

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Cinética de detecção de coproantígenos e de antígenos,
anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de lavado
bronco alveolar de ratos imunossuprimidos e experimentalmente
infectados por *Strongyloides venezuelensis***

Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves

Uberlândia- MG

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Cinética de detecção de coproantígenos e de antígenos,
anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de lavado
bronco alveolar de ratos imunossuprimidos e experimentalmente
infectados por *Strongyloides venezuelensis***

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Uberlândia

2011

1

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G635c Gonçalves, Ana Lúcia Ribeiro, 1982-
2011 Cinética de detecção de coproantígenos e de antígenos, anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de lavado bronco alveolar de ratos imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis* / Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves. -- 2011.
84 f. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Estrongiloidíase - Diagnóstico - Teses. *Strongyloides venezuelensis* - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. . Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

“Sejamos como o sol, que não visa nenhum elogio, não espera nenhuma recompensa, não vive de lucros nem fama, simplesmente brilha.”

autor desconhecido

“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.”

São Francisco de Assis

Dedicatória

*A florzinha que trouxe
alegria e esperança aos que
mais amo: **Maria Cecília
Coelho Gonçalves.***

Agradecimento especial

À Profa. Dra. Júlia Maria Costa-Cruz pela orientação de mais um trabalho e apoio nos momentos difíceis.

Agradecimentos

À Deus, meu sagrado e amado Pai, por ter permitido o fim de uma caminhada.

Aos meus pais, Joana D'arc Ribeiro Gonçalves e Lúcio Carlos Gonçalves pelo incentivo constante e por acreditar em mim sempre.

À Leonardo Ribeiro Gonçalves, meu irmão estimado que sempre apoiou-me nas minhas escolhas.

Aos Professores Dr. Cláudio Vieira da Silva, Dra. Fabiana Martins de Paula, Dra. Idessania Nazareth Costa, Dr. Julio Mendes, Dr. Marcelo Emílio Beletti, Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Michele Aparecida Ribeiro de Freitas por aceitarem o convite de participação nas bancas de qualificação e/ou defesa. Meus sinceros e profundos agradecimentos pelas valiosas contribuições.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia (PPIPA) por participarem da minha formação intelectual.

Aos colegas discentes que acreditaram e permitiram que eu trocasse grandes experiências e os representassem no Colegiado do PPIPA. Foram tardes enriquecedoras com as Profas. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro, Dra. Neide Maria da Silva, Dra. Deise Aparecida de Oliveira, Dra. Rosineide Marques e Dra. Márcia Cristina Cury.

Meu carinho especial aos colegas de iniciação científica, mestrado, doutorado e egressos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. Eles foram muito importantes para a conclusão dos meus trabalhos. A vivência diária fez com que construíssemos grandes laços de amizade.

Aos colegas dos Laboratórios de Parasitologia, Imunologia, Histologia, Microbiologia, Fisiologia e Família Biologia Molecular (BIOMOL – Tripanossomatídeos) pela gentileza de emprestar equipamentos e sempre me acolherem com carinho.

Aos técnicos dos Laboratórios de Parasitologia, Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, Maria das Graças Marçal, Elaine Silva Faria Marques, Geraldo Onofre, Rosângela Teresinha Moreira, Scheila Pedrosa e Doralice Marçal por me auxiliarem das diversas formas em alguma parte dos experimentos.

Ao técnico João Batista A. Oliveira, do Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por ter me auxiliado na infecção dos animais. Obrigada por tudo.

Às secretárias do PPIPA, Luceleide Freitas Queiroz Damásio e Lucélia da Costa Assis pelo carinho e atenção constantes. Ao secretário do Instituto de Ciências Biomédicas: Jorge Andrade.

À equipe da Garagem da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que possibilitaram tantas viagens à UNICAMP e aos diversos eventos de divulgação da pesquisa.

Aos colegas e professores da XX Turma de Análises Clínicas da Escola de Educação Básica em Saúde da UFU, Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Escola Municipal de Educação Infantil Monteiro Lobato e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU por acreditarem no meu trabalho e terem possibilitado as difíceis fases de conciliação entre trabalho e estudo.

Aos meus familiares, tios (as), primos (as), avós e amigos que sempre torceram incansavelmente pela minha vitória.

Aos colegas que compartilharam o dia-a-dia fora dos laboratórios, em especial Larissa Bonevaes de Paula e Juliana Kahlau.

Ao meu querido Felipe Tavares De Angelis Sales, pelo carinho, companherismo e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro da pesquisa.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram da construção desse trabalho. Com certeza, estão todos marcados em meu coração. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos morfo-biológicos do gênero <i>Strongyloides</i>	2
1.2 Modo de transmissão e ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	4
1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana	6
1.4 Sintomatologia da estrogiloidíase humana	8
1.5 Resposta imune no hospedeiro	9
1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase	12
1.7 Imunossupressão e ação modulatória da dexametasona	14
1.8 Modelos experimentais na estrogiloidíase	15
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Animais	24
3.3 Obtenção de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	25
3.3.1 Coprocultura pelo método de Looss	25
3.3.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954) e processamento das larvas recuperadas	26
3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona	26
3.5 Infecção experimental dos animais	27
3.6 Contagem de ovos/gramas de fezes e produção do sobrenadante fecal ----	24
3.7 Obtenção de extrato alcalino de larvas de <i>S. venezuelensis</i>	28
3.8 Coleta de sangue e de lavado bronco alveolar	28
3.9 Contagem global e diferencial dos leucócitos no sangue e no LBA	29
3.10 Produção de soro imune em coelhos	29
3.10.1 Imunização dos coelhos	29
3.10.2 Obtenção da gamaglobulina imune	30
3.10.3 Isolamento de IgG em proteína A-sepharose	30
3.10.4 Preparação do conjugado marcado com peroxidase	31
3.10.5 Titulação do conjugado para pesquisa de antígenos em amostras de sobrenadante fecal, soro e de LBA	32
3.11 Padronização do teste ELISA para detecção de coproantígenos	32
3.12 Padronização do teste ELISA para detecção de antígenos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA	33
3.13 Padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA	34
3.14 Padronização do teste ELISA para detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA	35
3.15 Análises estatísticas	35
3.16 Normas de biossegurança	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Cinética de eliminação de ovos	38

4.2 Reconhecimento de coproantígenos de <i>S. venezuelensis</i> por anticorpo policlonal e cinética de detecção de coproantígenos -----	39
4.3 Participação dos leucócitos de amostras de sangue e de lavado bronco alveolar na infecção por <i>S. venezuelensis</i> -----	41
4.4 Cinética de detecção de antígeno de <i>S. venezuelensis</i> em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados -----	45
4.5 Dosagem de IgG em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i> -----	47
4.6 Cinética de detecção de imunocomplexo em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i> -----	49
4.7 Análise comparativa da cinética de detecção de antígeno em amostras de fezes, de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i> ---	51
4.8 Análise comparativa da cinética de detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i> ---	53
4.9 Análise comparativa da cinética de detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i>	53
5. DISCUSSÃO -----	57
6. CONCLUSÕES -----	64
REFERÊNCIAS -----	66
ANEXO -----	80

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
µm	Micrômetros
2n	Carga cromossômica
3n	Carga cromossômica
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>Biochemical oxygen demand</i>)
CBEA/UFU	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia
CD	Grupo de diferenciação (<i>Cluster differentiation</i>)
CEUA/UFU	Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia
CO ₂	Dióxido de carbono
d.p.i	Dias pós-infecção
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
ECP	Proteína catiônica de eosinófilo (<i>Eosinophil cationic protein</i>)
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilos
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EPO	Eosinófilo peroxidase (<i>Eosinophil peroxidase</i>)
FcR _γ	Receptor de alta afinidade gama
FcεRI	Receptores de alta afinidade da IgE
g	Gramas
g	Gravidade
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-monócito (<i>Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IE	Índice ELISA

IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G da subclasse 1
IgG2a	Imunoglobulina G da subclasse 2a
IgG4	Imunoglobulina G da subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
kg	Quilogramas
L1	Larvas rabditoides de primeiro estádio
L2	Larvas rabditoides de segundo estádio
L3	Larvas filarioides
L4	Estádio de diferenciação das larvas filarioides
LBA	Lavado bronco alveolar
M	Molar
mAb	Anticorpo monoclonal (<i>Monoclonal antibody</i>)
MBP	Proteína básica principal (<i>Major basic protein</i>)
mg/Kg	Miligramas por quilogramas
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIP	Proteína inflamatória de macrófago (<i>Macrophage inflammatory protein</i>)
MK886	Inibidor sintético do leucotrieno B ₄
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
n	Carga cromossômica
N	Normal
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaIO ₄	Periodato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAFR	Fator ativador de plaquetas

PAMPs	Vias moleculares patógeno-associadas (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Solução salina tamponada de fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS contendo 0,3% de Tween 20
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
pH	Ponto hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (<i>Real time polimerase chain reaction</i>)
s.c	Subcutânea
TGF β	Fator de transformação de crescimento beta (<i>Ttransforming growth factor β</i>)
Th	Linfócito T helper
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i> (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>tumoral necrosis factor-α</i>)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v/v	Volume-volume
x	Vezes
WT	Linhagem de camundongo selvagem (<i>Wild-type</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cinética de eliminação de ovos/g de fezes em fezes de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos infectados por *Strongyloides venezuelensis*. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). ** p < 0,01. 38
- Figura 2.** Curva padrão de detecção de coproantígenos de *S. venezuelensis* pelo teste ELISA. Diferentes concentrações do antígeno foram diluídas em sobrenadantes de amostras de fezes de ratos não infectados. CN: representa o controle negativo (fezes sem adição do antígeno). A linha tracejada representa o limiar de reatividade. 39
- Figura 3.** Detecção de antígenos de *S. venezuelensis* em amostras de fezes de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados, em diferentes diluições do sobrenadante fecal, por ELISA, e diferentes dias pós-infecção. A) Diluição 1:2 do sobrenadante fecal, B) Diluição 1:4, C) Diluição 1:8, D) Diluição 1:16, E) Diluição 1:32 do sobrenadante fecal. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *p< 0,05, **p< 0,01 e *** p< 0, 001. 40
- Figura 4.** Cinética de detecção de antígenos de *S. venezuelensis* em sobrenadante fecal de amostras de fezes (1:8) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. O controle (dia zero) é representado por c. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. 41
- Figura 5.** Contagem de leucócitos em amostras de sangue de ratos Wistar não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Contagem global de leucócitos (A), contagem diferencial de eosinófilos (B), neutrófilos (C) e de células mononucleares (D). As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *p< 0,05, **p< 0,01 e *** p< 0, 001. 43
- Figura 6.** Contagem de leucócitos em amostras de lavado bronco alveolar de ratos Wistar não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Contagem global de leucócitos (A), contagem diferencial de eosinófilos (B), neutrófilos (C) e de células mononucleares (D). As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *p< 0,05 e **p< 0,01. 44
- Figura 7.** Curva padrão de detecção de antígenos circulantes de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos. Diferentes concentrações do antígeno foram diluídas em amostras de soro negativo. CN: representa o controle negativo (soro sem adição do antígeno) (A). Cinética de detecção de antígenos circulantes de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle (B). A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *p< 0,05 e **p< 0,01. 46
- Figura 8.** Cinética de detecção de antígenos circulantes *S. venezuelensis* em amostras de lavado bronco alveolar de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *** p< 0,001. 47

- Figura 9.** Cinética de detecção de IgG específica para larva de *S. venezuelensis* em amostras de soro (A) e em amostras de lavado bronco alveolar (B) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$. 48
- Figura 10.** Cinética de detecção de imunocomplexos de *S. venezuelensis* em amostras de soro (A) e em amostras de lavado bronco alveolar (B) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 50
- Figura 11.** Painel comparativo da cinética de detecção de antígenos em amostras de fezes, de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 52
- Figura 12.** Painel comparativo da cinética de detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6).*** $p < 0,001$ 54
- Figura 13.** Painel comparativo da cinética de detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 55

RESUMO

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase normalmente é realizado mediante a detecção de larvas nas fezes; porém a quantidade de parasitos é limitada e a eliminação de larvas é reduzida e irregular. Sendo assim, o desenvolvimento de testes sorológicos confiáveis para o diagnóstico da estrogiloidíase torna-se uma alternativa necessária. O objetivo deste estudo foi demonstrar a cinética de detecção de coproantígenos e de antígenos, anticorpos e imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de lavado bronco alveolar (LBA) de ratos imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*. Para a cinética (0 e 5, 8, 13 e 21 dias pós-infecção (d.p.i)) de coproantígenos utilizou-se anticorpo policlonal anti-L3 produzido em coelhos. Para a detecção de antígenos e de imunocomplexos em amostras de soro e de LBA (0 e 2, 5, 8, 13 e 21 d.p.i), placas de microtitulação foram sensibilizadas com IgG anti-*S. venezuelensis* e com extrato alcalino de larvas para a detecção de anticorpos. A análise estatística foi realizada por Two Way ANOVA, seguida pela teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$ significativo. A cinética de eliminação de ovos/g de fezes mostrou que o pico ocorre no 8° d.p.i sendo significativamente maior nos animais imunossuprimidos ($p < 0,01$). O pico de detecção de coproantígenos nos animais não imunossuprimidos foi no 13° d.p.i ($p < 0,05$), sendo que nos animais imunossuprimidos a detecção foi antecipada para o 5° d.p.i. A detecção de antígeno em amostras de soro não foi uma boa ferramenta diagnóstica para avaliar a infecção enquanto que em amostras de LBA mostrou ser ferramenta auxiliar. A detecção de IgG específica para *S. venezuelensis* em amostras de soro de animais não imunossuprimidos foi preferencialmente durante o 5° e o 8° d.p.i. e em animais imunossuprimidos, durante toda a cinética experimental. Nas amostras de LBA, a detecção de anticorpos ocorreu do 8° ao 21° d.p.i em animais não imunossuprimidos e em animais imunossuprimidos, foi antecipada para o 2° d.p.i, como pico de reatividade no 5° d.p.i ($p < 0,05$). A detecção de imunocomplexos em amostras de soro de animais não imunossuprimidos foi possível do 5° aos 13° d.p.i e em animais imunossuprimidos, durante toda a cinética. Em amostras de LBA, a detecção de imunocomplexo foi maior em animais não imunossuprimidos. Concluiu-se que a detecção de coproantígeno e de imunocomplexos circulantes em amostra de soro e em amostras de LBA são uma alternativa para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase principalmente nos casos de imunossupressão.

Palavras-chave: *S. venezuelensis*, coproantígeno, imunocomplexo, imunossupressão, lavado bronco alveolar, ratos.

ABSTRACT

Kinetic of coproantigen, antigens, antibodies and immune complexes detection in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*

The definitive diagnosis of strongyloidiasis is normally done by detection of larvae on faecal samples; however, the number of parasites is limited in most cases and the elimination of larvae is irregular. Thus, developing reliable serological methods for the diagnosis of strongyloidiasis becomes imperative. The aim of this study was to establish a coproantigen, antigen, antibody and immune complex detection by enzyme-linked immunosorbent assay in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples of non immunosuppressed or immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. For kinetics of coproantigen detection (0 and 5, 8, 13 and 21 days post-infection (d.p.i)), we used an anti-L3 polyclonal antibody produced in rabbits. For antigen and immune complex detection in serum and BALF samples (0 and 2, 5, 8, 13 and 21d.p.i), the microtitre plates were coated with IgG anti-*S. venezuelensis* and with alkaline parasite extract for antibody detection. The statistical analysis were analyzed using Two Way ANOVA, followed by the Bonferroni test. The criterion for statistical significance was set at $p < 0,05$. The number of eggs/g of faeces recovered at 8 d.p.i was significantly higher for non immunosuppressed and immunosuppressed animals ($p < 0.01$). The coproantigen detection was significantly higher at 13° d.p.i in non immunosuppressed ($p < 0.05$) and in immunosuppressed it was anticipated to the 5th d.p.i. It was observed that antigen detection in serum samples was not a good approach for evaluating the infection however in BALF samples it showed superior results. In immunosuppressed animals, IgG specific for *S. venezuelensis* was preferentially detected during the 5° and 13° d.p.i and in immunosuppressed animals, during the entire experimental kinetics. In BALF samples, antibodies detection was observed from the 8° to the 21° d.p.i in non immunosuppressed animals and in immunosuppressed animals it was anticipated to the 2° d.p.i, with higher reactivity at 5° d.p.i ($p < 0.05$). The immune complex detection in serum samples of the non immunosuppressed animals was observed from the 5° to the 13° d.p.i and in immunosuppressed animals, during the entire kinetics. In BALF samples, immune complex detection was higher in non immunosuppressed animals. In conclusion, coproantigen and immune complex detection in serum and BALF samples are alternatives for early strongyloidiasis diagnosis, mainly in immunocompromised cases.

Keys-words: *S. venezuelensis*, coproantigen, immune complex, immunosuppression, bronchoalveolar lavage fluid, rats.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassall, 1902 é uma parasitose humana negligenciada e quando limitada ao trato gastro-intestinal geralmente é assintomática em hospedeiro imunocompetente, podendo tornar-se infecção disseminada ou hiperinfecção em casos de imunossupressão (KEISER; NUTMAN, 2004; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

O parasito intestinal *S. stercoralis* foi primeiro observado pelo médico francês Louis Normand em 1876, na cidade de Toulon - França, quando examinava fezes diarreicas de soldados franceses que serviram na Conchinchina, atual Vietnã. Bavay, farmacêutico e colaborador de Normand, classificou as formas encontradas nas fezes como *Anguillula stercoralis* (latim “Änguillula” = pequena enguia ou peixe longo e “stercus” = esterco) e como *A. intestinalis* as presentes na luz intestinal de indivíduos necropsiados (GROVE, 1996).

O nematódeo *Strongyloides* sp, pertence ao ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae que é composta por parasitas de interesse médico e veterinário (NCBI, 2011). O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas tem importância clínica para o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* von Linstow (1905). A primeira espécie tem distribuição mundial, especialmente nas regiões tropicais, podendo também infectar cães, gatos e macacos e a segunda, é encontrada na África e nas Filipinas (SPEARE, 1989; PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996; SHARIATI et al., 2010).

No Brasil, a importância desse parasito como agente etiológico da estrogiloidíase ou anguilulose, foi salientada primeiramente por Ribeiro da Luz em 1880. A partir de então, estudos têm sido realizados demonstrando variações

na prevalência dessa parasitose em decorrência de vários fatores, principalmente como idade, diferenças geográficas e sócio-econômicas (GENTA, 1989; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

1.1 Aspectos morfo-biológicos do gênero *Strongyloides*

As espécies do gênero *Strongyloides* apresentam duas gerações, uma de vida livre e outra parasitária, com dimorfismo sexual na primeira e a presença de apenas fêmeas na segunda (MORAES, 1948). Seis formas evolutivas: fêmea partenogenética parasita e de vida livre, macho de vida livre, ovos e larvas rhabditóide e filarioide são distintas morfologicamente (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2005).

A fêmea partenogenética parasita tem aspecto filiforme, com a extremidade posterior afilada. A de *S. stercoralis* mede cerca de 2,5 mm de comprimento por 40 µm de largura, enquanto a de *S. venezuelensis*, parasito natural de roedores, tem até 3,2 mm por 41 µm. Revestimento formado por uma cutícula delgada, com estriações transversais. O sistema digestório é formado por boca trilabiada; esôfago filariforme e longo; intestino simples; e orifício anal na extremidade posterior em posição transversal. Vulva ventral, posicionada no terço médio do corpo; dela parte o útero anfidelfo; seguem-se ovários, que dependendo da espécie são espiralados com o intestino; e ovidutos, com os ovos enfileirados em seu interior; estes órgãos formam o sistema reprodutor que ocupa até 2/3 do organismo (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

A fêmea de vida livre ou estercoral é fusiforme, com a porção posterior afilada. Tanto a de *S. stercoralis*, quanto a de *S. venezuelensis* são menores que a fêmea partenogenética e medem até 1,2 por 0,07 mm e 1,2 por 130 µm no comprimento e largura, respectivamente. A cutícula é fina e com leves estrias

marcando-a transversalmente. Nessa forma evolutiva, o sistema digestório também é simples e formado por boca pequena, esôfago curto e rabditoide, intestino simples e ânus próximo à extremidade posterior. O sistema reprodutor é organizado em vulva na região mediana do corpo, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal. O número de ovos no interior do útero é maior em relação à fêmea parasita (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

O macho de vida livre possui o corpo afusado e menor que o das fêmeas. Mede 0,7 mm de comprimento por 0,04 mm de largura em *S. stercoralis* e 0,9 mm por 70 µm em *S. venezuelensis*. Tem revestimento similar ao das fêmeas. O sistema digestório é organizado em boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples terminando em cloaca na região caudal. A cauda é recurvada ventralmente e apresenta dois espículos iguais copulatórios, sustentados pelo gubernáculo. A genitália é constituída pelos testículos, vesícula seminal e canais deferente e ejaculador (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

As larvas rabditoides são os primeiros estádios larvais (L1 e L2) das espécies de *Strongyloides* e medem de 200 a 300 µm no comprimento. As oriundas das fêmeas estercoral ou parasita são quase idênticas. Elas têm uma cutícula delicada e hialina recobrando-as. A boca é diminuta e o esôfago é do tipo rabditoide, com dilatações bulbiformes e constricção na porção mediana. O sistema digestório é continuado pelo intestino, que termina em abertura anal espaçada da extremidade posterior. Observa-se também um primórdio genital nítido, formado por agregado de células (MORAES, 1948; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

Após a segunda muda, as larvas diferenciam-se em L3, que são as larvas filarioides. As L3 são alongadas e finas e medem 0,05 mm de comprimento. Apresentam cutícula fina e estriada e cauda com detalhe entalhado

característico. O vestíbulo bucal é curto, o esôfago filarioide e o intestino longo e estreito com ânus posterior. Podem seguir o curso evolutivo ao penetrar no hospedeiro ou ainda em vida livre e essa diferença acarreta algumas pequenas mudanças na morfologia deste estágio (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

Ovos das fêmeas parasitas e de vida livre assemelham-se, com diferença apenas no tamanho, sendo os da última maiores. São estruturas elipsóides, de parede translúcida que permite visualizar no momento da oviposição o embrião parcial ou totalmente desenvolvido (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

1.2 Modo de transmissão e ciclo biológico de *S. stercoralis*

As espécies de *Strongyloides* têm ciclos evolutivos complexos (ANDERSON, 2000; FERREIRA et al., 2007; VINEY; LOK, 2007). A maioria destes helmintos apresenta habilidade de manter-se alternando gerações homogônicas ou diretas em etapas parasitárias e heterogônicas ou indiretas em repetidas proles de vida livre. Estas fases são comumente divididas nos ciclos parasitários partenogênético e no sexuado de vida livre, ambos monoxênicos (REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005; THOMPSON et al., 2005).

A infecção no homem ocorre pela penetração ativa das L3 na pele íntegra, ou ocasionalmente, através das mucosas, principalmente da boca e do esôfago, quando são deglutidas acidentalmente através de alimentos contaminados. Essas larvas secretam metaloproteases, enzimas que auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos (GROVE, 1996; MARUYAMA et al., 2006).

Ao encontrar o hospedeiro, as larvas filarioides infectantes penetram ativamente a pele ou mucosas alcançando a circulação linfática ou venosa e

chegando aos pulmões. Nos capilares pulmonares, segundo alguns, diferenciam-se em L4 quando estimuladas pelo uso de imunossupressores, atravessam o endotélio alveolar, sobem pela árvore brônquica, chegam à faringe, são deglutidas e alcançam o intestino delgado (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005), aí se estabelecendo como fêmea parasita.

A fêmea partenogenética parasita localiza-se no duodeno em contato com as glândulas de *Lieberkühn*, onde faz a postura de ovos larvados, que eclodem na mucosa e liberam as larvas rabditoides, transportadas nas fezes até o meio externo, onde dependendo das condições encontradas desenvolverão o ciclo homogônico (direto) ou heterogônico (indireto) (MORAES, 1948). Em modelos experimentais, foi demonstrado que em casos graves de imunossupressão as fêmeas parasitas podem alojar-se nas diversas regiões do intestino: duodeno, jejuno e até mesmo íleo (GONÇALVES et al., 2008).

No ciclo homogônico, que é o mais simples, as larvas rabditoides muito vorazes alimentam-se da microbiota das fezes, aumentam de tamanho e em 24 horas diferenciam-se em larvas de segundo estágio e após dois dias atingem o estágio de L3 que não ingerem alimento. Estas larvas morrem em uma a duas semanas, a menos que infectem ou reinfectem o hospedeiro (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005).

No ciclo heterogônico, mais complexo, as larvas rabditoides sofrem quatro diferenciações no solo e após 18 a 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005). O encontro dos adultos maduros favorece o acasalamento e na seqüência ocorre a postura de ovos larvados, dos quais eclodem L1 que desenvolvem para L3 sem passar pelo estágio de L2 de vida livre (YAMADA et al., 1991).

A definição do sexo das larvas rabditoides ocorre durante a oogênese ou embriogênese, sendo as cargas cromossômicas n , $2n$ e $3n$ correspondentes aos machos, fêmeas de vida livre e às larvas filarioides, respectivamente. Infecções

recentes produzem grandes quantidades de larvas infectantes que facilitam a reinfecção contínua do hospedeiro e as infecções crônicas favorecem o ciclo indireto que garante uma fonte de L3 por longos períodos de tempo, embora as taxas de produção sejam baixas. Nas infecções mais antigas, o número de machos de vida livre aumenta devido aos efeitos da imunidade do hospedeiro e da idade das fêmeas partenogênicas (MONCOL; TRIANTAPHILLOU, 1978; SHIWAKU et al., 1988).

Entre as infecções humanas causadas por nematódeos, *S. stercoralis* é o único que possui a habilidade de auto-infecção, tanto externa (onde as L1 na região perianal de indivíduos infectados diferenciam-se em L3 e aí penetram, completando o ciclo direto), quanto interna (onde as L1 na luz intestinal de indivíduos infectados, diferenciam-se em L3 que penetram a mucosa intestinal - íleo e cólon) o que faz a estrogiloidíase persistir por muitas décadas após o indivíduo ter sido infectado mesmo na ausência de novas infecções. A auto-infecção interna pode provocar a elevação do número de parasitos no intestino e nos pulmões, conhecido como hiperinfecção. O termo disseminação é usualmente restrito para infecções nas quais parasitos são encontrados em sítios ectópicos (LIU; WELLER, 1993; RAMACHANDRAN et al., 1998; SIDDIQUI; BERK, 2001 e 2003).

1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana

Parasitose de prevalência mundial, a estrogiloidíase tem distribuição heterogênea e estima-se que entre 30 e 100 milhões de pessoas encontram-se infectadas com *S. stercoralis* (PIRES; DREYER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; VINEY; LOK, 2007; OLSEN et al., 2009; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Dentre as infecções causadas por geohelminthos a estrogiloidíase está entre as seis primeiras. Esta posição refere-se apenas as infecções ativas, uma vez que o

número de pessoas potencialmente expostas ou com quadro de infecção subclínico é muito maior (BETHONY et al., 2006; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2007).

As larvas de *S. stercoralis* apresentam tropismos que podem ter correlações epidemiológicas na doença parasitária que causam: geotropismo negativo: movimento de ascensão das larvas pelas superfícies; histotropismo positivo: penetração das larvas infectantes pela pele; tigmotropismo positivo: tendência a se fixarem em substratos; termotropismo positivo: deslocamento para onde a temperatura for maior; hidrotropismo positivo: tendência de deslocamento para onde tiver água; quimiotropismo ao O₂ positivo; quimiotropismo ao CO₂ negativo; galvanotropismo indiferente e fototropismo indiferente (MORAES, 1948).

Foi definido por Stuerchler (1981 apud PIRES; DREYER, 1993) as regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção por *S. stercoralis*: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). As áreas hiperendêmicas estão situadas, principalmente, entre os trópicos, especialmente nos países em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; FARDET et al., 2007; DEVI; BORKAKOTY; MAHANTA, 2011).

Nas regiões desenvolvidas do mundo, como Sudeste da América do Norte e Europa, as infecções são freqüentes em trabalhadores do campo e também tem origem não autóctone em razão dos imigrantes e visitantes de áreas endêmicas (CELEDON et al., 1994; SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008). Nos países desenvolvidos as infecções helmínticas, incluindo a strongiloidíase, podem ser controladas por programas de atenção básica à saúde e medidas de saneamento efetivo (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

No Brasil, várias doenças causadas por parasitos ainda possuem alta prevalência. Entretanto, como em um mesmo país podemos encontrar áreas altamente desenvolvidas contrastando com áreas bastante pobres, a prevalência

e o espectro parasitário variam muito. Pode-se dizer que esta variação se deve a diversos fatores observados nas diferentes áreas, como: sócio-econômicos, educacionais, condições sanitárias e ambientais (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

Os estados de maior ocorrência da estrogiloidíase são Amazonas, Alagoas, Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). No município de Uberlândia (MG) foi reportado 13% de positividade em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), 3,31 % em crianças hospitalizadas (PAULA et al., 2000), 33,3% em alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002), 12% em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)/ síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SILVA et al., 2005); os quatro trabalhos utilizaram os métodos de Baermann-Moraes (1917; 1948) e de Lutz (1919). Ainda em Uberlândia, estudos realizados por Mendonça et al. (2006) mostraram 3,8% de prevalência de estrogiloidíase em pacientes diabéticos, 9,1% em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO et al., 2008) e 4,4% em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009), com a mesma metodologia coprodiagnóstica. Estes resultados revelam que a região é área hiperendêmica.

1.4 Sintomatologia da estrogiloidíase humana

Muitos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto que outros podem apresentar desconfortos intestinais. A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resultam em reação inflamatória, podendo ocorrer síndrome de má absorção, diarreia crônica com perda proteica, dor abdominal, hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia e anemias (GROVE, 1996; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007).

Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou

sem expectoração, dispnéia, crises asmátiformes decorrentes das larvas filarioides e ocasionalmente de fêmeas, que aí podem atingir a maturidade liberando larvas rabditoides. A migração e a diferenciação das larvas filarioides podem provocar rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e podem ser limitados ou em casos mais graves, provocar a Síndrome de Löeffler, edema pulmonar e insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; TING, 2000; MUKERJEE et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005).

A cronicidade da infecção por *S. stercoralis* ocasiona exposição constante dos antígenos do parasito aos componentes celulares e humorais do sistema imune. O envolvimento de mecanismos imunológicos no processo fisiopatológico da estrogiloidíase não foi completamente elucidado (FOGAÇA et al., 1990; GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009).

1.5 Resposta imune do hospedeiro

Na estrogiloidíase, alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros apresentam sintomas leves com cura espontânea, e outros ainda, a hiperinfecção com doença disseminada. A variação destes sintomas pode estar relacionada com a capacidade do sistema imunológico de desenvolver ou não resposta imune contra o parasito e curar a infecção, ou do grau de infecção que resultaria em menor ou maior sintomatologia (GROVE, 1996; FARDET et al., 2007).

Independente da extensa complexidade dos organismos, na maioria dos casos as respostas imunes dos hospedeiros contra os parasitos são similares, sendo respostas T-dependentes com perfil Th2, com a produção de Interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, resposta humoral mediada por IgE e resposta celular mediada por eosinófilos e mastócitos (GAUSE; URBAN; STADECKER,

2003, NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006, FERREIRA et al., 2007, RODRIGUES et al., 2009). A produção de IL-4 que é necessária para proteção contra diversos helmintos limita a gravidade da infecção interferindo na resposta imune diretamente na fisiologia do intestino, aumentando o conteúdo de fluido no trato digestório. Este aumento de fluido é decorrente do aumento da permeabilidade intestinal e redução da absorção de líquidos (GOLDHILL et al., 1997).

No mecanismo T-independente, moléculas inflamatórias inespecíficas secretadas por macrófagos incluindo *tumoral necrosis factor- α* (TNF α) e IL-1, contribuem para a proliferação de células caliciformes e provocam aumento na secreção de muco, que reveste os parasitos e levam à sua expulsão (MARUYAMA et al., 2000, NEGRÃO-CORRÊA, 2001; COSTA-CRUZ, 2005). A mucina gastrointestinal é um constituinte da barreira luminal que é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. As glicoproteínas poliméricas do muco são ricas em resíduos dos aminoácidos serina e treonina, que fornecem numerosos sítios de ligação para oligossacarídeos presentes na superfície de parasitos. Se o invasor vence a primeira linha de defesa há em nível de epitélio e lâmina própria os *Toll-like receptors* (TLRs) que fazem parte da resposta imune inata e reconhecem os parasitos via *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). A estimulação desta via leva à produção de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias pelas células dendríticas e macrófagos. Dependendo do TLR estimulado, haverá polarização de uma resposta adaptativa de perfil Th1 para o Th2, por exemplo, a sinalização pelo TLR-2 induz a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003, KEREPESEI et al., 2007). A IL-12 e a IL-18, citocinas produzidas primariamente pelos macrófagos e outras células acessórias, induzem a produção de interferon- γ (INF- γ) que favorece a proliferação e a ativação das células Th1, modulando ou inibindo a resposta imune protetora dependente de Th2 (ARIZONO et al., 2007).

Os eosinófilos são fundamentais para a resposta protetora contra

helminhos (TRAJMAN; MACDONALD; ELIA, 1997; COSTA-CRUZ, 2005, ARIZONO et al., 2007; FERREIRA et al., 2007). Eles sintetizam e estocam em grânulos citoplasmáticos as proteínas catiônicas: *major basic protein* (MBP), *eosinophil cationic protein* (ECP), *eosinophil peroxidase* (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN); estas proteínas são as responsáveis pelos maiores danos teciduais atribuídos aos eosinófilos. Após a ativação celular são secretados mediadores secundários: leucotrienos, fator ativador de plaquetas, outros mediadores lipídicos, peptídeos da inflamação aguda [IL-1, IL-8, *macrophage inflammatory protein* (MIP)], TNF α e citocinas imunoreguladora (IL-3, IL-4, IL-5), *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF), *transforming growth factor* β (TGF β). Estes mediadores provocam vasodilatação, aumento da secreção de muco e contração da musculatura lisa (MEEUSEN, 1999, MACHADO et al., 2005).

Anticorpos das classes IgM, IgA e IgG específicos, além de IgE, também são produzidos pelo hospedeiro na resposta imune contra helmintos, incluindo *Strongyloides* sp. IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo entre 70 -75% do total de anticorpos séricos. Entre as subclasses de IgG forma-se, principalmente, IgG1 e IgG4 na elaboração da resposta contra *S. stercoralis*. Credita-se à IgG4 o bloqueio na resposta protetora promovida pela IgE, ou seja, modula as respostas alérgicas IgE-mediadas pela ligação em sítios dos mastócitos (ATKINS et al., 1997, 1999; RODRIGUES et al. 2007). É possível que o aumento nos níveis de IgG4, que se segue às infecções primárias, reduza a expulsão dos parasitos o que permite o estabelecimento das fêmeas parasitas. Assim, a estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas de hipersensibilidade (IgE-mediadas) para a persistente autoinfecção, com conseqüente redução dos efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997). No entanto, nos casos de doença disseminada e de imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS et al., 2008).

IgA é o segundo anticorpo mais presente no soro e representa a classe

mais proeminente nas mucosas e suas secreções. Pelo fato do ciclo biológico do parasito apresentar o envolvimento de mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por imunoglobulina A (ATKINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; MOTA-FERREIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012). Pacientes com sintomatologia grave tem redução significativa da concentração de IgA e IgM, entretanto, não há alteração nos níveis de IgG (COSTA-CRUZ, 2005).

1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é incerto uma vez que a maioria dos casos é assintomático, ou quando com sintomatologia presente, os sintomas pulmonares e intestinais são comuns à outras parasitoses. Com isso, é necessária a utilização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWA; GHOSHAL, et al., 2009).

O diagnóstico da estrogiloidíase humana é confirmado pelo encontro das formas parasitárias de *S. stercoralis* nas fezes. Os parasitos, menos rotineiramente, podem ser encontrados em fluidos de aspirado duodenal, lavado bronco alveolar (LBA), escarro, urina, esfregaço de sangue periférico e líquor; ou amostras de tecido sólido, como de biópsia de pele e endoscopia do sistema digestório (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; DOORN et al., 2007; KAKATI et al., 2011).

Na grande maioria dos indivíduos, *S. stercoralis* é encontrado em um número reduzido, devido a baixa e irregular eliminação das larvas nas fezes. Desta forma as técnicas de rotina para o exame coproparasitológico como Hoffmann, Pons e Janer (1934), Faust; Sawitz; Tobie (1939) e Ritchie (1948) não são sensíveis para a detecção deste parasito. Os métodos parasitológicos de

Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) são indicados, pois se baseiam no hidro e termotropismo das larvas, ainda assim, são necessárias sete amostras de fezes colhidas em dias alternados para o diagnóstico de certeza (ANDRADE-NETO, ASSEF, 1996; UPARANUKRAW et al., 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001; INÊS et al., 2011).

Estudos demonstraram sensibilidade dos exames de fezes com variação de 15 a 24%, com uma amostra, aumentando entre 55 e 78% quando utilizadas três amostras. No intuito de facilitar o diagnóstico, com o aumento da sensibilidade do exame coprológico, foram desenvolvidas técnicas de cultivo dos estádios larvais. As técnicas de cultura mais comuns são a de cultura em papel filtro (HARADA; MORI, 1955) ou em placa de ágar (KOGA et al., 1991; STEINMANN et al., 2007; INÊS et al., 2011).

O diagnóstico imunológico da estrogiloidíase tem sido direcionado preferencialmente para a detecção de anticorpos da classe IgG contra antígenos larvais somáticos, principalmente no soro (LINDO et al., 1994; SATO et al., 1995, SILVA et al., 2003). Acredita-se que estes testes sejam mais sensíveis que o exame parasitológico, mas não são utilizáveis para diferenciação entre a infecção crônica e a infecção ativa e nem disseminação, além do fato de estarem correlacionados com a intensidade da resposta imune do indivíduo, sofrendo influência da idade, entre outros fatores (LINDO et al., 1994). Assim, para contribuir com o diagnóstico precoce, foi desenvolvida a detecção de antígenos parasitários em amostras fecais por ensaios imunológicos, método que também tem a vantagem de ter grande sensibilidade, fator importante quando se considera os pacientes imunodeficientes, de grupo de risco para a estrogiloidíase (BAILEY, 1989; NAGESWARAN; CRAIG; DEVANEY, 1994).

Testes imunológicos como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e *immunoblotting* têm sido úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro, nos casos de formas assintomáticas

com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soropidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (FOGAÇA et al., 1990; LINDO et al., 1994; BOSCOLO et al., 2007; DOORN et al., 2007). Porém, a maior limitação encontrada na padronização de testes mais específicos é a dificuldade de obter-se larvas filarioides de *S. stercoralis* para a produção do extrato antigênico homólogo.

Na tentativa de melhor acurácia no diagnóstico da estrogiloidíase, foi desenvolvido utilizando a ferramenta de biologia molecular o uso de antígeno recombinante de larva filarioide purificado em reação imunoenzimática (RAVI et al., 2002).

Recentemente padronizou-se a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) para detecção de DNA de *S. stercoralis* em material fecal humano (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2011).

1.7 Imunossupressão e ação modulatória da dexametasona

Os glicocorticoides são esteroides anti-inflamatórios produzidos na zona fasciculada do córtex da adrenal. Como são moléculas lipossolúveis, difundem-se facilmente através das membranas celulares. Exercem seus efeitos pela ligação aos receptores que se encontram no citoplasma, então o complexo é translocado para o núcleo, ligando-se em genes alvos inibindo a transcrição de vários genes para citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão (NEWTON, 2000; LIBERMAN et al., 2007).

A dexametasona é um glicocorticoide que possui amplo espectro de ação, sendo um potente anti-inflamatório e imunossupressor uma vez que ela age sobre vasos sanguíneos, diversos mediadores, precursores e tipos celulares inflamatórios e tem atividade marcante sobre o sistema imunológico. Tem um

efeito sobre a concentração, a distribuição e a função dos leucócitos periféricos, bem como efeitos supressores sobre a produção de citocinas e de outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação (ROBERT et al., 1995; PARFITT, 1999).

Com relação às infecções helmínticas, os glicocorticoides atuam inibindo a ativação, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias, como eosinófilos e mastócitos através de bloqueio das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pelo recrutamento e sobrevivência dessas células. Estudos mostraram que os glicocorticoides, além de inibir a ação de IL-5 na sobrevivência dos eosinófilos, também podem atuar como inibidores da proteína básica principal presentes nos eosinófilos (WALLEN et al., 1991).

Utilizando *Rattus norvegicus* Wistar imunossuprimidos com dexametasona e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*, Tefé-Silva et al. (2008) demonstraram que o uso de drogas com ação imunomodulatória, tais como a dexametasona, pode interferir na morbidade no ciclo pulmonar, durante a infecção por *S. venezuelensis*, contribuindo para revelar os mecanismos envolvidos na sua patogênese.

1.8 Modelos experimentais na estrogiloidíase

Para o estudo da infecção humana bem como para a biologia de seu agente causador, tem sido utilizado como modelo experimental o parasito da espécie *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934) (BAEK; ISLAM; MATSUDA, 1998; GONÇALVES et al., 2008). Esses helmintos parasitam roedores silvestres, e podem ser favoravelmente mantidos em roedores de linhagens desenvolvidas para uso na pesquisa. Ratos e camundongos são facilmente sustentados em laboratório, eliminam considerável número de ovos nas fezes, a coprocultura não oferece risco de infecção para os manipuladores e o tempo na estufa é reduzido.

Assim, pode-se manter a produção de antígeno no laboratório de forma constante e segura (GROVE; BLAIR, 1981; NORTHERN et al., 1989; SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001; GONÇALVES et al., 2012).

Em infecções experimentais, as larvas infectantes de *S. venezuelensis* percorrem, obrigatoriamente, um trajeto pulmonar antes de se estabelecerem na mucosa duodenal do hospedeiro, similar à migração de *S. stercoralis* em humanos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2003; FERREIRA et al., 2007), o que permite o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro.

Diante da dificuldade de obtenção de extrato antigênico homólogo, diversos estudos têm sido realizados a partir de extrato antigênico heterólogo no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, necessitando para isso do modelo experimental. Machado et al. (2003) afirmaram que o extrato alcalino de larva de *S. venezuelensis* demonstrou alta sensibilidade e especificidade para a detecção de IgG específica em amostras de soro humano pelo teste ELISA e que pode ser empregado no diagnóstico. Purificando o extrato bruto larval de *S. venezuelensis* com triton X-114, Feliciano et al. (2010) verificaram que a fração detergente do extrato salino demonstrou alta especificidade, indicando fonte de peptídeos específicos para o diagnóstico na sorologia humana. Além disso, recentemente, Gonçalves et al. (2012) verificaram que os extratos alcalinos produzidos a partir de fêmeas partenogênicas parasitas e de ovos de *S. venezuelensis* podem ser utilizados como fonte alternativa no imunodiagnóstico, embora o melhor extrato antigênico continue a ser o extrato produzido a partir de larvas filarioides.

Embora a resposta Th2 esteja associada com a proteção do hospedeiro na maioria dos modelos experimentais de infecção por helmintos em murinos, o exato mecanismo responsável por este fenômeno ainda não foi completamente esclarecido (LAWRENCE et al., 1995; NEGRÃO-CORRÊA, 2001). Desse modo, vários estudos experimentais buscam compreender a complexa interação imunológica entre parasito e hospedeiro. Pesquisas *in vitro* demonstraram que os

eosinófilos sozinhos ou em conjunto com outros componentes do sistema imune tais como anticorpos ou complemento podem mediar a morte de nematódeos (GALIOTO et al., 2006). Utilizando modelos experimentais, Coffman et al. (1989) e Urban; Katona; Finkelman (1991) observaram que em camundongos tratados com anticorpo monoclonal (mAb) para IL -5 há uma depleção dos eosinófilos, o que resulta no bloqueio da imunidade para outras infecções. Camundongos deficientes em IL-5 são incapazes de induzir eosinofilia tanto sanguínea quanto tecidual quando infectados por helmintos contribuindo para a sobrevivência do parasito (OVINGTON et al., 1998). Estudos complementares demonstraram que em camundongos transgênicos para IL-5 houve aumento na produção de IL-5, com consequente eosinofilia sistêmica (LEE et al., 1997), diminuindo a sobrevivência de vários nematódeos intestinais (SHIN et al., 1997; HERBERT et al., 2000).

Outros autores investigaram a interação do parasito com o intestino do hospedeiro e demonstraram que a expulsão da fêmea partenogenética de *Strongyloides* sp. da mucosa intestinal de camundongos e ratos, está associada com a hiperplasia de mastócitos intraepiteliais através da ativação de mediadores inflamatórios (ABE; NAWA, 1987; NAWA et al., 1994). A ativação destes mediadores é induzida pelo processo de liberação de grânulos pré-formados, através da ligação cruzada de receptores de alta afinidade da IgE (FcεRI) (BEAVEN; METZGER, 1993; MARUYAMA et al., 2000). Onah; Nawa, (2004) demonstraram que camundongos geneticamente deficientes em receptor de alta afinidade gama (FcγR) são susceptíveis à infecção por *S. venezuelensis*, devido à redução no número de mastócitos intestinais.

Camundongos infectados por *S. rattii* e *S. venezuelensis* na primeira infecção induzem imunidade, na segunda infecção tornam-se resistentes ao parasitismo. Essa resistência foi demonstrada pela diminuição da produção de ovos pelas fêmeas partenogenéticas de ambas espécies e foi devido à alta produção de IL-5 e aumento de eosinófilos (KORENAGA et al., 1995). Resultados

semelhantes foram demonstrados por Baek et al. (2003), que observaram a ocorrência da resposta protetora em ratos infectados por *S. venezuelensis*. Além disso, verificaram que após a infecção inicial com 1000 L3 de *S. venezuelensis*, todos os ratos dos grupos experimentais desenvolveram algum grau de infecção com alta população de larvas filarioides nos pulmões no terceiro dia pós-infecção, e parasitos adultos no intestino delgado no sétimo dia pós-infecção entre animais imunossuprimidos e não imunizados; no 42º dia pós-infecção, os parasitos foram expelidos gradualmente. Os primeiros ovos apareceram nas fezes no sexto dia pós-infecção, sendo que o pico de eliminação foi no nono dia pós-infecção, tendendo a zero no 38º dia pós-infecção, nos animais controles.

Em estudo experimental de coproantígenos, Nageswaram et al. (1994) realizaram a detecção de antígeno em amostras fecais de ratos experimentalmente infectados por *Strongyloides ratti* utilizando o teste ELISA. Os dados foram bastante promissores, sinalizando alternativa para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase na prática laboratorial. No entanto, um fator relevante é considerar a cinética de detecção desse antígeno no modelo experimental dando ênfase à imunossupressão, variável muito importante no contexto da estrogiloidíase atual, uma vez que percebe-se o aumento de transplante de órgão, disseminação do vírus da AIDS, desnutrição, diabetes, aumento do consumo de bebidas alcólicas e pacientes com câncer gastrointestinal que favorecem o desenvolvimento da parasitose (FERREIRA et al., 1999; KEISER; NUTMAN, 2004; MENDONÇA et al., 2006; MACHADO et al., 2008; MARCOS et al., 2008).

Para auxiliar no imunodiagnóstico, têm sido padronizadas técnicas de detecção de anticorpos das várias classes em amostras de soro de modelos experimentais. Camundongos infectados por *S. stercoralis* desenvolveram imunidade protetora mediada pelo aumento nos níveis de IgA, IgG e IgM específicos e não específico ao parasito (ABRAHAM et al 1995). Em camundongos parasitados por *S. ratti*, houve aumento significativo somente nos

níveis de IgG1 e IgM associados com a imunidade protetora contra a L3 (GROVE; NORTHEN; DAWKINS, 1985; ABRAHAM et al., 1995). Além disso, a depleção de anticorpos IgE específicos e não específicos não afeta o curso da infecção em camundongos parasitados por *S. rattii* (KORENAGA et al, 1995).

Em camundongos Swiss infectados por *S. venezuelensis* tratados e não tratados com inibidor sintético do leucotrieno B₄ (MK886) e camundongos controles verificaram que a concentração de IgG1 no soro de camundongos infectados foi mais elevada do que aquela vista nos animais controles, somente no 14º dia pós-infecção. Os níveis de IgG2a foram similares em todos os grupos estudados. Concentrações de IgE específico ao parasito no soro dos camundongos infectados aumentou significativamente somente entre os dias 7 e 14 pós-infecção, com o pico no dia 14. O tratamento com MK886 reduziu a concentração de IgE em 65% e 45%, respectivamente, nesses dois dias (MACHADO et al., 2005).

Estudo realizado com camundongos Balb/c previamente imunizados com antígeno de *S. venezuelensis*, ou infectados com larvas filarioides, demonstrou que todos os camundongos imunizados desenvolveram resposta imune predominantemente Th2, com produção de IgG1 e IgE, com intenso infiltrado de granulócitos na pele, pulmão e intestino (FERNANDES et al., 2008).

A análise do LBA em modelos experimentais permitiu a observação do aumento de leucócitos totais e de células mononucleares (MACHADO et al., 2005), dados que estão de acordo com estudos preliminares utilizando outros parasitos (KORENAGA et al., 1991; ROTMAN et al., 1996; MARUYAMA et al., 2000). Utilizando amostras de LBA de camundongos, Silveira et al., (2002) também verificaram a presença de processo inflamatório e produção de muco no quinto dia pós-infecção por *S. venezuelensis*, quando ocorre a migração de larvas dos pulmões para o intestino. Em amostra humana, foi possível detectar a estrogiloidíase em paciente imunocomprometido, pela visualização da larva

filarioide em lâmina corada pela técnica de Gram (ZHAO; ZAHRA, 2011). No entanto, não há registros na literatura demonstrando a utilização desse fluido biológico no imunodiagnóstico, detectando antígeno, anticorpo e imunocomplexo.

O advento da biologia molecular permitiu a padronização de técnicas mais sensíveis para detecção da estrogiloidíase. Em modelos experimentais, desenvolveu-se a *polimerase chain reaction* (PCR) em amostras fecais de ratos Lewis infectados experimentalmente por *S. venezuelensis* (MARRA et al., 2010), no entanto continua sendo inviável na rotina laboratorial devido aos custos.

Desse modo, tendo como modelo experimental o roedor *Rattus norvegicus*, hospedeiro natural de *S. venezuelensis*, acredita-se que o estudo pelo teste ELISA baseado na detecção de antígenos, anticorpos e imunocomplexos em diferentes amostras biológicas de hospedeiros imunossuprimidos representa potencial perspectiva para diagnóstico da infecção humana, sinalizando importância de aplicabilidade na clínica de pacientes imunodeprimidos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Demonstrar a cinética de detecção de coproantígenos e de antígenos, anticorpos e imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de lavado bronco alveolar de ratos imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*.

Objetivos específicos

1. Produzir extrato alcalino a partir de larvas filarioides de *S. venezuelensis*;
2. Produzir soro imune em coelhos para obtenção de IgG anti-larva de *S. venezuelensis*;
3. Produzir anticorpo policlonal secundário marcado com peroxidase (conjugado);
4. Padronizar a cinética de detecção de coproantígenos, antígenos, anticorpos e imunocomplexos circulantes de *S. venezuelensis* em amostras de soro e de lavado bronco alveolar.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob os protocolos de N° 004/08 e 172/10.

3.2 Animais

Foram utilizados 126 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) da linhagem *Wistar* Greenman & Donaldson (1906) com aproximadamente 120g e entre 4 a 6 semanas de idade. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo CEUA e pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA/UFU) onde os ratos foram mantidos durante o período experimental.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo I (ratos não imunossuprimidos): animais selvagens infectados com *S. venezuelensis*, n=30,

Grupo II (ratos imunossuprimidos): animais imunossuprimidos com fosfato de dexametasona e infectados com *S. venezuelensis*, n=30,

Grupo III (ratos controle não imunossuprimidos): animais não infectados, n=30,

Grupo IV (ratos controle imunossuprimidos): animais imunossuprimidos com fosfato de dexametasona e não infectados, n=30.

Para cada ponto da cinética experimental (0, 2, 5, 8, 13 e 21 dias pós-infecção (d.p.i)), foram utilizados 6 animais. Sendo que para a padronização dos testes imunológicos foram utilizados três ratos controle não infectados e três ratos imunossuprimidos não infectados.

3.3 Obtenção de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (Brumpt,1934) utilizada foi isolada de roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem é mantida em *Rattus norvegicus Wistar*, experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil e foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta para a infecção experimental.

Os ovos presentes nas fezes dos ratos *Wistar* infectados liberam larvas rabditoides (L1 e L2) de *S. venezuelensis*. Essas larvas foram mantidas em cultura de carvão animal granulado por 3 dias a 28°C, segundo Looss (IN: NEVES et al., 2005). Após este processo as L3 foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.3.1 Coprocultura pelo método de Looss

O material fecal foi cultivado pelo método de Looss (IN: NEVES et al., 2005) misturando-se partes iguais de fezes e carvão animal úmido. Para a mistura foi utilizado béquer, bastão de vidro, luvas descartáveis e recipientes plásticos descartáveis (100 mL). Os recipientes foram cobertos com gaze

cirúrgica. As culturas foram colocadas em estufa BOD - *Biochemical Oxygen Demand* (TE 390, Tecnal, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 25°C e 70% de umidade por três dias. Após este procedimento as L3 foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.3.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954) e processamento das larvas recuperadas

A recuperação das larvas filarioides de *S. venezuelensis* após a coprocultura pelo método de Looss (IN: NEVES et al., 2005) foi baseada no método de Rugai, Mattos e Brisola (1954). Cálices de sedimentação foram preenchidos com água corrente aquecida à temperatura de 40-45°C. Os recipientes de cultura, cobertos com gaze, foram embocados para o interior dos cálices, de modo que a água alcançasse toda a extensão da abertura. O sistema cálice e recipiente foi mantido em repouso por um período de 1 hora. O sedimento com larvas foi coletado com pipeta capilar longa e transferido para tubos de ensaio. Cada tubo de ensaio foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos e submetido a cinco lavagens em solução salina tamponada de fosfato (PBS) (0,15 M, pH 7,2), durante três minutos para retirada dos resíduos. Após a última lavagem, o sedimento de larvas foi ressuspenso em PBS e 10 µL desta suspensão foi diluída e analisada em microscópio óptico de luz em aumentos de 100x, para contagem das larvas filarioides (Eclipse E200, Nikon Instruments, Melville, EUA). As L3 de *S. venezuelensis* recuperadas e contadas foram utilizadas para a infecção experimental e produção de extrato antigênico.

3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona

Para a supressão imune, ratos Wistar (120g) do grupo II e do grupo IV foram tratados com Fosfato de Dexametasona 5 µg/mL em água durante 5 dias (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998). A solução foi preparada e colocada em mamadeiras nas gaiolas dos ratos correspondentes ao grupo dos imunossuprimidos. Diariamente, essa solução foi repostada conforme o consumo dos animais durante o período de imunossupressão.

3.5 Infecção experimental dos animais

Após quantificação das L3, o total de 30 ratos do grupo I e 30 ratos do grupo II (após a imunossupressão) foram inoculados com 1500 (L3) por via subcutânea (s.c).

3.6 Contagem de ovos/grama de fezes e produção do sobrenadante fecal

Durante todos os procedimentos experimentais, os ratos permaneceram individualizados em gaiolas para facilitar a retirada das amostras de fezes. Aos 5, 8, 13 e 21 d.p.i, os animais foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido. Em 1/2 do material fecal (aproximadamente 2g) foi realizada a pesquisa de ovos e em 1/2 foi estocada a -20°C para a produção do sobrenadante fecal utilizado nos testes imunológicos.

A estimativa do número de ovos/g de fezes foi realizada segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). Para a preparação do sobrenadante fecal, os espécimes congelados foram descongelados e acrescentados volume-volume (v/v) em PBS, contendo 0,3% de Tween 20 (PBS-

T). A suspensão foi misturada em tubos de centrífuga e então centrifugada a 1500 x g por 30 minutos.

3.7 Obtenção de extrato alcalino de larvas de *S. venezuelensis*

A extração antigênica foi realizada segundo Machado et al. (2003), sendo utilizadas 100.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*, adicionadas a 1 mL de NaOH 0,15 M (Merck, Germany) com inibidores de proteases; essa solução permaneceu em repouso por 6 horas a 4^oC sob agitação lenta. Subseqüentemente, foi adicionado HCl 0,3 M (Merck) até atingir pH 7,0 e a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4^oC. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951).

3.8 Coleta de sangue e de lavado bronco alveolar

Para a coleta de sangue, aos 0 e 5, 8, 13 e 21 d.p.i, seis ratos em cada tempo, após serem anestesiados com ketamina (60 mg/Kg) e xilazina (7 mg/Kg) s.c, foram submetidos à abertura da cavidade torácica para a coleta de sangue por meio de punção cardíaca. As amostras de sangue destinadas à obtenção do soro foram centrifugadas e o soro obtido foi armazenado separadamente em alíquotas a -20^oC até o momento do uso.

Para a retirada do LBA (aos 0 e 2, 5, 8, 13 e 21 d.p.i) seis animais em cada tempo, após a abertura da cavidade torácica os músculos que cobrem a traqueia foram rebatidos para a sua exposição. Com auxílio de uma cânula de poliestireno introduzida na traqueia, 1 mL de PBS contendo 0,5% de citrato de sódio à temperatura ambiente foi injetado nos pulmões e recuperado pela aspiração. Em seguida, o material destinado aos testes imunológicos foi armazenado em alíquotas a -20 °C até o momento do uso.

3.9 Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue e no LBA

Para a contagem global das células, realizada em câmara de Neubauer, 20 µL de sangue ou de LBA foram diluídos em 380 µL de solução de Turk. A contagem diferencial foi realizada através de esfregaço corado por Giemsa, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100X.

3.10 Produção de soro imune em coelhos

3.10.1 Imunização dos coelhos

Para a produção do anticorpo policlonal, foram utilizados dois coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, pesando aproximadamente 2,5 Kg. O soro imune foi obtido conforme protocolo descrito por Coligan et al. (1991). Antes da inoculação os animais passaram por um período de adaptação no CBEA/UFU, sendo submetidos a exames de fezes pelo método de Baermann (1917) – Moraes (1948) e de Hoffmann, Pons e Janer (1934) para descartar a possibilidade de uma infecção prévia. Após este período, foi colhida uma amostra de soro normal de cada coelho, com o intuito de serem utilizadas como soro padrão negativo. Posteriormente, os animais receberam 500 µg/mL de extrato alcalino de larvas de *S. venezuelensis* s.c. (obtido conforme descrito no item 3.7) emulsificado com adjuvante completo de Freund na primeira imunização (1ª dose). A cada duas semanas após a primeira imunização, foi realizado um reforço, com a mesma dose, volume e via subcutânea, utilizando adjuvante sem o *Mycobacterium* sp, adjuvante incompleto de Freund. As amostras de sangue dos coelhos foram colhidas por punção auricular, antes da inoculação e com intervalo de duas semanas no último mês das inoculações para avaliação dos anticorpos presentes. Após três meses de acompanhamento, ao atingir o título

ideal (1:20.000) de anticorpo, os animais foram submetidos a punção cardíaca com sangria total e as amostras de soro obtidas por centrifugação foram armazenadas a - 70°C até o momento de uso.

3.10.2 Obtenção de gamaglobulina imune

Para a obtenção da gamaglobulina imune, foi realizada a precipitação salina onde em 5 mL do anticorpo policlonal produzido em coelho, foi adicionado gota a gota 5 mL de solução de sulfato de amônio 3,12 M pH 6,5 em banho de gelo, sob agitação. Após 18 horas a 4°C a solução foi centrifugada a 3000 x g por 30 minutos à 4°C e o sedimento lavado três vezes em solução de sulfato de amônio 1,56 M pH 6,5, sob agitação.

O sedimento foi dissolvido em solução de sulfato de amônio na metade do volume original e dialisado por 24 horas a 4°C contra PBS com frequentes trocas de banho, após centrifugação a 3000 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi armazenado à -20°C. O conteúdo proteico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.10.3 Isolamento de IgG em proteína A-Sepharose

Para o isolamento de IgG, 1,5 g de proteína A-Sepharose CL-4B foi entumescida em 10 mL de PBS (0,01 M, pH 7,2) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi empacotada em coluna de 20 mL. Essa coluna foi equilibrada com tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0) utilizando no mínimo 10 vezes o volume da coluna. Posteriormente, a amostra diluída (v/v) foi aplicada em tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0). A coluna foi lavada com tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0) até que a absorbância em leitura a 280 nm fosse igual a zero e então, eluída com tampão glicina 0,1 M, pH 2,5 a 2,8. As frações, em torno de 2 mL, foram

coletadas, monitorando-as com leitura a 280 nm. Foi feito um *pool* das frações de maior absorvância e acertou-se o pH para 7,0 com NaOH 0,1M (Merck). Em seguida, foi dialisado em membrana por 24 horas, a 4°C contra PBS. A IgG obtida foi dosada quanto ao teor protéico pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.10.4 Preparação do conjugado marcado com peroxidase

Para o preparo do conjugado imunoenzimático, foi utilizada a metodologia descrita por Wilson e Nakane (1978). Para tanto, 5 mg de peroxidase (Horseradish Peroxidase tipo VI, Sigma Chemical CO, St Louis, MO) foi dissolvida em 1,25 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado gota a gota, 0,25 mL de NaIO₄ 0,1 M, sob agitação lenta a temperatura ambiente. Essa solução foi mantida sob agitação por 20 minutos e então dialisada contra tampão acetato 1 mM, pH 4,4 a 4°C, por 18 horas. Em seguida, foi diluída 10 mg de IgG de coelho a ser marcado em 1 mL de PBS. O pH da enzima oxidada e da solução de anticorpo foi neutralizado com tampão carbonato 0,5 M, pH 9,5. O valor foi verificado com papel indicador. A solução foi mantida sob agitação lenta, a temperatura ambiente, por 2 horas. Foram adicionados 65 µL de NaBH₄ 0,1 M e a solução foi mantida sob agitação como previamente descrito. Após, foi dialisada contra PBS a 4°C, por 18 horas para retirada de NaBH₄. Foi feita cromatografia em coluna (1,5 x 70 cm) de Sephadex G-75, coletando-se 50 gotas por tubo a um fluxo de \pm 8 gotas/minuto. O material foi lido a 280 e 403 nm e em seguida, foi feito um *pool* dos tubos contendo o conjugado e nova leitura feita a 280 e 403 nm. Foi então, concentrado cerca de 10 vezes e dialisado contra PBS por 18 horas a 4°C. O conjugado foi estocado em alíquotas a – 20°C.

3.10.5 Titulação do conjugado para pesquisa de antígenos em amostras de sobrenadante fecal, soro e de LBA

A titulação do conjugado anti-*S. venezuelensis* produzido a partir do antissoro específico para larva foi realizada pelo teste ELISA. As condições ótimas de processamento do conjugado foram determinadas separadamente para cada espécime (sobrenadante fecal, soro ou LBA), seguidas pela variável a ser pesquisada (antígeno). Para controle das reações, foram utilizados três padrões positivos de sobrenadante fecal, soro ou de LBA e três padrões negativos de sobrenadante fecal, soro ou LBA. O conjugado foi adicionado nas diluições de 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, sendo utilizado como controle do próprio conjugado somente PBS-T, por 45 minutos a 37 °C.

3.11 Padronização do teste ELISA para detecção de coproantígenos

Ensaio preliminares foram realizados para otimizar as condições de reação. Foram testados os dois tipos de placas (alta e baixa afinidade), diferentes concentrações de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* (5, 10, 20 e 40 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato para sensibilizar as placas, diferentes concentrações de extrato antigênico variando de 100 a 0,185 µg/mL diluídos em sobrenadante fecal de ratos controle imunossuprimidos ou não imunossuprimidos para verificar a diluição das amostras, diferentes tempos de incubação das amostras (45, 60, 90 e 120 minutos) e diferentes tempos de incubação após adicionar o conjugado (45 e 60 minutos).

Após a padronização, a cinética de detecção de coproantígenos pelo teste ELISA foi realizada em placas de microtitulação de alta afinidade (Corning-Costar, Laboratory Sciences Company, NY, USA) sensibilizadas com 50 µL/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* (40 µg/mL) em tampão carbonato-

bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos e então foram adicionados 50 µL das amostras de sobrenadante fecal (1:8) diluídas em PBS-T a serem testadas. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µL do conjugado no título de 1:40 por 45 minutos a 37°C, sendo lavadas novamente e reveladas pelo substrato H₂O₂ (Merck) + o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany), após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de H₂SO₄ 2N (Merck). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, McLean VA) utilizando filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / cut \text{ off}$, onde *cut off* foi estabelecido como a média de DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quando $IE > 1$.

3.12 Padronização do teste ELISA para detecção de antígenos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA

Ensaio preliminares foram realizados para determinar as condições ideais para o teste ELISA, utilizando diluição seriada dos reagentes (IgG anti-larva de *S. venezuelensis*, amostras de soro ou de LBA controle e conjugado).

Para avaliar a cinética de detecção de antígenos circulantes nas amostras, placas de microtitulação de baixa afinidade (BioAgency Laboratories, São Paulo, Brazil) (para as amostras de soro) e de alta afinidade (Corning-Costar) (para as amostras de LBA), foram sensibilizadas com 50 µL/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* (40 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Após incubação as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos; a seguir foram adicionados 50 µL/poço das amostras de soro ou de

LBA não diluídas. Para controle da reação foram utilizados PBS-T e soro ou LBA de ratos controles. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µL/poço do conjugado anti-IgG específico para larva de *S. venezuelensis* marcado com peroxidase produzido em coelhos no título ideal de 1:40 por 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas novamente e a reação foi revelada como descrito no item 3.11. As amostras foram consideradas positivas quanto $IE > 1$.

3.13 Padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA

Ensaio preliminares foram realizados para determinar as condições ideais do teste ELISA, pela diluição seriada dos reagentes (extrato alcalino de L3, amostras de soro ou de LBA controle e conjugado).

Placas de microtitulação de baixa afinidade para as amostras de soro e de alta afinidade para as amostras de LBA, foram sensibilizadas com 10 µg/mL do extrato alcalino de larvas de *S. venezuelensis* em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T e então, as amostras de soro (1:10) e as amostras de LBA puras foram adicionadas (50 µL/poço). Para controle da reação foram utilizados PBS-T e soro ou LBA de ratos controles. Após incubação de 45 minutos a 37 °C, as placas foram lavadas como descrito e adicionado 50 µL/poço do conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase (Sigma) no título de 1:8000. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C e após novo ciclo de lavagem a reação foi revelada como descrito no item 3.11. As amostras foram consideradas positivas quanto $IE > 1$.

3.14 Padronização do teste ELISA para detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e em amostras de LBA

Ensaio preliminares foram realizados para determinar as condições ideais do teste ELISA, pela diluição seriada dos reagentes (IgG anti-*S. venezuelensis*, amostras de soro ou de LBA controle e conjugado).

A cinética de detecção de imunocomplexos pelo teste ELISA foi realizada em placas de microtitulação de baixa afinidade (para as amostras de soro) e de alta afinidade (para as amostras de LBA) sensibilizadas com 50 µL/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* na concentração de 40 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Após incubação as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos cada lavagem; a seguir foram adicionados 50 µL/poço de soro (1/10) ou 50 µL/poço de LBA (puro). As amostras de soro ou LBA positivas para IgG anti-*S. venezuelensis* foram utilizadas como amostras de referência. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µL/poço do conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase (Sigma), no título de 1:8000. Após incubar por 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas novamente e reveladas como descrito no item 3.11. As amostras foram consideradas positivas quanto $IE > 1$.

3.15 Análises estatísticas

Para análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). As variáveis foram analisadas com os testes não-paramétricos por Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

3.16 Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2005).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Cinética de eliminação de ovos

Para comprovar a presença de infecção por *S. venezuelensis* realizou-se a cinética da eliminação de ovos em amostras fecais de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos. Observou-se que o dia inicial de eliminação de ovos em amostras fecais de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos foi o 5º dia pós-infecção (d.p.i), sendo o 8º d.p.i o pico de maior eliminação de ovos por grama de fezes, com diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos. Durante toda a cinética, os animais imunossuprimidos eliminaram maior número de ovos e, após o 13º d.p.i, houve decréscimo na eliminação em ambos os grupos. Contudo, foi possível observar que a partir do 21º d.p.i a eliminação de ovos em ratos não imunossuprimidos tende a zero, enquanto em ratos imunossuprimidos a infecção persistiu com elevada oviposição (Figura 1).

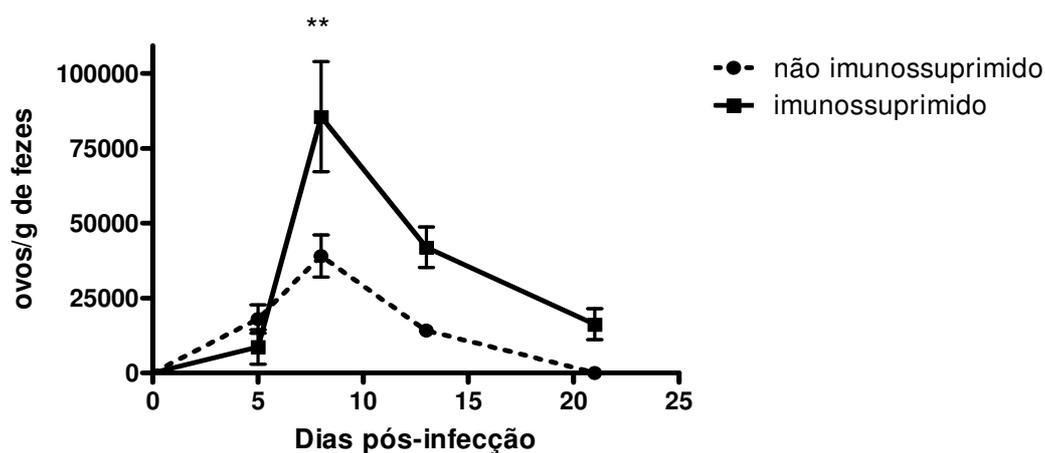


Figura 1: Cinética de eliminação de ovos/g de fezes em fezes de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos infectados por *Strongyloides venezuelensis*. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6).** $p < 0,01$.

4.2 Reconhecimento de coproantígenos de *S. venezuelensis* por anticorpo policlonal e cinética de detecção de coproantígenos

Para verificar o reconhecimento de coproantígenos pelo anticorpo policlonal no teste ELISA, foram utilizadas amostras fecais não infectadas acrescidas de antígeno de *S. venezuelensis* em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que o anticorpo obtido foi capaz de detectar antígeno de *S. venezuelensis* em amostras fecais até a concentração de 0,39 µg/mL, considerando que as duas concentrações inferiores testadas tiveram densidades ópticas próximas ao controle negativo e PBS. Como controle negativo foram utilizadas amostras fecais sem a adição do antígeno (Figura 2).

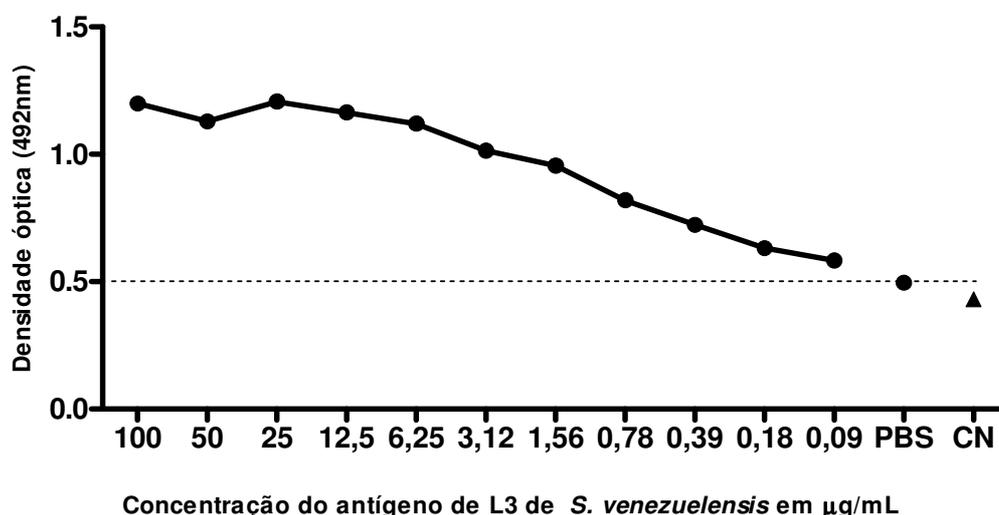


Figura 2: Curva padrão de detecção de coproantígenos de *S. venezuelensis* pelo teste ELISA. Diferentes concentrações do antígeno foram diluídas em sobrenadantes de amostras de fezes de ratos não infectados. CN: representa o controle negativo (fezes sem adição do antígeno). A linha tracejada representa o limiar de reatividade.

Para determinar as condições ótimas de diluição das amostras fecais para detecção de antígeno de *S. venezuelensis* por ELISA, utilizou-se diferentes diluições de sobrenadante fecal de ambos grupos experimentais, aos 5, 8, 13 e 21 d.p.i. Nos animais não imunossuprimidos, o pico de detecção de antígeno foi no 13° d.p.i com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todas as diluições. No 21° d.p.i, foi observada diminuição na detecção de coproantígeno

em todas as diluições realizadas. Nos animais imunossuprimidos, o perfil da cinética foi antecipado para o 5º d.p.i e no 8º d.p.i mostrou-se com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em todas as diluições quando comparado aos animais não imunossuprimidos (Figura 3).

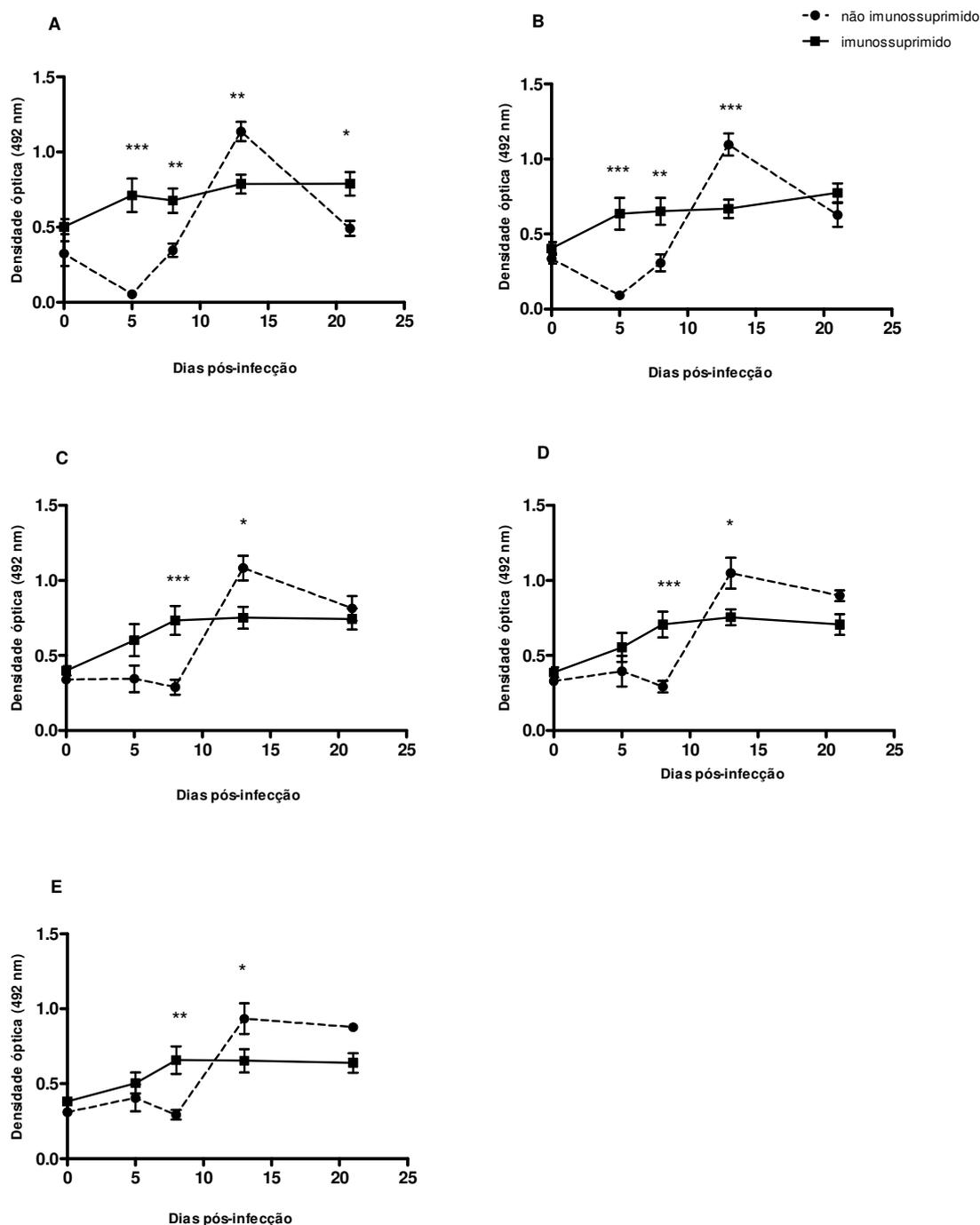


Figura 3: Detecção de antígenos de *S. venezuelensis* em amostras de fezes de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos, em diferentes diluições do sobrenadante fecal, por ELISA, e diferentes dias pós-infecção. A) Diluição 1:2 do sobrenadante fecal, B) Diluição 1:4, C) Diluição 1:8, D) Diluição 1:16, E) Diluição 1:32 do sobrenadante fecal. As barras indicam a média e o erro padrão ($n=6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A partir desses resultados, foi selecionada para análises posteriores a diluição de 1:8, por representar a média das outras diluições testadas com bons níveis de detecção, visando o melhor aproveitamento dos sobrenadantes fecais no uso da rotina laboratorial (Figura 4).

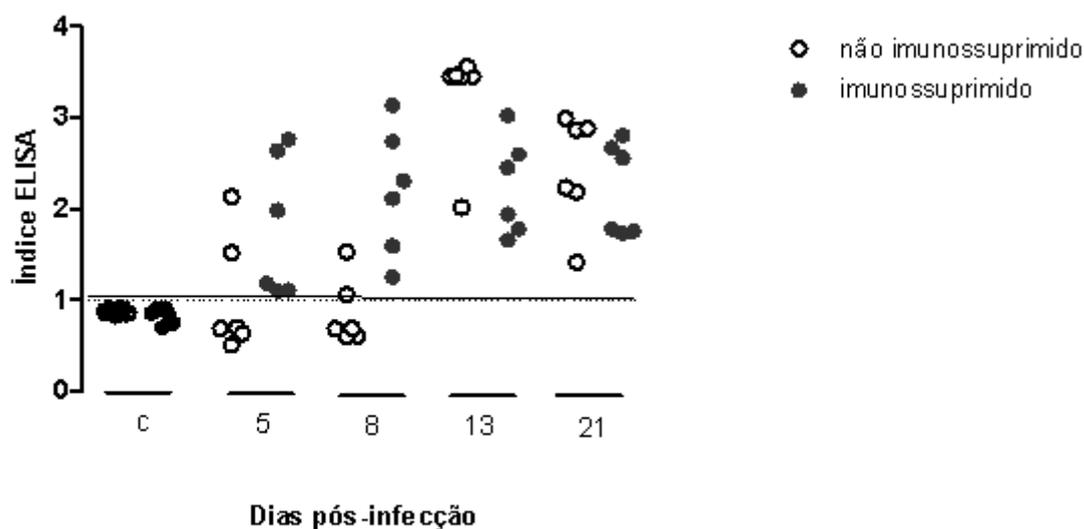


Figura 4: Cinética de detecção de antígenos de *S. venezuelensis* em sobrenadante fecal de amostra de fezes (1:8) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. O controle (dia zero) é representado por c. A linha tracejada representa o limiar de reatividade.

4.3 Participação dos leucócitos de amostras de sangue e de lavado bronco alveolar na infecção por *S. venezuelensis*

A contagem global de leucócitos e diferencial de eosinófilos, neutrófilos e de células mononucleares foi realizada em amostras de sangue de ratos não imunossuprimidos e ratos imunossuprimidos. O perfil de leucócitos totais durante toda a cinética foi semelhante em ambos grupos, sendo observado valores elevados para os animais não imunossuprimidos (Figura 5A). Os eosinófilos apresentaram maior pico no 8º d.p.i no grupo dos ratos não imunossuprimidos ($p < 0,01$), apresentando decréscimo e mantendo-se cinética linear a partir do 13º

d.p.i (Figura 5B). Quanto aos neutrófilos, a contagem foi significativamente menor no grupo dos ratos imunossuprimidos, mesmo antes do 5° d.p.i ($p < 0,001$) (Figuras 5C). Para as células mononucleares, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo dos animais não imunossuprimidos no 8° d.p.i.

Em amostras de LBA, a contagem total dos leucócitos mostrou-se significativamente aumentada no grupo dos animais não imunossuprimidos do 5° ao 13° d.p.i ($p < 0,05$) (Figura 6A). Os eosinófilos mostraram baixa contagem em ambos os grupos, sendo significativamente maior apenas no 5° d.p.i em animais não imunossuprimidos ($p < 0,05$) (Figura 6B). Neutrófilos foram significativamente reduzidos do 5° ao 8° d.p.i nos animais imunossuprimidos ($p < 0,05$) (Figura 6C) e as células mononucleares foi significativamente aumentada ($p < 0,05$) no 5° d.p.i em animais não imunossuprimidos (Figura 6D).

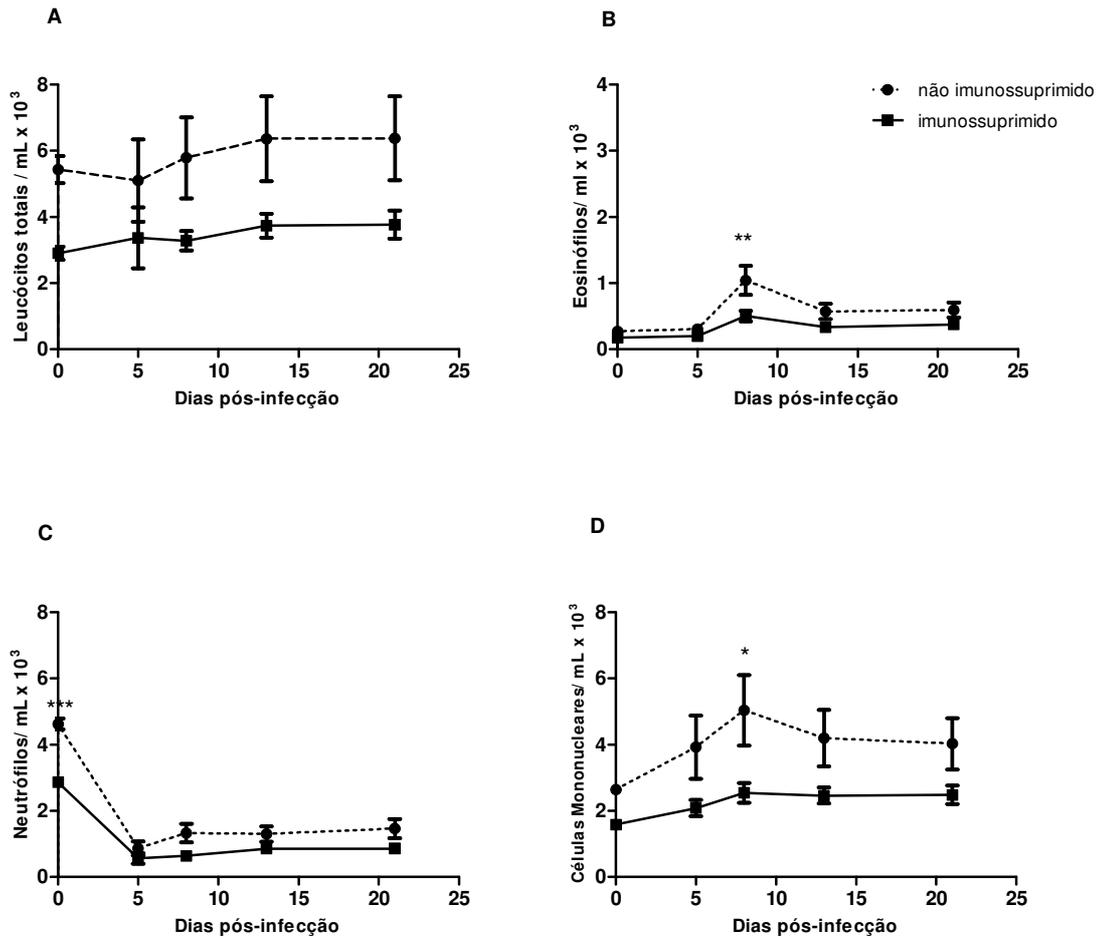
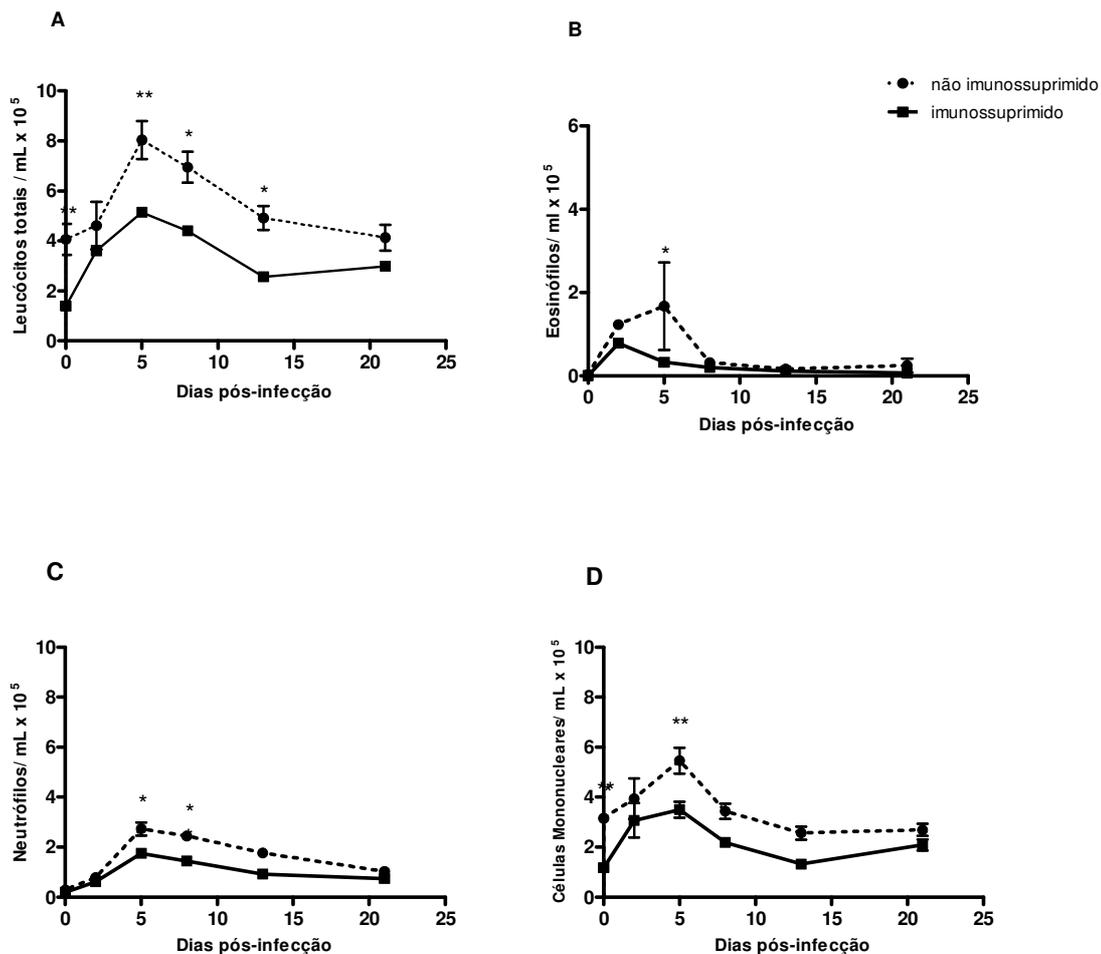


Figura 5: Contagem de leucócitos em amostras de sangue de ratos Wistar não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Contagem global de leucócitos (A), contagem diferencial de eosinófilos (B), neutrófilos (C) e de células mononucleares (D). As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0, 001.



4.4 Cinética de detecção de antígeno de *S. venezuelensis* em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados.

Durante a padronização das condições ótimas de reação, verificou-se que o anticorpo policlonal produzido em coelho detectou até 12,5 µg/mL de antígeno específico para larva de *S. venezuelensis* em amostras de soro, considerando que as duas concentrações inferiores testadas tiveram densidades ópticas próximas ao controle negativo e PBS (Figura 7A).

Após essa padronização, foi realizada a cinética de detecção de antígenos em amostras de soro dos ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e infectados por *S. venezuelensis*. Foi observado que a detecção de antígeno no soro não é uma boa ferramenta diagnóstica para avaliar a infecção em ambos grupos do estudo visto que os índices de reatividade ficaram abaixo do ponto de corte na maioria dos animais imunossuprimidos e quando apresentaram diferença significativa em relação ao controle (dia 0), os animais não imunossuprimidos no 8° d.p.i ($p < 0,01$) e no 13° d.p.i ($p < 0,05$) apresentaram índices de reatividade baixos (Figura 7B) ou pouco acima do limiar de corte.

Em amostras de LBA, observou-se que a detecção de antígenos mostrou ser ferramenta auxiliar na avaliação da cinética de infecção em ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos. Observou-se que as taxas de detecção do antígeno no 2° d.p.i foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e do 5° ao 21° d.p.i foram similares, pouco acima do limiar de reatividade (Figura 8).

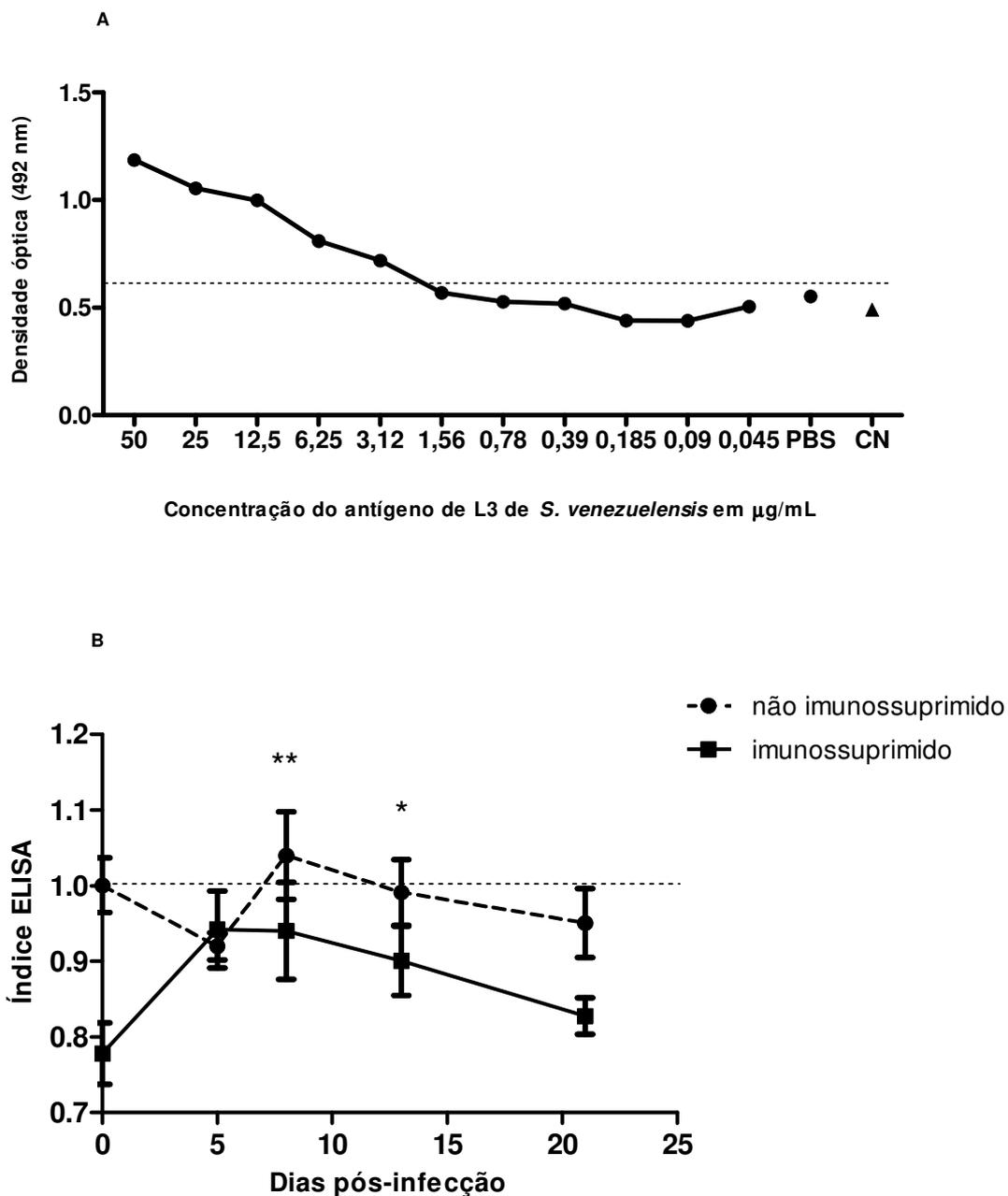


Figura 7: Curva padrão de detecção de antígenos circulantes de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos. Diferentes concentrações do antígeno foram diluídas em amostras de soro negativo. CN: representa o controle negativo (soro sem adição do antígeno) (A). Cinética de detecção de antígenos circulantes de *S. venezuelensis* em amostras de soro de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle (B). A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

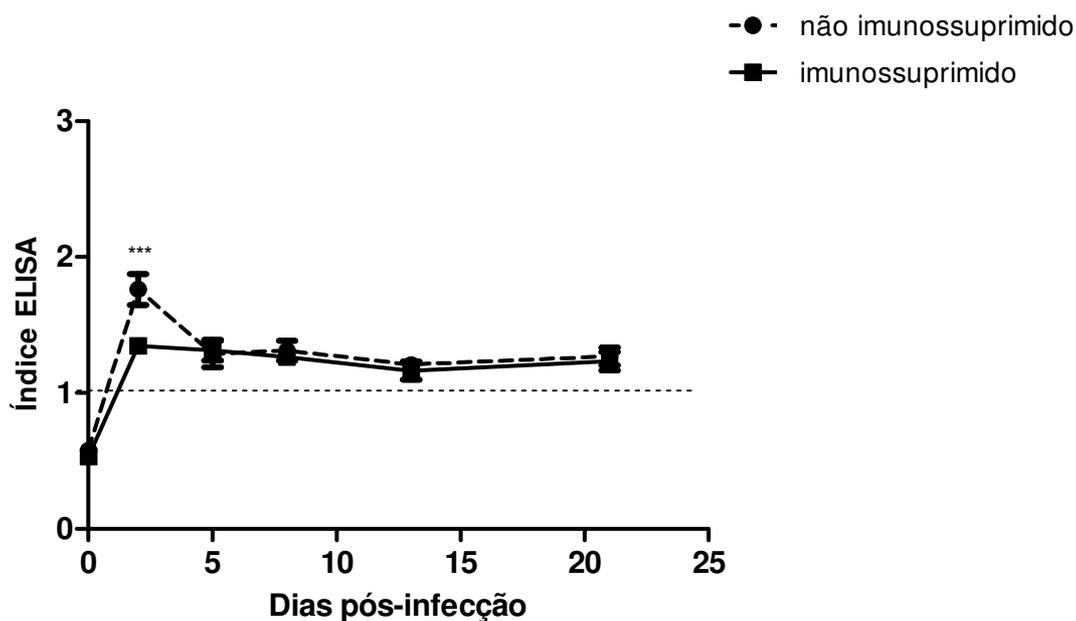


Figura 8: Cinética de detecção de antígenos circulantes *S. venezuelensis* em amostras de lavado bronco alveolar de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *** $p < 0,001$.

4.5 Dosagem de IgG em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*

Em amostras de soro, a IgG específica para larva de *S. venezuelensis* foi detectada preferencialmente durante o 5º e o 8º d.p.i em animais não imunossuprimidos, sendo capaz de apresentar redução significativa ($p < 0,05$) com índices de reatividade abaixo do limiar no 21º d.p.i. Nos animais imunossuprimidos, a IgG foi detectada durante toda a cinética experimental, persistindo inclusive no 21º d.p.i (Figura 9A).

Nas amostras de LBA, a IgG foi detectada a partir do 8º d. p.i em animais não imunossuprimidos, persistindo até o 21º d.p.i. Em animais imunossuprimidos, a detecção de anticorpos foi antecipada para o 2º d.p.i, como pico de reatividade no 5º d.p.i ($p < 0,05$) (Figura 9B).

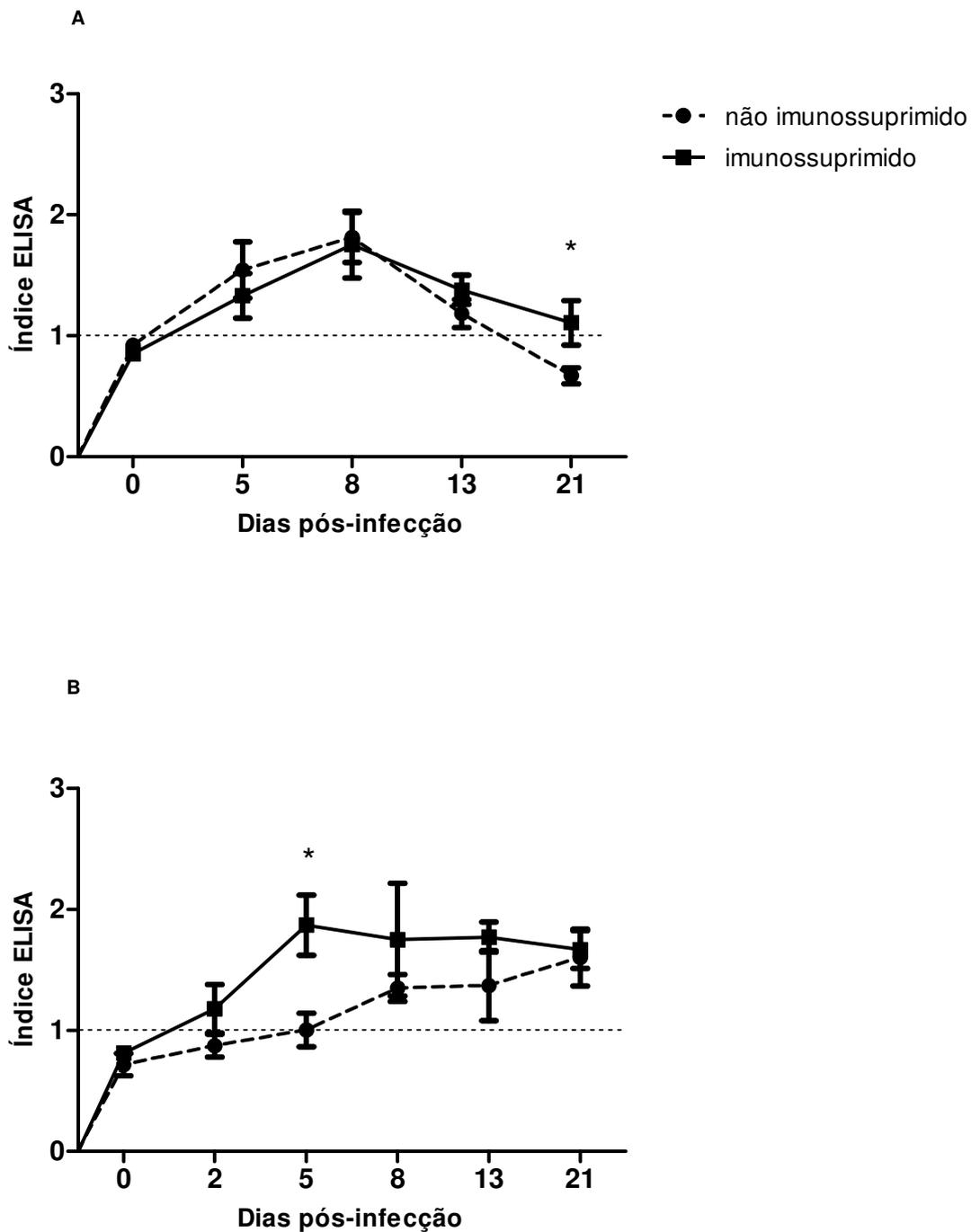


Figura 9: Cinética de detecção de IgG específica para larva de *S. venezuelensis* em amostras de soro (A) e em amostras de lavado bronco alveolar (B) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$.

4.6 Cinética de detecção de imunocomplexo em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*

A detecção de imunocomplexos em amostras de soro de animais não imunossuprimidos foi possível do 5° aos 13 d.p.i, ficando com índices de reatividade próximos ao limiar no 21° d.p.i. Em animais imunossuprimidos, a detecção foi possível até o 21° d.p.i (Figura 10A).

Em amostras de LBA, a detecção de imunocomplexo foi maior em animais não imunossuprimidos em todos os pontos da cinética, sendo estatisticamente significativa no 5°, 8° e 21° d.p.i. Nos animais imunossuprimidos, o imunocomplexo foi melhor detectado no 2° d.p.i, ficando do 5° ao 21° d.p.i próximos ao limiar de reatividade (Figura 10B).

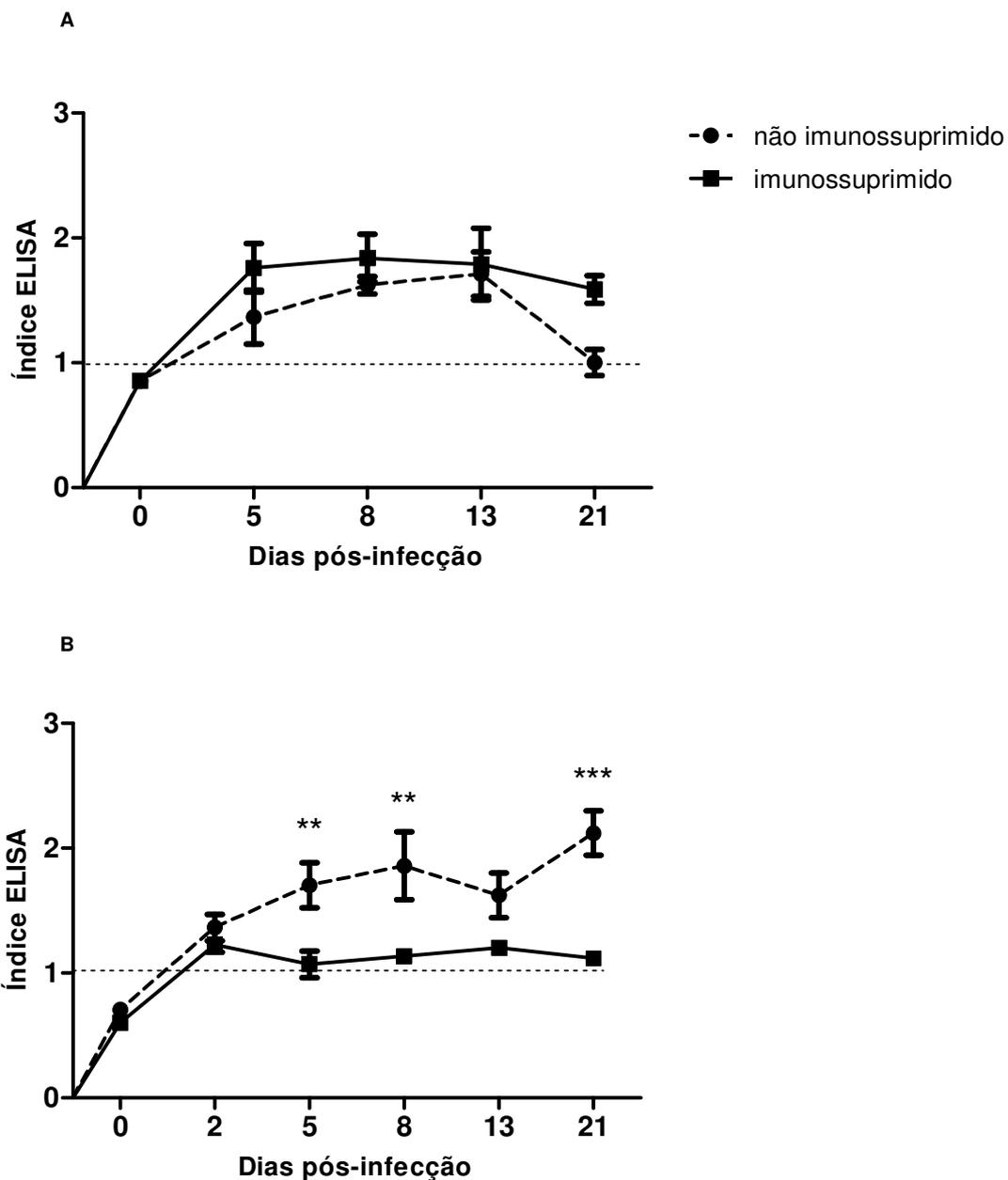


Figura 10: Cinética de detecção de imunocomplexos de *S. venezuelensis* em amostras de soro (A) e em amostras de lavado bronco alveolar (B) de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos experimentalmente infectados. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7 Análise comparativa da cinética de detecção de antígeno em amostras de fezes, de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*

No grupo dos animais não imunossuprimidos, a detecção de coproantígenos foi melhor no 13° e 21° d.p.i quando comparada à detecção em amostras de soro ($p < 0,001$) e em amostras de LBA ($p < 0,01$). Observou-se que a detecção de antígenos em amostras de LBA no 2° d.p.i foi efetiva, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no 5° e 8° d.p.i quando comparada à detecção de antígenos nas fezes. (Figura 11A).

Em animais imunossuprimidos, observou-se que a detecção de coproantígeno foi melhor desde o 5° d.p.i, com diferença significativa ($p < 0,001$) no 8°, 13° e 21° d.p.i quando comparada à detecção de antígeno em amostras de soro. A detecção de antígenos em amostras de LBA foi contínua em todos os pontos da cinética (Figura 11B).

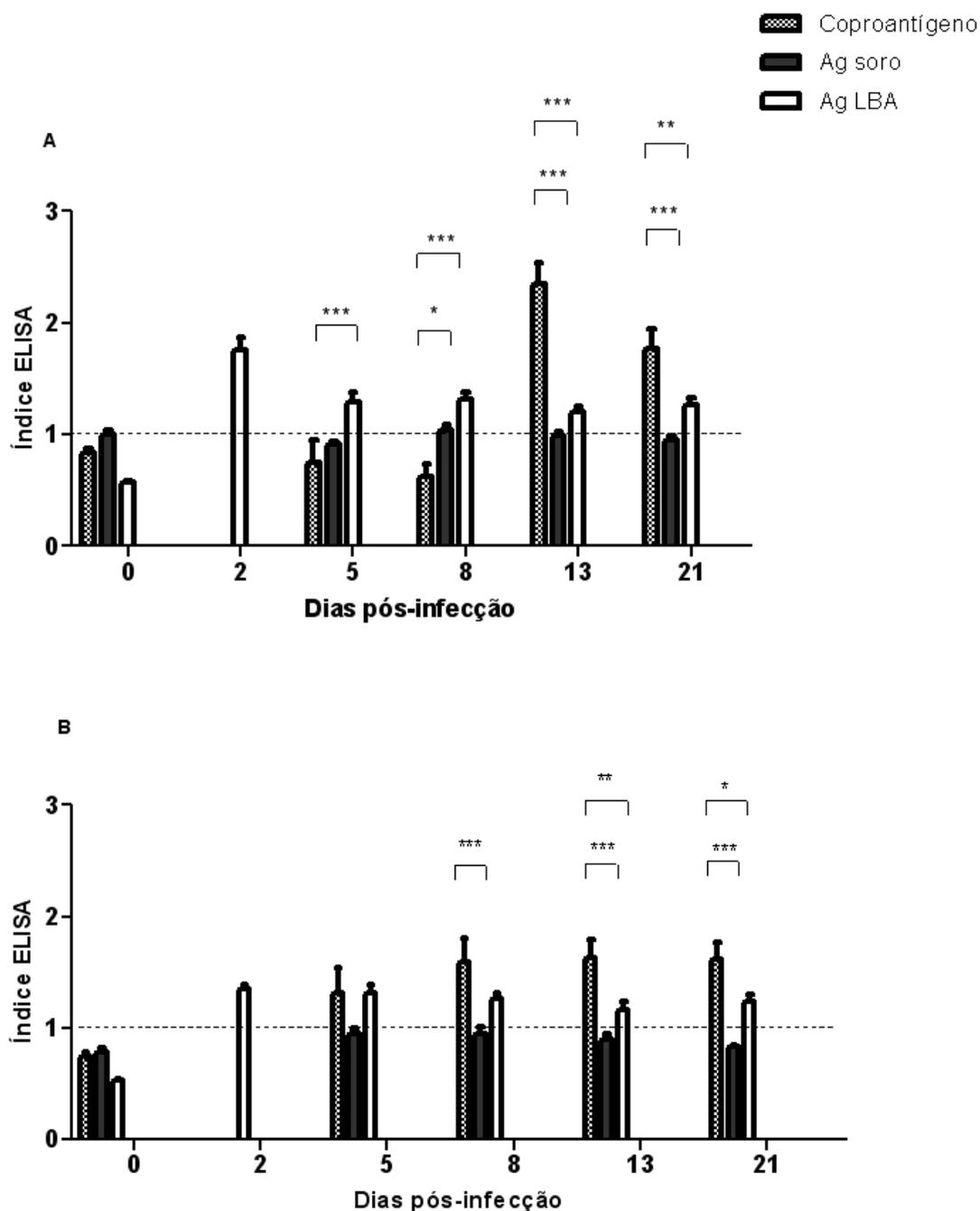


Figura 11: Painel comparativo da cinética de detecção de antígenos em amostras de fezes, de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ag: antígeno

4.8 Análise comparativa da cinética de detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*

A análise comparativa entre os testes de detecção de anticorpos nas diferentes amostras revelou que em animais não imunossuprimidos foi mais efetiva no 5° e no 8° d.p.i em amostras de soro e no 13° e 21° d.p.i no LBA. Foi observada diferença significativa ($p < 0,001$) no último dia da cinética onde não foi possível detectar anticorpos em amostras de soro, apenas em LBA (Figura 12A). Em animais imunossuprimidos a detecção de anticorpos foi mais efetiva em amostras de LBA em todos os pontos da cinética (Figura 12B).

4.9 Análise comparativa da cinética de detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*

Em animais não imunossuprimidos, a detecção de imunocomplexos em amostras de LBA foi mais efetiva do que em amostras de soro em todos os pontos da cinética, com diferença significativa no 21° d.p.i ($p < 0,001$) (Figura 13A). No grupo dos animais imunossuprimidos, a detecção de imunocomplexos foi efetiva em amostras de LBA e em amostras de soro foi melhor do 5° ao 21° d.p.i (Figura 13B).

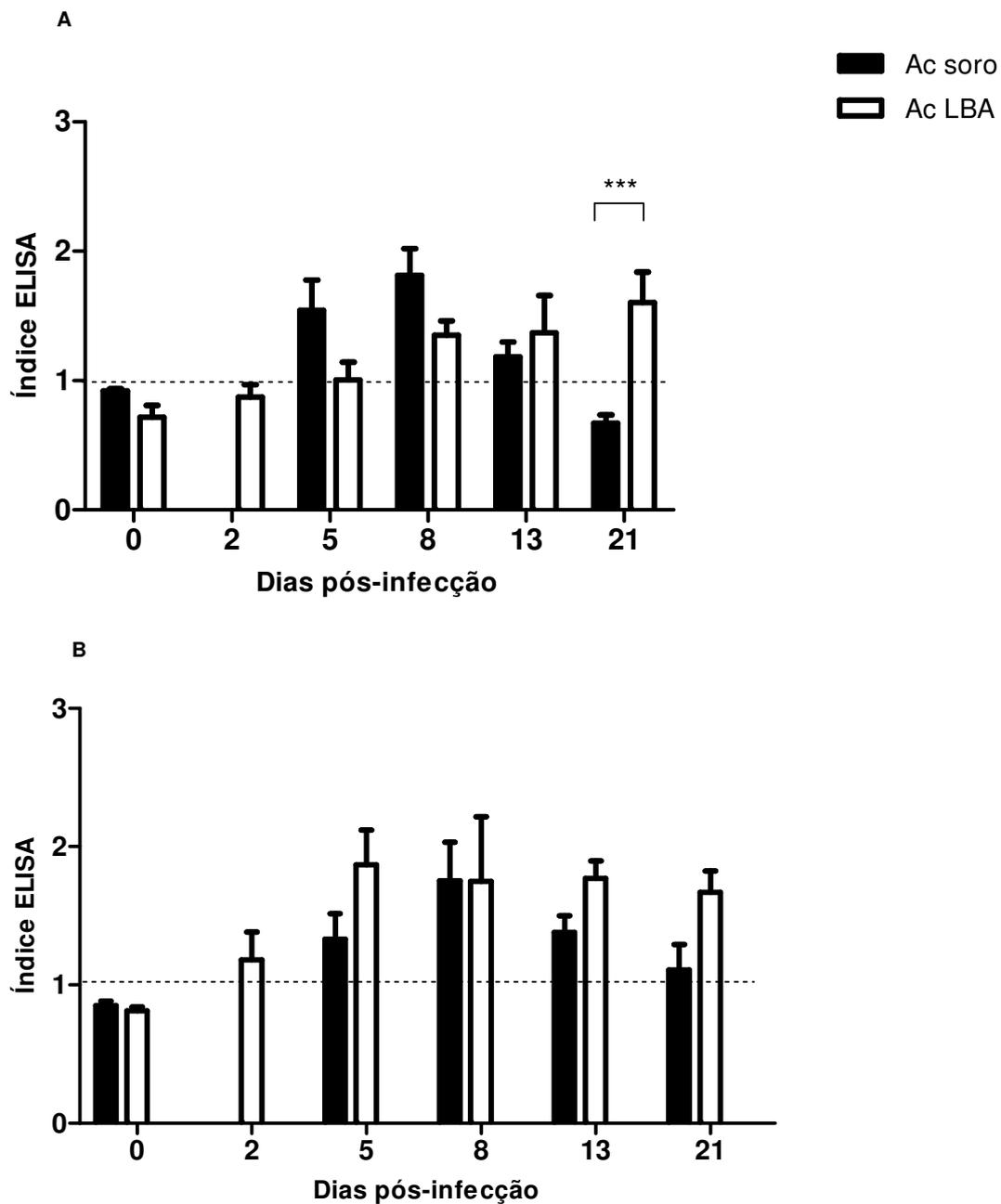


Figura 12: Painel comparativo da cinética de detecção de anticorpos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). *** p < 0,001. Ac: anticorpo

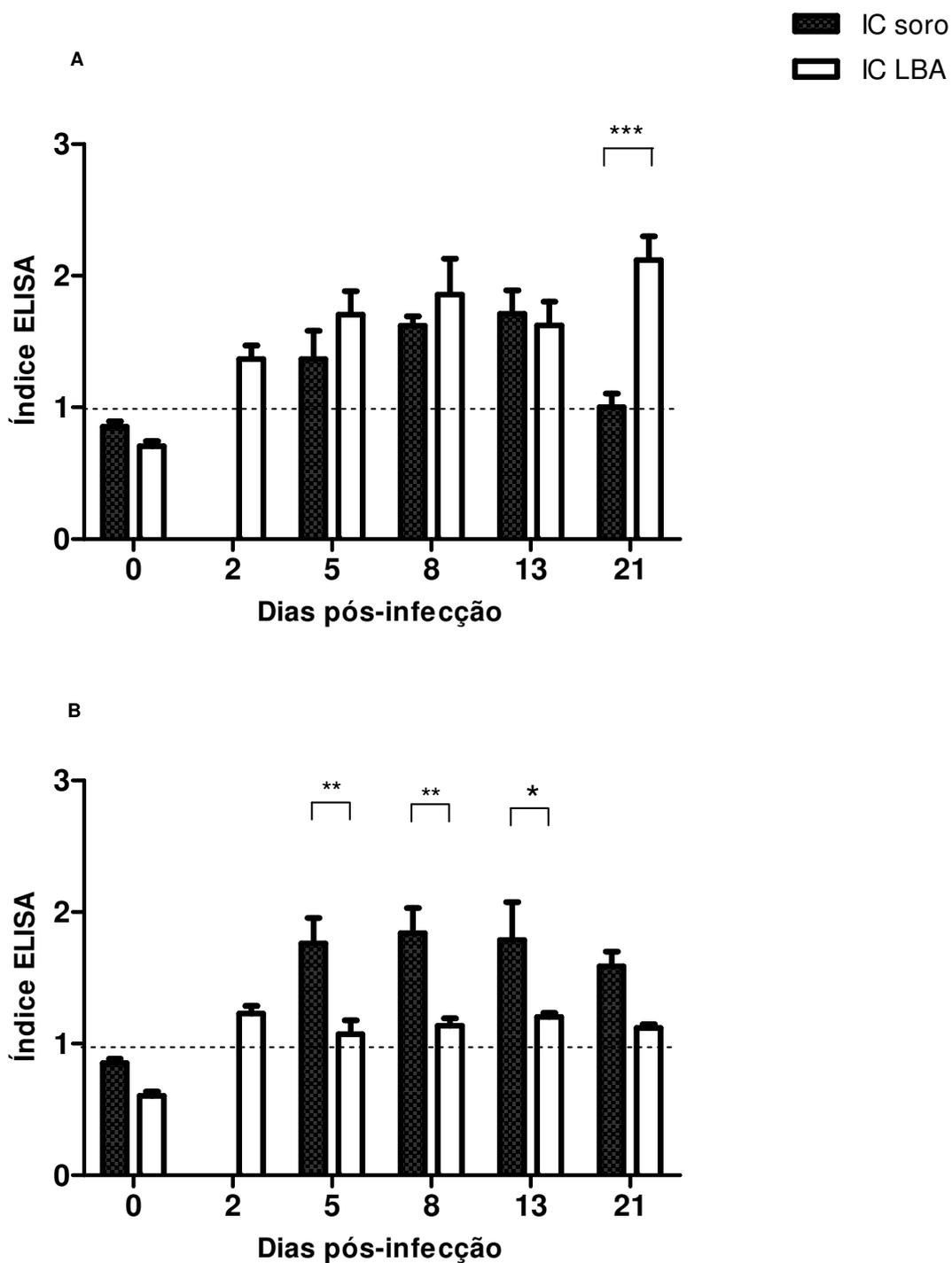


Figura 13: Painel comparativo da cinética de detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de LBA de ratos não imunossuprimidos (A) ou imunossuprimidos (B) e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*. Dia zero (0) indica o controle. A linha tracejada representa o limiar de reatividade. As barras indicam a média e o erro padrão (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. IC: imunocomplexo

Discussão

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase é limitado devido a baixa carga parasitária e irregular eliminação larval. Embora existam vários métodos imunológicos de diagnóstico para detectar a presença de *S. stercoralis* não existe um padrão ouro (GONÇALVES et al, 2012).

Os recentes avanços no diagnóstico da estrogiloidíase incluem um sistema de imunoprecipitação utilizando a enzima luciferase que mostra maior sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos específicos de *S. stercoralis* (RAMANATHAN et al., 2008) e um método de PCR quantitativa em tempo real para detecção do parasito em amostras fecais (VERWEIJ et al., 2009). No entanto, esses métodos estão fora da realidade econômica da população sob risco de infecção. Assim, a proposta de detectar o antígeno nas fezes é uma ferramenta alternativa para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase antes do surgimento da hiperinfecção e/ou disseminação. Além disso, estes resultados podem representar o primeiro passo para o desenvolvimento de um “kit” para detecção rápida de coproantígenos, economicamente mais viável.

Neste estudo foi demonstrado que a eliminação de ovos e a persistência da infecção foram afetadas pela imunossupressão dos animais. Os ratos imunossuprimidos e infectados por *S. venezuelensis* foram mais susceptíveis à infecção, sugerindo que a falha na expressão das moléculas modulatórias da resposta imune pode interferir na resposta Th2 efetiva. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que camundongos MHC II^{-/-} infectados por *S. venezuelensis* foram mais susceptíveis à infecção, supondo que a falha na expressão das moléculas de MHC classe II pode interferir na apresentação antigênica para os linfócitos T CD4⁺ (RODRIGUES et al, 2009). Semelhantemente, Pereira (2008), verificou que em camundongos geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos, a eliminação de ovos nas fezes desse

hospedeiro foi significativamente maior que em camundongos Balb/c, sendo que no 10° d.p.i, a contagem de ovos por grama de fezes foi cerca de 10 vezes maior no grupo dos animais geneticamente deficientes em relação ao grupo Balb/c.

Durante a cinética de infecção, a detecção de coproantígenos coincidiu com o aparecimento de ovos nas fezes, indicando que este teste apresenta boa sensibilidade e aplicabilidade no diagnóstico da estrogiloidíase experimental. Resultados semelhantes foram obtidos por Nageswaran; Crayg; Devaney (1994) usando anticorpo policlonal anti-L3 de *S. ratti* e anti-forma adulta somática. A metodologia aqui descrita mostrou que o anticorpo policlonal anti- L3 de *S. venezuelensis* pode detectar uma baixa quantidade de antígenos nas amostras fecais e também que o modelo de imunossupressão foi eficaz com base no número e tempo de eliminação de ovos em ratos imunossuprimidos. Recentemente, Sykes; James; McCarthy (2011) demonstraram que o anticorpo de excreção/secreção policlonal anti-*S. ratti* pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica da estrogiloidíase humana.

Os eosinófilos sozinhos ou em conjunto com outros componentes do sistema imune tais como anticorpos ou complemento podem mediar à morte de nematódeos intestinais (MARUYAMA et al., 2000; EL-MALKY et al., 2003). A redução do recrutamento de leucócitos totais do sangue periférico seguido pela redução no número de eosinófilos nos ratos imunossuprimidos e infectados, demonstrada neste estudo coincidiu com maior pico de eliminação de ovos do parasito. Estudos prévios com camundongos geneticamente deficientes em fator ativador de plaquetas (PAFR^{-/-}) infectados por *S. venezuelensis* demonstraram que o número de leucócitos e eosinófilos circulantes foram reduzidos, os quais coincidiram com o retardo na eliminação do parasito e decréscimo na fecundidade comparado com os camundongos *wild-type* (WT) infectados (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004). No presente estudo, utilizando amostras de LBA, esse fato também foi observado nos ratos imunossuprimidos, no entanto, a redução no recrutamento de leucócitos e eosinófilos ocorre antecipadamente

entre o 2º d.p.i e o 5ºd.p.i que é justamente o período em que a larva de *S. venezuelensis* está percorrendo o seu trajeto pulmonar. Machado et al. (2005), demonstraram que a infecção por *S. venezuelensis* reduziu o número de leucócitos totais e de células mononucleares no LBA quando os animais foram tratados com MK886 que confere aos animais um estado de imunossupressão.

Outros estudos demonstraram que os neutrófilos são essenciais para induzir a morte de larvas de *S. stercoralis* (GALIOTO et al., 2006). Semelhantemente a esses autores, foi demonstrado que o número de neutrófilos circulantes tanto em amostras de soro quanto em amostras de LBA de ratos imunossuprimidos estavam continuamente mais baixos do que nos ratos não imunossuprimidos, isto pode justificar a permanência da infecção após o 21 d.p.i naqueles animais.

Tentativas têm sido realizadas nos últimos anos para melhorar o diagnóstico sorológico da parasitose em questão. Os esforços envolvem a criação de um método confiável, que pode ser acessível pela população com estrogiloidíase. A detecção de anticorpos utilizando antígeno heterólogo tem sido amplamente utilizado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, com resultados promissores, especialmente, para levantamento epidemiológico (COSTA-CRUZ et al, 1997; MACHADO et al, 2003; GONÇALVES et al., 2012). No entanto, níveis de anticorpos ainda não diferenciam totalmente entre infecção ativa de resultados sorológicos falsos positivos. Além disso, testes imunodiagnósticos não são capazes de distinguir casos com eliminação de larvas detectáveis em exames coproparasitológicos dos casos com exames de várias amostras fecais negativas para *S. stercoralis*, mas com resultados positivos em ensaios sorológicos. Por essa razão, não foi estabelecida um estratégia de triagem ideal (SUDARSHI et al., 2003; HIRA et al., 2004). Como exemplo cita-se o problema de por em dúvida casos em que não é possível o encontro de larvas nas fezes, mesmo com investigação intensiva, mas o diagnóstico é clinicamente suspeito.

Baseando nesses pressupostos é que foi proposto a detecção de antígeno em amostras de soro e de LBA de ratos imunossuprimidos ou não imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* visto que a presença do antígeno indicaria a infecção ativa. Os resultados demonstraram que a detecção de antígeno em amostras de soro não foi eficaz para o diagnóstico de estrogiloidíase, pois apresentou índices abaixo do limiar de reatividade, em contrapartida, em amostras de LBA pode ser uma boa ferramenta diagnóstica nos casos de imunossupressão com sinalização durante toda a cinética.

Ainda hoje, o diagnóstico da estrogiloidíase depende primariamente da detecção de larvas nas fezes e é comumente auxiliado pela detecção de anticorpos específicos no soro (SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWAL; GHOSHAL, 2009). Sabe-se que a estrogiloidíase humana e animal induzem a produção de anticorpos da classe IgG, IgM, IgA e IgE com aumento característico de IgG4 em humanos e IgG1 em camundongos (GENTA, 1989, ROSSI et al., 1993; RODRIGUES et al., 2007). O presente estudo demonstrou que realmente a produção de IgG em amostras de soro é mais acentuada em ratos não imunossuprimidos sugerindo que os níveis elevados de IgG podem estar associados com a proteção do hospedeiro. Dados similares foram encontrados por Rodrigues et al. (2009) que observaram os níveis das imunoglobulinas foram significativamente reduzidos no soro de camundongos MHC II^{-/-} e infectados por *S. venezuelensis*.

A utilização de amostras de LBA torna-se útil nos casos de imunossupressão, uma vez que são amostras biológicas enriquecidas de células, muco e outros elementos pulmonares que auxiliam na detecção de doenças nos pulmões. Tendo em vista que o parasito *S. venezuelensis* possui trajeto pulmonar e que estimula a produção de IgE e hipersecreção de muco é importante verificar a participação da IgG na infecção (SILVEIRA et al., 2002). Nesse sentido pela primeira vez registrou-se a cinética de detecção de anticorpos em amostras de

LBA de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*, observando que a IgG específica foi detectada durante toda a cinética avaliada e nos casos de imunossupressão, antecipou o diagnóstico para o 2º d.p.i., demonstrando que o LBA é uma alternativa para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase.

A detecção de imunocomplexos nesse estudo representou uma proposta inovadora para a estrogiloidíase, uma vez que demonstraram a infecção em atividade pela presença de antígenos complexados à anticorpos, ao contrário da detecção de anticorpos que podem sinalizar duas fases: 1) cronicidade da doença e 2) doença tratada com a presença de anticorpos de memória.

Imunocomplexos são bem estudados na esquistossomose. Rezende et al. (1997) sugeriram que imunocomplexos em pacientes com esquistossomose intestinal crônica são capazes de modular a hipersensibilidade granulomatosa aos ovos de *Schistosoma mansoni*, induzindo a produção de prostaglandina E, que aumenta os níveis de IL-10. A deposição glomerular de imunocomplexos está envolvida na patogênese da glomerulopatia esquistossomótica, que pode ocorrer em associação com as formas mais graves da infecção crônica (BARSOUM, 2003). Esses achados intensificam os questionamentos a respeito do real papel de imunocomplexos na estrogiloidíase, merecendo mais estudos.

O papel dos imunocomplexos no mecanismo de escape do *Plasmodium knowlesi* na destruição de macrófagos foi estudado in vitro. As observações indicam que durante a infecção por *P. knowlesi* em macacos *Rhesus*, imunocomplexos podem inibir a ligação de eritrócitos parasitados por fagócitos mononucleares e, portanto, pode permitir-lhes subtrair os mecanismos destrutivos produzidos pelo hospedeiro (SINGH; DUTTA, 1989).

No presente estudo, foi demonstrado que tanto em amostras de soro quanto em amostras de LBA a detecção de imunocomplexos foi mais expressiva nos animais imunossuprimidos. Esse fato sinaliza a importância da associação

desse diagnóstico aos métodos consagrados para auxiliar a detecção precoce nos casos de imunossupressão.

Novos métodos de diagnóstico são esperados para melhorar os estudos epidemiológicos e os esforços de controle, prevenção e tratamento da estrogiloidíase. Com base neste conceito, a detecção de coproantígeno e a detecção de imunocomplexos circulantes em amostra de soro e em amostras de LBA parecem ser uma alternativa para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase em indivíduos imunossuprimidos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os ratos imunossuprimidos foram mais susceptíveis à infecção, fato comprovado pela eliminação de ovos/grama de fezes;
- A detecção de coproantígenos foi sensível mesmo quando o antígeno apresentou-se em baixa concentração (0,39 µg/mL);
- A presença de antígenos em amostras de soro de ratos não imunossuprimidos ou imunossuprimidos não é uma boa ferramenta diagnóstica para avaliar a infecção;
- A detecção de antígenos em amostras de LBA foi possível durante toda a cinética, sinalizando importante ferramenta diagnóstica;
- A detecção de anticorpos em amostras de soro de animais não imunossuprimidos foi melhor do que em imunossuprimidos até o 8º d.p.i.;
- Em amostras de LBA, a detecção de anticorpos foi mais expressiva em animais imunossuprimidos.
- As amostras de LBA revelaram-se importantes materiais biológicos a serem investigados;
- A detecção de imunocomplexos nas amostras de soro e de LBA sinalizou uma nova forma diagnóstica para a estrogiloidíase associada aos métodos padrões.

Referências

REFERÊNCIAS¹

ABE, T.; NAWA, Y. Localization of mucosal mast cells in W/W^v mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 477-485, 1987.

ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.

ABRAHAM, D.; ROTMAN, H. L.; HABERSTROH, F. H.; YUTANAWIBOONCHIA, W.; BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. *Experimental Parasitology*, Orlando, v. 80, p. 297-307, 1995.

AGRAWAL, V.; AGARWAL, T.; GHOSHAL, U. C. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 242-246, 2009.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford : C.A.B International, 2000. 650 p.

ANDRADE-NETO, J. L. de; ASSEF, M. C. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 1373-1378, 1996.

ARIZONO, N.; NAKANIHSI, K.; HORII, T.; TANABE, K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. **Trends in Parasitology**, v.23, p. 175-181, 2007.

ATKINS, N. S.; LINDO, F. J.; CONWAY, D. J. BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D., BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D.A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 517-526, 1999.

BAEK, B. K.; ISLAM, M.K.; MATSUDA, K. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, p. 99-107, 1998.

¹ Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descritas em SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. **Guia para normalização de trabalhos técnico-científicos**: projetos de pesquisa, monografias, dissertações, teses. Uberlândia: EDUFU, 2002. 159p.

BAEK, B.K.; ISLAM, M.K.; KIM, B.S.; LIM, C. W.; HUR, J.; OLUOCH, A.O.; KIM, C.H.; KAKOMA, I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.217-227, 2003.

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BAILEY, J. W. A. Serological test for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* antibodies in ex far east prisoners of war. **The American Journal of Medicine and Parasitology**, v.83, p.241-247, 1989.

BARSOUM, R.S. Schistosomiasis and the kidney. **Seminars in Nephrology**, 23, 34-41, 2003.

BEAVEN, M. A.; METZGER, H. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. **Immunology Today**, v. 14, p. 222-226, 1993.

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. P. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **The Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521-1532, 2006.

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELMINI, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.129-133, 2007.

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L.; SEET, R. C.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **American Journal of Medicine**, v. 120, p. 545-548, 2007.

CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and reviews of the literature. **Medicine**, v.73, p. 256-263, 1994.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B.W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, v. 245, p. 308-310, 1989.

COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. **Current Protocols in Immunology**, vol.1. John Wiley & Sons, Inc, 1991. p.2.4.1- 2.4.6.

COSTA, I.N.; SOPELETE, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human

strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306-311, 2003.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. p. 275-284.

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; PIRES, M. R. F. G.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 313-317, 1997.

COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329-331, 1998.

DEVI, U.; BORKAKOTY, B.; MAHANTA, J. Strongyloidiasis in Assam, India: a community-based study. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 30-32, 2011.

DOORN, H.R., KOELEWYN, R., HOFWEGEN, H., GILIS, H., WETSTEYN, J.C., WISMANS, P.J., SARFATI, C., VERVOORT, T., VAN GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 438-442, 2007.

ELLIOTT, D. E.; SUMMERS, R.W.; WEINSTOCK, J. V. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 457-464, 2007.

EL-MALKY, M.; MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; SHIMADA, S.; YOSHIDA, A.; AMANO, T.; TOMINAGA, A.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitology International**, v.52, p. 71-79, 2003.

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: Case series and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, p. 18-27, 2007.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. Comparative efficiency of various techniques for diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241-262, 1939.

FELICIANO N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 153-161, 2010.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T. M.; ESCHENAZI, P. D.; SCHILTER, H. C.; SOUSA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 139-149, 2008.

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; SOUZA, R. S.; CASSALI, G. D.; SOUZA, D. G.; LEMOS, V. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 813-820, 2007.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, A. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; ARAÚJO, F. F. N. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 28, p. 154-155, 1999.

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrogiloidíase. **A Folha Médica**, v. 101, p. 229-235, 1990.

GALIOTO, A.M.; HESS, J.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; LEE, J.J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v.74, p.5730-5738, 2006.

GAUSE, W. C.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminthes: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 269-277, 2003.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.

GOLDHILL, J.; MORRIS, S. C.; MALISZEWSKI, C.; URBAN, JR. J. F.; FUNK, C. D.; FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE T. Interleukin-4 modulates cholinergic neural control of mouse small intestinal longitudinal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1135-1140, 1997.

GONÇALVES, A.L.R.; RODRIGUES, R.M; SILVA, N.M; GONÇALVES, F.A; CARDOSO, C.R; BELETTI, M.E; UETA, M.T; SILVA, J.S; COSTA-CRUZ, J.M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.319-328, 2008.

GONÇALVES, A. L. R.; ROCHA, C. A.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious**, v.72, p. 79-84, 2012.

- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H.V.A. New technique for counting nematode eggs in sheep feces. **J. Comm. Sci. Ind. Organiz.**, v.12, p. 17–18, 1939.
- GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p.251-309, 1996.
- GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.
- GROVE, D. I.; NORTHEN, C.; DAWKINS, H. J. Interactions of *Strongyloides ratti* free living and skin penetrated infective larvae and parasitic adults with serum and cells in vitro. **Australian Journal of Experimental Biology Medicine Science**, v. 63, p. 521-529, 1985.
- HARADA, T.; MORI, O. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-179, 1955.
- HERBERT, D. R.; LEE, J. J.; LEE, N.A; NOLAN, T. J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Journal of Immunology**, v. 165, p.4544-4551, 2000.
- HIRA, P. R.; AL-ALI, F.; SHWEIKI, H. M.; ABDELLA, N. A.; JOHNY, M.; FRANCIS, I.; IQBAL, J.; THOMPSON, R.; NEVA, F. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, p. 261-270, 2004.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.
- INÊS, E. J.; SOUZA, J. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, E. S.; SANTOS, F. L.; SILVA, M. L. S.; SILVA, M. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, in press, 2011.
- KAKATI, B.; DANG, S.; HEIF, M.; CARADINE, K.; MCKNIGHT, W.; ADULI, F. *Strongyloides duodenitis*: case report and review of literature. **Journal of the National Medical Association**, v. 103, p. 60-63, 2011.
- KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 208-217, 2004.
- KEREPESI, L.A.; HESS, J. A.; LEON, O.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to

larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes and Infection**, v.9, p. 28-34, 2007.

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IELDA, M.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; TAKATSU, Y.; TADA, I. Cross – resistance between *Strongyloides venezuelensis* and *S. ratti* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 23, p. 119-123, 1995.

KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, K., TADA, Y. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v.72, p.502-507, 1991.

KOSUBSKY, L.; ARCHELLI, S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 38, p. 333-338. 2004.

KRAMME, S., NISSEN, N., SOBLIK, H., ERTTMANN, K., TANNICH, E., FLEISCHER, B., PANNING, M., BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 454–458, 2011.

LAWRENCE, R. A.; ALLEN, J. E.; GREGORY, W. F.; KOPF, M.; MAIZELS, R. M. Infection of IL-4 deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2 dominated immune response. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 5995-6000, 1995.

LEE, N. A.; MCGARRY, M. P.; LARSON, K. A.; HORTON, M. A.; KRISTENSEN, A. B.; LEE, J. J. Expression of IL-5 in thymocytes/T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. **The Journal of Immunology**, v. 158, p. 1332-1344, 1997.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis: Burgess, 1979. 427p.

LIBERMAN, A. C.; DRUKER, J.; PERONE, M. J.; ARTZT, E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. **Cytokine & Growth factor Review**, v.18, p.45-56, 2007.

LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175-179, 1994.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 37, p. 655-682, 1993.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p.265-275, 1951.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-155, 1919.

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI L. H.; COSTA- CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulat of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in Indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005.

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONCALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO, Z. M.; ARAUJO, R.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2008.

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 314-318, 2008.

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; FRANÇA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; AMARANTE, A. F.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57-61, 2010.

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglicans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.

MARUYAMA, H.; NISHIMAKI, A.; TAKUMA, Y.; KURIMOTO, M.; SUZUKI, T.; SAKATOKU, Y.; ISHIKAWA, M.; OHTA, N. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, p.1-8, 2006.

MEEUSEN, E.N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, 259-273, 1999.

MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA JÚNIOR, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus? **Acta Tropica**, v. 99, p. 102-105, 2006.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU, p. 81-111, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 320 p.

MONCADA, D. M.; KAMMANADIMINTI, S.J.; CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v.19, 305-310, 2003.

MONCOL, D.J.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. *Strongyloides ransonii*: Factors influencing the in vitro development of the free-living generation. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 220-225, 1978.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 64, p. 507-624, 1948.

MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; FERREIRA JÚNIOR, A.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, V. O. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 109, p. 103-107, 2009.

MUKERJEE, C. M.; CARRICK, J.; WALKER, J. C.; WOODS, R. L. Pulmonary strongyloidiasis presenting as chronic bronchitis leadin to interlobular septal fibrosis and cured by treatment. **Respirology**, v. 8, p. 536-540, 2003.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>>. Acesso em 12 de outubro de 2011.

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P.S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994.

NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; ABE, T.; KHAN, A. I.; BING, S.; ITOH, H.; IDE, H.; UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 333-338, 1994.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SILVEIRA, M.R.; BORGES, C.M.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. **Infection and Immunity**, v.71, p.2607-2614, 2003.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G. ; PEREIRA, A. T. de M.; FERNANDES, A.; SCHEURMANN, K.; HAMER, F.; SOUZA, A. L.; MARTINS, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?. **Thorax**, v.55, p.603-613, 2000.

NORTHERN, C.; GROVE, D. I.; WARTON, A.; LOVEGROVE, F. T. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 75, p. 487-92, 1989.

OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 119-121, 2002.

OLSEN, A.; VAN LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 967-972, 2009.

ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal mast cell-derived chondroitin sulphate levels in and worm expulsion from FcRgamma-knockout mice following oral challenge with *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p.221-226, 2004.

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 97, 1991.

OVINGTON K.S.; MCKIE K.; MATTHAEI K.I.; YOUNG I.G.; BEHM C.A. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. **Immunology**, v. 95 p. 488-493, 1998.

PARFITT, K. **Corticosteroids**. Mantidale: The complete drug reference, 32 ed. London. Pharmaceutical Press, 1999, p. 1010-1051.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J.M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, p.1331-1340, 2011.

PAULA, F. M.; CASTRO, E. D.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M. G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 51-55, 2000.

PEREIRA, A. T. M. **Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934), em camundongos Balb/c**. 2008. 115f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, p. 175-182, 1993.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R.W.; GAM, A.A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.196-203, 1998.

RAMANATHAN, R.; BURBELO, P.D.; GROOT, S.; IADAROLA, M. J.; NEVA, F. A.; NUTMAN, T. B. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Infectious Diseases**. v.198, p.444-451, 2008.

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 73-81, 2002.

REZENDE, S.A.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; DRUMMOND, S.C.; GOES, A.M. IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs induced by immune complexes. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.46, p. 96-102, 1997.

REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrongiloidíase. In: _____. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 581-590.

RITCHIE, L. S. Neither sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.

ROBERT, I. S.; PATRICIA, C. C.; ALAN, K L.; ALBERT, S.; BALDWIN Jr. Role of transcriptional activation of IB in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v.270, p.283-286, 1995.

RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI., E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1209-1214, 2007.

RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v. 128, p.e432-441, 2009.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologie diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research**, v. 84, p. 50-53, 1998.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO, L. G. V. L.; SILVA, L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 35, p. 361-365, 1993.

ROTMAN, H. L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R. A.; LEON, O.; GLEICH, G. J.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in Balb/cByJ mice. **Experimental Parasitology**, v. 82, p.267-278, 1996.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995.

SHARIATI, F.; PÉREZ-ARELLANO, J. L.; LÓPEZ-ABÁN, J.; EL BEHAIRY, A. M.; MURO, A. Role of angiogenic factors in acute experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Parasite Immunology**, v. 32, p.430-439, 2010.

SHIN, E.H.; OSADA Y.; CHAI, J.Y.; MATSUMOTO, N.; TAKATSU, K.; KOJIMA, S. Protective roles of eosinophils in *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 45-50, 1997.

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v.97, p. 129-138, 1988.

SIDDIQUI A. A.; BERK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1040 –1047, 2001.

SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Strongyloidiasis. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 5, p. 283-289, 2003.

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 211-215, 2005.

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

SILVEIRA, M.R.; NUNES, K. P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORREIA, A.JR, TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunity**, v.70, p.6263-6272, 2002.

SINGH, P.P., DUTTA, G.P. Immune-complexes-mediated evasion of *Plasmodium knowlesi* from destruction by macrophages. **Acta Tropica**, v. 46, p. 239-247, 1989.

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: GROVE, D. I. (Ed.). **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**. 1 ed. London: Taylor and Francis, 1989. p. 11-84.

STEINMANN, P.; ZHOU, X.; DU, Z.; JIANG, J.; WANG, L.; WANG, X.; LI, L.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 1-6, 2007.

SUDARSHI, S.; STÜMPFLE, R.; ARMSTRONG, M.; ELLMAN, T.; PARTON, S.; KRISHNAN, P.; CHIODINI, P. L.; WHITTY, C. J. M. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 728-732, 2003.

SYKES, A. M.; McCARTHY, J. S. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e995, 2011.

TEFÉ-SILVA, C.; SOUZA, D.I.; UETA, M.T.; FLORIANO, E.M.; FACCIOLI, L.H.; RAMOS, S.G. Interference of dexamethasone in the pulmonary cycle of

Strongyloides venezuelensis in rats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.571-578, 2008.

THOMPSON, F. J.; MITREVA, M.; BARKER, G. L.; MARTIN, J.; WATERSON, R. H.; McCARTER, J. P.; VINEY, M. E. An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 142, p. 32-45, 2005.

TING, Y. M. Pulmonary strongyloidiasis – cases report of 2 cases. **Journal Medical Science**, v. 16, p.269-74, 2000.

TRAJMAN, A.; MACDONALD, T. T.; ELIA, C. C. S. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Clinical Pathologic**, v. 50, p. 991-995, 1997.

URBAN, J. J. JR.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D. *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. **Experimental Parasitology**, v. 73, p.500-511, 1991.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MARAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 342-346, 2009.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. 2007. In: HODGKIN. J.; ANDERSON, P. **Wormbook**: the *C. elegans* Research Community. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 17 out. 2011.

WALLEN, N.; KITA, H.; WEILLER, D.; GLEICH, G. J. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. **Journal of Immunology**, v.147, p. 3490-3495, 1991.

WILSON, M.B., NAKANE, P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. IN: W. KNAPP, K. HOLUBAN & G. WICK (EDS.): **Immunofluorescence and Related Techniques**. North-Holland Biomedical, Amsterdam, 215, 1978.

YAMADA, M.; MATSUDA, S.; NAKAZAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Parasitology**, v.77, p.592-594, 1991.

ZHAO, P.; ZAHRA, M. *Strongyloides stercoralis* in bronchoalveolar lavage specimen processed as Prussian blue stain. **Diagnostic Cytopathology**, in press, 2011.

ANEXO I

**Artigo científico referente à Tese publicado em periódico internacional
(Experimental Parasitology)**



A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats

Ana Lúcia R. Gonçalves^a, Claudio V. Silva^a, Marlene T. Ueta^b, Julia M. Costa-Cruz^{a,*}

^aInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, Uberlândia 38400-902, Minas Gerais, Brazil

^bLaboratório de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2009

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 25 February 2010

Available online 3 March 2010

Keywords:

Strongyloides venezuelensis

Strongyloidiasis

Coproantigen

Immunosuppression

Rats

Diagnosis

ABSTRACT

This study was performed with the objective of developing innovative procedures for the diagnosis of strongyloidiasis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted to detect coproantigen in the faecal samples of normal and of immunosuppressed rats using an anti-L3 polyclonal antibody produced in rabbits. Analysis revealed the kinetics of egg shedding in the non-immunosuppressed and immunosuppressed rats infected with *S. venezuelensis*. Further analysis verified the ability of the immune serum to detect L3 antigens in faecal samples from infected animals. The number of eggs recovered in the faeces at 8 days p.i was significantly higher for both groups. Immunosuppressed animals eliminated increased quantities of eggs. The immune serum was able to detect 0.39 µg/ml of L3 antigens. The antigen recognition in the immunosuppressed group was anticipated on the 8th day p.i. In conclusion, these results may represent a first step in the development of a rapid coproantigen detection kit for strongyloidiasis.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Strongyloidiasis is an infection caused by the intestinal helminth *Strongyloides stercoralis*, a cosmopolitan parasite most prevalent in tropical and subtropical regions. The disease is of great importance in public health, especially due to the severe cases that compromise a range of predisposed individuals, principally those immunocompromised (Genta, 1989; Ferreira et al., 1999; Boulware et al., 2007).

Strongyloides venezuelensis is a rodent parasite that has been extensively used as an experimental model to study human infection (Baek et al., 1998; Machado et al., 2009). In experimental infections, infective larvae from *S. venezuelensis* migrate to the lungs before fixing in duodenal mucosa. Thus, migration in the rodent host is similar to that of *S. stercoralis* in humans (Negrão-Correa et al., 2003; Ferreira et al., 2009).

Diagnosis of this infection is an important, but difficult, task since it relies on the detection of larvae in faeces using parasitological methods (Machado et al., 2008; Hasegawa et al., 2009). In this context, analysis performed on single faecal samples may fail to detect infection in 70% of positive cases. Thus, to increase sensitivity the technician must analyze three or more samples (Dreyer et al., 1996; Uparanukraw et al., 1999).

Immunological assays, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and Western blotting or immunoblotting are useful in evaluating the host immune response, in diagnosing asymptomatic cases and in epidemiological surveys (Lindo et al., 1994; Boscolo et al., 2007; Machado et al., 2008). However, the principal limitation in establishing such specific methods is the difficulty of obtaining infective larvae of *S. stercoralis*. In order to circumvent this difficulty heterologous antigens obtained from *Strongyloides ratti*, *Strongyloides cebus* or *S. venezuelensis* have been used (Campos et al., 1988; Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001, 2003).

Parasite antigen detection in faecal samples by immunological assays may contribute to earlier diagnosis, an important consideration for patients such as immunocompromised individuals, potentially at risk of strongyloidiasis. Normally, the diagnosis is performed when patients have already developed severe forms of the disease (Bailey, 1989; Nageswaran et al., 1994).

In order to establish an innovative faecal antigen detection system, Wistar rats, non-immunosuppressed and immunosuppressed and experimentally infected with *S. venezuelensis*, were used.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 100–120 g, bred at the *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia*

* Corresponding author. Fax: +55 34 3218 2332.

E-mail address: costacruz@ufu.br (J.M. Costa-Cruz).

(ICBIM-UFU), were used in the experiments. During this study, the rats were maintained at the animal facilities of the *Centro de Experimentação e Utilização de Animais*, UFU, MG, Brazil, fed with laboratory ration, and given tap water to drink *ad libitum*. All experiments were conducted in agreement with animal ethics guidelines and were approved by the *Comitê de Ética na Utilização de Animais* of the *Universidade Federal de Uberlândia* (CEUA 004/08).

2.2. Parasites

S. venezuelensis was isolated from wild rodents, *Bolomys lasiurus*, in April, 1986 and was maintained in Wistar rats (*Rattus norvegicus*), routinely infected in the *Departamento de Parasitologia* of the *Universidade Estadual de Campinas* (UNICAMP), Brazil. *S. venezuelensis* third-stage infective larvae (L3) were obtained from charcoal cultures of infected rat faeces. The cultures were stored at 28 °C for 48 h, and the infective larvae were collected and concentrated using the Rugai method (Rugai et al., 1954). The recovered larvae were washed several times in phosphate-buffered saline (PBS) and counted. For each infection, 1,500 *S. venezuelensis* L3 larvae were inoculated subcutaneously in the abdominal region of the rats.

2.3. Experimental groups

Animals were divided into four groups: non-immunosuppressed, infected rats ($n = 24$); immunosuppressed, infected rats ($n = 24$); control rats ($n = 24$) and, immunosuppressed, control rats ($n = 24$). Prior to infection the immunosuppressed groups received 5 µg/ml of dexamethasone disodium phosphate, in water, for 5 days as described by Romand et al. (1998). Subsequently, the infected groups were inoculated subcutaneously in the abdominal region with 1500 *S. venezuelensis* L3.

2.4. Experimental procedures

At 5, 8, 13 and 21 days post-infection (p.i.), groups of six rats were placed on clean, moist absorbent paper and allowed to defecate. Eggs/g in the faeces were counted using the Cornell-MacMaster quantitative method (Gordon and Whitlock, 1939). The parasitological examination was performed three times and the average of the three results was recorded.

Each fecal sample was divided into two subsamples, one of which was submitted to the Cornell-MacMaster quantitative method and the other was stored at -70 °C for future testing.

Faecal samples to be used with ELISA were prepared by the addition of 0.15 M PBS, pH 7.4, and containing 0.3% Tween 20 in an approximately 1:1 volume-to-volume ratio of buffer to faeces.

2.5. Production of immune serum and conjugate

For the production of immune serum, two rabbits were immunized with crude larval somatic antigen. The immunization was cervical as described by Gonçalves et al. (2008). When a high antibody level was detected, 20 ml of blood was collected and an IgG fraction prepared using a Protein A Sepharose CL 4B column. After testing the IgG activity against the specific antigen, a portion of the IgG fraction was stored at -20 °C to be used as capture antibody in ELISA. The other portion was mixed with horseradish peroxidase (Sigma) according to the method of Wilson and Nakane (1978).

2.6. Coproantigen detection ELISA

Preliminary experiments were carried out in order to determine the optimal conditions for ELISA through serial titration of the reagents (antibodies, control faecal supernatant, and conjugates).

Briefly, high-binding microtitre plates (Corning-Costar; Laboratory Sciences Company, New York, NY) were coated with 40 µg/ml of IgG anti-*S. venezuelensis* alkaline extract in 0.06 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and stored overnight at 4 °C. Plates were washed three times for 5 min with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). After washing, plates were incubated with faecal supernatant diluted 1:2 up to 1:64 for 45 min at 37 °C. Subsequently the secondary antibody consisting of peroxidase-labeled rabbit anti-*S. venezuelensis* IgG at the optimal dilution of 1:40 was added and the plates were again incubated for 45 min at 37 °C. The reaction was revealed by adding the enzyme substrate (0.03% H₂O₂ and *o*-phenylenediamine [OPD] in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0) with a final incubation for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 2 N H₂SO₄ and the optical density (OD) was determined at 492 nm in a plate reader (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, McLean VA).

2.7. Statistical analysis

Each experiment was performed twice. The results of the experiments are expressed as mean ± SEM. Statistical variations were analyzed using ANOVA, followed by the Bonferroni test. The criterion for statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. An Animal model and the kinetics of egg shedding

Our initial analysis was to establish an animal model of immunosuppression to be used as a positive control for high infection rates. The immunosuppressant used was 5 µg/ml of dexamethasone disodium phosphate, in water, during 5 days as previously described (Romand et al., 1998). We observed that the initial time point for egg shedding was 5 days p.i. for both non-immunosuppressed and immunosuppressed groups. The peak in egg output was observed at 8 days p.i. and a statistical difference between groups was observed ($P < 0.01$). It was clearly verified that immunosuppressed animals shed higher numbers of eggs in their faeces. After 13 days p.i., the number of eggs decreased in both groups. However, it was observed that on the 21st day p.i. the infection was eliminated in non-immunosuppressed animals, while in the immunosuppressed, the infection persisted (Fig. 1).

3.2. Antigen recognition using polyclonal antibodies and the dilution of faecal samples for antigen detection

Continuing the research, the ability of immune serum to detect L3 antigens in faecal samples from infected animals was verified.

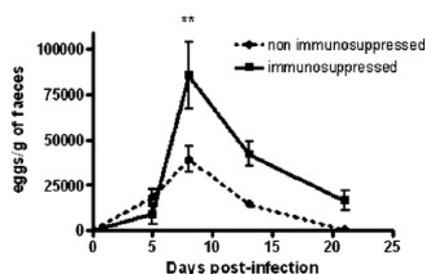


Fig. 1. Total number of eggs/gm of faeces eliminated in faeces from rats immunosuppressed or not, infected with *Strongyloides venezuelensis*. The error bar indicates the means and standard ($n = 6$). ** $P < 0.01$.

The results showed that the immune serum could detect 0.39 $\mu\text{g/ml}$ of L3 antigen (Fig. 2). In order to determine the optimal dilution of faecal samples for antigen detection we performed ELISA using different dilutions of faeces from both the non-immunosuppressed and immunosuppressed groups at 5, 8, 13 and 21 days p.i. In non-immunosuppressed animals antigen was best detected at day 13 and the dilution chosen for analysis was 1:8. At day 21 p.i., a lower optical density was observed probably due to the reduction of antigen in faeces as a result of elimination of the infection. On the other hand, immunosuppressed animals showed similar results on days 8, 13 and 21 p.i. (data not shown). Individual Separate analysis, using a 1:8 faecal dilution, demonstrated that antigen detection levels in non-immunosuppressed animals were similar to those in immunosuppressed ones (Fig. 3).

4. Discussion

The methodology described in our research indicated that the polyclonal antibody anti-*S. venezuelensis* L3 antigen could detect even small amounts of parasite antigen in faeces. The ability to detect *S. venezuelensis* antigens was corroborated by the immunosuppressant schedule that increased the numbers of egg that were shed. Previous studies have shown that immunosuppressed status favors *Strongyloides* spp. infection (Machado et al., 2005; Negrão-Corrêa et al., 2006; Gonçalves et al., 2008; Rodrigues et al., 2009; Machado et al., 2009).

During the course of the research, the first detection of coproantigen coincided with the appearance of larvae in the stool. Thus, indicating that it is sensitive to parasitological diagnosis in detecting the beginning of infection. Similar results were obtained by Nageswaran et al., (1994) using polyclonal antibody anti-*S. ratti* L3 antigen and anti-adult somatic.

Heterologous antigen has been widely used in the serum-based diagnosis of human strongyloidiasis with good and promising results, especially in epidemiological surveys (Campos et al., 1988; Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001, 2003). On the other hand, this approach provides lower efficiency in diagnosing current infection, particularly in immunocompromised patients, such as HIV/AIDS positives (Ferreira et al., 1999; Oliveira et al., 2002; Keiser and Nutman, 2004; Safdar et al., 2004; Machado et al., 2007). Copro-parasitological methods are the most commonly used, however due to insensitivity; diagnosis may be possible only after dissemination or hyperinfection takes place in these immunosuppressed patients (Sato et al., 1995; Uparanukraw et al., 1999; Siddiqui and Berk, 2001). Our results highlight new possibilities for the diagnosis of human strongyloidiasis in immunosuppressed patients. The sensitivity of detecting the *S. venezuelensis* antigen early may be useful for diagnosis and consequent treatment. In this way severe cases of the disease may be avoided. It was concluded that these results may

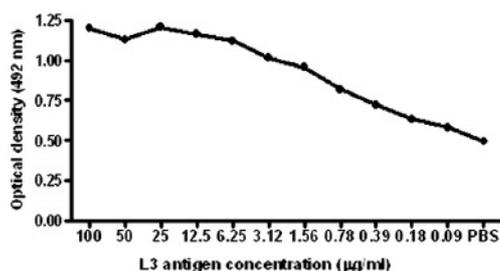


Fig. 2. Standard curve of *S. venezuelensis* antigen detection. Different concentrations of antigen diluted in the supernatant of negative faecal samples.

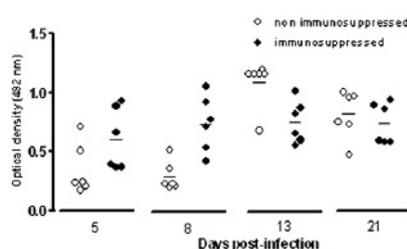


Fig. 3. *S. venezuelensis* antigen detection in faecal supernatants. Faecal supernatants were diluted 1:8 and incubated with anti-L3 polyclonal antibody. Note that antigen detection in the immunosuppressed groups occurred on day 8 post-infection. The results from each group were calculated using $n = 6$ animals.

represent a first step in the development of a rapid coproantigen detection kit for strongyloidiasis.

Acknowledgments

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento ao Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Baek, B.K., Islam, M.K., Matsuda, K., 1998. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. *The Korean Journal of Parasitology* 36, 99–107.
- Bailey, J.W.A., 1989. A serological test for the diagnosis of *Strongyloides* antibodies in ex Far East Prisoners of war. *The American Journal of Medicine and Parasitology* 83, 241–247.
- Boscolo, M., Gobbo, M., Mantovani, W., Degani, M., Anselmi, M., Monteiro, G.B., Marocco, S., Angheben, A., Mistretta, M., Santacatterina, M., Tais, S., Bisoffi, Z., 2007. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 129–133.
- Boulware, D.R., Stauffer, W.M., Hendel-Paterson, B.R., Rocha, J.L.L., Seet, R.C.S., Sumner, A.P., Nield, L.S., Supparatpinyo, K., Chaiwarith, R., Walker, P.F., 2007. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians in training survey. *The American Journal of Medicine* 120, 545–551.
- Campos, D.M.B., Oliveira, O.S., Barbosa, W., Campos, M.L.L., Rosa, Z.S., Souza, O.C., 1988. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico da estrogiloidase humana. *Revista de Patologia Tropical* 17, 17–23.
- Costa-Cruz, J.M., Bullamah, C.B., Gonçalves-Pires, M.R.F., Campos, D.M.B., Vieira, M.A., 1997. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39, 313–317.
- Dreyer, G., Fernandes-Silva, E., Alves, S., Rocha, A., Albuquerque, R., Addiss, D., 1996. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2569–2571.
- Ferreira, C.M., Pereira, A.T.M., Amaral, F.A., de Souza, R.S., Coelho, F.M., Souza, D.G., Negrão-Corrêa, D., Teixeira, M.M., 2009. Mechanisms of the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* infection in rats: role of capsaicin-sensitive neurons. *Microbes and Infection* 11, 315–320.
- Ferreira, M.S., Nishioka, S.A., Borges, A.S., Costa-Cruz, J.M., Rossin, I.R., Rocha, A., Silvestre, M.T.A., Nunes-Araújo, F.F., 1999. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. *Clinical Infectious Diseases* 28, 154–155.
- Genta, R.M., 1989. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Journal of Infectious Diseases* 11, 755–767.
- Gonçalves, A.L.R., Rodrigues, R.M., Silva, N.M., Gonçalves, F.A., Cardoso, C.R.B., Beletti, M.E., Ueta, M.T., Silva, J.S., Costa-Cruz, J.M., 2008. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. *Veterinary Parasitology* 158, 319–328.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V.A., 1939. New technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Communication Science in Industrial Organization* 12, 17–18.

- Hasegawa, H., Hayashida, S., Ikeda, Y., Sato, H., 2009. Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis. *Parasitology Research* 104, 869–874.
- Keiser, P.B., Nutman, T.B., 2004. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 208–217.
- Lindo, J.F., Coway, D.J., Atkins, N.S., Bianco, A.E., Robinson, R.D., Bundy, D.A.P., 1994. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 175–179.
- Machado, E.R., Ueta, M.T., Gonçalves-Pires, M.R.F., Alves-Oliveira, J.B., Faccioli, L.H., Costa-Cruz, J.M., 2001. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Experimental Parasitology* 99, 52–55.
- Machado, E.R., Ueta, M.T., Gonçalves-Pires, M.R.F., Alves-Oliveira, J.B., Faccioli, L.H., Costa-Cruz, J.M., 2003. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 849–851.
- Machado, E.R., Ueta, M.T., Lourenço, E.V., Anibal, F.F., Sorgi, C.A., Soares, E.G., Roque-Barreira, M.C., Medeiros, A.I., Faccioli, L.H., 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *The Journal of Immunology* 175, 3892–3899.
- Machado, E.R., Teixeira, E.M., Gonçalves-Pires, M.R.F., Loureiro, Z.M., Araújo, R.A., Costa-Cruz, J.M., 2007. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 40, 154–158.
- Machado, E.R., Faccioli, L.H., Costa-Cruz, J.M., Lourenço, E.V., Roque-Barreira, M.C., Gonçalves-Pires, M.R.F., Ueta, M.T., 2008. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Experimental Parasitology* 119, 7–14.
- Machado, E.R., Carlos, D., Lourenço, E.V., Sorgi, C.A., Silva, E.V., Ramos, S.G., Ueta, M.T., Aronoff, D.M., Faccioli, L.H., 2009. Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. *Microbes and Infection* 11, 571–578.
- Nageswaran, C., Craig, P.S., Devaney, E., 1994. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. *Parasitology* 108, 335–342.
- Negrão-Corrêa, D., Silveira, M.R., Borges, C.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., 2003. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. *Infection and Immunity* 71, 2607–2614.
- Negrão-Corrêa, D., Pinho, V., Souza, D.G., Pereira, A.T.M., Fernandes, A., Scheuermann, K., Souza, A.L.S., Teixeira, M.M., 2006. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *International Journal for Parasitology* 36, 1185–1195.
- Oliveira, L.C.M., Ribeiro, C.T., Mendes, D.M., Oliveira, T.C., Costa-Cruz, J.M., 2002. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 119–121.
- Rodrigues, R.M., Silva, N.M., Gonçalves, A.L.R., Cardoso, C.R., Alves, R., Gonçalves, F.A., Beletti, M.E., Ueta, M.T., Silva, J.S., Costa-Cruz, J.M., 2009. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 128 (1 Suppl.), e432–441.
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P., 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research* 84, 50–53.
- Rugai, E., Mattos, T., Brisola, A.P., 1954. A new technic for the isolation of nematode larvae from faeces; modification of Baermaß method. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 14, 5–8.
- Safdar, A., Malathum, K., Rodriguez, S.J., Husni, R., Rolston, K.V., 2004. Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States. *Cancer* 100, 1531–1536.
- Sato, Y., Kobayashi, J., Shiroma, Y., 1995. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 37, 35–41.
- Siddiqui, A.A., Berk, S.L., 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1040–1047.
- Uparanukraw, P., Phongsri, S., Marakote, N., 1999. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 967–973.
- Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holuban, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Technique*. North-Holland Biomedical, Amsterdam, p. 215.