

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

**Avaliação parasitológica e sorológica de coinfecção por *Syphacia muris* e
*Strongyloides venezuelensis***

JOSÉ EDUARDO NETO DE SOUSA

Uberlândia
Julho – 2014

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

**Avaliação parasitológica e sorológica de coinfecção por *Syphacia muris* e
*Strongyloides venezuelensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Imunologia e Parasitologia Aplicadas para obtenção do
título de Mestre.

José Eduardo Neto de Sousa

Prof^ª. Dr.^a. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Uberlândia

Julho – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725a Sousa, José Eduardo Neto de, 1990-
2014 Avaliação parasitológica e sorológica de coinfeção por
Syphacia muris e *Strongyloides venezuelensis* / José Eduardo
Neto de Sousa. – 2014.
56 p. : il.

Orientadora: Júlia Maria Costa Cruz.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Strongyloides venezuelensis* -
Teses. 3. *Immunoblotting* – Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

José Eduardo Neto de Sousa

“Avaliação parasitológica e sorológica de co-infecção por *Syphacia muris* e *Strongyloides venezuelensis*”

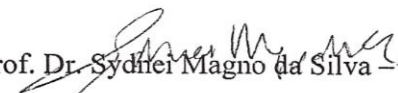
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

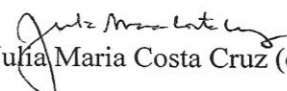
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de julho de 2014.


Prof.ª. Dra. Idessânia Nazareth da Costa – UEL/PR


Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU


Prof.ª. Dra. Julia Maria Costa Cruz (orientadora) – ICBIM/UFU

Depois de algum tempo você aprende...

Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas para onde está indo.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.

William Shakespeare

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pela força, coragem, determinação e perseverança durante toda esta caminhada.

Aos meus pais,

Mônica e José Carlos que se dedicaram e renunciaram muitos dos seus sonhos, para que pudesse realizar os meus.

E toda minha família,

Em especial aos meus avós José Eduardo, Sebastiana, Otacílio e Ivete, a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me proteger e sempre estar ao meu lado, em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Mônica e José Carlos que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Obrigado por ter me fornecido esta oportunidade. Gostaria de agradecer especialmente minha mãe mesmo à distância, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir.

Aos meus irmãos Wanderlei, Diego e Karla por serem acima de tudo, meus amigos. A minha família principalmente meus avós paternos José Eduardo e Sebastiana e aos maternos Otacílio e Ivete, por serem exemplos de pessoas humildes e honestas. Aos meus sobrinhos Camila e Vinícius. A todos os meus tios (as) e primos (as). Devo tudo o que sou hoje, a minha família. Muito obrigado a todos.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, oportunidade e dedicação, mostrando-se sempre disposta a resolver os problemas que surgiram neste período de dois anos. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma humana que conduziu minha orientação. Muito Obrigado por tudo.

A toda equipe do laboratório Daniela, Gabriela, Lucas, Renata, Camila, Nágilla e Henrique que se tornaram grandes companheiros e amigos. Agradeço em especial meu colega Edson por todo apoio e cumplicidade e que durante esse período acabou se transformando em um grande amigo.

As minhas colegas de mestrado Elivaine, Layane, Leilaine, Melina, Pâmela e Letícia. Agradeço a todas pelo convívio e troca de experiências. Gostaria de agradecer especialmente aos colegas Murilo e Eliezer que se tornaram grandes amigos no decorrer destes dois anos.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia Juliana, Scheila e Elaine. Agradeço em especialmente a Maria do Rosário e ao Marcelo pela paciência e disponibilidade nunca negada.

As pessoas que ao longo do tempo, desde a infância viram meu crescimento enquanto pessoa, enquanto amigo, enquanto estudante e em busca de novos sonhos e horizontes, Thamires, Heloise, Damiana, Talyta, Marcos Vinicius, Paulo Alexandre, Luiz Eduardo, Eduardo, Aderso, Luiz Fernando. Aos meus amigos de hoje que fazem parte da minha trajetória de vida Ana Karolina, Flávia, André, Kamilla, Pollyanna e Nathâny. Também não poderia deixar de agradecer aos meus amigos, professores e colegas de graduação que durante

todos esses anos foram capazes de compreender as alegrias, tristezas, os amores, as ilusões, Renan, Fernando, Marcos, Wid Cuvinel, Bárbara, Nayara, Patrícia, Paula, Nawany, Raíslla, Aretha, Laylaine, Mário, Aline, Narcisa, Carlos André. Obrigado a todos vocês.

Ao Dr. Arlindo que sempre esteve ao meu lado e sempre disposto a me ajudar. Obrigado pela amizade e companheirismo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelos ensinamentos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela atenção e disponibilidade.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, que participaram diretamente ou indiretamente para conclusão da dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Microgramas

µl – Microlitro

µm – Micrometro

°C – Graus Celsius

% – Por cento/porcentagem

1D – unidimensional

AgNO₃ – Nitrato de prata

ANOVA – Análise de variância

APS – Persulfato de amônio

CEBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

cm – Centímetro

CO – Animais coinfectados com *Syphacia muris* e *Strongyloides venezuelensis*

Cut-off – ponto ótimo

DAB – Diaminobenzidina

DO – Densidade Ótica

d.p.i. – Dias pós infecção

EDTA – *Ethylenediamine tetracetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Es – Especificidade

FcεRI – *Human leukocyte receptors for the Fc portion of IgE* (Receptores de leucócitos humanos para a porção Fc de IgE)

FcγRIII – *Human leukocyte receptors for the Fc portion of IgG* (Receptores de leucócitos humanos para a porção Fc de IgG)

g – Gramas

g – Força gravitacional

G1 – Animais sem infecção (*Naïve*)

G2 – Animais infectados com *Strongyloides venezuelensis*

G3 – Animais infectados naturalmente com *Syphacia muris*

G4 – Animais coinfectados (*S. muris* + *S. venezuelensis*)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HPJ – Hoffman, Pons e Janer

IE – Índice ELISA

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G subclasse 1

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

kDa – KiloDalton

kg – Quilogramas

L3 – Larvas filarioides

LBA – Lavado broncoalveolar

M – Molar

mA – Miliamperagem

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

N – Normalidade

NaCl – Cloreto de Sódio

Na₂S₂O₃.5 H₂O – Tiosulfato de sódio pentahidratado

nm – Nanômetro

p – Nível de significância

pH – Potencial hidrogeniônico

OPD – Ortofenilenodiamina

OPG – Ovos Por Gramas de fezes

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PBS-T – *Phosphate Buffered Saline* – Tween (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20)

PBS-TM – *Phosphate Buffered Saline* – Tween (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PM – Padrão de peso molecular

Rf – Mobilidade relativa

RI – *Reactivity index* (Limiar de reatividade)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS–PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Se – Sensibilidade

SM – Animais infectados com *Syphacia muris*

SV – Animais infectados com *Strongyloides venezuelensis*

TA – temperatura Ambiente

TBS – *Tris–buffered saline* (Solução salina tamponada com Tris)

TEMED – N, N, N, N–tetrametil etilenodiamino

TG–ROC – *Two graphic receiver operating characteristic*

Th2 – Células T *helper*

Tris – Hidroximetil

Tris HCl – Solução de Tris adicionada de HCl

Tween 20 – Polioxietilensorbitano–monolaurato

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

V – Volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número total de parasitos adultos de *S. venezuelensis* e *S. muris* recuperados dos intestinos dos ratos infectados dos quatro grupos estudados.....34

Tabela 2. Comparação de três métodos parasitológicos para detecção de ovos de *Syphacia muris* em trinta *Rattus norvegicus* infectados naturalmente.36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de infectados com *Strongyloides venezuelensis* (GII) e ratos coinfectados com *Syphacia muris* e *S. venezuelensis* (GIV). São graficamente apresentados a média e o erro padrão da média. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$33
- Figura 2.** Média de parasitos adultos recuperados dos intestinos dos ratos experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* (A), naturalmente infectados com *S. muris* (B) e animais coinfectados com *S. venezuelensis* e *S. muris* (A e B). Os traços horizontais representam desvio padrão. *** = $p < 0,0001$35
- Figura 3.** Ovos de *Syphacia muris* detectados pelos métodos de sedimentação, (A), Willis (B), Graham (C) 100x e Graham (D) 40x.....37
- Figura 4.** Perfil eletroforético em SDS–PAGE 12% dos extratos salinos total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e adultos de *Syphacia muris*. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa). SV – Extrato salino total de *Strongyloides venezuelensis*. SM – Extrato salino total de *Syphacia muris*.38
- Figura 5.** Avaliação do limiar de reatividade de testes ELISA para diferentes extratos antigênicos por *Graph Receiver Operating Characteristic Curve* (TG–ROC), com valores expressos em Índice ELISA (IE). Extrato salino total de *Strongyloides venezuelensis* (A). Extrato salino total de *Syphacia muris* (B). O cruzamento das linhas representa o limiar de reatividade determinado pela análise, considerando Sensibilidade (\ominus) e Especificidade (\ominus) ótimas para cada antígeno analisado. Se – Sensibilidade. Es – Especificidade..40
- Figura 6.** Sororeatividade de IgG pelo teste ELISA e expresso em Índice ELISA (IE), frente aos extratos antigênicos de *Strongyloides venezuelensis* (A) e *Syphacia muris* (B) em amostras de soros de ratos *Naïve* e infectados dos quatro grupos estudados. A linha pontilhada significa o limiar de reatividade obtido por TG–ROC. A linha contínua indica a média de cada grupo.....41
- Figura 7.** Análise da reatividade sorológica de anticorpos IgG em *Immunoblotting* a antígenos presentes no extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* (A) e extrato salino de adultos de *Syphacia muris* (B) nos quatro grupos de animais estudados. Os picos de intensidade detectados por Image J versão 1.48 indicam a intensidade de reconhecimento e valor das bandas detectadas. N – ratos sem infecção (*Naïves* – GI). SV – ratos infectados com *S. venezuelensis* (GII). SM – ratos infectados com *S. muris* (GIII). CO – ratos coinfectados com *S. muris* e *S. venezuelensis* (GIV).....43

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – Modelos animais no estudo da strongiloidíase.....	14
1.2 – Aspectos morfológicos de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	15
1.3 – Modo de transmissão e ciclo biológico de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	16
1.4 – Sintomatologia da strongiloidíase murina.....	17
1.5 – Diagnóstico e tratamento da strongiloidíase murina	17
1.6 – Aspectos morfológicos de <i>Syphacia muris</i>	18
1.7 – Modo de transmissão e ciclo de vida de <i>Syphacia muris</i>	19
1.8 – Sintomatologia da infecção por <i>Syphacia muris</i>	20
1.9 – Diagnóstico e tratamento da infecção por <i>Syphacia muris</i>	20
2 – OBJETIVO GERAL	23
2.1 – Objetivos específicos	23
3 – MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Aspectos éticos.....	24
3.2 – Animais	24
3.3 – Obtenção das larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	25
3.4 – Contagem de ovos por grama de fezes.....	25
3.5 – Coleta do intestino dos ratos e contagem dos adultos dos helmintos	25
3.6 – Exames de fezes para detecção de <i>S. muris</i>	26
3.7 – Exame de fita gomada ou Graham.....	26
3.8 – Preparação dos extratos salinos totais de <i>S. venezuelensis</i> e <i>Syphacia muris</i>	26
3.9 – ELISA indireto para detecção de IgG específico	27
3.10 – Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE) dos extratos salinos de <i>S. venezuelensis</i> e de <i>S. muris</i>	28
3.11 – <i>Immunoblotting</i>	29
3.12 – Normas de Biossegurança.....	30
3.13 – Análises estatísticas.....	31
4 – RESULTADOS	32
4.1 – Avaliação parasitológica	32
4.1.1 – Contagem de ovos por gramas de fezes de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	32
4.1.2 – Comparação de carga parasitária dos helmintos presente em intestinos de ratos infectados	33
4.1.3 – Comparação de métodos qualitativos para diagnóstico de <i>Syphacia muris</i>	36
4.2 – Avaliação sorológica.....	38
5 – DISCUSSÃO	44
6 – CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

RESUMO

A espécie *Strongyloides venezuelensis* é um parasito de roedores utilizado no estudo da relação parasito/hospedeiro em animais infectados pelo helminto devido à semelhança do ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*. O nematódeo *Syphacia muris* é encontrado em grande número no ceco de ratos mantidos em biotério. O presente estudo teve como objetivo proceder a avaliação parasitológica e da reatividade cruzada entre ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar naturalmente infectados com *S. muris* e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*. Foram utilizados 40 animais divididos em quatro grupos de 10 animais para avaliação de carga parasitária através da quantificação dos helmintos recuperados dos intestinos dos animais e também da quantificação de ovos por gramas de fezes se *S. venezuelensis*. Para a reatividade cruzada foram utilizados ELISA e *immunoblotting*. Além disso, 30 animais foram utilizados para comparação de métodos de diagnóstico de *S. muris* pelos métodos de HPJ, Willis e Graham. Foi demonstrado que a eliminação de ovos bem como a quantidade de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* diminui significativamente pela coinfecção por *S. muris*. O método de Graham foi o mais eficaz na detecção da infecção por *S. muris* em ratos Wistar. No ELISA foi observada elevada reatividade cruzada das amostras de soro de todos os ratos infectados com *S. muris* frente ao extrato salino total de *S. venezuelensis* e de todos os animais infectados apenas com *S. venezuelensis* frente ao extrato salino de *S. muris*. Por *immunoblotting* foi demonstrado reatividade cruzada em anticorpos IgG presentes em amostra de soro de animais infectados apenas com *S. muris* e o reconhecimento de oito bandas no extrato salino de *S. venezuelensis*. Destas, apenas as bandas de 68 e 102 kDa foram consideradas imunodominantes em amostras de soro específico proveniente de animais infectados apenas com *S. muris*. Nas amostras de soro de animais infectados com *S. venezuelensis* houve o reconhecimento cruzado de sete bandas antigênicas, sendo que as de 36, 91 e 149 kDa demonstraram maiores picos de reação. A resposta imune gerada a *S. muris* pode ter influenciado na infecção por *S. venezuelensis* nos animais coinfectados, diminuindo a carga parasitária dos animais. Esse fato pode ser justificado pela semelhança antigênica entre os parasitos e proteção parcial cruzada pelos anticorpos IgG gerados inicialmente aos antígenos *S. muris*. Diante disso, os animais mantidos em biotério devem ser periodicamente avaliados uma vez que infecções com *S. muris* podem comprometer e interferir nos resultados experimentais com *S. venezuelensis*.

Palavras chaves: *Strongyloides venezuelensis*; *Syphacia muris*; Reatividade cruzada; ELISA; *Immunoblotting*.

ABSTRACT

Parasitological and serological evaluation of coinfection *Syphacia muris* and *Strongyloides venezuelensis*

The specie *Strongyloides venezuelensis* is a parasite of rodents used in the study of parasite–host relationship in helminth–infected animals due to their resemblance of the cycle of *Strongyloides stercoralis*. The *Syphacia muris* is a nematode found in large numbers in the cecum of laboratory rats. The present study aimed carry out assessment parasitological and the cross-reactivity among rats (*Rattus norvegicus*) Wistar naturally infected with *S. muris* and experimentally infected with *S. venezuelensis*. Forty animals were used divided into four groups of 10 animals for evaluating the parasite load by quantification of helminths recovered from the intestines of animals and quantification of eggs *S. venezuelensis* per gram of feces. For cross-reactivity ELISA and *immunoblotting* were used. In addition, thirty animals were used for comparison of diagnostic methods for *S. muris* using the methods HPJ, Willis and Graham. Was demonstrated that elimination of eggs as well as the amount female parthenogenetic of *S. venezuelensis* decreases significantly by coinfection for *S. muris*. The method of Graham was the most effective in the detection of *S. muris* infection in rats. In ELISA was observed high cross–reactivity at the sera from all rats infected with *S. muris* front to the total saline extract of *S. venezuelensis* and all animals infected only with *S. venezuelensis* front to the saline extract of *S. muris*. By *immunoblotting* demonstrated cross–reactivity of IgG antibodies in sera from animals infected only with *S. muris* and recognition eight bands in the saline extract of *S. venezuelensis*. Of these only the bands of 68 and 102 kDa were considered to be immunodominant in specific serum from animals infected only with *S. muris*. In the sera from animals infected with *S. venezuelensis* there was the cross–recognition of seven bands, and the 36, 91 and 149 kDa demonstrated the major peaks of reaction. The adaptive immune response generated for *S. muris* may have influenced in the infection by *S. venezuelensis* in coinfecting animals, decreasing the animal load parasitic. This fact can be explained by antigenic similarity between the parasites and cross–protection by IgG antibodies to antigens initially generated by *S. muris*. Given this, the rats kept in animal facilities should be periodically evaluated, once that infections with *S. muris* may compromise and interfere with experimental results with *S. venezuelensis*.

Key-words: *Strongyloides venezuelensis*; *Syphacia muris*; Cross–reactivity; ELISA; *Immunoblotting*.

1 – INTRODUÇÃO

O gênero *Strongyloides* pertence ao reino Animalia, filo Nematoda, classe Secernentea, subclasse Rhabditida, ordem Rhabdiasoidea, família Strongyloididae (BLAXTER et al., 1998). O gênero é composto por mais de 50 espécies, sendo eles parasitos gastrointestinais obrigatórios de vertebrados como anfíbios, répteis, aves e mamíferos. A especificidade do hospedeiro é uma característica destes nematoides, no entanto algumas espécies podem infectar um ou mais hospedeiros (VINEY; LOK, 2007).

Dentre as espécies do gênero *Strongyloides*, *Strongyloides stercoralis* é o causador da estrongiloidíase humana, importante problema médico e social que atinge até 100 milhões de pessoas em cerca de 70 países, sendo a maioria desses localizados em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Latina (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013). A estrongiloidíase humana é uma das doenças infecciosas parasitárias mais difíceis de se diagnosticar. Métodos parasitológicos têm baixa sensibilidade devido à intermitente excreção larval e a baixa carga parasitária (COSTA-CRUZ et al., 2011).

Com a finalidade de melhorar o diagnóstico da estrongiloidíase humana, técnicas imunológicas têm sido utilizadas para diagnosticar a doença. A vantagem destas técnicas, além de maior sensibilidade quando comparado aos métodos parasitológicos é a utilização de extratos antigênicos heterólogos (SATO; TOMA, 1990; GENTA, 1992; COSTA-CRUZ et al., 2003; MACHADO et al., 2007; COSTA-CRUZ et al., 2011).

1.1 – Modelos animais no estudo da estrongiloidíase

As espécies *Strongyloides venezuelensis* e *Strongyloides ratti* parasitos de roedores são espécies utilizadas para estudar a relação parasito/hospedeiro em animais infectados pelo helminto (MARRA et al., 2011) sendo que a espécie *S. venezuelensis* é a mais utilizada pela semelhança do ciclo biológico de *S. stercoralis*.

Em estudo realizado em ratos comprovou-se que a rota de migração de *S. ratti* envolvia vários órgãos diferentes como o fígado, baço, rins, cérebro ou da nasofaringe e não passava pelos pulmões, o que difere da rota de migração de *S. stercoralis*. Também foi verificado que os ratos são mais suscetíveis ao *S. venezuelensis* quando comparado com *S. ratti* (SATO; TOMA, 1990).

A utilização de larvas filarioides de *S. venezuelensis* é uma alternativa de obtenção de antígenos heterólogos utilizados para o diagnóstico de estrongiloidíase humana. Esta espécie é

de fácil obtenção e manutenção em laboratório, apresenta grande quantidade de larvas filarioides em culturas de fezes utilizando-se carvão, além de eliminar o risco de infecção de laboratoristas durante a manipulação (MACHADO et al., 2003; MACHADO et al., 2008).

Os antígenos obtidos de *S. venezuelensis* possuem determinantes antigênicos que apresentam reação cruzada com os antígenos de *S. stercoralis*, o que permite utilizá-los para diagnosticar a estrogiloidíase humana. Vários ensaios imunodiagnósticos têm sido estudados para detectar anticorpos contra *S. stercoralis*, porém têm-se mostrado ineficientes na detecção de infecções disseminadas, além de apresentarem reatividade cruzada nos casos de filariose e esquistossomose (COSTA-CRUZ, 2011). Entretanto, são importantes para detectar casos de infecções latentes de *S. stercoralis*, antes do início da administração quimioterápica ou em pacientes de risco. O sorodiagnóstico é um avanço importante para o diagnóstico de parasitoses, principalmente para indivíduos imunossuprimidos, onde esta doença pode diminuir a qualidade e a sobrevida desses pacientes (RIGO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

As infecções helmínticas em modelos murinos tornaram-se importantes ferramentas para identificação de mecanismos de proteção mediada por células imunitárias efetoras específicas frente à infecção por *S. venezuelensis*, dentre essas células pode-se destacar os mastócitos, eosinófilos e linfócitos B que são fundamentais para desenvolvimento da imunidade ao parasito no hospedeiro (EL-MALKY et al., 2013).

Os linfócitos B atuam principalmente na produção de citocinas e imunoglobulinas contra o parasito. Dentre as imunoglobulinas de maior relevância estão IgG e IgM que atuam como potenciais mediadores da imunidade protetora, após as infecções por helmintos (LESCANO et al., 2012). Em seres humanos e em camundongo a IgG funciona de forma equivalente, evidenciando que o modelo experimental em ratos para estudar a imunidade contra *S. stercoralis* fornece informações que são comparadas com a resposta imune à infecção humana (BONNE-ANNÉE; HESS; ABRAHAM, 2011).

1.2 – Aspectos morfológicos de *Strongyloides venezuelensis*

A espécie *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1947) foi relatada pela primeira na Venezuela juntamente com *S. ratti*, no qual foram encontrados em 10 de 14 ratos selvagens (*Rattus norvegicus*) de Nova Orleans. A descrição foi breve e incompleta, mas o autor listou duas características que diferenciam *S. venezuelensis* de *S. ratti*, os ovários em espiral e ovos desenvolvidos para estádios iniciais de clivagem quando passado nas fezes do hospedeiro.

Foram utilizadas culturas de fezes de ratos silvestres naturalmente infectados para estabelecer infecções em ratos albinos. As infecções resultantes eram presumivelmente tanto por *S. rattii* e como por *S. venezuelensis*. Numa tentativa para estabelecer infecções pura cada um dos oito ratos foi exposto a uma única larva. Infecção patente desenvolvida em apenas um rato, mas esta linha pura foi subsequentemente passada através de uma série de cinco ratos. Exames das fêmeas parasitas revelou que eles eram *S. venezuelensis* (LITTLE, 1966).

As fêmeas partenogénicas e/ou parasitos medem 2.0–3.2 mm de comprimento por 33–41 µm de largura. Elas são encontradas no duodeno e jejuno superior de ratos (*R. norvegicus*). Apresentam estoma ornamentado, elevação do circum com oito pequenos lobos desemparelhados dorsalmente e ventralmente, subdorsais emparelhados, laterais e subventrais. Ambos os ovários possuem formato em espiral em torno de intestino, o anterior geralmente três vezes e posterior duas vezes. Os ovos nos úteros variam de 8 a 12. A cauda é curta e cônica (LITTLE, 1966).

As fêmeas de vida livre medem de 0,81 a 1,2 mm de comprimento por 40–70 µm de largura não possuem constrição do corpo, os lábios da vulva não são proeminentes. Os ovos estão dispostos em fila única nos úteros. Os machos de vida livre medem 0,80 – 0,93 mm por 40–50 µm de largura, possuem papilas pós-anal subdorsal ligeiramente posterior as subventrais, os espículos curvados e evidentes, a membrana ventral proeminente (LITTLE, 1966).

As larvas de terceiro estágio são o estágio infectante. Medem de 470–640 µm de comprimento por 16–19 µm de largura. O esôfago é filariforme como na fêmea partenogénica com comprimento aproximado de 40% do corpo. Cutícula levemente estriada, boca pequena, sistema excretor semelhante ao de adultos de vida livre. A cauda é bifurcada ou entalhada (LITTLE, 1966).

1.3 – Modo de transmissão e ciclo biológico de *Strongyloides venezuelensis*

Strongyloides venezuelensis possui uma rota de migração pela via clássica através da corrente sanguínea aos pulmões e para o intestino delgado, semelhante ao de *S. stercoralis* em humanos. O desenvolvimento de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* ocorre no ambiente (ciclo de vida livre) e no hospedeiro (ciclo de vida parasitária). A fase parasitária inicia-se com a penetração das larvas filarioides (L3) através da mucosa e da pele, migram pela corrente sanguínea até os pulmões, após são deglutidas e chegam ao intestino delgado onde atingem a

maturidade. O parasito elimina ovos nas fezes do hospedeiro e não larvas como *S. stercoralis* (YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014).

1.4 – Sintomatologia da estrogiloidíase murina

Quando os animais estão infectados com nematoides intestinais, os hospedeiros desenvolvem resposta imune do tipo Th2, que induzem a produção de imunoglobulina (Ig) IgE e IgG1, mastocitose intestinal, eosinofilia pulmonar (síndrome de Loeffler) e eosinofilia sistêmica (YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014).

Durante a infecção por *S. venezuelensis* a migração obrigatória das larvas infectantes através do pulmão induz reação inflamatória por eosinófilos, a produção de muco, aumento das concentrações locais de total e específica de IgE, e hiper-reatividade brônquica (SILVEIRA, et al., 2002; NEGRÃO-CORRÊA, et al., 2003; YASUDA, et al., 2012). As larvas induzem a mudança inflamatória grave nos pulmões (síndrome Loeffler), caracterizada por infiltração eosinofílica severa (YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014).

Assim que elas deixam os pulmões, migram para a cavidade oral, e chegam no intestino delgado, onde se tornam fêmeas adultas induzindo a mastocitose intestinal grave e a hiperplasia das células caliciformes. A ativação de mastócitos de mucosa é importante para rápida expulsão de *S. venezuelensis* (YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014).

1.5 – Diagnóstico e tratamento da estrogiloidíase murina

Na infecção experimental por *S. venezuelensis*, o diagnóstico parasitológico é efetuado por meio de exame direto e cultura das fezes. Também pode ser realizado por métodos indiretos como ensaios imunológicos e moleculares como a *Polymerase Chain Reaction* – PCR (PAULA et al., 2013).

Dentre os métodos imunológicos para diagnóstico podem ser utilizados: *Enzyme Linked-Immunoabsorbent Assay* (ELISA), *Immunoblotting* e Imunofluorescência Indireta (IFI) (COSTA-CRUZ, 2011; LEVENHAGEM; COSTA-CRUZ, 2014) para detecção de IgG sérica específica a antígenos de *Strongyloides*. A detecção de antígenos nas fezes também mostrou-se uma alternativa viável para o diagnóstico em ratos imunossuprimidos (GONÇALVES et al., 2010). De forma semelhante, a detecção de antígeno e imunocomplexo em amostras do lavado broncoalveolar (LBA) demonstrou ser uma boa abordagem para o diagnóstico precoce nas infecções em ratos imunocompetentes ou imunocomprometidos (GONÇALVES et al., 2012).

A ivermectina e o levamisol injetáveis são indicados no combate de múltiplas espécies de parasitos, em animais acometidos por ectoparasitoses ou infectados por certos tipos de nematoides. Esses medicamentos agem em distintas etapas do desenvolvimento dos parasitas, no entanto a utilização da ivermectina demonstrou maior eficácia antiparasitária, com atividade antilarvária em ratos infectados por *S. venezuelensis* (CAMPOS et al., 1989; AMATO NETO et al., 1997).

Estudo com fungos nematófagos tem apresentado resultados promissores como potenciais controladores biológicos. As espécies de fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense* são identificadas como predadoras de nematoides e têm atividade predatória sobre larvas infectantes de *S. venezuelensis* (BRAGA et al., 2011).

Estudo recente demonstrou também a utilização de probióticos na diminuição da carga parasitaria de *S. venezuelensis* em camundongos. No qual foi comprovado que houve redução de 33% das fêmeas parasitos no intestino, 21% de eliminação de ovos e também foi observado que a altura das vilosidades no duodeno em animais tratados com probiotico sofrem menos agressão (OLIVEIRA–SEQUEIRA et al., 2014).

1.6 – Aspectos morfológicos de *Syphacia muris*

Os parasitos do gênero *Syphacia* pertencem à classe Nematoda, ordenar Ascarida, subordem Oxyurina. O gênero é composto por 23 espécies e dentre eles se destacam *Syphacia obvelata*, *S. muris* e *Aspicurulus tetraptera* que são encontrados comumente infectando roedores de laboratório (FLYNN, 1973; WESCOTT, 1982). De forma geral os parasitos do gênero *Syphacia* spp. possuem esôfago proeminente seguido por um único bulbo bem desenvolvido na extremidade posterior. O ciclo de vida é simples e direto, no qual os hospedeiros se tornam infectados pela ingestão de ovos embrionados.

Syphacia muris Yamaguti, 1941 é um nematódeo que habitualmente infecta ratos albinos (*R. norvegicus*) no entanto, o parasito pode infectar camundongos. Devido a esta infecção cruzada pode se confundir *S. muris* com *S. obvetata* que usualmente infectam camundongos. No entanto as espécies podem ser facilmente diferenciadas pelo tamanho dos ovos, posições do poro excretor e da vulva das fêmeas, e das posições do poro excretor e comprimento da cauda dos machos (HUSSEY, 1957; TAFFS, 1976).

As fêmeas adultas de *S. muris* medem 2,8–4,0 µm de comprimento por 250 µm de largura. A vulva está localizada na região posterior ao bulbo esofágico. O anel nervoso e poro

excretor estão localizados na extremidade anterior (TAFFS, 1976; PINTO et al., 2001).

Os machos adultos medem 1,2–1,3 μm de comprimento por 100 μm de largura. O comprimento da cauda é cerca de duas vezes a largura do corpo, enquanto que o comprimento da cauda de *S. obvelata* é aproximadamente igual à sua largura do corpo. Possuem três mamelons proeminentes na superfície ventral da porção posterior. Boca com três lábios. Os dois subventrais contém uma estrutura papiliforme cada um, não projetando-se para fora da cutícula, enquanto que o dorsal apresenta duas estruturas semelhantes, uma de cada lado. O esôfago, caracteriza-se por possuir um bulbo globular. O anel nervoso está localizado na extremidade anterior, enquanto que o poro excretor não pode ser visualizado. Espicula único, gubernáculo com um processo distal em forma de gancho e possuem três pares de papilas caudais (TAFFS, 1976; PINTO et al., 2001).

Os ovos de *S. muris* são levemente assimétricos medem de 75 x 20 μm , casca delgada e transparente, apresentando um pouco mais do que metade do comprimento dos ovos de *S. obvelata* (134 x 36 μm), embora quase a mesma largura (FLYNN, 1973; TAFFS, 1976;; WESCOTT, 1982).

1.7 – Modo de transmissão e ciclo de vida de *Syphacia muris*

O ciclo de vida de *S. muris* é simples e direto. Os ratos se tornam infectados pela ingestão de ovos provenientes da região perianal de um animal infectado ou indiretamente através de alimento, água ou materiais contaminados. Os ovos eclodem no trato intestinal superior do rato, e as larvas migram para o ceco, o principal habitat deste parasito. A maturação é rápida, aproximadamente sete dias. As fêmeas grávidas migram do cólon e na região perianal a partir de meio-dia, no qual depositam os ovos embrionados na região perianal (STAHL, 1963; VAN DER GULDEN, 1967; TAFFS, 1976; LYTVYNETS et al., 2010). Os ovos encontram-se infectantes dentro de 5 a 20 horas, podendo contaminar outros roedores. Outra possibilidade de infecção ocorre pela retroinfecção, através da eclosão de ovos no ânus e as larvas movimentando em direção ao cólon. Os vermes adultos ocorrem no ceco e no cólon anterior; o período pré-patente de *S. muris* é de 7–8 dias (LEWIS; D’SILVA, 1986; BAKER, 1998; LYTVYNETS et al., 2010).

1.8 – Sintomatologia da infecção por *Syphacia muris*

A maioria das infecções por esse *S. muris* é assintomática em roedores imunocompetentes, mas complicações atribuídas às infecções incluem alterações físicas, comportamentais e imunológicas (MOHN; PHILLIP, 1981; WAGNER, 1988; LUBCKE; HUTCHESON; BARBEZAT, 1992; BAKER, 1998; HUERKAMP et al., 2000; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004; HILL; RANDOLPH; MANDRELL, 2009). Sinais clínicos associados com infecções maciças incluem prolapso retal, intussuscepção intestinal, enterite mucoide e diarreia (LUCA et al., 1996; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004; DOYLE et al., 2006).

1.9 – Diagnóstico e tratamento da infecção por *Syphacia muris*

Várias técnicas têm sido descritas para diagnosticar infecções por *S. muris* em roedores de laboratório. Técnicas de diagnóstico mais comuns incluem fita gomada, swab anal, flutuação espontânea, necropsia com exame microscópico do conteúdo cecal e cólon, e exame histológico (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; HILL; RANDOLPH; MANDRELL, 2009).

Ao coletar material para realizar os exames parasitológicos, os mesmos devem ser realizados sempre no período da tarde. Este fato se deve a periodicidade das fêmeas de *S. muris* de migrar do intestino grosso para a região anal ao meio-dia, no qual os ovos são encontrados sempre à tarde quando comparado com os outros períodos de 24 horas (VAN DER GULDEN, 1967; TAFFS, 1976).

Syphacia muris apresenta grande dificuldade de controle devido a características do seu ciclo biológico como retroinfecção e pela fácil dispersão dos ovos acarretando na contaminação de outros animais de laboratório e equipamentos (DIX; ASTILL; WHELAN, 2004). Essa contaminação generalizada faz com que a manutenção de animais de laboratório se torne um processo extremamente laborioso e dispendioso devido principalmente à interferência nos dados experimentais assim como o longo período de tratamento. Desse modo, torna-se fundamental o estabelecimento de métodos de diagnóstico eficazes que promovam a detecção precoce da infecção por esse parasito.

A erradicação de infecções por *S. muris* é extremamente difícil, especialmente a partir de grandes colônias de reprodução de roedores. Além disso, os programas de quarentena também são necessários para novos animais ou materiais biológicos (REHG; TOTH, 1998;

GILIOLI et al., 2000; TANIDEH et al., 2010). Para o controle, seria interessante que as colônias fossem iniciadas com matrizes livre de parasita, caso contrário, deve-se realizar a administração de anti-helmínticos (LYTVYNETS et al., 2010). As infecções por esse nematódeo têm sido tratadas com drogas como ivermectina (KLEMENT et al., 1996; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004). A eficácia da ivermectina tem sido demonstrada em ratos de laboratório naturalmente infectados com *S. muris*, sendo administrada na água dos animais ao longo de quatro períodos de 5 dias com dose de 2,5 mg/kg de peso corporal por dia, sendo que o tratamento não apresentou toxicidade ou alterações fisiológicas nos animais (LYTVYNETS et al., 2010).

Ao longo da última década têm se estabelecido e desenvolvido melhores condições sanitárias nas colônias de roedores. Isto envolveu a eliminação de agentes patogênicos, incluindo *S. muris* (NICKLAS et al., 2002; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004). Devido à resistência de ovos de *S. muris* a procedimentos de desinfecção utilizados rotineiramente e considerando a sua alta taxa de infecção é essencial elaborar procedimentos de descontaminação eficazes. Entre os métodos mais adequados para a descontaminação de equipamentos ou materiais contaminados com *S. muris* destacam-se o calor seco a 100 °C e óxido de etileno com 100% de eficácia na eliminação de ovos do parasito. Tratamentos com formaldeído e dióxido de cloro mostrou menor eficácia com eliminação de 94% e 96%, respectivamente (HUSSEY, 1957; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004).

Para melhor controle de *S. muris* em animais de laboratório, algumas medidas podem ser implementadas como: utilização de isoladores para as gaiolas, para evitar o contato ambiental, aumento na frequência da troca de gaiolas e garrafas e manter menor quantidade de animais por gaiola (DIX; ASTILL; WHELAN, 2004). Estudo indicam a necessidade de investimentos maciços em ciência e tecnologia para utilização de animais de laboratório (ambiente físico, equipamentos, implementação da qualificação de recursos humanos sobre rígidas barreiras sanitárias e monitoramento sanitário) para a melhoria da qualidade de vida de animais de laboratório, para pesquisa biomédica e diminuição da transmissão para outros animais de laboratório (TANIDEH et al., 2010).

Levando-se em consideração que animais de laboratório são de grande importância à experimentação biológica e que a debilidade nas condições sanitárias do plantel pode interferir nos resultados esperados, o presente estudo possui relevância para o entendimento e elucidação do perfil de reatividade cruzada em modelo murino, no qual os dados poderão ser utilizados como comparativo entre animais naturalmente infectados *S. muris* com os experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*. Pois, caso as amostras de soro desses

animais não apresentem nenhuma interferência nos resultados, as mesmas poderão ser utilizados em outros projetos de pesquisa em estrongiloidíase, visto que a infecção por *S. muris* em biotérios acontece frequentemente.

2 – OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo proceder a avaliação parasitológica e sorológica, entre ratos (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados com *Syphacia muris* e experimentalmente infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

2.1 – Objetivos específicos

- Comparar a carga parasitária dos helmintos nos ratos infectados e coinfectados.
- Comparar três métodos qualitativos para diagnóstico de *Syphacia muris*.
- Caracterizar o perfil eletroforético de proteínas provenientes de *S. muris* e *S. venezuelensis*.
- Avaliar a presença de reatividade cruzada entre soros de ratos naturalmente infectados com *S. muris* e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e por *Immunoblotting*.
- Determinar frações proteicas por *Immunoblotting* que representem os principais determinantes de reatividade cruzada entre soros obtidos de animais infectados com *S. muris* e *S. venezuelensis*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa–Cruz. O estudo foi realizado com 40 animais sob o protocolo de registro 146/13 do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU e com 30 animais sob o protocolo de registro 112/12 do CEUA/UFU.

3.2 – Animais

Para os experimentos foram utilizados 70 *Rattus norvegicus* (Wistar) machos de 4 a 6 semanas de idade (100 a 200g). Na comparação de carga parasitária e avaliação de reatividade cruzada foram utilizados 40 animais divididos em quatro grupos, com dez indivíduos em cada:

Grupo I: animais sem infecção – controles negativos (*Naïve*).

Grupo II: animais experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* – controles positivos.

Grupo III: animais naturalmente infectados com *S. muris*.

Grupo IV: animais coinfetados, infectados naturalmente com *S. muris* e posteriormente infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*.

Os animais do grupo II e IV foram inoculados por via subcutânea com 1.500 larvas infectantes de *S. venezuelensis* e os animais do grupo I receberam solução salina. Antes de iniciar a infecção parasitária por *S. venezuelensis* ou não, foram coletadas fezes dos animais de todos os grupos para exames parasitológicos. Aos 21 dias todos os animais foram eutanasiados com tiopental intraperitoneal (160 mg/kg) para coleta de sangue e obtenção dos soros para serem utilizados na avaliação de reatividade cruzada por meio de imunodiagnósticos. Também foram coletados o intestinos e fezes dos animais para determinação de carga parasitária.

Para avaliação das técnicas parasitológicas de detecção de *Syphacia muris*, foram utilizados mais 30 animais. Estes animais foram mantidos em um único grupo.

3.3 – Obtenção das larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1947) foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem está sendo mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil.

As larvas filarioides utilizadas foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Para a coprocultura os animais foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido no 7º d.p.i. no período da tarde e as fezes foram coletadas no 9º dia pela manhã. As fezes coletadas foram mantidas em cultura de carvão mineral por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2011), e foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brizola (1954).

3.4 – Contagem de ovos por grama de fezes

Durante todos os procedimentos experimentais, os ratos permaneceram individualizados em gaiolas para facilitar a retirada das amostras de fezes. Os mesmos foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido. As fezes foram coletadas antes de iniciar a infecção parasitária com larvas filarioides de *S. venezuelensis* diariamente até o 21º d.p.i. e a estimativa do número de ovos/g de fezes foi realizada segundo o método de Cornell–MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939).

3.5 – Coleta do intestino dos ratos e contagem dos adultos dos helmintos

Para quantificação de fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis*, após eutanásia dos animais, o intestino delgado foi removido e colocado em placa de Petri contendo salina, seccionado longitudinalmente e incubado a 37 °C por 3 horas para o desprendimento dos parasitos do tecido intestinal. Em seguida a contagem das fêmeas partenogênicas foi realizada, segundo Sato e Toma (1990).

Para quantificação de adultos de *S. muris*, o intestino grosso foi removido e todo o conteúdo intestinal lavado com PBS sobre peneiras. O conteúdo foi colocado em um cálice e deixado por 6 horas. Após esse período foi adicionada solução saturada de NaCl e

imediatamente os adultos de *S. muris* foram coletados lavados com PBS, centrifugados e após contados em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão).

3.6 – Exames de fezes para detecção de *S. muris*

Para detecção de ovos de *S. muris*, fezes coletadas no período da tarde dos 30 animais e foram processadas para a realização dos exames coprológicos pelos métodos de sedimentação espontânea – HPJ (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934) e flutuação espontânea – Willis (WILLIS, 1921). Para o método HPJ, as fezes coletadas foram diluídas em água destilada e submetidas à sedimentação por um período de 24h. Após esse tempo, as amostras foram coradas com lugol e analisadas ao microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão) com lâmina/lamínula. No método de Willis as amostras foram processadas com solução saturada de NaCl e transferidas para frasco de Borrel. Sobre o frasco foi colocada uma lâmina. Após 5 minutos as lâminas foram retiradas do frasco, e em seguida coradas com lugol e analisadas em microscópio óptico Olympus CH2, após montagem com lamínula. As imagens foram capturadas por microscópio óptico Bioval L-2000 (Bioval, China) acoplado a um sistema de captura de imagens Biocam e software PixelView (Prolink, EUA).

3.7 – Exame de fita gomada ou Graham

Os mesmos 30 animais foram submetidos ao exame de fita gomada – Graham (GRAHAM, 1941) pela tarde de acordo com Taffs (1976). Para detecção de ovos de *S. muris* foram utilizadas fitas autoadesivas transparentes colocadas em contato com a região perianal de cada animal. As fitas obtidas no exame foram colocadas sobre uma lâmina e realizada a leitura em microscópio óptico Olympus CH2 para identificação dos ovos do parasito. As imagens foram capturadas por microscópio óptico Bioval L-2000 (Bioval, China) acoplado a um sistema de captura de imagens Biocam e software PixelView (Prolink, EUA).

3.8 – Preparação dos extratos salinos totais de *S. venezuelensis* e *Syphacia muris*

O extrato salino total foi produzido a partir de 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis* conforme metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2007), com algumas

modificações, e o extrato de *S. muris* foi produzido a partir de 500 adultos de *S. muris* de acordo com Sotillo *et al.* (2012), com algumas modificações. As larvas de *S. venezuelensis* ou adultos de *S. muris* foram descongelados e separadamente ressuspensos em 100 µL de solução PBS 0,15 M, pH 7,2. A seguir foram trituradas no homogeneizador de tecidos por 5 ciclos de 5 minutos em banho de gelo. Posteriormente o homogenato foi submetido a 8 ciclos de ultra-som de 20 segundos em banho de gelo e em seguida adicionado 100 µL do coquetel de inibidores de proteases (cOmplete mini, Roche) para cada um mL do homogenato. O preparado foi incubado sob agitação lenta por 18 horas a 4 °C e em seguida, centrifugado a 12400 x g por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes dos extratos salinos foram quantificados quanto ao conteúdo proteico pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e armazenados a -20 °C, constituindo-se assim, nos extratos antigênicos de *S. venezuelensis* e *S. muris*. O procedimento foi repetido para obtenção de quantidade necessária de antígenos para todos os experimentos.

3.9 – ELISA indireto para detecção de IgG específico

Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para o ELISA (concentração de antígeno, diluição ideal de soro e conjugado). O antígeno foi testado nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Amostras de soro padrão (positivas e negativas) foram testadas nas diluições 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20, o conjugado IgG de cabra anti-IgG de rato marcado com peroxidase *whole molecule* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi testado nas diluições 1:1000, 1:5000, 1:8000 e 1:10000 e foi testada a condição de bloqueio e não bloqueio da placa com PBS-TM 3% após sensibilização com 5 ou 10 µg de proteína por poço da placa.

As placas de microtitulação (Greiner Bio-One, Áustria) foram sensibilizadas com 50 µL dos extratos salinos de *S. venezuelensis* ou *S. muris* na concentração de 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M (pH 9,6) e incubada *overnight* a 4°C em câmara úmida, por 18 horas. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Após as lavagens, foi adicionado 50 µL por poço das amostras de soro a serem testadas (diluídas 1:10 em PBS-T). Em todas as placas foram incluídos controles de reação que constituíram de três amostras de soro padrão positivo e três amostras de soro padrão negativo, além das amostras de soros dos grupos de estudo, a serem testadas. Após incubação por 45 minutos a 37°C e três lavagens de 5 minutos com PBS-T foi adicionado 50 µL de conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase *whole molecule* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA)

na diluição ideal de 1/8.000 em PBS-T e incubado por 45 minutos a 37 °C. Após um ciclo final de lavagens a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato H₂O₂ (Merck) e solução cromógena de orto-fenilenodiamina – OPD (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) preparado no momento do uso (5 mg de OPD + 12,5 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 10 µL de H₂O₂ 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 2N (Merck).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus Flow Laboratories). O *cut off* de cada reação foi determinado pela média dos valores de DO das amostras de soros controles negativos acrescidos de três desvios padrões. Os níveis de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: IE = DO da amostra / DO do *cut off* (SILVA et al., 2002).

3.10 – Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE) dos extratos salinos de *S. venezuelensis* e de *S. muris*

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE) foi realizada para analisar o perfil eletroforético dos extratos salinos de *S. venezuelensis* ou de *S. muris*. Os extratos salinos e padrões de peso moleculares *RecomTM Blue Wide Range Protein Marker* (BioAmerica Biotech, China) foram submetidos à SDS–PAGE a 12%, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O mini–gel foi preparado entre placas de vidro (10x10 cm) com espaçadores em politetrafluoretileno de 0,75–1,0 mm de espessura em suporte próprio do sistema completo de cuba eletroforética vertical para mini–gel. Foram necessários dois tipos de géis para o procedimento: gel de separação e gel de empilhamento. O gel de separação foi preparado utilizando-se tris–HCl 0,375 M, pH 8,8, SDS 1%, EDTA (ácido etilenodiamino tetra–acético) 2mM, solução de acrilamida 30% e bis–acrilamida 0,8%, TEMED (N, N, N, N–tetrametil etilenodiamino) 0,125%, APS (Persulfato de amônio) 0,125% e água destilada. A solução preparada foi adicionada lentamente entre as placas seladas, para evitar a formação de bolhas no gel. Para impedir a polimerização do gel na presença de oxigênio foi colocado butanol até a formação de fina camada, que foi descartada após a polimerização. Em seguida, o gel de empilhamento foi depositado na placa sobre o gel de separação e moldado rapidamente com pente em politetrafluoretileno para a formação de poços de aplicação de amostras. Tal gel foi preparado com tris–HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 0,1%, EDTA 2mM, solução acrilamida/bis–acrilamida a 5%, TEMED 0,125%, APS a 0,125% e água destilada. Antes da aplicação no gel, as amostras foram diluídas em tampão de amostra 2X contendo tris–HCl 100 mM, pH 6,8,

SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20% ou tampão 10X contendo tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS 10%, azul de bromofenol 0,25%, EDTA 200 mM e sacarose 20%, e submetidas a aquecimento em banho seco por 3 minutos para desnaturação proteica completa.

As placas foram encaixadas nas cubas para eletroforese contendo tampão de corrida tris-glicina. O tampão de corrida pH 8,3 foi uma solução de glicina 0,19 M, tris 0,025 M, SDS 0,075% e EDTA 1,95 M. A migração dos polipeptídios foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 150 V por aproximadamente três horas. O padrão de peso molecular foi utilizado para o cálculo dos pesos moleculares relativos das bandas proteicas presentes nos extratos de *S. venezuelensis* e de *S. muris*.

Depois da corrida o gel foi corado com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982). A coloração do gel por nitrato de prata destaca os polipeptídios em tons de amarelo. Após a migração das proteínas, o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora composta de metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,05% e água destilada, por no mínimo uma hora ou até 20 horas. Em seguida, o fixador foi removido com etanol 50% em três banhos de 20 minutos cada. Em seguida foi executado um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 0,2% por um minuto. Posteriormente, o gel foi lavado três vezes de 20 segundos cada, com água destilada, e foi impregnado com solução de formaldeído 37%, nitrato de prata (AgNO_3) 2% e água; mantido ao abrigo da luz por 20 minutos. Por fim, o gel foi lavado em água destilada por 3 vezes de 20 segundos, e revelado com solução composta de 3 g de carbonato de sódio, 25 μL de formaldeído e 1 mL de tiosulfato de sódio pentahidratado 0,2% até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com solução de metanol 50% e ácido acético glacial 12%. O gel foi digitalizado e para fins de documentação e conservação foi colocado para secar em repouso estendido entre folhas de papel celofane, embebidas de água destilada, e placas de vidro.

3.11 – Immunoblotting

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o *Immunoblotting* (diluição ideal de soro e conjugado utilizados). Amostras de soro padrão (positivas e negativas) de ratos comprovadamente positivos e negativos a *S. venezuelensis* ou *S. muris* foram testadas nas diluições 1:2, 1:10, 1:30, 1:50, 1:80 e 1:100 e o conjugado IgG de cabra anti-IgG de rato marcado com peroxidase *whole molecule* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi testado nas diluições 1:100, 1:500 e 1:1000 sendo que cada diluição do soro foi submetida à três diluições do conjugado.

Os componentes proteicos dos extratos salinos de *S. venezuelensis* e *S. muris* foram submetidos separadamente à eletroforese 1D à SDS–PAGE a 12% (LAEMMLI, 1970), sob condições não redutoras na concentração de aproximadamente 250µg de extrato por gel, separadamente, juntamente com padrões de alto e baixo peso molecular.

Após a separação eletroforética, os componentes proteicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (0,45 µm – Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) utilizando sistema de transferência úmido (Hoefer® miniVE, San Francisco, EUA), de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Foi preparado um “sandwich” com uma esponja, um papel filtro, gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas, membrana de nitrocelulose, mais uma folha de papel de filtro e por último outra esponja, todos umedecidos em tampão de transferência constituído de Tris 25 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), glicina 192 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e metanol a 20%, e foram colocados em uma cuba de transferência para aplicação de corrente elétrica de 300 mA, durante uma hora e quarenta minutos.

Ao término da transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para confirmar as bandas eletrotransferidas. As membranas foram colocadas em cubas para *Immunoblotting* e bloqueadas com PBS–T acrescido de 5% de leite desnatado (PBS–TM) por duas horas, a TA; depois foram lavadas com PBS–TM a 0,05%. As amostras de soro foram utilizadas na diluição 1/50 em PBS–TM a 1% para um volume final de 500 µL/poço e as membranas foram então incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Após as 18 horas as membranas foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS–T 0,05%, posteriormente adicionados 500µL do conjugado IgG de cabra anti–IgG de rato marcado com peroxidase na diluição 1/500, em PBS–TM a 1%. Após uma hora sob agitação lenta a TA, as tiras foram submetidas a seis ciclos de lavagens com PBS–TM a 0,05%. O teste foi revelado com *SIGMA–FAST*TM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) 3,3 diaminobenzidina (DAB) em 15 mL de TBS (Tris–buffered saline) e acrescido de 12 µL peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%). Após a visualização das bandas antigênicas a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada. As tiras foram secas em temperatura ambiente, identificadas de acordo com a amostra de soro e o antígeno usado, e posteriormente foram analisadas.

3.12 – Normas de Biossegurança

O procedimento de coleta e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.13 – Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, EUA). As variáveis foram analisadas com os testes específicos, paramétricos ou não paramétricos, segundo a distribuição dos dados. Todos os dados foram considerados significativos quando valor de p foi menor que 0,05.

Os dados de ovos por gramas de fezes (OPG) foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguidas de pós-teste de Bonferroni.

Para comparação da carga parasitária foi utilizado o teste t de *Student* para amostras pareadas independentes. Os dados foram expressos em número total, média e desvio padrão.

Na comparação entre os métodos parasitológicos foi utilizada o Teste exato de Fisher.

Para real distinção entre amostras positivas e negativas por ELISA, o limiar de reatividade (*Reactivity Index* – RI) foi obtido através do cálculo Sensibilidade (Se) e Especificidade (Es). Para isso utilizou-se análise pelo método *Two-Graph Receiver Operating Characteristic* (TG-ROC) (MINEO, 2009). O ponto de intersecção entre as curvas de Se e Es equivale ao valor no qual o RI apresenta o máximo de sensibilidade e especificidade que podem ser alcançados. Assim, o TG-ROC foi construído para discriminação de animais sorologicamente positivos e negativos.

Para análise qualitativa da intensidade de bandas antigênicas nos extratos de *S. venezuelensis* e *S. muris* foi utilizado o programa computacional Image J 1.48 (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA). Para análise quantitativa, os pesos moleculares das bandas polipeptídicas foram estimados por regressão linear, de acordo com o padrão de peso molecular referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa (Rf), utilizando o programa computacional Excel, 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA). O Rf de cada peso molecular foi obtido através da fórmula:

$$Rf = \text{Distância da origem à migração} / \text{Distância da origem até o ponto de referência}$$

4 – RESULTADOS

4.1 – Avaliação parasitológica

4.1.1 – Contagem de ovos por gramas de fezes de *Strongyloides venezuelensis*

Para avaliação de carga parasitária realizou-se cinética de eliminação de ovos de *S. venezuelensis* diariamente até 21 d.p.i. em amostras fecais provenientes de animais infectados. No grupo II (animais infectados com *S. venezuelensis*) e grupo IV (animais co-infectados) observou-se o início de eliminação de ovos em amostras fecais analisadas a partir do quinto d.p.i, sendo o período entre o sexto e nono d.p.i onde foi observado maior quantidade de eliminação de ovos por grama de fezes, com diferença estatística significativa ($p < 0,001$). O oitavo dia apresentou o pico de maior eliminação de ovos em ambos os grupos. Os animais do grupo IV, a partir do 10º até o 13º d.p.i, eliminaram mais ovos por gramas de fezes comparado ao grupo II. Diferença estatística significativa foram observadas apenas no 11º d.p.i. ($p < 0,01$). A partir do 13º dia houve uma linearidade na eliminação de ovos e no 21º d.p.i a eliminação de ovos em ambos os grupos aproximou-se a zero (Figura 1). Nos animais do grupo I (animais *Naïve*) e grupo III (animais infectados naturalmente com *S. muris*) não foram encontrados ovos de *S. venezuelensis* durante o período de experimentação.

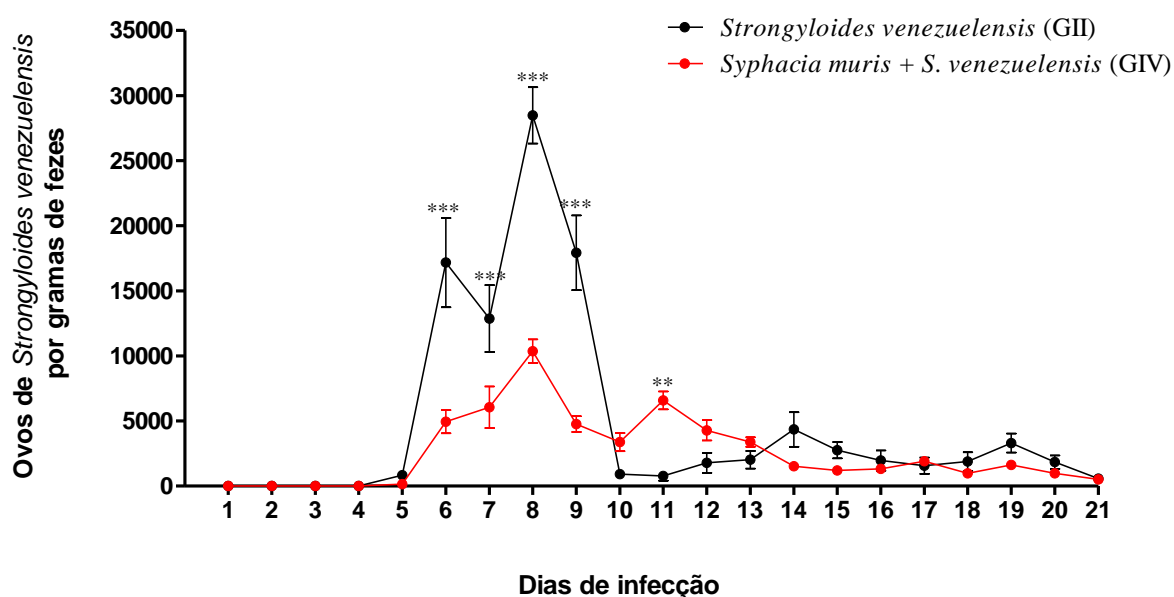


Figura 1. Cinética da eliminação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* nos diversos d.p.i avaliados nas fezes de infectados com *Strongyloides venezuelensis* (GII) e ratos coinfectados com *Syphacia muris* e *S. venezuelensis* (GIV). São graficamente apresentados a média e o erro padrão da média. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.2 – Comparação de carga parasitária dos helmintos presente em intestinos de ratos infectados

Ao comparar os animais coinfectados com animais infectados somente com *S. venezuelensis* ou *S. muris* foi possível observar que houve redução da carga parasitária em relação aos parasitos adultos recuperados nos intestinos dos ratos infectados (Tabela 1). Ao analisar a figura 2A foi possível observar que os animais do grupo II apresentaram maior quantidade de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* recuperadas do intestino delgado quando comparada com os animais do grupo IV ($p < 0,0001$). O mesmo aconteceu quando foi analisada a figura 2B, onde os animais do grupo III apresentaram maior quantidade de adultos de *S. muris* recuperados do intestino grosso quando comparado ao grupo IV ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Número total de parasitos adultos de *S. venezuelensis* e *S. muris* recuperados dos intestinos dos ratos infectados dos quatro grupos estudados.

Animal	Número total de helmintos recuperados dos intestinos				
	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	
	<i>Naïve</i>	<i>S.venezuelensis</i>	<i>Syphacia muris</i>	<i>S.venezuelensis</i>	<i>Syphacia muris</i>
1	0	459	53	100	5
2	0	437	10	150	4
3	0	452	28	190	6
4	0	390	17	45	3
5	0	452	17	32	2
6	0	411	65	189	4
7	0	334	41	122	7
8	0	418	17	100	5
9	0	463	14	134	6
10	0	432	69	90	8
Média	0	425	33	115	5

GI – Animais *Naïve* (n = 10); GII – Animais infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* (n = 10); GIII – Animais naturalmente infectados com *S. muris* (n = 10); Grupo IV – animais coinfectados com *S. muris* e *S. venezuelensis* (n = 10).

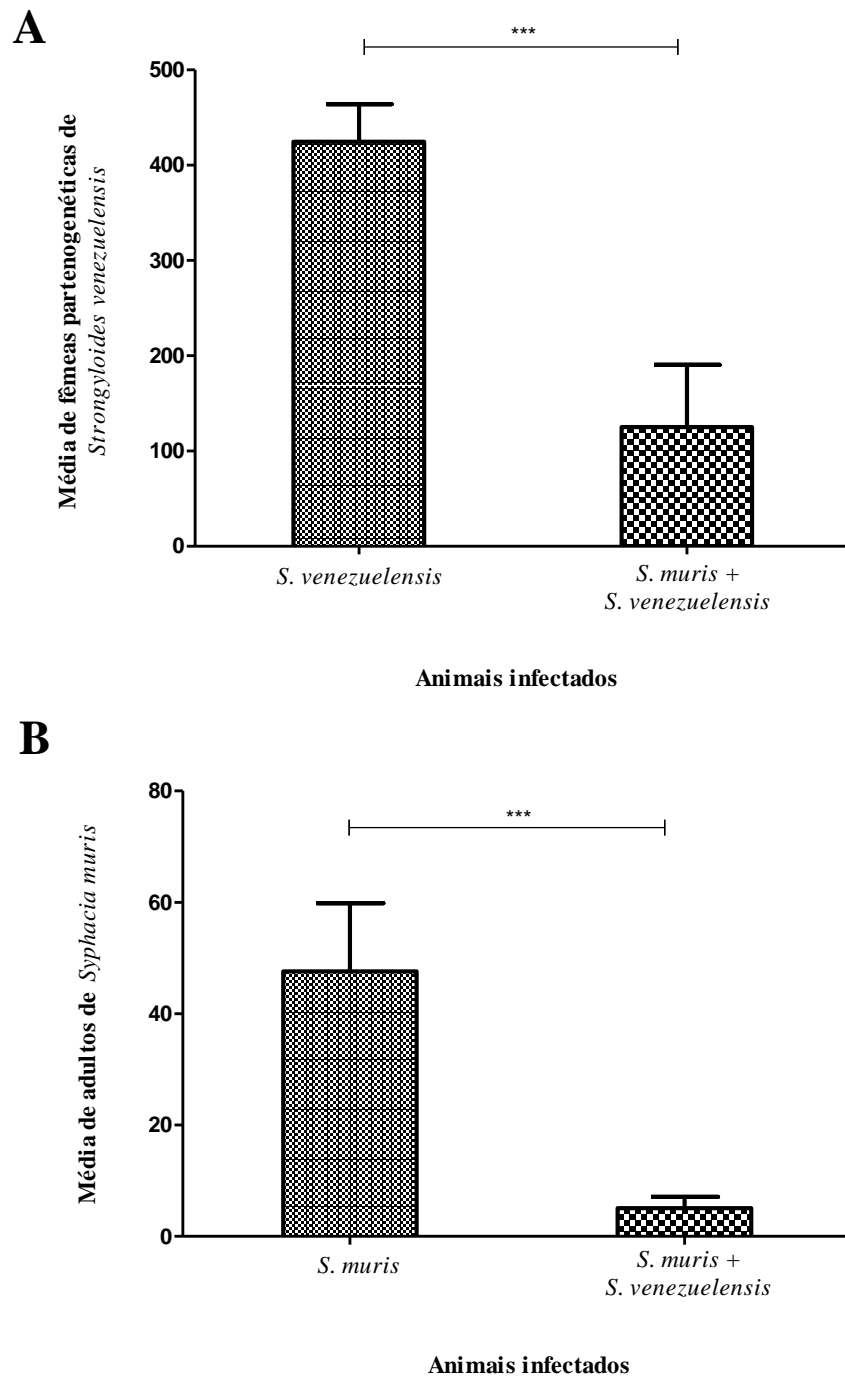


Figura 2. Média de parasitos adultos recuperados dos intestinos dos ratos experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* (A), naturalmente infectados com *S. muris* (B) e animais coinfectados com *S. venezuelensis* e *S. muris* (A e B). Os traços horizontais representam desvio padrão. *** = $p < 0,0001$.

4.1.3 – Comparação de métodos qualitativos para diagnóstico de *Syphacia muris*.

A positividade da infecção por *S. muris* foi confirmada pela observação de qualquer forma parasitária do helminto no conteúdo intestinal dos animais após necropsia.

Entre os métodos utilizados para detecção de ovos do parasito observou-se que o método de Graham detectou 30/30 amostras positivas (100%). O método de Willis identificou 26/30 amostras positivas (83%) e o método de HPJ detectou 18/30 amostras positivas (60%) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação de três métodos parasitológicos para detecção de ovos de *Syphacia muris* em trinta *Rattus norvegicus* infectados naturalmente.

Métodos	Positivos	Negativos	Total
	n (%)	n (%)	n
HPJ	18 (60)	12 (40)	30
Willis	26 (83)	4 (17)	30
Graham	30 (100)	0	30

Pelo Teste exato de Fisher buscou-se comparar qual dos três métodos foi o mais indicado para identificação de ovos do parasito nas amostras. Observou-se que os métodos de Graham e Willis apresentaram maior eficiência na detecção de ovos do parasito em relação ao HPJ, com valores de $p=0,0001$ e $p=0,0391$, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os métodos de Willis e Graham ($p=0,1124$).

O método de Graham possibilitou visualização de uma maior quantidade ovos/campo (Figura 3), além de ser capaz de detectar ovos em 100% das amostras positivas, e apresentar algumas vantagens metodológicas como praticidade e rapidez.

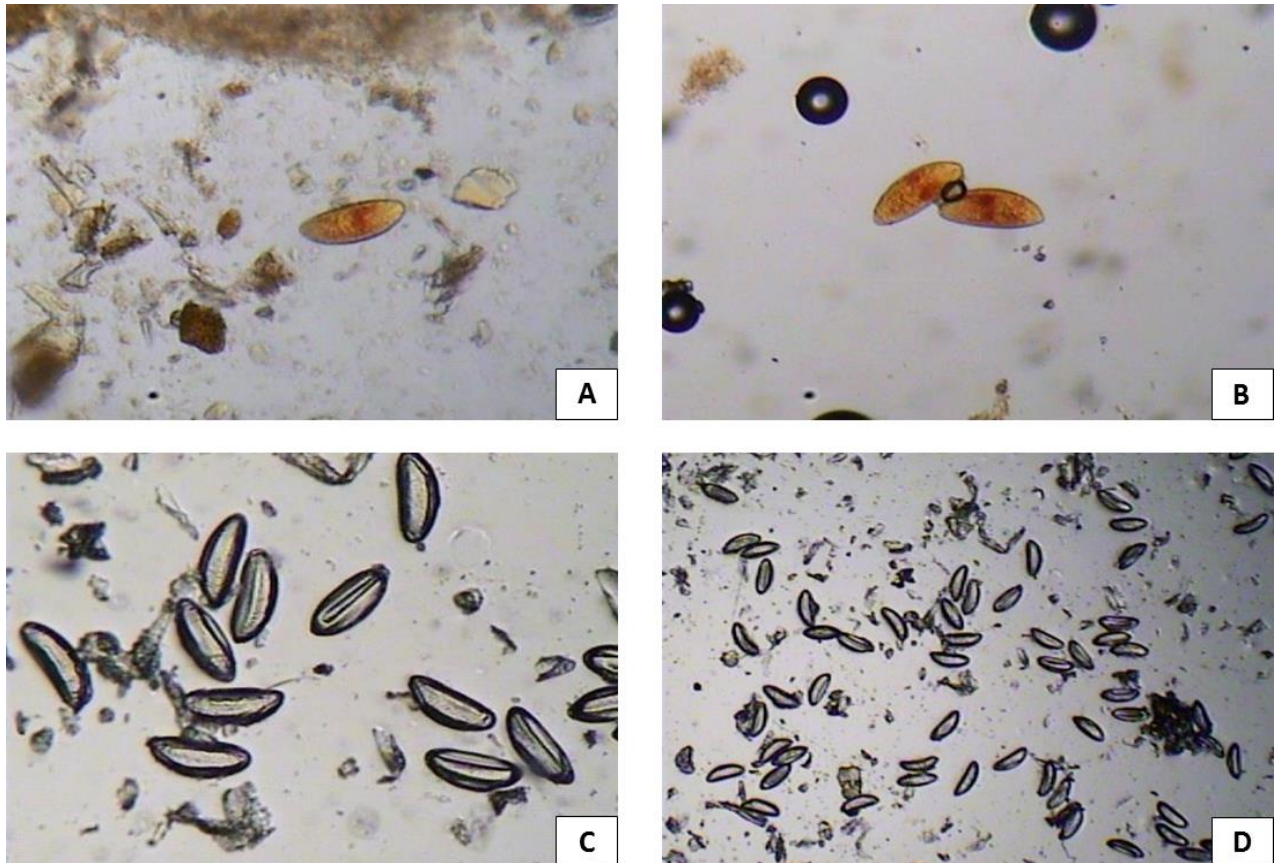


Figura 3. Ovos de *Syphacia muris* detectados pelos métodos de sedimentação, (A), Willis (B), Graham (C) 100x e Graham (D) 40x.

4.2 – Avaliação sorológica

Os perfis eletroforéticos dos preparados antigênicos de *S. venezuelensis* e *S. muris* foram analisados após serem submetidos a SDS–PAGE 12% e corados por nitrato de prata. Após análise por programa *Image J*, observou-se a presença de proteínas provenientes dos extratos salinos de ambos os parasitos com perfis eletroforéticos distintos com bandas de peso molecular variando de 9 a 249 kDa, mas com presença de alguns padrões de picos representativos das bandas proteicas indicando proximidades de peso moleculares (Figura 4).

No extrato salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (SV) foi possível a visualização de aproximadamente 20 bandas dentre elas as de 6, 14, 30, 36, 45, 57, 100 e 249 kDa com maior pico de intensidade. Enquanto que no extrato salino de adultos de *S. muris* (SM) foram observadas aproximadamente 24 bandas sendo a de 9 kDa e as faixas entre de 34 a 39, 42 a 92 kDa com maior pico de intensidade.

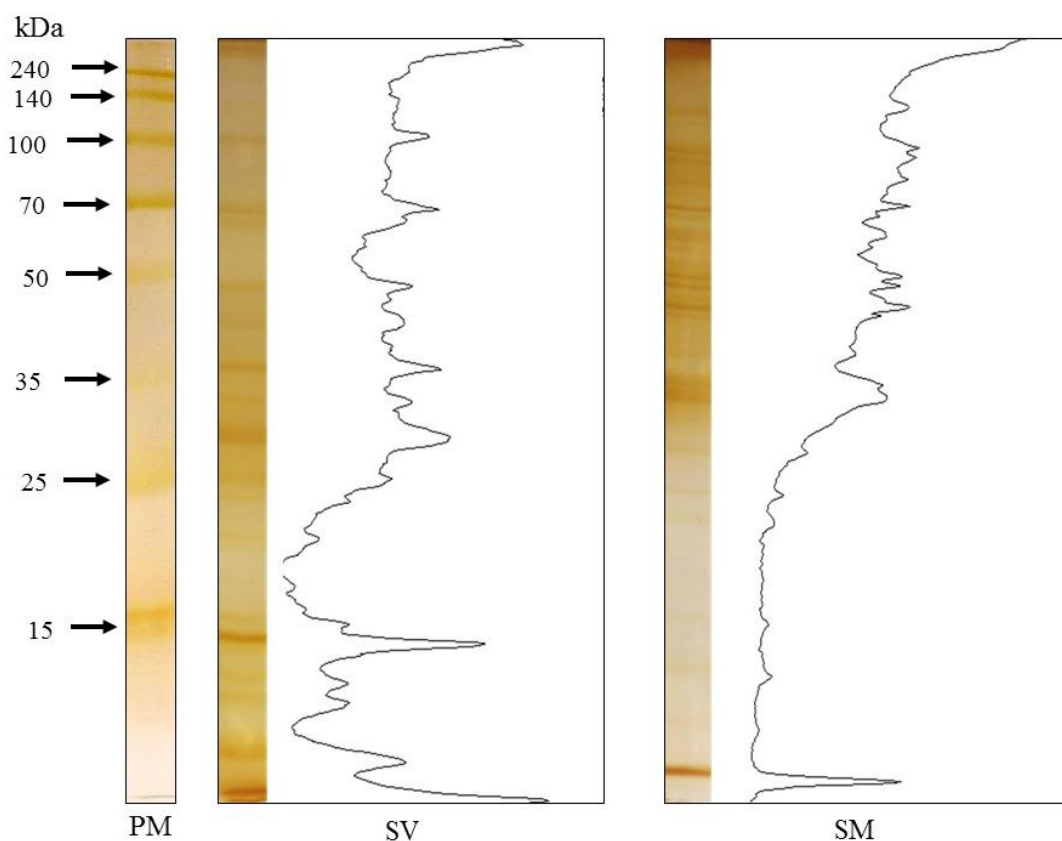


Figura 4. Perfil eletroforético em SDS–PAGE 12% dos extratos salinos total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* e adultos de *Syphacia muris*. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa). SV – Extrato salino total de *Strongyloides venezuelensis*. SM – Extrato salino total de *Syphacia muris*.

Para melhor caracterização sorológica do perfil de reconhecimento específico por IgG de rato frente aos extratos salinos totais de *S. venezuelensis* e de *S. muris*, foram realizados ensaios sorológicos com amostras de soros de animais infectados com estes parasitos. Os limiares de reatividade dos ensaios ELISA de cada extrato foram obtidos através do cálculo de Sensibilidade e Especificidade relativas por TG-ROC. Durante as análises, foram encontrados valores próximos de limiar de reatividade para *S. venezuelensis* e *S. muris*, com presença de 100% de Sensibilidade e Especificidade, para caracterização sorológica por ELISA em soro de animais parasitados com estes parasitos (Figura 5). Utilizando os limiares de reatividade obtidos por TG-ROC para cada extrato, pode-se observar distinção de sororeatividade entre amostras de soro de animais infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* (Figura 6A) e animais naturalmente infectados com *S. muris* (Figura 6B), ambos quando comparados com a reatividade sorológica dos animais *Naïve*.

Ao avaliar a reatividade sorológica no extrato salino de *S. venezuelensis* por ELISA, pode ser observada elevada reatividade cruzada em soros de ratos infectados apenas com *S. muris*, no qual 100% dos animais apresentaram reatividade a antígenos presentes nesse extrato. Nos ratos coinfectados, anticorpos IgG presentes nos soros destes animais apresentaram reatividade semelhante aos anticorpos de mesmo subtipo em soros de animais infectados apenas com *S. venezuelensis* para este mesmo extrato (Figura 6A).

De forma semelhante, avaliando o perfil de reatividade frente ao extrato salino de *S. muris*, todos os animais infectados com apenas *S. venezuelensis* apresentaram reatividade cruzada aos antígenos presentes no extrato utilizado no ELISA. Em contrapartida, anticorpos IgG presentes em soros dos animais coinfectados apresentaram discreta diminuição nos Índices ELISA, quando comparados com os soros de animais infectados apenas com *S. muris* (Figura 6B).

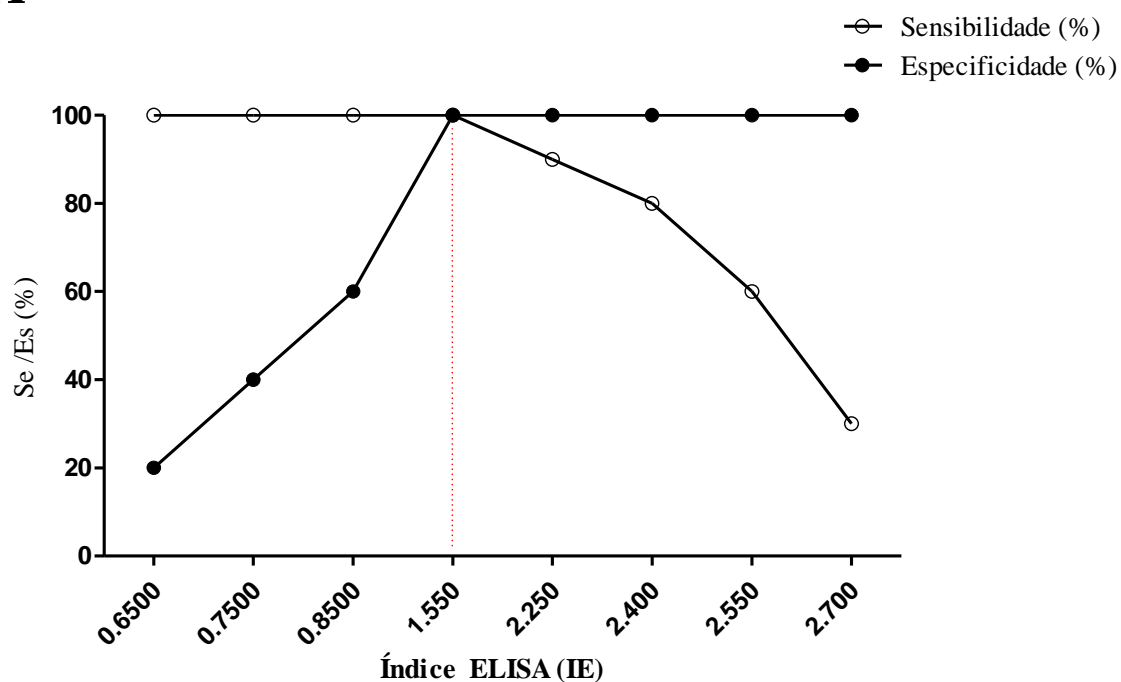
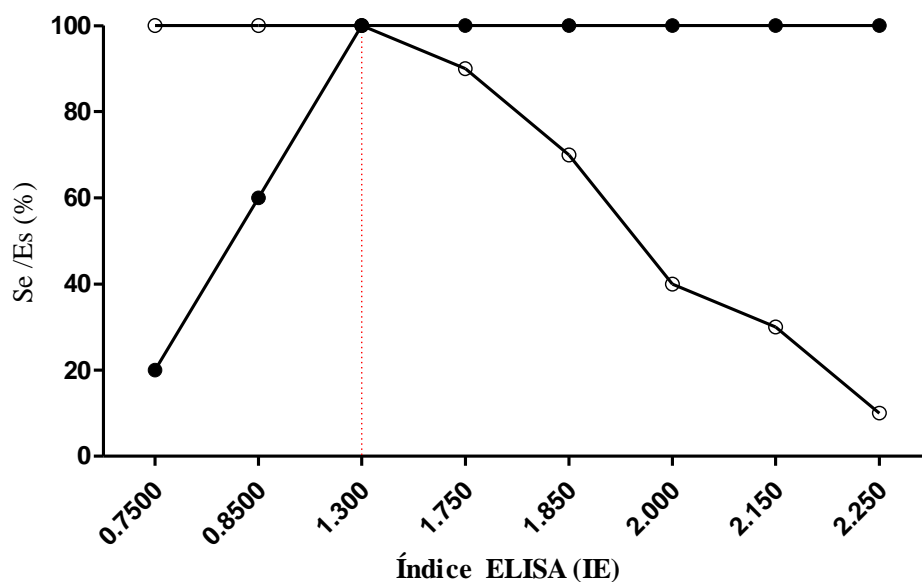
A**B**

Figura 5. Avaliação do limiar de reatividade de testes ELISA para diferentes extratos antigênicos por *Graph Receiver Operating Characteristic Curve* (TG-ROC), com valores expressos em Índice ELISA (IE). Extrato salino total de *Strongyloides venezuelensis* (A). Extrato salino total de *Syphacia muris* (B). O cruzamento das linhas representa o limiar de reatividade determinado pela análise, considerando Sensibilidade (○) e Especificidade (●) ótimas para cada antígeno analisado. Se – Sensibilidade. Es – Especificidade.

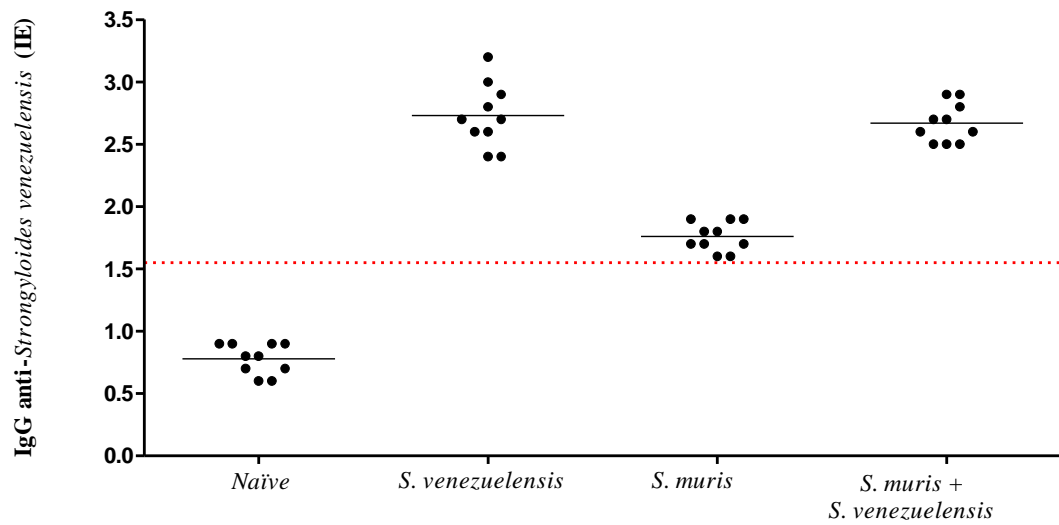
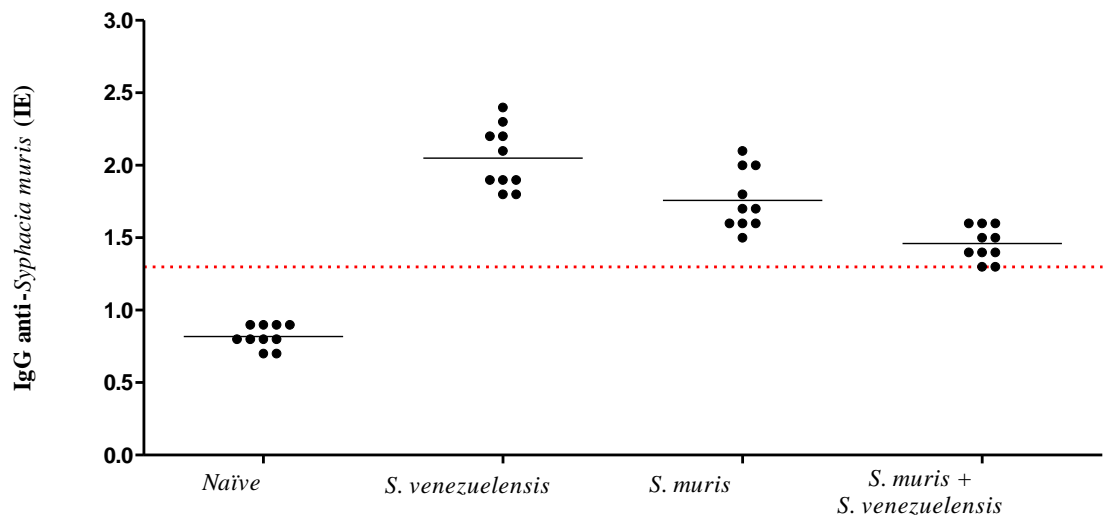
A**B**

Figura 6. Sororeatividade de IgG pelo teste ELISA e expresso em Índice ELISA (IE), frente aos extratos antigênicos de *Strongyloides venezuelensis* (A) e *Syphacia muris* (B) em amostras de soros de ratos *Naïve* e infectados dos quatro grupos estudados. A linha pontilhada significa o limiar de reatividade obtido por TG-ROC. A linha contínua indica a média de cada grupo.

Todas as amostras de soro dos quatro grupos de animais foram testadas por *Immunoblotting* utilizando extratos salinos de *S. venezuelensis* e *S. muris*. Os perfis de reatividade das proteínas reconhecidas pelo *Immunoblotting* estão demonstrados na figura 7.

No extrato salino de *S. venezuelensis* foram reconhecidas de forma específicas 14 bandas antigênicas com peso molecular variando de 17 a 119 kDa, utilizando amostras de soros de animais infectados com *S. venezuelensis*. Foram consideradas regiões imunodominantes as bandas de 17 e 30 kDa e as faixas entre 42 a 45 kDa, 55 a 68 kDa e 79 a 119 kDa. Quando avaliado a presença de reatividade cruzada em anticorpos IgG presentes em soros de animais infectados apenas com *S. muris* pode ser observado a presença de reconhecimento de oito bandas no extrato salino de *S. venezuelensis* (36, 40, 42, 68, 76, 83, 102 e 242 kDa). Destas apenas as bandas de 68, 83 e 102 foram consideradas imunodominantes em amostras de soro proveniente de animais infectados apenas com *S. venezuelensis*. Nos animais coinfetados ocorreu o reconhecimento antigênico semelhante aos animais infectados apenas com *S. muris*. Pode ser observado o reconhecimento de reatividade das bandas de 22, 23 e 149 kDa por IgG presente nas amostras de soro de animais coinfetados (Figura 7A).

No extrato salino de *S. muris* foram reconhecidas de forma específica bandas antigênicas com peso molecular variando entre 36 a 129 kDa. Anticorpos IgG presentes nas amostras de soro desses animais reconheceram como imunodominante a região de 36 kDa, 62 a 78 kDa e 105 a 129 kDa e as bandas de 39, 41 e 91 kDa. Nas amostras de soros de animais infectados com *S. venezuelensis* foi observada o reconhecimento cruzado de sete bandas antigênicas com peso molecular variando entre 24 a 149 kDa, sendo que as bandas de 36, 91 e 149 kDa demonstraram maiores picos de reação cruzada. De modo semelhante a reatividade para extrato salino de *S. venezuelensis*, as amostras de soro dos animais coinfetados apresentaram reconhecimento parecido aos dos animais infectados apenas com *S. muris* (Figura 7B). Tanto a reatividade sorológica das amostras de soro de animais *Naïve* frente aos antígenos presentes nos extratos salinos de *S. venezuelensis* ou *S. muris* apresentaram reatividade inespecífica para a banda de 30 kDa (Figura 7A e 7B).

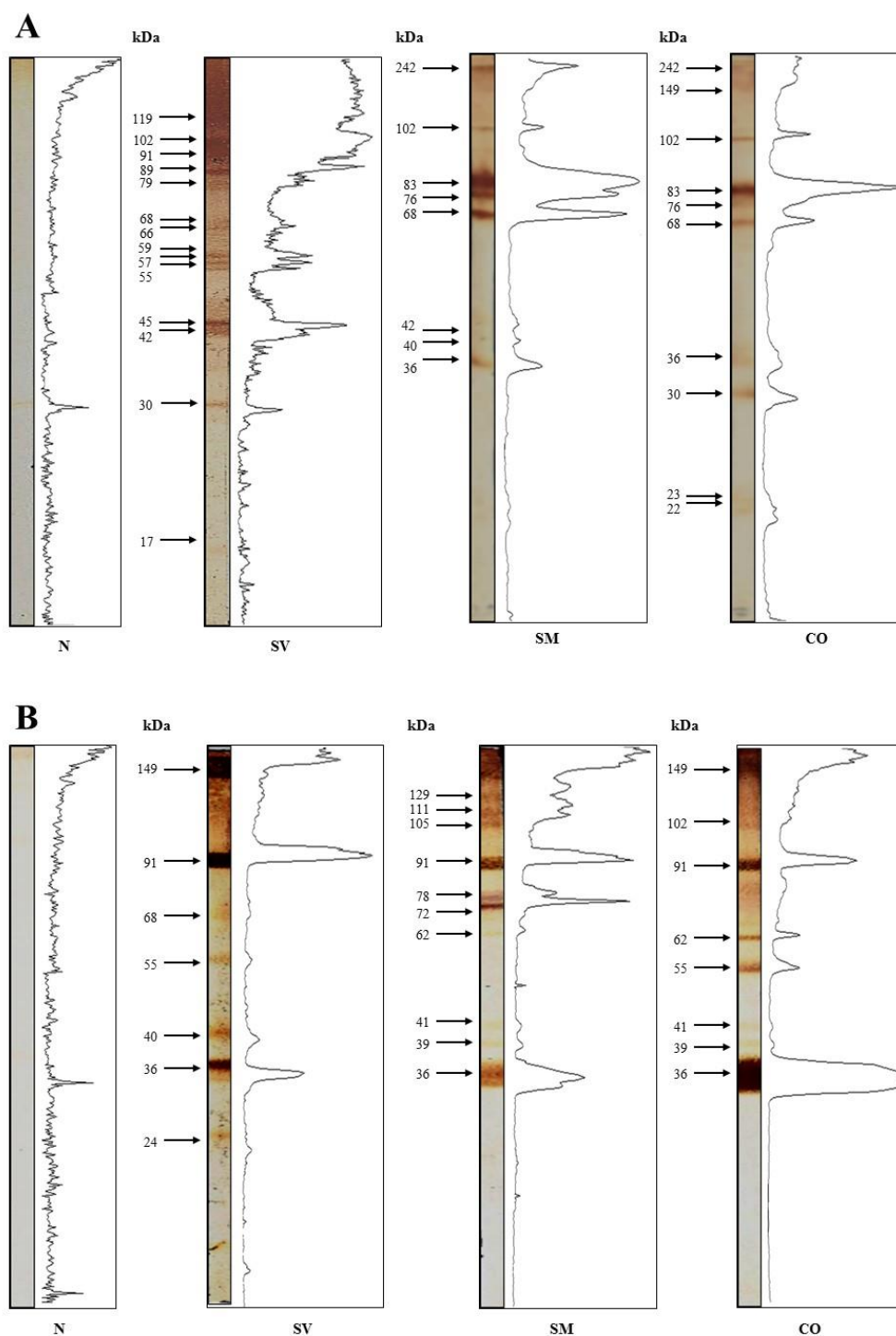


Figura 7. Análise da reatividade sorológica de anticorpos IgG em *Immunoblotting* a antígenos presentes no extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* (A) e extrato salino de adultos de *Syphacia muris* (B) nos quatro grupos de animais estudados. Os picos de intensidade detectados por Image J versão 1.48 indicam a intensidade de reconhecimento e valor das bandas detectadas. N – ratos sem infecção (*Naïves* – GI). SV – ratos infectados com *S. venezuelensis* (GII). SM – ratos infectados com *S. muris* (GIII). CO – ratos coinfectados com *S. muris* e *S. venezuelensis* (GIV).

5 – DISCUSSÃO

Strongyloides venezuelensis tem sido utilizado como modelo experimental para estudo da estrogiloidíase humana pela capacidade natural de infectar roedores (MARRA et al., 2011; YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014) e pela semelhança do ciclo biológico com *S. stercoralis*. As larvas de *S. venezuelensis* penetram por via cutânea, migram para os pulmões, são deglutidas e se instalam na mucosa do intestino delgado (SATO; TOMA, 1990; FERREIRA et al., 2010). Por possuir essas características, a utilização de larvas filarioides de *S. venezuelensis* constitui uma alternativa para obtenção de antígenos heterólogos utilizados no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana.

Adicionalmente, uma das principais limitações em se desenvolver testes sorológicos mais sensíveis e específicos para a estrogiloidíase humana é a dificuldade em obter quantidades suficientes desses antígenos provenientes de *S. stercoralis*, que permitam seu posterior fracionamento e análise em estudos imunológicos (ROSSI et al., 1993; RIGO et al., 2008). Desta forma, *S. venezuelensis* por ser de fácil obtenção e manutenção em laboratório, apresentar bom rendimento larval em culturas de fezes utilizando-se carvão vegetal e eliminação de risco de infecção durante a manipulação, o cultivo desse parasito sustenta a importância da obtenção de antígenos para estudos na estrogiloidíase humana (MACHADO et al., 2003).

Diversos parasitos têm sido detectados em animais de laboratório como *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *S. muris*, *S. obvelata*, *Aspiculuris tetraptera*, *Physaloptera*, *Paraspidodera uncinata* e *Trichinella* sp., sendo que alguns desses apresentam alto potencial zoonótico, dificultando seu controle (HUQ; KARIM; SHEIKH, 1985; TANIDEH et al., 2010). *S. muris* é um oxiurídeo comumente encontrado na maioria das colônias de ratos de laboratório e cuja infecção pode acarretar diversas alterações fisiológicas, comprometendo os dados da pesquisa biomédica (WAGNER, 1988; GILIOLI et al., 2000; LYTVYNETS et al., 2010; TANIDEH et al., 2010).

Neste estudo foi demonstrado que a eliminação de ovos bem como a quantidade de fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* diminui significativamente pela coinfeção por *S. muris*. Um estudo recente demonstra que a infecção por *S. muris* em ratos Wistar torna-se capaz de regular e até mesmo gerar resistência contra outros helmintos, tais como *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae), mesmo que cada um dos parasitos ocupe diferentes nichos no hospedeiro (TRELIS et al., 2013).

O uso de animais de laboratório em pesquisas biomédicas experimentais tem

proporcionado uma melhor compreensão dos processos fisiológicos e patológicos humanos e veterinários (CASEBOLT; LINDSEY; CASSELL, 1988; BICALHO et al., 2007; TANIDEH et al., 2010). Portanto, a qualidade, confiabilidade e consequente padronização desses animais têm um grande impacto sobre a pesquisa, uma vez que somente animais saudáveis e livres de patógenos produzem dados científicos válidos (LYTVYNETS et al., 2010). Estudos demonstraram a importância da detecção de infecções nos animais de laboratório não somente para assegurar a confiabilidade da pesquisa científica como para evitar o desenvolvimento de zoonoses, uma vez que aproximadamente 150 a 200 doenças podem ser transferidas a partir de animais de laboratório comprometendo a saúde humana, incluindo parasitoses (HUQ; KARIM; SHEIKH, 1985; TANIDEH et al., 2010).

Nesse estudo verificou-se que o método de Graham foi mais eficaz na detecção de *S. muris* em relação ao método de HPJ. Isso se deve às características do método, pois é específico para detecção de ovos leves de oxiurídeos, e devido ao próprio ciclo do parasito em que as fêmeas realizam a postura dos ovos preferencialmente na região perianal. Esse fator também pode explicar porque o método de sedimentação foi menos eficiente, uma vez que a maioria dos ovos vão se encontrar na região perianal, e somente uma pequena parcela foi eliminada juntamente com as fezes. Pode-se observar que não houve diferença estatística entre os métodos de Graham e Willis. Isso se deve pelo fato de que o método de Willis também é um método específico para detecção de ovos leves; entretanto, como nesse método também se utiliza fezes, ocorrerá o mesmo problema já relatado para o método de HPJ. Essa diferença na aplicação dos métodos, em relação à amostragem, também pode explicar porque o método de Graham detectou a infecção parasitária em 100% das amostras positivas e o método de Willis em 83% das amostras.

Entretanto, resultados falso-negativos têm sido relatados na utilização da fita gomada. Esse problema pode estar relacionado a alguns fatores como: carga parasitária, sexo e idade do animal, treinamento e desempenho do técnico e tempo do teste (TAFFS, 1976; HILL; RANDOLPH; MANDRELL, 2009). Um fator importante que deve ser levado em consideração para o diagnóstico da infecção por *S. muris* é a periodicidade da produção de ovos. Fêmeas de *S. muris* migram do intestino e ceco ao meio dia, e os ovos são encontrados na região perianal preferencialmente durante a tarde em relação aos outros períodos do dia (TAFFS, 1976; HILL; RANDOLPH; MANDRELL, 2009).

Em ratos infectados com helmintos, tais como *S. muris* (TRELIS et al., 2013) ou *S. venezuelensis* ocorre a indução da resposta do tipo Th2 (KORENAGA; BRUSCHI, 2014). Apesar das infecções intestinais por helmintos induzirem esse tipo de resposta, o hospedeiro

implementa um subconjunto de reações imunes na tentativa de expelir os parasitos intestinais. Dentre elas destacam-se a hiperplasia de células caliciformes, mastocitose, eosinofilia, e o aumento de níveis séricos de IgG, IgG1 e IgE (MATSUMOTO et al., 2013). A indução de produção IgG e IgE é um pré-requisito para eliminação de *S. venezuelensis*, uma vez que elas agem em conjunto para ativar mastócitos pelo reconhecimento dos receptores FcγRIII e FcεRI, que depois de ativados atuam na expulsão de *S. venezuelensis* do intestino delgado durante a infecção primária (YASUDA; MATSUMOTO; NAKANISHI, 2014).

Após a eliminação dos parasitos adultos de *S. venezuelensis* na infecção primária, o rato desenvolve imunidade protetora contra à reinfecção. Desta forma, quando os mesmos são reinfectados, grande parte das larvas são mortas durante a rota de migração. Apenas poucos indivíduos conseguem atingir o intestino no hospedeiro e desenvolver maturidade sexual, podendo ser assim eliminados prematuramente, diminuindo a carga parasitária (SCHILTER et al., 2010).

De forma semelhante, as infecções com outros nematoides gastrintestinal, incluindo membros do gênero *Syphacia* spp., também possuem respostas imunomoduladoras semelhantes, entretanto, as respostas imunes geradas por *Syphacia* spp. têm sido pouco estudadas (MAIZELS et al, 2004; MICHELS et al., 2006; TRELIS et al., 2013).

No presente estudo pode ser observado que existe reatividade cruzada entre *S. venezuelensis* e *S. muris* nos imunoensaios realizados. Desta forma, a resposta imune adaptativa gerada a *S. muris* pode ter influenciado na infecção por *S. venezuelensis* nos animais coinfectedos, diminuindo assim a carga parasitária dos animais. Esse fato pode ser justificado pela semelhança antigênica entre os parasitos e proteção cruzada pelos anticorpos IgG gerados inicialmente aos antígenos *S. muris*. No entanto, existem poucos dados sobre reatividade cruzada de *S. venezuelensis* e *S. muris* com outros parasitos gastrointestinais descritos na literatura. Em um estudo realizado para detecção de coproantígenos em ratos infectados experimentalmente com *Strongyloides ratti*, demonstrou reatividade cruzada com *Necator americanus* e *S. muris* (NAGESWARAN; CRAIG; DEVANEY, 1994). Em contrapartida, outro estudo realizado em camundongos coinfectedos com *Toxocara canis* e *S. venezuelensis* não houve a presença de reatividade cruzada frente a antígeno de *T. canis* (LESCANO et al., 2012).

Considerando as bandas descritas de *S. venezuelensis* no presente estudo, apenas três delas foram relatadas por outros autores. Em estudo realizado por Machado et al., (2008), no qual foi utilizado antígeno de *S. venezuelensis* para o diagnóstico da estrogiloidíase humana, foi relatado o reconhecimento da uma única fração antigênica de 45 kDa. Em um estudo

utilizando frações antigênicas de *S. venezuelensis* para o diagnóstico da estrogiloidíase humana houve reconhecimento de proteínas de 45 e 33 kDa (FELICIANO et al., 2010). Enquanto em estudo utilizando antígenos de *S. stercoralis*, os soros de pacientes com estrogiloidíase reconheceram bandas de 97, 66, 41 e 26 kDa (SATO et al., 1990). Similarmente, estudo realizado por Sudré et al., (2007) utilizando essa mesma espécie de *Strongyloides* para o diagnóstico de pacientes infectados com o parasito apresentou alta frequência de reatividade de IgG com uma proteína de aproximadamente 26 kDa. Proteínas imunodominantes de aproximadamente 41, 31, e 28 kDa foram reconhecidas pelos anticorpos IgG de soros de indivíduos com estrogiloidíase (CONWAY et al., 1993).

Até o momento na literatura não foram encontrados registros do perfil de reconhecimento de bandas antigênicas de *S. muris* utilizando *Immunoblotting*. No presente estudo houve predominantemente o reconhecimento de dez bandas antigênicas sendo elas com peso molecular de 36, 39, 41, 62, 72, 78, 91, 105, 111 e 129 kDa. Contudo, podem ser encontrados estudos com relatos de perfis antigênico para *S. obvelata*, como exemplo da banda de 65 kDa que pode ser observada no dia 26 d.p.i. em camundongos infectados (SATO et al., 1995). A infecção pelo parasito geralmente possui natureza crônica e a reinfecção com ovos ocorre de forma contínua, uma vez que os camundongos infectados são geralmente mantidos em caixas, o que facilita a reinfecção com os ovos liberados no ambiente. Por este motivo sugere que outras bandas podem ser observadas com os soros de animais em infecções a longo prazo (TAFSS, 1976).

A correta escolha de um método parasitológico na triagem de animais recebidos e mantidos em biotérios auxilia na prevenção de futura contaminação do ambiente e infecção dos animais. Considerando a importância da condição saudável de animais de laboratório para pesquisas e pesquisadores torna-se fundamental o monitoramento periódico desses animais para avaliação, uma vez que infecções com *S. muris* podem comprometer e interferir nos resultados experimentais com *S. venezuelensis*.

Observa-se que existe a necessidade de mais estudos desenvolvam insumos proteicos de valor para diagnóstico na avaliação sorológica e de real distinção das infecções de diferentes helmintíases por imunoensaios com elevadas sensibilidade, especificidade e valores preditivos.

6 – CONCLUSÕES

- A carga parasitária de *S. venezuelensis* diminui quando os animais estão coinfectados com *S. muris*.
- O Método de Graham foi o mais eficaz na detecção da infecção por *S. muris* em ratos Wistar.
- Existe reatividade cruzada por IgG, entre soros de ratos naturalmente infectados com *S. muris* e experimentalmente infectados com *S. venezuelensis* por ELISA e *Immunoblotting*.
- As bandas predominantes na reatividade cruzada no extrato salino de *S. venezuelensis* foram as de 36, 68, 76, 83, e 102 kDa, enquanto que no extrato salino de *S. muris* foram as de 36, 91, e 149 kDa.

REFERÊNCIAS

- AMATO NETO, V.; CARIGNANI, F. L.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, através da ivermectina administrada por via oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 481–484, 1997.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p.41–47, 1917.
- BAKER, D. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 231–266, 1998.
- BICALHO, K. A.; ARAÚJO, F. T. M.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, O.S. Sanitary profile in mice and rats colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I – Endo and Ectoparasite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1478–1484, 2007.
- BLAXTER, M. L.; LEY, P.; GAREY, J. R.; LIUK, L. X.; SCHELDAMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKEY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSEL, L. M.; VIDAL, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Letters to Nature**, v. 392, p. 71–75, 1998.
- BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic Research**, v. 51, p.205–214, 2011.
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M.; MELO, A. L. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 389–391, 2011.
- BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**. 6th ed. Masson et Cie. Paris, 1947. 1.042 p.
- CAMPOS, R.; PINTO, P. L. S.; AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; MIYAMOTO, A.; CARVALHO, S. A.; TAKIGUTI, C. K.; MOREIRA, A. A. B. Tratamento da infecção experimental de ratos por *Strongyloides venezuelensis*, mediante uso da ivermectina e do levamisol injetáveis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 48–52, 1989.
- CASEBOLT, D. B.; LINDSEY, J. R.; CASSELL, G. H. Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. **Laboratory Animal Science**, v. 38, p. 327–329, 1988.

CONWAY, D. J.; BAILEY, J. W.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 784–787, 1993.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana**, 12 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2011. p. 295–305.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 265–268, 2003.

DIX, J.; ASTILL, J.; WHELAN, G. Assessment of methods of destruction of *Syphacia muris* eggs. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 38, p. 11–16, 2004.

DOYLE, R.L.; MONTEIRO, S.G.; GRAÇA, D.L.; SANTURIO, J.M.; SILVA, A. S. da; BERTOLIN, K. Avaliação helmintológica de camundongos (*Mus musculus*) criados em biotério experimental. **Revista da Faculdade de Veterinária, Zootecnia e Agronomia**, v. 13, p. 1–8, 2006.

EL-MALKY, M. A.; MARUYAMA, H.; AL-HARTHI, S. A.; EL-BESHBISHI, S. N.; OHTA, N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. **Parasites and Vectors**, v. 6, p. 1–5, 2013.

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. do R.; GONÇALVES, A. L.; 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.

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; SOUZA, R. S. de; COELHO, F. M. C.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Role of IL-13 in a model of *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 12, p.409–414, 2010.

FLYNN, R. J. **Parasites of Laboratory Animals**. The Iowa State University Press, Ames, 1973. pp. 239 – 242.

FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 346–349, 1982.

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 345–355, 1992.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L.A.G.; PASSOS, L.A.C.; SILVA, F.A.; RODRIGUES, D.M.; GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 33–37, 2000.

GONÇALVES, A. L.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 125, p. 338–341, 2010.

GONÇALVES, A. L.; RIBEIRO, T. S.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A novel approach based on antigen, antibody and immune complex detection in bronchoalveolar lavage fluid samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica**, v. 124, p. 166–169, 2012.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, A. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council Scientific and Industry Research**, v. 12, p. 50–52, 1939.

GRAHAM, C. F. A device for the diagnosis of *Enterobius* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, p. 159–161, 1941.

HILL, W. A.; RANDOLPH, M. M.; MANDRELL, T. D. Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, p. 378–380, 2009.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis Mansonii. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 9, p. 283–291, 1934.

HUERKAMP, M.; BENJAMIN, K.; ZITZOW, L.; PULLIUM, J.; LLOYD, J.; THOMPSON, W.; WEBB, S.; LEHNER, N. Fenbendazole treatment without environmental decontamination eradicates *Syphacia muris* from all rats in a large, complex research institution. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 39, p. 9–12, 2000.

HUQ, M. M.; KARIM, M. J.; SHEIKH, H. Helminth parasites of rats, house mouse and moles in Bangladesh. **The Pakistan Veterinary Journal**, v. 5, p. 143–144, 1985.

HUSSEY, K. L. *Syphacia muris* vs. *Syphacia obvelata* in laboratory rats and mice. **The International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 555–559, 1957.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J.; DELANEY, K.; KLEMENT, G.; WEITZ, J. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 46, p. 286–290, 1996.

KORENAGA, M.; BRUSCHI, F. Qualitative and quantitative studies of eosinophils in parasitic infections. **Methods in Molecular Biology**, v. 1178, p. 203–213, 2014.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LESCANO, S. A. Z.; NAKHLE, M. C.; RIBEIRO, M. C. S. A.; CHIEFFI, P. P. IgG antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 154, p. 45–52, 2012.

LEWIS, J.W.; D'SILVA, J. The life-cycle of *Syphacia muris* Yamaguti (Nematoda: Oxyuroidea) in the laboratory rat. **Journal of Helminthology**, v. 60, p. 39–46, 1986.

LITTLE, M. D. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **The Journal of Parasitology**, v. 52, p. 69–84, 1966.

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.

LUBCKE, R.; HUTCHESON, F.A.; BARBEZAT, G.O. Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris*. **Digestive Disease and Sciences Journal**, v. 37, p. 60–64, 1992.

LUCA, R.R. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2ª ed. São Paulo: Winner Graph. 1996. 260 pp.

LYTVYNETS, A.; LANGROVÁ, I.; LACHOUT, J.; VADLEJCH, J.; FUČÍKOVÁ, A.; JANKOVSKÁ, I. Drinking water ivermectin treatment for eradication of pinworm infections from laboratory rat colonies. **Journal of Helminthology**, v. 47, p. 233–237, 2010.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES M. DO R. F.; ALVES DE 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.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; FACCIOLI, L. H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, v. 29, p.549–557, 2007.

MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. DO R.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7–14, 2008.

MAIZELS, R.M.; BALIC, A.; GÓMEZ-ESCOBAR, N.; NAIR, M.; TAYLOR, M.D.; ALLEN, J.E. Helminth parasites – masters of regulation. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 89–116, 2004.

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in lewis rats: comparison of histological analyses and PCR. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 334–339, 2011.

MATSUMOTO, M.; SASAKI, Y.; YASUDA, K.; TAKAI, T.; MURAMATSU, M.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 2518–2527, 2013.

MICHELIS, C.; GOYAL, P.; NIEUWENHUIZEN, N.; BROMBACHER, F. Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5926–5932, 2006.

MINEO, J. R (Coord.). **Pesquisa na área Biomédica: do planejamento a publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. 273 p.

MOHN, G.; PHILLIP, E.M. Effects of *Syphacia muris* and the anthelmintic fenbendazole on the microsomal monooxygenase system in the mouse liver. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 15, p. 89–95, 1981.

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

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; BARSANTE, M. M.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1135–1142, 2003.

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011. p. 523–527.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 12 ed., São Paulo: Atheneu, 2011. 546 p.

NICKLAS, W.; BANNEX, P.; BOOT, R.; DECELLE, T.; DEENY, A.; FUMANELLI, M.; ILLGEN-WILCKE, B. Recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) working group on health monitoring of rodent and rabbit colonies. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 36, p. 20–42, 2002.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; DAVID, E. B.; RIBEIRO, C.; GUIMARÃES, S.; MASSENO, A. P.; KATAGIRI, S.; SEQUEIRA, J. L. Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.56, p. 105–109, 2014.

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

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSCHKE, R. C.; CHIEFFI, P. P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 141–143, 2013.

PINTO, R. M.; GONÇALVES, L.; NORONHA, D.; GOMES, D. C. Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 133–136, 2001.

PRITCHETT, K.R.; JOHNSTON, N.A. A review of treatment for the eradication of pinworm infections from laboratory rodent colonies. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 41, p. 36–46, 2002.

REHG, J. E.; TOTH, L. A. Rodent quarantine programs: purpose, principles, and practice. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 48, p. 438–447, 1998.

RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; NETO, V. A. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p.648–653, 2008.

RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; 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.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E. H.; TEIXEIRA, A. L.; BARROS–MAZON, S.; TREVISAN, R. C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 83–87, 1993.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRIZOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes, modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 8, p.5–8, 1954.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p.57–62, 1990.

SATO, Y.; INQUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 84, p. 403–406, 1990.

SATO, Y.; OOI, H. K.; NONAKA, N.; OKU, Y.; KAMIYA, M. Antibody production in *Syphacia obvelata* infected mice. **The Journal of Parasitology**, v. 81, 559–562, 1995.

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1–17, 2013.

SCHILTER, H.C.; PEREIRA, A. T. M.; ESCHENAZI, P. D.; FERNANDES, A.; SHIM, D.; SOUSA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO–CORRÊA, D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunology**, v. 32, p.184–192, 2010.

SILVA, D. A.O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veteterinary Parasitology**, v. 107, p.181–195, 2002.

SILVEIRA, M. R.; NUNES, K. P.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G.; JÚNIOR, A. C.; 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.

SOTILLO, J.; TRELIS, M.; CORTÉS, A.; VALERO, M. L.; DEL PINO, M. S.; ESTEBAN, J. G.; MARCILLA, A.; TOLEDO, R. Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats. **Parasitology International**, v. 61, p. 561–564, 2012.

STAHL, W. Studies on the life cycle of *Syphacia muris*, the rat pinworm. **Keio Journal of Medicine**, v. 12, p. 55–60, 1963.

SUDRÉ, A. P.; SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G.; PERALTA, R. H.; MACEDO, H. W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1117–1723, 2007.

TAFFS, L. F. Pinworm infections in laboratory rodents: a review. **Laboratory Animals**, v. 10, p. 1–13, 1976.

TANIDEH, N.; SADJJADI, S.M.; MOHAMMADZADEH, T.; MEHRABANI, D. Helminthic infections of laboratory animals in animal house of Shiraz University of Medical Sciences and the potential risks of zoonotic infections for researchers. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 12, p. 151–157, 2010.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 76, p. 4350–4354, 1979.

TRELIS, M.; CORTÉS, A.; FRIED, B.; MARCILLA, A.; ESTEBAN, J. G.; TOLEDO, R. Protective immunity against *Echinostoma caproni* in rats is induced by *Syphacia muris* infection. **The International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 453–463, 2013.

VAN DER GULDEN, W. J. T. Diurnal rhythm in egg production by *Syphacia muris*. **Experimental Parasitology**, v. 21, p. 344–347, 1967.

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 30 de janeiro de 2014.

WAGNER, M. The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 38, p. 476–478, 1988.

WESCOTT, R. B. **Helminths: the mouse in biomedical research**. Vol. II. New York: Academic Press, 1982. pp. 373–384

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **The Medical Journal of Australia**, v. 8, p. 375–376, 1921.

YASUDA, K.; MATSUMOTO, M.; NAKANISHI, K. Importance of both innate immunity and acquired immunity for rapid expulsion of *S. venezuelensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–5, 2014.

YASUDA, K.; MUTO, T.; KAWAGOE, T.; MATSUMOTO, M.; SASAKI, Y.; MATSUSHITA, K.; TAKI, Y.; FUTATSUGI-YUMIKURA, S.; TSUTSUI, H.; ISHII, K. J.; YOSHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 28, p. 3451–3456, 2012.