specific IgG enzyme linked immunosorbent assay. **Mem. Inst Oswaldo Cruz** 96 (40): 515-518, 2001.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. **Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil** Rio de Janeiro. 137p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1986.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; AGOSTINI, A. A. & BUSATO, JR. E. Novo hospedeiro intermediário do *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 2 (sup.1), 1993.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of an immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. **Trop. Med. Int. Health** 2 (3): 254-260, 1997.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. **Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo** 32: 147-150, 1990.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILO-COURA, L. & LENZI, H. L. Abdominal angiostrongyliasis - an underdiagnosed disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82 (6): 353-354, 1987.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILO-COURA, L. & LENZI, H. L. Angiostrongilíase abdominal - uma nova parasitose no sul do Brasil. **Rev. AMRIGS** 35: 91-98, 1991.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILO-COURA, L. & LENZI, H. L. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. **Parasitol. Res** 77: 606- 611, 1991a.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILO-COURA, L. & LENZI, H. L. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. **Rev. do Inst. Med. Trop. S. Paulo** 33: 373-378, 1991b.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Natural infection of *Phyllocaulis soleiformis* with larvae morphologically similar to L2 of *Angiostrongylus costaricensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 89: 121, 1994.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. *Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84: 65-68, 1989.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 88: 487-489, 1993.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38(4): 310-315, 2005.

HIRSCHFELD, M. P. M. Angiostrongilíase abdominal. **Laes / Haes**. Ed. Mc Will Editores Incorporados Ltda. Ano XIV, Junho / Julho. n° 83, 1993.

INNIS, M.A. et al. PCR protocols: Principles and applications. **Academic Press, New York**, 1990.

ISHII, A. L. Effects of temperature on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **Parasitol. Res.** 70: 375-379, 1984.

ISHIWATA, K. et al. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. **Parasitol. Res.** 92: 50-52, 2004.

KAMENSKY, S.N. Sistematiche scoe poloz henieradov *Metastrongylus* wots in *Protostrongylus* g.n. sredi drugikh Strongylidae (in Russian). **Sb. Tr. Khardk Vet. Inst.** 7:17–20, 1905.

KAMINSKY, R.G.; ANDREWS, K. & MOR, N. R. *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Estudio preliminar. **Rev. Med. Honduras** 55: 4-8, 1987.

KAP, M. et al. P. Histological assessment of PAXgene tissue fixation and stabilization reagents. **PLoS ONE.** (6) 11: e27704, 2011.

LIACOURAS, C. A. et al. *Angiostrongylus costaricensis* enterocolitis mimics Chron's disease. **J. Pedia. Gastroent. Nutr.** 16: 203-297, 1993.

LIMA, L. K. et al. Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 34(5): 399-402, 1992.

LUZZI, C. A. & NEWMANN, M. Angiostrongilíase abdominal. Apresentação de dois casos. **Arq. Catarin. Med.** 18: 41-44, 1989.

LOBO-SANAHUJA, F.; LORIA-CORTES, R. & GONZALEZ, G. Angiostrongilosis abdominal. Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de literatura. **Bol. Med. Hosp. Inf.** 44: 4-9, 1987.

LORIA-CORTES, R. & LOBO-SANAHUJA, J. F. Clinical abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. **Am. J. trop. Med. Hyg.** 29: 538-544, 1980.

MAGALHÃES, A. V. et al. Novo caso de angiostrongilose abdominal. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 24: 252-256, 1982.

MAGALHÃES, K.G. et al. Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. **Vet. Parasitol.** 152: 333-338, 2008.

MAURER, R. L. et al. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca; gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 44(1): 53-54, 2002.

MENTZ, J. P. et al. Manifestações de comprometimento hepático na angiostrongilíase abdominal e diagnóstico pelo encontro dos ovos do parasita. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, 37 (4): 289-290, 1993.

MENTZ, M. B.; AGOSTINI, A. A. & GRAEFF-TEIXEIRA, C. Phenantroline, lovastatin and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*. **Parasitol. Res.** 100: 379-382, 2007.

- MOJON, M. Angiostrongylose humaine à *Angiostrongylus costaricensis*. **Bull. Acad. Natle. Med.** 178: 645-633, 1994
- MONGE, E.; ARROYO, R. & SOLANO, E. A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. **J. Parasitol.** 64: 34, 1978.
- MORERA, P. Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. **Bol. Chileno Parasitol.** 25: 133 –134, 1970.
- MORERA, P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). **Am. J. trop. Med. Hyg.** 22 (5): 613-621, 1973.
- MORERA, P. Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. **Parasitol. Today** 1: 173-175, 1985.
- MORERA, P. Angiostrongyliasis abdominal: transmisión y observaciones sobre su posible control. Control y erradicación de enfermedades infecciosas. In: Resúmenes del Simposio Internacional OMS/OPS, Séries de copublicaciones de La OPS, 1., 1986.
- MORERA, P. Abdominal Angiostrongyliasis. In: Baillier's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. **Intestinal Helminthic Infections** 2 (3): 744- 753, 1987.
- MORERA, P.; ANDREWS, K. L. & RUEDA, D. The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. **Rev. Biol. Trop.** 36: 575-576, 1988.
- MORERA, P. & ASH, L. R. Investigación del huésped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). **Bol. Chileno Parasitol.** 25: 135, 1970.
- MORERA, P. & BONTEMPO, I. Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. **Rev. Med. Hosp. Nac. Niños** 20: 165-174, 1985.
- MORERA, P. & CÉSPEDES, R. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. **Acta Med. Cost.** 14: 159-173, 1971.
- MORERA, P. et al. First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. **Am. J. trop. Med. Hyg.** 14: 931-976, 1983.
- MOTA, E. M. & LENZI, H. L. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 90(6): 707-709, 1995.
- MÜLLER, N. et al. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Vet. Parasitol.** 114: 223-229, 2003.
- NOGUCHI, M. et al. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. **Pathol. Int.** 47:685–691, 1997.
- NUNEZ, R. & MIRAMBELL, F. Angiostrongilosis abdominal: um caso de conducta conservadora. **Rev Méd. Hosp. Nac. Niños** 16: 109-116, 1981.

- PASKA, C. et al. Effect of formalin, acetone, and RNA later fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. **Diagn. Mol. Pathol.** 13: 234-240, 2004.
- PENA, G. P.; ANDRADE FILHO, J. S. & ASSIS, S. C. de. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 37(4): 369-374, 1995.
- PIROUZ, T. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. **Dig. Dis. Sci.** 54: 1456-1459, 2009.
- RAMBO R. P.; AGOSTINI, A. A. & GRAEFF-TEIXEIRA, C. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusk intermediate host from eighteen endemic foci. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** 92: 9-14, 1997.
- REN, Z.P. et al. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. **Pathobiology** 68: 215-217, 2000.
- REY, L **Parasitologia**. 3 ed. Guanabara-Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001. 865 p.
- RICHINITTI, L. M.; FONSECA, N. A. & GRAEFF-TEIXEIRA, C. The effect of temperature on mobility of *Angiostrongylus costaricensis* third stage larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 41(40): 225-228, 1999.
- RODRIGUEZ, R. **Anatomia patológica da angiostrongilose abdominal**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. 117 p. 1997.
- ROURA, X. et al. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.** 11: 385-387, 1999.
- RUDZKI, Z.; ZAULA, M. & STACHURA, J. A technical note on microsatellite DNA instability studied in archival paraffin-embedded tissues. **Pol. J. Pathol.** 52, 225-230, 2001.
- SÁNCHEZ, G.F. et al. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. **Vet. Parasitol.** 164: 328-332, 2009.
- SANTOS, C. P. Redescritção de *Angiostrongylus (Paranstrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre *Proechimys sp.* na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongylidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 80: 82-83, 1985.
- SAUERBREY, P. J. A precipitin test for the diagnosis of human abdominal angiostrongyliasis. **Am. J. trop. Med. Hyg.** 26: 1156-1158, 1977.
- SCHERER, W.F et al. Ecologic Studies of Venezuelan Encephalitis Virus and Isolations of Nepuyo and Patois Viruses during 1968–1973 at a Marsh Habitat near the Epicenter of the 1969 Outbreak in Guatemala. **Am. J. trop. Med. Hyg.** 25:151-162 1976.

- SCHNEIDER, R. et al. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Int. J. Parasitol.** 38: 1065-1071, 2008.
- SCORSARO, A.P.; TELLES, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 47(5): 541-548, 2011.
- SIERRA, E. & MORERA, P. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). **Acta Med. Cost.** 15: 95-99, 1972.
- SILVA, A. C. da; GRAEFF-TEIXEIRA, C. & ZAHA, A. A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. **Rev. Inst Med trop. S. Paulo** 45(5): 295-297, 2003.
- SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D. & JEWELL, S.: Effect of fixatives and tissue Processing on the content and integrity of nucleid acids. **Am. J. Pathol.** 161(6): 1961-1971, 2002.
- START, R.D. et al. Reassessment of the rate of fixative diffusion. **J. Clin. Pathol.** 45:1120–1121, 1992.
- STEWART, G. L.; UBELAKER, J. E. & CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **J. Invert. Pathol.** 45: 152-157, 1985.
- TESH, R. B. et al. *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. **Am. J. trop. Med. Hyg.** 22: 348-356, 1973.
- UBELAKER, J. E; BULLICK, G. R. & CARUSO, J. Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.** 66(5): 856-857, 1980.
- UBELAKER, J. E.; CARUSO, J. & PEÑA, A. Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis*. **J. Parasitol.** 67 (2): 219-221, 1981.
- UBELAKER, J. E. & HALLN, M. First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971 in the United States. **J. Parasitol.** 65: 307, 1979.
- VELAZQUEZ, J. Z. et al. *Angiostrongilosis costaricensis*: primeros casos mexicanos. **Rev. Invest. Clin.** 26: 398-394, 1974.
- VIERTLER, C. et al. A New Technology for Stabilization of Biomolecules in Tissues for Combined Histological and Molecular Analyses. **J. Mol Diagn.** 14 (5), 2012.
- WILKINSON, E.J. & HENDRICKS, J.B. Role of the pathologist in biomarker studies. **J. Cell. Biochem.** 23: 10-18, 1995.
- YAGI, N. et al. The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. **Biotech Histochem.** 71:123–129, 1996.

ZANINI, M. G. & GRAEFF-TEIXEIRA, C. Angistrongilose abdominal: profilaxia pela destruição das larvas infectantes em alimentos tratados com sal, vinagre e hipoclorito de sódio. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 28: 389-392, 1995