

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

***Immunoblotting* utilizando extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *Strongyloides venezuelensis* na estrogiloidíase experimental associada à imunossupressão.**

EDSON FERNANDO GOULART DE CARVALHO

Uberlândia – MG  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

***Immunoblotting* utilizando extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *Strongyloides venezuelensis* na estrogiloidíase experimental associada à imunossupressão.**

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

Edson Fernando Goulart de Carvalho

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz  
Orientadora

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior  
Orientador

Uberlândia – MG  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C331i  
2014 Carvalho, Edson Fernando Goulart de, 1980-  
Immunoblotting utilizando extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *Strongyloides venezuelensis* na estrogiloidíase experimental associada à imunossupressão / Edson Fernando Goulart de Carvalho. – 2014.  
56 f.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.  
Coorientador: Jair Pereira da Cunha Junior.  
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. Imunossupressão - Teses. 4. Immunoblotting – Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Cunha Junior, Jair Pereira da, 1974- III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

*Albert Einstein.*

## Dedicatória

Dedico essa vitória a pessoa mais importante de minha vida. Um ser iluminado que a mim dedicou vários anos de sua vida. Uma guerreira que nunca fugiu de uma batalha e hoje ainda trava e finda guerras. Essa pessoa é: **Maria Cristina Goulart de Carvalho (minha Mãe).**

## Agradecimentos

Agradeço a *Deus*, por iluminar a minha caminhada para esta vitória.

Agradeço a minha mãe, ao meu padrasto José de Lourdes, a minhas irmãs, irmão, cunhados, cunhada, sobrinhos e sobrinha pelo amor, carinho e incentivo.

Ao Noriel e família pelo companheirismo e por fazer de mim parte de sua família.

Aos meus amigos por permitir que aliviasse os momentos de cansaço em sua companhia.

A professora Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Costa Cruz pela orientação, saberes e oportunidades compartilhadas.

Ao Dr. Jair Pereira da Cunha Junior pela orientação, apoio e conselhos em momentos de dificuldade.

A Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves pela contribuição a minha carreira acadêmica ao partilhar comigo seus conhecimentos e experiência científica.

A equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, em especial ao Eduardo, Daniela, Lucas, Henrique, Gabriela e Renata pelas palavras de incentivo, amizade e companheirismo.

Aos Técnicos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses em especial a Maria do Rosário Gonçalves Pires e Marcelo Arantes Levenhagen pelo auxílio prestado em momentos de dificuldade, pela experiência compartilhada e amizade.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente dessa minha conquista.

## Lista de abreviaturas

±.....	Mais ou menos
% .....	Por cento/porcentagem
° C .....	Graus Celsius
APS.....	Persulfato de Amônio
CBEA.....	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso Animal
cm .....	Centímetros
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono
DAB.....	Diaminobenzidina
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DO.....	Densidade óptica
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA.....	Teste imunoenzimático ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
g.....	Gramma
g.....	Gravidade
h.....	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	Ácido sulfúrico
HCl.....	Ácido clorídrico
HIV.....	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPR.....	peroxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
HTLV.....	Vírus linfotrópico humano
IE.....	Índice ELISA
IL.....	Interleucina
ILC.....	Células linfoides inatas
IgA .....	Imunoglobulina A
IgE.....	Imunoglobulina E
IgG .....	Imunoglobulina G
IgG4 .....	Imunoglobulina G4
IgM .....	Imunoglobulina M

kDa.....	KiloDaltons unidade de massa atômica
kg.....	Kilogramas
L1 .....	Larva rabditoide de primeiro estágio
L2 .....	Larva rabditoide de segundo estágio
L3 .....	Larva filarioide de terceiro estágio
M .....	Molar
mA.....	Miliampere
min .....	Minutos
mg.....	Miligramas
mL.....	Mililitros
mM.....	Milimolar
mm.....	Milímetros
N.....	Normal
NaOH.....	Hidróxido de sódio
ng .....	Nanogramas
nm .....	Nanômetro
O <sub>2</sub> .....	Oxigênio
OPD.....	o-fenilenodiamina
d.p.i. ....	dias pós- infecção
PBS .....	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T.....	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
pH.....	Potencial hidrogênico indicador e condição ácida ou básica de um determinado meio)
p.....	nível de significância
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PM.....	Peso molecular
Rf.....	Motilidade relativa
RIFI.....	Reação de imunoflorescência indireta
r.p.m.....	Rotações por minuto
s.c. ....	Subcutânea
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE.....	Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio



TEMED.....	N,N,N,N-tetrametil etilenodiamino
Th 1.....	Linfócito T helper 1
Th 2.....	Linfócito T helper 2
Tris.....	Hidroximetil
Tris-HCl.....	Solução de hidroximetil acrescido de ácido clorídrico
Tween-20.....	Polioxietilensorbitano-monolaurato
UFU.....	Universidade Federal de Uberlândia
V.....	Volts
v.....	Volume
v/v.....	Volume a volume
X.....	Vezes
µg/mL.....	Micrograma por mililitro
µL.....	Microlitros
µm.....	micrometro

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Epidemiologia da estrogiloidíase .....	12
1.2 Morfologia e ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i> .....	13
1.3 Sintomatologia .....	17
1.4 Perfil de resposta do hospedeiro .....	18
1.5 Imunossupressão na estrogiloidíase .....	19
1.6 Modelo experimental na estrogiloidíase .....	20
1.7 Diagnóstico da estrogiloidíase .....	21
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>24</b>
2.1 Objetivos específicos .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Aspectos éticos .....	25
3.2 Animais .....	25
3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de <i>S. venezuelensis</i> .....	26
3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona .....	26
3.5 Infecção experimental .....	26
3.6 Obtenção e contagem de ovos/ g de fezes .....	27
3.7 Obtenção de amostras de soro e recuperação de fêmea partenogenética de <i>S. venezuelensis</i> .....	27
3.8 Produção de extrato alcalino de larvas (L3), fêmeas partenogenéticas ou ovos de <i>S. venezuelensis</i> .....	28
3.9 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) comparativo na detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogenéticas ou antiovos de <i>S. venezuelensis</i> em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido. ....	28
3.10 Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogenéticas ou ovos de <i>S. venezuelensis</i> . ....	29
3.11 <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogenéticas ou antiovos de <i>S. venezuelensis</i> em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido. .	30
3.12 Análise estatística .....	32
3.13 Normas de biossegurança .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Comparação de ELISA na detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogenéticas ou antiovos de <i>S. venezuelensis</i> em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido. ....	33
4.2 Perfil eletroforético dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogenéticas ou ovos de <i>S. venezuelensis</i> . ....	34
4.3 <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogenéticas ou antiovos de <i>S. venezuelensis</i> em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido. .	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## Resumo

O nematódeo *Strongyloides stercoralis* é responsável pela estrogiloidíase cujo diagnóstico é realizado pela detecção de larvas nas fezes. Porém a baixa eliminação de larvas dificulta a detecção da doença em especial em casos de imunossupressão. Testes imunodiagnósticos têm sido desenvolvidos, porém há dificuldade de se obter larvas de *S. stercoralis* para a produção de extrato antigênico homólogo assim o parasito *Strongyloides venezuelensis* e suas diferentes formas evolutivas são utilizados para produção de extratos antigênicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a detecção de anticorpos anti *S. venezuelensis* a partir de extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogenéticas ou ovos na estrogiloidíase experimental associada à imunossupressão. Ratos machos foram divididos em dois grupos: não-imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados e o soro de todos os animais foram obtidos no 0, 5°, 8°, 13° e 21° dias pós-infecção (d.p.i.). O teste *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) foi realizado para comparar o potencial reativo dos extratos alcalinos de larva L3, fêmeas partenogenéticas e ovos de *S. venezuelensis* em ratos não-imunossuprimidos e imunossuprimido. *Immunoblotting* foi avaliado quanto sua detecção de IgG anti *S. venezuelensis* em ambos os grupos frente aos extratos alcalinos das três formas evolutivas do parasito. No ELISA comparativo todos extratos foram efetivos na detecção de anti-IgG de *S. venezuelensis*. O extrato de larvas apresentou reatividade a partir do 5° d.p.i cessando no 21° d.p.i. no grupo não-imunossuprimido enquanto o grupo imunossuprimido essa reatividade permaneceu no 21° d.p.i.. O *immunoblotting* apresentou perfil de reatividade com frações imunorreativas no grupo imunossuprimido a partir do 5° d.p.i. enquanto o grupo não-imunossuprimido a reatividade a partir do 8° d.p.i. Os extratos alcalinos de fêmeas partenogenéticas e de ovos apresentaram similar perfil de reatividade tanto no ELISA comparativo quanto no *immunoblotting*. Frações proteicas imunorreativas de 26 e 17 kDa presentes no extrato alcalino de larvas apresentaram como importantes marcadores de infecção em animais imunossuprimidos. Conclui-se que todos os extratos alcalinos possuem potencial diagnóstico na estrogiloidíase experimental com destaque para o extrato de larvas em casos de imunossupressão, sendo o *immunoblotting* uma importante ferramenta diagnóstica complementar.

Palavras-chave: imunossupressão, *Strongyloides venezuelensis*, *Immunoblotting*, ratos.

## Abstract

### **Immunoblotting using alkaline extracts of L3 larvae, parthenogenetic females or eggs of *Strongyloides venezuelensis* in experimental strongyloidiasis associated with immunosuppression.**

The nematode *Strongyloides stercoralis* responsible for strongyloidiasis diagnosed by detection of larvae in feces. However, the elimination of low larvae hampers the detection of disease particularly in cases of immunosuppression. Immunodiagnostic tests have been developed, but the difficulty of obtaining larvae of *S. stercoralis* for the production of homologous antigenic extract, thereby *Strongyloides venezuelensis* and their different evolutionary forms for the production of antigen extracts. The aim of this study was to evaluate the detection of antibodies anti *S. venezuelensis* against alkaline extracts of L3 larvae, parthenogenetic females or eggs in experimental strongyloidiasis associated with immunosuppression. Male rats were divided into two groups: non-immunosuppressed and immunosuppressed experimentally infected and serum from all animals were obtained at 0, 5<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days post infection (d.p.i.). The test enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to compare the reactive potential of alkaline extracts of L3 larvae, parthenogenetic females and eggs of *S. venezuelensis* in rats non-immunosuppressed and immunosuppressed. Immunoblotting was also evaluated for detection of IgG anti *S. venezuelensis* in both groups front to alkaline of the three developmental forms of the parasite extracts. In all comparative ELISA extracts were skilled in detecting IgG *S. venezuelensis*. The extract of larvae showed reactivity from the 5<sup>th</sup> dpi ceasing at 21<sup>th</sup> d.p.i in the non-immunosuppressed group while the group immunosuppressed this reactivity remained at 21<sup>th</sup> d.p.i. immunoblotting showed the reactivity profile with immunoreactive fractions in immunosuppressed group from the 5<sup>th</sup> d.p.i. while the non-immunosuppressed group reactivity from 8<sup>th</sup> d.p.i. The alkali extracts of parthenogenetic females and eggs showed a similar profile of reactivity in both ELISA and immunoblotting. Immunoreactive protein fractions of 26 and 17 kDa present in the alkaline extract of larvae presented as important markers of infection in immunosuppressed animals. It is concluded that all alkali extracts have diagnostic potential in experimental strongyloidiasis especially the larval extract in cases of immunosuppression, and immunoblotting an important complementary diagnostic tool.

Keywords: immunosuppression, *Strongyloides venezuelensis*, immunoblotting, rat.

## 1. INTRODUÇÃO

O nematódeo *Strongyloides stercoralis* (BAVAY, 1876) infecta 30 a 100 milhões de pessoas em 70 países e é responsável pela geohelmintíase estrongiloidíase (SIDDIQUI; BERK, 2001; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014). O parasito foi identificado primeiramente em soldados franceses que retornavam de serviço militar na Conchinchina (atual Vietnã) por Louis A. Normand (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011). Os parasitos foram então descritos pelo Professor Arthur René Jean Baptiste Bavay, que os nomeou primeiramente como *Anguillula intestinalis*, por isso a denominação de anguilulose para a doença ocasionada por esse helminto. O gênero *Strongyloides* foi definido em 1879 por Grassi, após a descoberta de Normand. A demonstração de que no ciclo de vida desse parasito ocorre uma fase estercoral constituída por parasitos de vida livre e outra fase intestinal representada pela fêmea parasita originou a denominação *Strongyloides stercoralis*, Stiles e Hassall, 1902. (“Strongylus” = arredondado; “oides” = semelhantes; “stercus” = esterco) (GROVE, 1996). Ribeiro da Luz reportou pela primeira vez em 1880, no Estado do Rio de Janeiro, a importância do *S. stercoralis* como agente etiológico da estrongiloidíase no Brasil e, posteriormente, em 1948, Moraes enfatizou a importância médico-sanitária dessa parasitose (MORAES, 1948; MAIA *et al.*, 2006; COSTA-CRUZ, 2011).

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae que é composta por parasitos de interesse médico e veterinário (REY, 2001). Admite-se atualmente 52 espécies do gênero *Strongyloides* que podem ocorrer em aves, répteis, anfíbios, mamíferos domésticos e silvestres e no homem causando a estrongiloidíase (GROVE, 1996).

## 1.1 Epidemiologia da estrogiloidíase

Das diferentes espécies do gênero *Strongyloides*, apenas duas acometem o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* (Von Linstow, 1905) sendo o último com ocorrência em algumas regiões da África e Ásia (LEVINE, 1980; COSTA-CRUZ, 2011, SCHÄR *et al.*, 2013).

Com distribuição mundial heterogênea, a estrogiloidíase apresenta áreas de predileção no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África, algumas ilhas do Caribe e regiões dos Estados Unidos (GENTA, 1989, BOULWARE *et al.*, 2007; FARDET *et al.*, 2007; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR *et al.*, 2013). Três regiões mundiais foram definidas de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (< 1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) TUERCHLER apud PIRES; DREYER, 1993; RODRIGUEZ *et al.*, 2001). Todas as áreas agrupadas como hiperendêmicas estão situadas nos trópicos, onde as condições climáticas favorecem a disseminação deste parasito.

As larvas de *S. stercoralis* estão sujeitas a tropismos que de algum modo têm importância epidemiológica na helmintíase como o geotropismo negativo (movimento de ascensão das larvas pelas superfícies e outros movimentos em sentido contrário a terra), histotropismo positivo (fator determinante na penetração das larvas infectantes através da pele que está associado ao termotropismo positivo, hidrotropismo positivo, quimiotropismo ao O<sub>2</sub>) e quimiotropismo negativo ao CO<sub>2</sub> (MORAES, 1948).

Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto que nos trópicos acomete principalmente as crianças pela frequente permanência em solos contaminados (GROVE, 1996). Em países desenvolvidos as taxas de infecção pelo parasito estão relacionados com imigrantes e refugiados atingindo valores de 75%; muitas das vezes os indivíduos parasitados são assistidos nos hospitais nos países que o hospedam aumentando a taxa de infecção nesses países, sendo esta variável dependendo do país de origem do indivíduo infectado (SHÄR *et al.*, 2013). Na América Latina apresentou áreas de alta prevalência (>

20%) como a Argentina, Equador, Venezuela, Peru e Brasil, em estudo epidemiológico que avaliou a prevalência do *S. stercoralis* (BUONFRATE *et al.*, 2014). No Brasil, essa parasitose tem grande importância em saúde pública com taxas de infecção variando de acordo com as diversas regiões e métodos de escolha para o diagnóstico parasitológico (PAULA, COSTA-CRUZ, 2011). A ocorrência deste parasito tem sido analisado pelos métodos de Baermann-Moraes e de Lutz, em Minas Gerais, nos anos de 1998 a 2002 e a positividade foi de 2,4%, em crianças (DE PAULA *et al.*, 2000) e 33,3%, em grupos de alcoólatras (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

## 1.2 Morfologia e ciclo biológico de *S. stercoralis*

O parasito apresenta seis formas evolutivas: fêmeas partenogênicas, ovos, larvas raptidoides, fêmeas de vida livre, machos de vida livre e larva filarioide, todas morfologicamente distintas (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2011).

A fêmea partenogênica parasita adulta mede 1,7 a 2,5 mm de comprimento e 35 a 45mm de diâmetro, apresentando uma porção anterior mais afilada e a uma posterior curta e romba. Ao longo do corpo apresenta uma cutícula fina, semi-transparente e estriada transversalmente em toda a extensão. Em posição ventral, encontra-se a vulva no terço médio do corpo, contendo dois lábios distintos e pouco proeminentes. O ânus localiza-se transversalmente, próximo à extremidade posterior. Um aparelho digestório simples, com boca hexagonal provida de lábios inconspícuos cercados por seis papilas, à qual seguem-se uma pequena cavidade bucal e um curto vestíbulo. O esôfago alongado, filariforme, cilíndrico, com pequena dilatação anterior, mede de um terço a um quarto do comprimento do helminto. Apresenta dois canais excretores longitudinais, localizados ao longo do parasito, conectados um ao outro e a uma única célula excretora, por um ducto transversal, imediatamente atrás do

anel nervoso. O sistema reprodutor em posição anfidelfa ocupa quase a totalidade dos dois terços posteriores do parasito. O útero com número reduzido de ovos em geral de 6 a 9 ovos com graus variáveis de maturação, estão dispostos seriadamente, ovidutos em continuação e na mesma orientação dos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996). Os ovos formados, no princípio têm uma única célula (metâmera) a qual se divide progressivamente até formar mórula e depois embrião. As características cromossomais das fêmeas partenogênicas parasitas (triplóides) estão de acordo com sua capacidade de reprodução a partir da partenogênese (MORAES, 1948; HENDRIX *et al.*, 1987). A reprodução por partenogênese permite ao parasito a produção de ovos haploides (1N), diploides (2N) ou triploides que darão origem a larvas rabditoides com uma dessas características genéticas citadas anteriormente, sendo estas diferenciadas em machos de vida livre quando forem haploides, fêmeas de vida livre quando forem diploides e larvas L3 infectantes quando forem triploides (MORAES, 1948; HENDRIX *et al.*, 1987).

A fêmea de vida livre ou estercoral, menor que a fêmea partenogênica, é fusiforme e mede de 0,8 a 1,2 mm de comprimento e 50 µm de diâmetro. Possui uma cutícula hialina, translúcida, delgada e estriada transversalmente. Apresenta extremidade anterior arredondada e posterior afilada pontiaguda. Provida de uma boca pequena, com lábios inconspícuos, seguida por curto vestíbulo. Esôfago curto, medindo entre a sétima e a oitava parte do comprimento total do corpo, dividido em três porções, uma anterior, cilíndrica e alongada, uma intermediária estreita e uma posterior globulosa (bulbo), aproximando-se do tipo rabdiforme. Ânus situado junto a uma papila próximo a extremidade posterior. Vulva situada próxima ao meio do corpo, com dois lábios conspícuos, proeminentes. Úteros em posição anfidelfa, ocupando grande parte do corpo do helminto, contendo cada um até 28 ovos em graus diversos de evolução dispostos seriadamente. Oviduto em continuação com os úteros,



ligando-se aos ovários dobrados em orientação contrária aos respectivos úteros (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011).

O macho de vida livre apresenta corpo cilíndrico, estreitando-se para a extremidade anterior, que é arredondada e a posterior afila-se abruptamente, recurvando-se ventralmente terminando em ponta romba. Semelhante à fêmea apresenta uma cutícula, lábios indistintos, esôfago com morfologia análoga à da fêmea e equivalente à sexta ou sétima parte do comprimento do corpo. Testículos ocupando grande extensão do corpo, contendo espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides, abrindo em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios, iguais ou sub-iguais canaliculados, curvos e medindo aproximadamente 38mm, intimamente relacionados com o gubernáculo. Seis pares de papilas pré-cloacais desenvolvidas e um par de papilas cloacais de difícil observação (MORAES, 1948; GROVE 1996).

As larvas rhabditoides são as formas encontradas nas fezes ou nos fluídos intestinais. Tanto as da fêmea parasita com as de vida livre são indistinguíveis, com a porção anterior fina e arredondada; extremidade posterior afinando-se gradualmente terminando em ponta com ápice rombo. Cutícula delgada e hialina, que apoia sobre uma camada granular, provavelmente de gordura. Boca pequena, com vestíbulo curto com profundidade sempre menor que o diâmetro da larva, ao contrário do que se observa nas larvas de ancilostomatídeos, em que o vestíbulo é alongado e sua profundidade igual ao diâmetro do corpo. Esôfago com dois bulbos, o anterior cilíndrico e alongado, o posterior globuloso e entre os dois uma porção estreitada, seu comprimento varia com o desenvolvimento da larva. Intestino com a porção anterior mais estreita. Ânus relativamente afastado da extremidade posterior. Primórdio genital desenvolvido e um pouco atrás do meio do corpo, formando um conjunto de células em número de 6 a 18. Esse caráter é muito interessante para sua diferenciação das larvas rhabditoides dos ancilostomatídeos, em que o esboço genital é apenas vestigial (MORAES,

1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011). A larva filarioide (L3) é a forma infectante capaz de penetrar a pele e as mucosas, sendo vista migrando pelos tecidos do hospedeiro. Dois tipos distintos de L3 são descritos um que é de vida livre e outro presente na autoinfecção, diferem morfológicamente no tamanho e detalhes no esôfago, com o último sendo um pouco maior e mais destacado (GROVE, 1996).

Os ovos são depositados na mucosa intestinal nas glândulas de *Liebekühn*, sua forma é elíptica, parede fina e transparente, deixando perceber no momento da postura o embrião parcial ou inteiramente desenvolvido. Medindo de 50-58  $\mu$ m e comprimento por 30-34 $\mu$ m de diâmetro. Excepcionalmente, em indivíduos com o trânsito intestinal acelerado, pode-se observar nas fezes ovos do helminto já embrionados (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

O ciclo de vida de *S. stercoralis* é complexo quando comparado a outros nematódeos alternando entre ciclo de vida livre e ciclo parasitário, não apresentando eliminação de ovos e sim de larvas rabditoides (L1 e L2) nas fezes (MORAES, 1948; GENTA, 1989; IRIEMENAM *et al.*, 2010). Uma vez penetrada à pele do indivíduo, a larva filarioide atinge a corrente sanguínea e linfática fazendo rota pelo coração e pulmões, onde se diferencia de larva L3 para L4. As larvas L4 atingem a árvore brônquica chegando a faringe onde podem ser expelidas ou deglutidas atingindo o intestino delgado onde se fixam na mucosa diferenciando-se em fêmea partenogênética, que passa a liberar ovos (SIDDIQUI; BERK, 2001; COSTA-CRUZ, 2011). Os ovos são eliminados na mucosa intestinal e antes de atingirem o intestino grosso eclodem liberando larvas rabditoides juntamente com as fezes ocorrendo sua diferenciação de L2 para L3 em condições apropriadas, como solo arenoso, umidade alta, temperatura entre 25° a 30° e ausência de luz solar direta, como também podem diferenciar-se em larvas infectantes L3 no próprio intestino do hospedeiro dando continuidade ao ciclo de vida livre e parasitário respectivamente (MAHMOUD, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; COSTA-CRUZ, 2011; MACHADO *et al.*, 2011, REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013)

### 1.3 Sintomatologia

A infecção por *S. stercoralis* pode evoluir para erradicação, cronicidade decorrente da auto-infecção e hiperinfecção ou disseminação (COSTA-CRUZ, 2011).

Normalmente na estrogiloidíase muitos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto que outros podem apresentar desconfortos intestinais. A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resulta em reação inflamatória, podendo ocorrer a síndrome de má absorção, diarreia crônica com perda protéica, dor abdominal, hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia e anemias (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; BOULWARE *et al.*, 2007; FARDET *et al.*, 2007). Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem expectoração, dispnéia, crises asmátiformes decorrentes das larvas filarioides e ocasionalmente das fêmeas, que aí podem atingir a maturidade liberando larvas rabditoides. A migração e a diferenciação das larvas filarioides podem provocar rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e podem ser limitados ou em casos mais graves, provocar a Síndrome de Löffler, edema pulmonar e insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; MUKERJEE *et al.*, 2003; COSTA-CRUZ, 2011, SIEGEL, SIMON, 2012).

Esta infecção também pode apresentar sensações de prurido e pode se observar larvas migrando para derme, denominada síndrome da larva *currens*. A intensidade dos sintomas está relacionada com a carga parasitária no intestino do indivíduo. No entanto, em casos de imunossupressão, como os induzidos pela infecção do vírus linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1), tratamento com corticosteróides ou quimioterapia citotóxica, pode ocorrer aumento exacerbado da carga parasitária levando à síndrome de hiperinfecção e até mesmo a

disseminação das larvas pelo corpo, sendo esta última associada a um mau prognóstico (MARCOS *et al.*, 2008; ROXBY, GOTTLIEB, LIMAVE, 2009; BON *et al.*, 2010).

#### 1.4 Perfil de resposta do hospedeiro

O sistema imune do hospedeiro determina os fatores e evolução da infecção, desenvolvendo anticorpos das classes IgG, IgA, IgM e IgE específicos, sendo o IgE apresentado em níveis elevados em pacientes imunocompetentes e níveis normais em pacientes imunocomprometidos e com infecção disseminada, ocorrendo uma elevação de IgG4 em casos graves. Existem interações dinâmicas entre as respostas imunes apresentando perfil Th1 e Th2, sendo o último predominante na resposta contra *S. stercoralis* (GENTA, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2009, 2011).

O estudo da estrogiloidíase humana torna-se cada vez mais importante devido ao aumento de indivíduos imunossuprimidos em decorrência de fatores como: uso de corticóides, aumento de transplante de órgão, disseminação do vírus da AIDS, desnutrição, aumento do consumo de bebidas alcoólicas e pacientes com câncer gastrointestinal (GOMPELS *et al.*, 1991; NOZAIS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; KEISER; NUTMAN, 2004; SAFDAR *et al.*, 2004, MACHADO *et al.*, 2008b).

Na estrogiloidíase, alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros apresentam sintomas leves com cura espontânea, e outros ainda, a hiperinfecção com doença disseminada. A variação destes sintomas pode estar relacionada com a capacidade do sistema imunológico de desenvolver ou não resposta imune contra o parasito e do grau de infecção que resultaria em menor ou maior sintomatologia (GROVE, 1996; SHERDING; JOHNSON, 1998; FARDET *et al.*, 2007, SAID *et al.*, 2007).

Vários fatores imunológicos podem estar envolvidos no recrutamento de eosinófilos e outras células para o sítio inflamatório, auxiliando na proteção do hospedeiro contra ação dos helmintos e de outros agentes patológicos (FERREIRA *et al.*, 2007). Na estrogiloidíase os mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos uma vez que, em alguns casos, pode haver ativação da resposta imune mediada por células ou humoral, enquanto que em outros, ocorre supressão desta resposta, de tal forma que estes mecanismos responsáveis pela expulsão do parasito podem estar pouco presentes ou mesmo ausentes (GAUSE, URBAN, STADECKER, 2003; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006). Os conhecimentos a respeito dos mecanismos que o parasito utiliza para evadir da resposta imune do hospedeiro tanto na estrogiloidíase humana quanto em modelos experimentais são ainda insipientes.

### 1.5 Imunossupressão na estrogiloidíase

A imunossupressão tem sido associada aos casos de síndrome de hiperinfecção principalmente quando ocorrem alterações na imunidade mediada por células sendo identificados como fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome. As duas condições que foram mais frequentemente reconhecidas como fatores predisponentes ao desenvolvimento da síndrome de hiperinfecção são a utilização de corticosteróides e a infecção pelo HTLV-1. Estudos da doença disseminada em doentes transplantados, asmáticos, portadores de doença pulmonar crônica e paciente com doença autoimune mostraram que a terapia de corticosteróides tem sido um denominador comum no desenvolvimento de uma infecção grave (MEJIA; NUTMAN, 2012).

Em casos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) estudos epidemiológicos atuais sugerem que o HIV não é um fator de risco para

estrongiloidíase disseminada. O impacto do HIV sobre a susceptibilidade à infecção por *S. stercoralis* não está bem definido (SIEGEL, SIMON, 2012).

Apesar do fato de que o HIV e glucocorticosteróides serem supressores imunes as suas atividades imunossupressoras são diferentes. A infecção por HIV resulta principalmente na perda do perfil do tipo Th1 enquanto o perfil Th2 pode ser pouco prejudicado ou melhorado; não indicando que a infecção pelo HIV, leva a uma melhora na atividade contra *S. stercoralis* ou que o hospedeiro infectado possua atividade anti *Strongyloides* equivalente a de um indivíduo imunologicamente normal. No entanto, pode ser que a atividade de Th2 no hospedeiro do HIV ajude a prevenir a disseminação de *S. stercoralis* na população infectada pelo HIV (SIEGEL, SIMON, 2012).

## 1.6 Modelo experimental na estrongiloidíase

*Strongyloides venezuelensis* é um nematódeo de roedores selvagens, freqüentemente utilizado como organismo modelo para avaliar interação parasito-hospedeiro, aspectos moleculares durante a infecção, eficácia de novas terapias e muitas características imunológicas da estrongiloidíase. Também tem sido usado para padronizar novas técnicas imunológicas para aperfeiçoar o diagnóstico de estrongiloidíase humana (MACHADO *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2008; MARRA *et al.*, 2011, GONÇALVES *et al.*, 2012a). Apresentam uma rota de migração em roedores, semelhante à de *S. stercoralis* em seres humanos (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008).

*S. venezuelensis* produz grande número de larvas infectantes em culturas de fezes de ratos infectados experimentalmente, simplificando a produção de antígenos, com a possibilidade de identificar fração antigênica única que pode ser reconhecida com precisão e

especificidade por IgG específicos contra a estrogiloidíase (MACHADO *et al.*, 2003, 2008a, GONÇALVES *et al.*, 2008). Nesse sentido o emprego de modelos experimentais como *S. venezuelensis* apresentam boa aplicabilidade, pois são seguros por não infectarem humanos além de apresentarem bom rendimento larval em culturas de fezes.

### 1.7 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico de estrogiloidíase é realizado a partir de sinais clínicos e sintomas, eosinofilia e achados sorológicos, porém a detecção de larvas nas fezes é o método de escolha (GENTA, 1989; LIU, WELLER, 1993; GROVE, 1996; SIDDIQUI, BERK, 2001; GANESH, CRUZ JR, 2011, LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014).

As técnicas de exame coproparasitológico como Hoffmann, Pons e Janner (1934), Faust; Switz e Tobie (1939) e Ritchie (1948) não são sensíveis na detecção do parasito, sendo os métodos de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948), Rugai e cultura em placa de ágar são mais sensíveis que os demais métodos (SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDRÉ *et al.*, 2006; INÊS *et al.*, 2013; REQUENA-MÉNDEZ, 2013; LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014). Na maioria dos casos a carga parasitária é baixa e a liberação de larvas mínima, dessa forma um único exame de fezes não é suficiente para detectar a infecção em 70% dos casos (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001). As repetições dos exames melhoram a chance de encontrar parasitos e aumentam a sensibilidade em diagnosticar a infecção em 50% com três exames e 100% com sete amostras analisadas em série (SIDDIQUI; BERK, 2001). Como o exame de múltiplas amostras de fezes é bastante inconveniente para o paciente e consome muito tempo, a maioria dos médicos relutam em utilizá-lo (HIRA *et al.*, 2004).

Recentemente, a detecção de DNA do parasito em amostras fecais utilizando a teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) provou ser um método sensível e específico para o

diagnóstico de *S. stercoralis* (VERWEIJ *et al.*, 2009; KRAMME *et al.*, 2011, SITTA *et al.*, 2014), embora não seja facilmente adaptável para uso em situações clínicas em que as instalações de laboratório são muitas vezes limitadas (INÊS *et al.*, 2011).

Testes imunodiagnósticos têm sido realizados, com sucesso (SIDDIQUI; BERK, 2001). Ensaios como o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e *Western blotting* ou *Immunoblotting* são úteis para avaliação da resposta imune do hospedeiro em formas assintomáticas da infecção auxiliando no diagnóstico clínico por apresentarem maior sensibilidade quando comparados com os métodos parasitológicos (FOGAÇA *et al.*, 1990; LINDO *et al.*, 1994; SUDRÉ *et al.*, 2006; BOSCOLO *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012a; LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014).

Uma das limitações apresentadas para o desenvolvimento e padronização de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos homólogos que permitam seu posterior fracionamento e análise (COSTA-CRUZ *et al.*, 1998; ROSSI *et al.*, 1993; FELICIANO *et al.*, 2010, GONÇALVES *et al.*, 2012a).

Pesquisas experimentais têm sido realizadas visando aumentar a obtenção de antígenos heterólogos. Estudos com espécies de *Strongyloides* que se desenvolvem em roedores como o *S. venezuelensis*, possuem determinantes antigênicos que apresentam reação cruzada com os antígenos de *S. stercoralis*, tem mostrado resultados satisfatórios com antígenos heterólogos para diagnosticar a estrogiloidíase humana (SATO *et al.*, 1990; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; MACHADO *et al.*, 2008; RIGO *et al.*, 2008).

Diferentes preparações antigênicas podem ser utilizadas no diagnóstico da estrogiloidíase humana sendo atualmente realizado com antígenos totais de extratos de larvas infectantes de várias espécies de *Strongyloides*. Estudos recentes têm demonstrado que frações de extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* podem ser utilizados na detecção de infecções por *S. stercoralis* (RIGO *et al.*, 2008; FELICIANO *et al.*, 2010; GONZAGA *et*



*al.*, 2011). Feliciano *et al.* (2014) utilizando de técnica de *Phage Display* selecionou peptídeos miméticos a partir de extrato salino de *S. venezuelensis* identificando potenciais marcadores de infecção por *S. stercoralis* em soro humano utilizando técnica de *Phage-ELISA*.

As diferentes formas evolutivas do parasito como as fêmeas partenogênicas e os ovos também apresentam potencial uso como antígenos (GONÇALVES *et al.*, 2012b).

Em modelos experimentais infectados por *S. venezuelensis*, o fato de o roedor eliminar ovos nas fezes tem indicado que o uso de extrato antigênico de ovos no diagnóstico seria de grande relevância, ao passo que na estrogiloidíase humana além do extrato antigênico de larva, seria possível o uso de extrato antigênico produzido a partir de fêmeas partenogênicas, visto que é essa forma que se estabelece na mucosa intestinal (GONÇALVES *et al.*, 2012b).

Nos últimos anos pesquisas estão sendo realizadas no sentido de melhorar o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase. Os estudos enfatizam a criação de um método diagnóstico confiável, que seja acessível à população com estrogiloidíase. A detecção de anticorpos utilizando antígeno heterólogo tem sido amplamente utilizado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, especialmente, para levantamento epidemiológico (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2012c). No entanto, níveis de anticorpos ainda não diferenciam totalmente entre infecção ativa de resultados sorológicos falsos positivos. Além disso, testes imunodiagnósticos não são capazes de distinguir casos com eliminação de larvas detectáveis em exames coproparasitológicos dos casos com exames de várias amostras fecais negativas para *S. stercoralis*, mas com resultados positivos em ensaios sorológicos. Por essa razão, ainda não foi estabelecida uma estratégia de triagem ideal (SUDARSHI *et al.*, 2003; HIRA *et al.*, 2004).

Nesse sentido a pesquisa de anticorpos IgG anti *S. venezuelensis* em diferentes formas evolutivas por técnica de *immunoblotting* pode ser uma ferramenta complementar na detecção de infecção por *S. stercoralis* em casos de imunossupressão.

## 2. OBJETIVO GERAL

- ✓ Detectar anticorpos anti *S. venezuelensis* frente aos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogénicas ou ovos de *S. venezuelensis* através de técnica de *Immunoblotting* para caracterização de frações proteicas imunorreativas na estrogiloidíase experimental associada à imunossupressão.

### 2.1 Objetivos específicos

- ✓ Produzir extratos alcalinos a partir de larvas L3, fêmeas partenogénicas ou ovos de *S. venezuelensis*.
- ✓ Comparar a detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogénicas ou antiovos de *S. venezuelensis* em soro de ratos não-imunossuprimidos e imunossuprimidos por ELISA.
- ✓ Demonstrar o perfil eletroforético dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogénicas ou ovos de *S. venezuelensis* por eletroforese SDS-PAGE.
- ✓ Detectar anticorpos anti *Strongyloides venezuelensis* frente aos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogénicas ou ovos em amostras de soro de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) não-imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aprovado sob o parecer de N° 102/10.

As cepas de *S. venezuelensis* foram obtidas e mantidas conforme constam no projeto “Manutenção da cepa de *Strongyloides venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar” aprovado sob o parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) de N° 075/08.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos, pesando de 120-180g, com idade entre 6 a 8 semanas da espécie *Rattus norvegicus* Wistar, imunossuprimidos ou não, mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

Os animais foram divididos em dois grupos: **Grupo não-imunossuprimidos** (ratos selvagens infectados com *S. venezuelensis*, n = 30, sendo 6 animais por ponto de experimento 0, 5°, 8°, 13° e 21° dias pós-infecção – d.p.i.), **Grupo imunossuprimidos** (ratos imunossuprimidos com dexametasona e infectados com *S. venezuelensis*, n = 30, sendo 6 animais por ponto 0, 5°, 8°, 13° e 21° dias pós-infecção – d.p.i.). Os animais do ponto 0 da cinética de infecção foram utilizados como padrão negativo nos experimentos (animais do dia 0 de ambos grupos).

### 3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis*

O parasito foi mantido experimentalmente pela infecção em ratos da espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) da linhagem Wistar Greenman & Donaldson (1906), no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Fezes de ratos *Wistar* infectados foram mantidas em cultura de carvão animal por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (1905 apud NEVES *et al.*, 2011). Após este processo larvas filarioides foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

### 3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona

Para a supressão imune, ratos Wistar (120g) do grupo imunossuprimido foram imunossuprimidos com Fosfato de Dexametasona 5 µg/mL em água durante 5 dias (ROMAND; THULLIEZ; DUBEY, 1998). A solução preparada foi transferida para bebedores em gaiolas próprias para ratos correspondentes ao grupo dos imunossuprimidos. A solução era repostada diariamente conforme o consumo pelos animais durante o período de imunossupressão.

### 3.5 Infecção experimental

Os animais de ambos grupos foram infectados experimentalmente pela inoculação de 1500 larvas (L3) de *S. venezuelensis* via subcutânea (s.c). Para o monitoramento da infecção experimental, no dia 0 e 5°, 8°, 13° 21° d.p.i., os animais foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido. As amostras de fezes de cada animal foram recolhidas e realizada

a contagem de ovos por grama de fezes segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939) para monitoramento da infecção.

### 3.6 Obtenção e contagem de ovos/ g de fezes

A obtenção dos ovos utilizados para a produção do extrato antigênico foi realizada no 8º d.p.i. (pico de maior eliminação). Para tanto, três animais experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* foram colocados individualmente para defecarem sobre papel toalha limpo e úmido. As fezes foram recolhidas e processadas para a estimativa de ovos/g de fezes segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939) e os ovos recolhidos e armazenados à -70° C até o momento do uso.

### 3.7 Obtenção de amostras de soro e recuperação de fêmea partenogênética de *S. venezuelensis*

Para a obtenção das amostras de soro, os ratos de ambos os grupos em cada ponto da cinética (0 e 5º, 8º, 13º e 21º d.p.i.) foram sacrificados por exsanguinação total por punção cardíaca após anestesia (Cloridrato de cetamina na concentração de 60 mg/kg e cloridrato de xilazina 7 mg/kg). O sangue coletado foi centrifugado a uma rotação de 3000 r.p.m. por 10 min. para obtenção das amostras de soro. O sobrenadante obtido foi recolhido, alicotado e armazenado a -20° C até o momento do uso.

Para recuperação de fêmeas partenogênicas os animais sacrificados no 8º d.p.i., após a coleta do sangue, o intestino delgado foi removido, colocado em placa de Petri contendo solução salina, seccionado longitudinalmente e incubado a 37 ° C por duas horas. Após serem recuperadas as fêmeas partenogênicas, foi realizada a contagem segundo Sato; Toma (1990) e armazenadas a -20° C para posterior uso.

### 3.8 Produção de extrato alcalino de larvas (L3), fêmeas partenogênicas ou ovos de *S.venezuelensis*

A extração antigênica alcalina foi realizada segundo Machado *et al.* (2003) com modificações. Foram utilizadas aproximadamente 300.000 larvas (L3), 500 fêmeas partenogênicas ou 300.000 ovos de *S. venezuelensis*. No tubo contendo a solução resultante do rompimento das larvas, fêmeas ou ovos foi adicionado 1 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 0,15 M com inibidores de proteases, e este preparado permaneceu em repouso por 18 h a 4° C sob agitação lenta. Posteriormente, foi acrescentado 0,5 mL de HCl (ácido clorídrico) 0,3M até atingir pH 7,0 e a mistura foi centrifugada a 12400 g por 30 min a 4° C. O conteúdo proteico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry *et al.* (1951).

### 3.9 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) comparativo na detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogênicas ou antiovos de *S. venezuelensis* em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido.

O teste ELISA foi realizado de acordo com protocolo descrito por Gonçalves *et al.* (2012c). Placas de microtitulação de baixa afinidade (BioAgency Laboratories, São Paulo, Brasil) foram sensibilizadas com extrato alcalino de larvas L3 (10 µg/mL), fêmeas partenogênicas (10 µg/mL) ou ovos (10 µg/mL) de *S. venezuelensis* em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos e então bloqueadas com solução de leite desnatado em PBS-T 3% por 30 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 50µL das amostras de soro (1:10) diluídos em PBS-T. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50µL de anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (HPR) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany) no título de 1:8000 por 45 minutos a 37°C, sendo

lavadas novamente e reveladas pelo substrato  $H_2O_2$  (Merck KGaA© Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) + o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany), após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  2N (Merck KGaA© Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, McLean VA) utilizando filtro de 492nm. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula:  $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$ , onde *cut off* foi estabelecido como a média de DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quanto  $IE > 1$ .

### 3.10 Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogenéticas ou ovos de *S. venezuelensis*.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada para análise do perfil eletroforético dos extratos alcalinos ou transferência para realização de *Immunoblotting*. Os extratos alcalinos e padrões de peso moleculares foram submetidos à SDS-PAGE 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 (dodecil sulfato de sódio) a 1%, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 2mM, solução de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8%, TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamino) a 0,125% e APS (Persulfato de amônio) a 0,125%. O gel preparado foi adicionado 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. O gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCl a 0,125 M, pH 6,8, SDS a 0,1%, EDTA a 2mM, solução acrilamida/bis-acrilamida a 5%, TEMED a 0,125%, APS a 0,125% e água destilada. Antes da aplicação no gel, as amostras de extrato alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos foram diluídas em tampão de amostra 2X contendo tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20% ou tampão 10X contendo tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,25%, EDTA 200 mM e sacarose a 20%, e submetidas a aquecimento em banho-maria 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 preparado com solução de glicina a 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 1h e 30 min.

Após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982) ou realizada a transferência para *Immunoblotting*.

### 3.11 *Immunoblotting* para detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogênicas ou antiovos de *S. venezuelensis* em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido.

Os extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida foram transferidos do gel para membranas de



nitrocelulose como porosidade de 45  $\mu\text{m}$ , de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

Foi utilizado sistema de eletrotransferência semi-úmido para acondicionar um *sandwich* com: papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose e papel de filtro. Todo o *sandwich* foi umidecido em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) e colocado em cuba úmida de transferência para aplicação de corrente elétrica de 300 mA por 1h e 40 min. Ao término da transferência as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para confirmar as bandas eletrotransferidas. As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3mm para reação de *immunoblotting*. As tiras de nitrocelulose foram colocadas em cubas apropriadas para a reação de *immunoblotting*. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as tiras foram incubadas com 1 mL/poço de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (PBS-TM) por duas horas, à temperatura ambiente sob agitação horizontal lenta. Em seguida as tiras foram lavadas com PBS-TM a 0,05%. Para reação de *immunoblotting* foram utilizados pool do soros dos animais de todos os dias da cinética (0 e 5°, 8°, 13°, 21° d.p.i.) diluídos a 1:30 em PBS-TM a 1% para um volume final de 500  $\mu\text{L}$ /poço e incubados com as tiras por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta.

Após as 18 h foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-TM 0,05%, sendo posteriormente adicionados 500  $\mu\text{L}$  do conjugado anti-IgG de ratos conjugado com HRP (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany) na diluição 1:500 em PBS-TM a 1%. Após duas horas sob agitação lenta a temperatura ambiente, as tiras foram submetidas a um ciclo de seis lavagens com PBS-TM 0,05% com intervalos de cinco minutos cada. O *immunoblotting* foi revelado com 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany) em tampão salino adicionado de Tris e HCl (TBS-HCl pH 7,4 0,02 M)

e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). Após a visualização das frações proteicas reativas a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada.

Posteriormente, cada tira foi analisada com base no reconhecimento das frações imunogênicas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro testadas. As bandas polipeptídicas foram analisadas utilizando o programa computacional de análise de imagens *Image J* versão 1.47 (Instituto Nacional de Saúde , Bethesda, USA).

### 3.12 Análise estatística

Para a análise estatística do ELISA foi utilizado o software GRAPHPAD PRISM versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). As variáveis foram analisadas com os testes não-paramétricos por Two Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $p < 0,05$ . O peso molecular das frações proteicas foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores em relação ao Rf (motilidade relativa) através do software GRAPHPAD PRISM versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). O Rf foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distância da origem a migração}}{\text{distância da origem até o ponto de referência}}$$

### 3.13 Normas de biossegurança

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

## 4. RESULTADOS

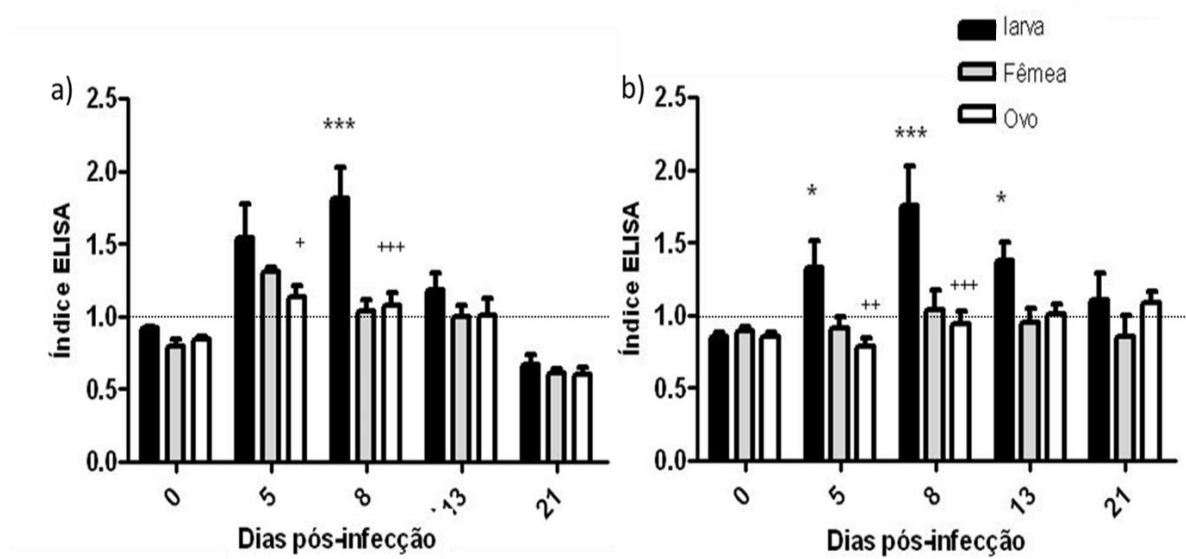
### 4.1 Comparação de ELISA na detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogênicas ou antiovos de *S. venezuelensis* em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido.

Em amostras de soro, a IgG específica para larva de *S. venezuelensis* foi detectada preferencialmente durante o 5° e o 8° d.p.i em animais não-imunossuprimidos, sendo capaz de apresentar redução significativa ( $p < 0,05$ ) com índices de reatividade abaixo do limiar no 21° d.p.i. Nos animais imunossuprimidos, a IgG foi detectada durante toda a cinética experimental, persistindo inclusive no 21° d.p.i. (Figura 1 a, b).

Para o extrato alcalino de fêmea partenogênica a detecção de IgG específica ocorreu principalmente no 5° d.p.i. no grupo não-imunossuprimido, enquanto no grupo imunossuprimido apresentou reatividade limitada apenas no 8° d.p.i., não apresentando significância em ambos os grupos.

No extrato de ovos a detecção ocorreu no 5° e 8° d.p.i. com ausência de reatividade no 21° d.p.i. no grupo não-imunossuprimido. Para o grupo imunossuprimido o extrato de ovo apresentou índices de reatividade a partir do 13° até 21° d.p.i. (Figura 1 a, b).

O extrato alcalino de larvas apresentou melhores resultados enquanto o extrato de fêmeas ou de ovos a detecção variou durante a cinética.

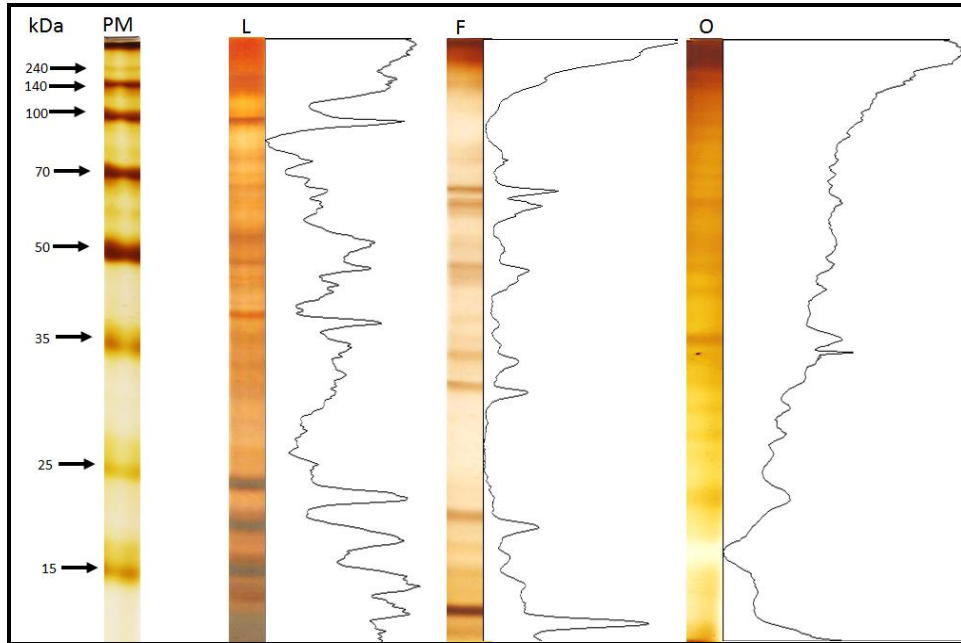


**Figura 1:** ELISA comparativo na detecção de IgG anti *S. venezuelensis* frente aos extratos alcalinos de larvas, fêmeas e ovos em amostras de soros de ratos. a) grupo não-imunossuprimido, b) grupo imunossuprimido. Controles representados pelo dia zero (0). Barras indicam a média e o erro padrão (\*estatística significativa entre larva e fêmea, + estatística significativa entre larva e ovo). \*, +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$  \*\*\*,+++  $p < 0,001$ .

#### 4.2 Perfil eletroforético dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *S. venezuelensis*.

O perfil eletroforético dos extratos alcalinos submetidos ao gel SDS-PAGE a 12% e corados com prata está representado na Figura 2. Observou-se pela análise pelo *software Image j* a presença de perfil eletroforético distintos entre os extratos alcalino de todas as formas evolutivas do parasito com peso molecular variando de 14 a 91kDa, mas com presença de alguns padrões de picos representativos das bandas proteicas indicando proximidades de peso moleculares.

O extrato alcalino de larvas L3 apresentou aproximadamente 8 frações proteicas dentre elas as de 14, 15, 17, 21, 25, 50, 70 e 91 kDa. Para o extrato alcalino de fêmeas partenogênicas foram identificadas frações de 14, 25, 31, 32, 50, 68 e 70 kDa. No gel do extrato alcalino de ovos observou-se 5 frações com pesos moleculares de 25, 35, 36, 50 e 70 kDa. Os três extratos compartilham entre si frações proteicas correspondentes com peso molecular entre 70, 50, 25 kDa (Figura 2).



**Figura 2:** Perfil eletroforético dos extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *S. venezuelensis* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% corado com nitrato de prata. Peso Molecular (PM), extrato de larva L3 (L), extrato de fêmea partenogênica (F) e extrato de ovos (O). Análise realizada por software *Imagej* (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA).

#### 4.3 *Immunoblotting* para detecção de anticorpos antilarvas L3, antifêmeas partenogênicas ou antiovos de *S. venezuelensis* em soro de ratos não-imunossuprimido e imunossuprimido.

A detecção de anticorpos anti-IgG por *immunoblotting* com extrato alcalino de larvas L3 no grupo não-imunossuprimido apresentou padrão de reatividade mais tardio em comparação com o grupo imunossuprimido. Frações proteicas reativas de 17kDa presentes no grupo não imunossuprimido no 13° e 21° d.p.i., foram expressadas no grupo imunossuprimido a partir do 5° d.p.i. persistindo nos dias restantes da infecção. Ambos os grupos apresentaram frações proteicas similares na detecção de IgG na cinética, frações de 50 kDa foram reativas no 8°, 13° e 21° d.p.i. tanto no grupo não-imunossuprimido como no grupo imunossuprimido. O dia zero da infecção apresentou frações proteicas inespecíficas de 91, 75 e 35 kDa em ambos os grupos, permanecendo reativas ao longo da cinética (Figura 3 a, b). A análise do 8° d.p.i. demonstrou um padrão de reatividade mais acentuado no grupo imunossuprimido em

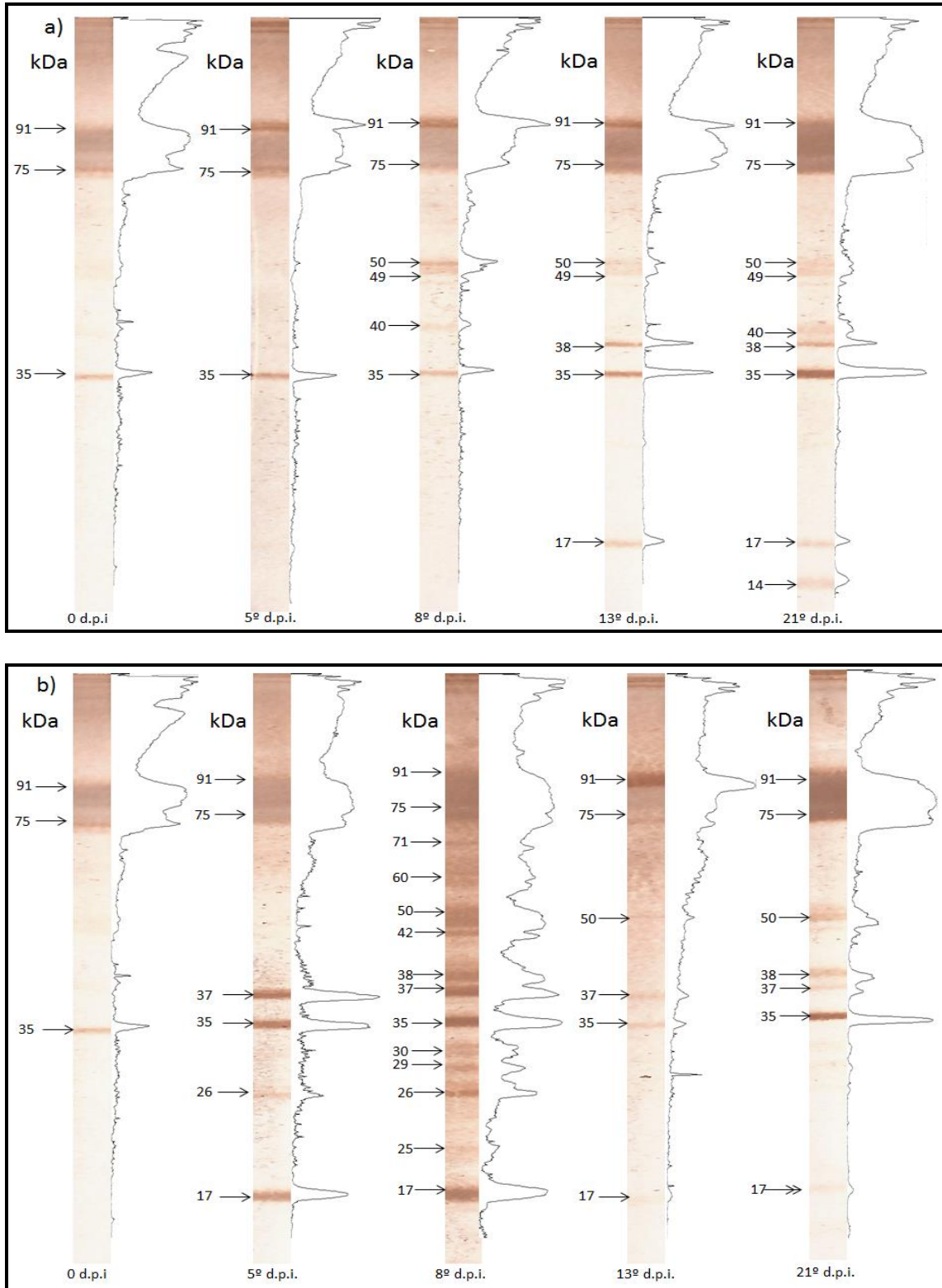
comparação com o grupo não-imunossuprimido, com frações proteicas de 71, 60, 42, 38, 37 e 30-17 kDa no grupo imunossuprimido e ausente no grupo não-imunossuprimido (Figura 3 a, b).

Para o extrato alcalino de fêmeas partenogênicas a reatividade para IgG ocorreu nas frações proteicas de alto peso molecular entre 136-71 kDa. Observou-se padrão de reatividade precoce no grupo imunossuprimido em comparação com o grupo não-imunossuprimido. Frações proteicas de 71 kDa presente no grupo não-imunossuprimidos apenas a partir do 21º d.p.i. estavam presentes no grupo imunossuprimido no 5º d.p.i.. Frações reativas de 85-80 kDa estavam presentes no grupo imunossuprimido a partir de 8 d.p.i. enquanto no grupo não-imunossuprimidos as mesmas frações estavam presentes apenas no 13º e 21º d.p.i. . O controle da reação apresentou frações inespecíficas, a fração de 136 kDa está presente em ambos o grupos e a fração de 73 kDa no grupo não-imunossuprimido (Figura 4 a, b).

Para o extrato alcalino de ovos frações proteicas reativas de baixo peso molecular de 35 a 20 kDa apresentaram-se em ambos os grupos (Figura 5 a, b). Para o grupo imunossuprimido observou-se um padrão de reatividade diferenciado com frações reativas entre 31-20 kDa no 8º d.p.i. que não se mostraram no 13º e 21º d.p.i., demonstrando frações proteicas de 59-40 kDa no 13º e de 42 e 59 kDa no 21 d.p.i. (Figura 5b). O controle da reação apresentou frações inespecíficas de 128 kDa somente no grupo imunossuprimido.

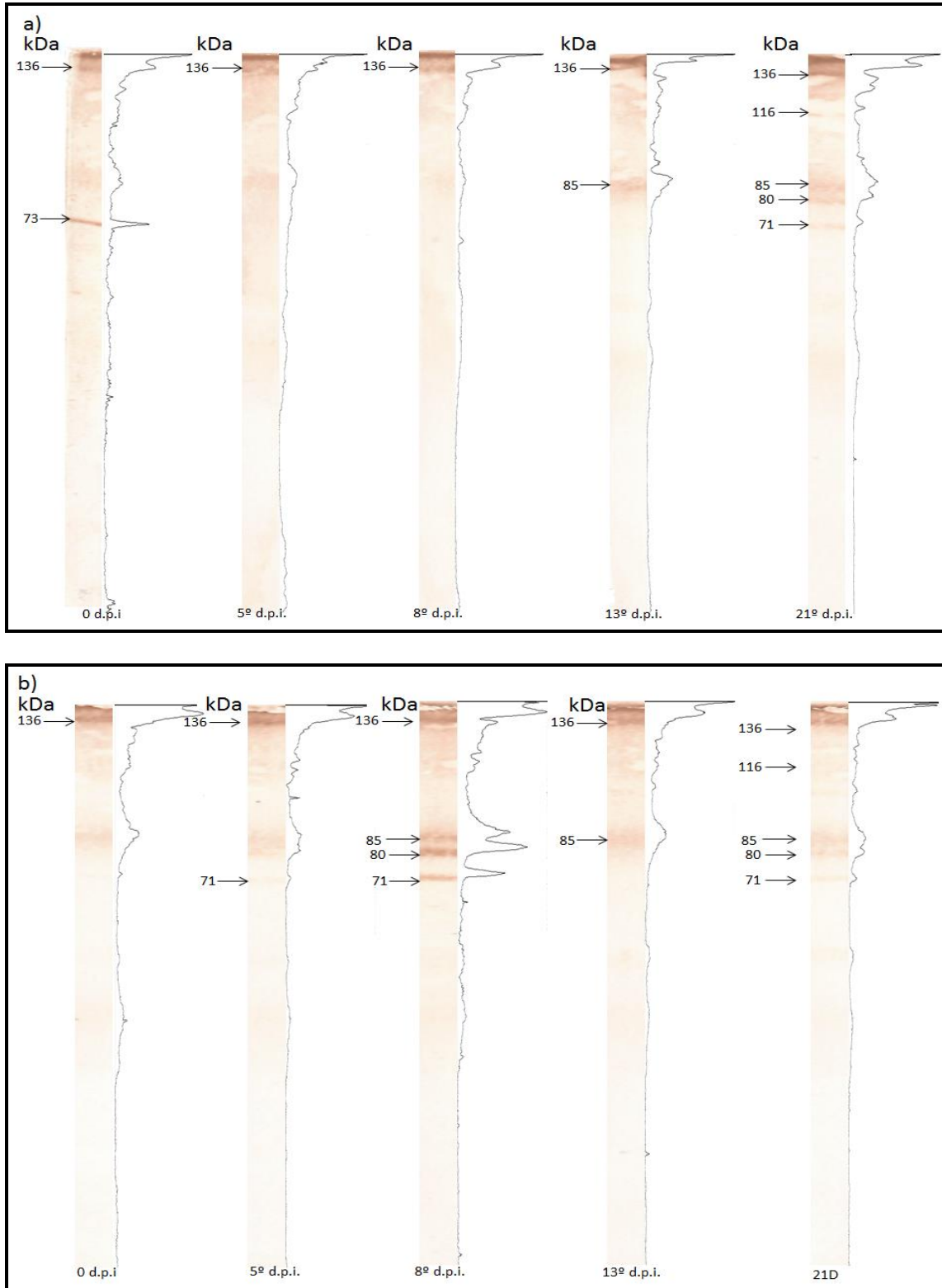
Painel comparativo entre os extratos alcalinos de larvas L3, fêmeas partenogênicas e ovos de *S. venezuelensis* e seu perfil de reatividade de acordo com os dias da cinética de infecção em ambos os grupos experimentais estão representados na figura 6. Frações proteicas reativas ocorreram em todos os dias da cinética da infecção com maior reatividade no 13º e 21º d.p.i. para o grupo não-imunossuprimidos e 8º d.p.i. no grupo imunossuprimido. Ao comparar o compartilhamento de frações imunoreativas entre os extratos alcalinos foi verificado que o extrato alcalino de larvas e ovos compartilham frações no grupo

imunossuprimido de 42 kDa, 30, 29 e 25 kDa, com a maioria sendo reativa no 8 d.p.i. com exceção da fração de 42 kDa presente no 13º e 21º d.p.i. no extrato alcalino de ovos e no 8º d.p.i. no extrato alcalino de larvas. O extrato alcalino de fêmeas partenogênicas não mostrou compartilhamento de reatividade entre os extratos no grupo não-imunossuprimido, sendo condicionada a um único compartilhamento com frações de 71kDa no 8º d.p.i. com o extrato alcalino de larvas no grupo imunossuprimido.

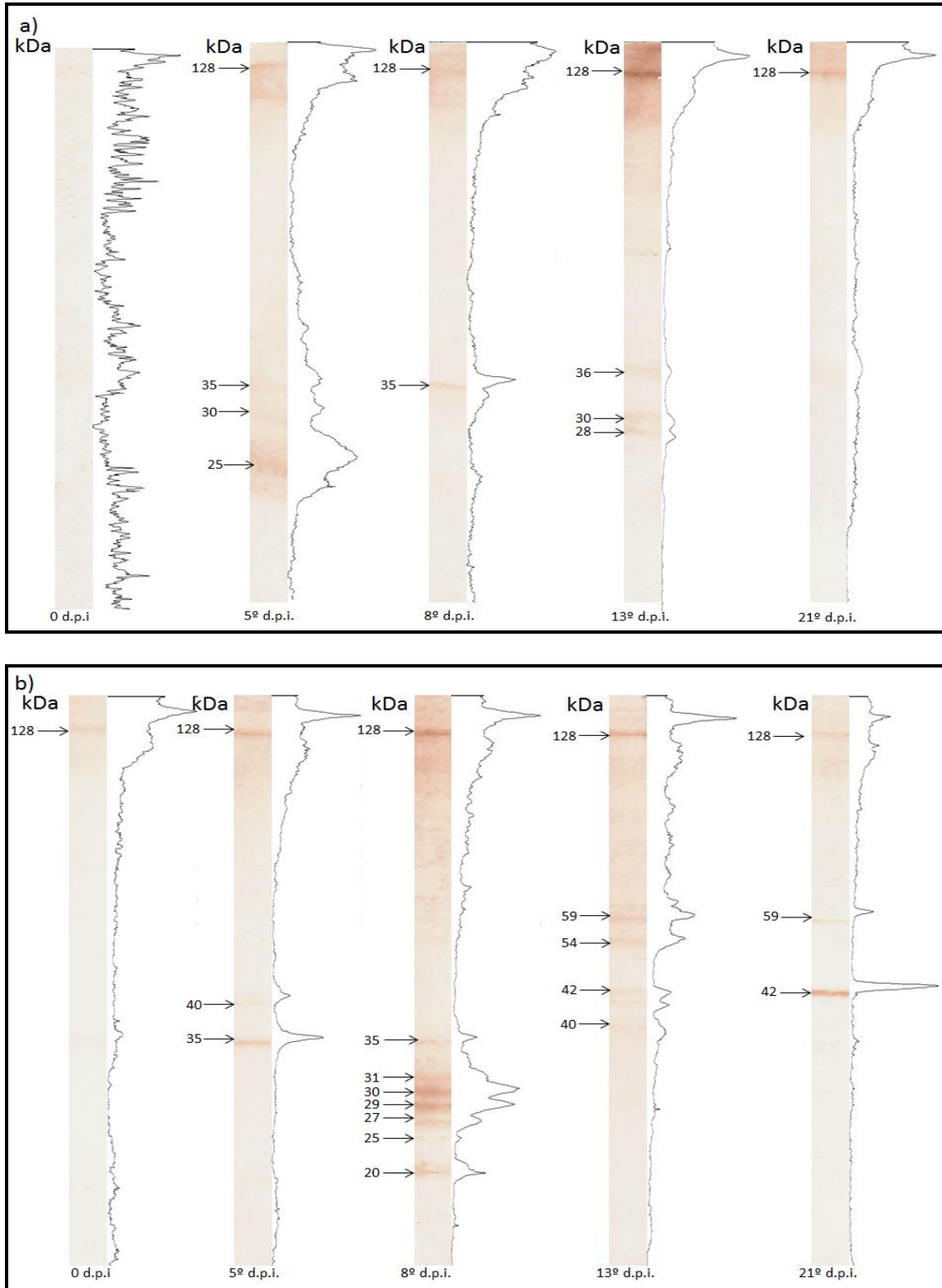


**Figura 3:** Immunoblotting para detecção de IgG anti *S. venezuelensis* em amostra de soro de ratos, frente ao extrato alcalino de larvas L3 de *S. venezuelensis*. a) Grupo não-imunossuprimido b) Grupo imunossuprimido. Frações proteicas em kDa, d.p.i – dias pós-infecção. Análise realizada por software *Imagej* (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA).

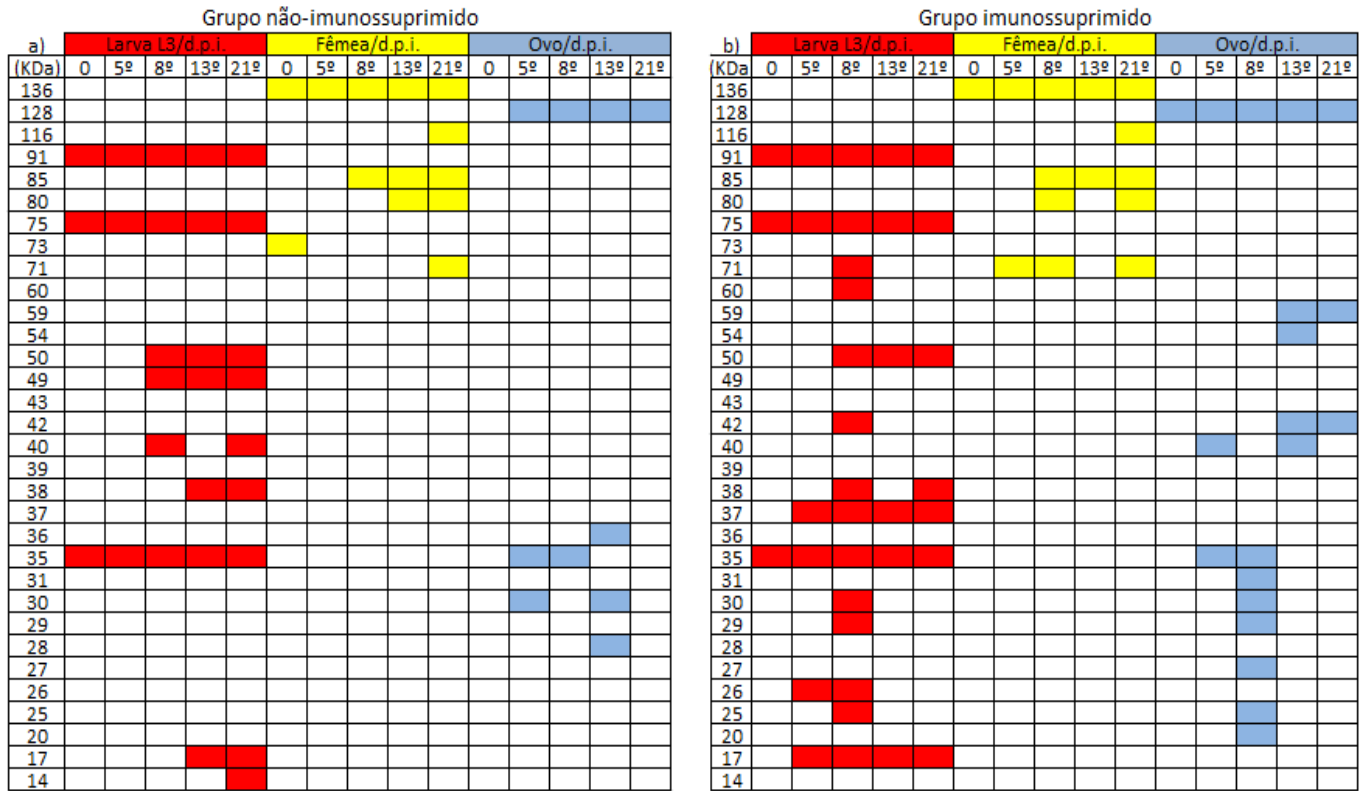




**Figura 4:** Immunoblotting para detecção de IgG anti *S. venezuelensis* em amostra de soro de ratos, frente ao extrato alcalino de fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis*. a) Grupo não-imunossuprimido b) Grupo imunossuprimido. Frações proteicas em kDa, d.p.i – dias pós-infecção. Análise realizada por software *Imagej* (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA).



**Figura 5:** Immunoblotting para detecção de IgG anti *S. venezuelensis* em amostra de soro de ratos, frente ao extrato alcalino de ovos de *S. venezuelensis*. a) Grupo não-imunossuprimido b) Grupo imunossuprimido. Frações proteicas em kDa, d.p.i – dias pós-infecção. Análise realizada por software *Imagej* (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, USA).



**Figura 6:** Painel comparativo de detecção de frações proteicas imunorreativas frente ao extrato alcalino de larvas L3, fêmeas partenogênicas ou ovos de *S. venezuelensis*. a) Grupo não-imunossuprimido b) Grupo imunossuprimido. Frações proteicas em kDa, d.p.i – dias pós-infecção.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a detecção de IgG antilarvas, fêmeas partenogênicas e ovos de *S. venezuelensis* em amostra de soro de ratos não-imunossuprimidos e imunossuprimidos utilizando técnicas de *immunoblotting*.

A literatura consultada não apresentou pesquisas que utilizassem as tres formas evolutivas de *S. venezuelensis* para produção de extrato antigênico como também técnica de *Immunoblotting* para detecção de IgG anti *Strongyloides venezuelensis* utilizando amostras de soro de ratos sendo a discussão embasada em estudos utilizando amostras de soro humano, outras espécies de *Strongyloides*.

No ELISA, observou-se perfil de reatividade para o extrato alcalino de larvas, com detecção a partir do 5º d.p.i. no grupo não-imunossuprimido e cessando no 21º d.p.i., enquanto o grupo imunossuprimido iniciou-se a reatividade no 5º d.p.i. persistindo após 21º d.p.i.. Esse mesmo perfil de reatividade é observado nos extratos alcalinos de fêmeas partenogênicas e ovos de *S. venezuelensis*, tanto no ELISA quanto no *immunoblotting*.

No *immunoblotting* o perfil de reatividade permaneceu com detecção de IgG por frações imunoreativas a partir do 8º d.p.i. no grupo não-imunossuprimido e a partir do 5º d.p.i. no grupo imunossuprimido com mesmo perfil de reatividade nos extratos alcalinos de fêmeas partenogênicas e ovos de *S. venezuelensis*. Experimento anterior de detecção de IgG anti *S. venezuelensis* utilizando ELISA frente ao extrato alcalino de larvas em soros de ratos o grupo não-imunossuprimido demonstrou reatividade a partir do 13º d.p.i. enquanto os animais do grupo imunossuprimido apresentaram reatividade em todos os dias da cinética de infecção (GONÇALVES *et al.*, 2012c). Estudo em amostras de soro humanos utilizando extrato alcalino de diferentes formas de *S. venezuelensis* na detecção de IgG anti *S. stercoralis* em humanos pelo ELISA apresentou dados similares com o melhor resultado para a detecção de anticorpos

IgG anti *S. stercoralis* usando extrato alcalino de larvas de *S. venezuelensis*, porém todos os extratos apresentaram detecção de IgG (GONÇALVES *et al.*, 2012b).

O grupo imunossuprimido apresentou maior eficiência na detecção de IgG anti *S. venezuelensis* frente aos extratos alcalinos, um fato que pode ser explicado devido a imunossupressão pela administração de dexametasona que promove hiperinfecção nos animais podendo resultar em uma carga antigênica maior, devido à maior quantidade de larvas infectantes, bem como aumento do número de fêmeas partenogênicas e consequente aumento na fertilidade produzindo mais ovos. Machado *et al.* (2011) em seu estudo demonstraram que a dexametasona, quando administrada a camundongos BALB/c infectados com *S. venezuelensis*, promove aumento dos neutrófilos circulantes e diminuição de eosinófilos e células mononucleares no sangue e lavado bronco-alveolar, com diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleucina (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12) e imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgE), com aumento na carga parasitária nos animais com consequente hiperinfecção e disseminação. Em recente revisão Yasuda *et al.* (2014) destacaram a importância da imunidade inata e adquirida na expulsão rápida do parasito *S. venezuelensis* em roedores, o que demonstra o papel destas duas vias envolvidas no combate à infecção e a importância da interação de ILC<sub>2</sub> células (células linfoides inatas) e eosinófilos com produção de IL-33 que induz IL-5 e IL-3 promovendo eosinofilia pulmonar auxiliando na expulsão de larvas nos pulmões como também a importância da contribuição do perfil Th2 em associação com IgG1 e IgE para a expulsão. Também supomos que a metodologia empregada no processo de imunossupressão possa ter contribuído, pois os animais consumiram à vontade solução de dexametasona podendo alguns animais ter consumido menor quantidade de solução não produzindo uma imunossupressão igualitária entre todos os animais do grupo.

No presente estudo utilizando amostras de soro de ratos foi detectado padrão de reatividade com frações proteicas imunorreativas entre 90 e 75kDa, 50-33 kDa e de 26-14 kDa

para o extrato alcalino de larvas em ambos os grupos, no entanto, o perfil do grupo imunossuprimido incluíam frações de 71-37 kDa, sendo este o extrato com melhor eficácia na detecção de IgG. O extrato alcalino de fêmeas partenogênicas expressou frações de 136-71 kDa em ambos os grupos experimentais e o extrato alcalino de ovos frações de 136 kDa e 36-28 kDa foram observadas no grupo não-imunossuprimido enquanto no grupo imunossuprimido mostraram frações reativas de 59-40 kDa e 35-20kDa, o perfil de reatividade de ambos os extratos não foi tão eficaz como o extrato de larvas, porém detectaram frações imunorreativas durante o percurso da infecção em ambos grupos experimentais.

Levenhagen e Costa-Cruz (2014) em uma revisão recente sobre diagnóstico da estrogiloidíase humana relataram que em estudos anteriores utilizando diferentes extratos de *Strongyloides* sp. e técnica de imunotransferência as frações proteicas imunoreativas apresentaram pesos moleculares entre 26-28, 31-33,41-45, 120-160 a 205 kDa.

Todos os extratos alcalinos apresentaram frações inespecíficas no dia 0 da infecção sendo este o controle dos experimentos, isso pode ser devido a utilização de animais convencionais na pesquisa, podendo estes apresentarem infecções por parasitos comensais que apresentaram reatividade cruzada com antígenos de *S. venezuelensis*.

Frações proteicas imunorreativas de 26-14 kDa presentes no extrato alcalino de larvas L3 foram relevantes no presente estudo em particular na detecção precoce da infecção pois apresentaram-se no início da cinética de infecção. Sato *et al.* (1990) utilizando técnica de immunoblotting para detecção de IgG anti *S. stercoralis* em amostra de soro humano, identificaram variação na reatividade de frações proteicas entre os pacientes, porém frações de 97, 66, 41 e 26 kDa foram identificadas na maioria das amostras de soros dos pacientes. Em estudo realizado para identificação de proteínas do choque térmico (Heat-shock proteins - HSP) durante a transformação de larva infectante para estágio parasita de *S. venezuelensis* observou-se um aumento de frações proteicas de 70 kDa além de complexos de 16 e 22 kDa no

immunoblotting, sendo estas proteínas relacionadas com o processo de transformação de estagios do parasito (Tsuji et al., 1996).

Fração proteica imunorreativa de 26 kDa presente apenas no extrato alcalino de larvas, também antecipou o diagnóstico para o grupo imunossuprimido. Estudos realizados com soro humano na identificação de epitopos de larva de *S. stercoralis* apresentou fração proteica imunorreativa de 26 kDa com alta frequência no grupo com estrogiloidiase (Sudré et al., 2007), podendo essa fração ser homologa a fração proteica identificada em nosso estudo com *S. venezuelensis* em soro de ratos imunossuprimidos, podendo esta ser extrapolada em testes com soro humano.

No grupo imunossuprimido frações de 17 kDa presente apenas no extrato alcalino de larvas pode apresentar uma potencial ferramenta diagnóstica sendo utilizada como um marcador de infecção precoce em indivíduos imunodeprimidos, mas para este propósito mais estudos serão necessários.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Todos os extratos alcalinos detectaram IgG anti *S.venezuelensis* no ELISA.
- ✓ O extrato alcalino de larvas L3 foi mais efetivo na detecção de IgG anti *S. venezuelensis*, com melhor reatividade no grupo imunossuprimido.
- ✓ No *immunoblotting* a detecção de frações proteicas no grupo imunossuprimido foi adiantada em relação ao grupo não-imunossuprimido para os três extratos alcalinos.
- ✓ As frações de 91, 75, 35 kDa foram inespecíficas para o extrato alcalino de larva L3, a fração de 136 kDa o extrato de fêmea partenogénica e a de 128 kDa para o extrato alcalino de ovo.

- ✓ No extrato alcalino de larvas L3 frações proteicas imunoreativas de 26 e 17 kDa apresentaram reatividade a partir do 5º d.p.i. no grupo imunossuprimido antecipando o diagnóstico representando um possível marcador de infecção em casos de imunossupressão.

## 7. REFERÊNCIAS

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel mit. H. Geneesk Batavia: Lab. Weltevreden. Feestbundel, p.41-47, 1917.

BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillula intestinalis*) nouveau ver nématode trouve par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de Cochinchine. **Comptes Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.

BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1716-1719, 2010.

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

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L. L.; SEET, R. C. S.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians in training survey. **The American Journal of Medicine**, v.120, p. 545-551, 2007.



BUONFRATE, D.; MENA, M. A.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; ALBONICO, M.; GOTUZZO, E.; BISOFFI, Z.; COHEMI Project Study Group. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. **Epidemiology & Infection Cambridge Journals Online**, v. 3, p. 1-9, doi:10.1017/S0950268814001563, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; GONZAGA, H. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human Strongyloidiasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2792. doi:10.1371/journal.pntd.0002792, 2014.

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

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.

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

GANESH, S.; CRUZ-JR, R. J. Strongyloidiasis: A multifaceted disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 194-196, 2011.

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

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

GENTA, R. M. Strongyloidiasis. **Encyclopedia of Immunology**, second edition, Ed. Elsevier, p. 2238-2239, 2004.

GOMPELS, M.; TADOL, J.; PETERS, B. S.; PINCHING, A. J. Disseminated strongyloidiasis in AIDS: uncommon but important. **AIDS**, v. 5, p. 329-332, 1991.

GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, F. A.; CARDOSO, C. R.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 319-328, 2008.

GONÇALVES, A. L. R., 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, 2012a.

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

GONÇALVES, A. L. R., SILVA, C.V., UETA, M.T., COSTA-CRUZ, J.M. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Experimental Parasitology** v.130, p. 205-208, 2012c.

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 78–84, 2011.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A. New technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal of Communication of Science and Industrial Organization**, v.12, p.17-18, 1939.

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-309, 1996.

HENDRIX, C. M; BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S. Whipworms and intestinal threadworms. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 17, p. 1366-1373, 1987.

HIRA, P. R.; AL-ALI, F.; SHWEIKI, H. M.; ABDELLA, N. A.; JOHNY, M.; FRANCIS, I.; IQBAL, J.; THOMPSON, R.; NEVA, F.. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Annual of Tropical Medicine Parasitology**, v.98, p. 261-270, 2004.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis *mansoni*. Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

INÊS, E. J.; SOUZA, J. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, E. S.; SANTOS, F. L.; SILVA, M. L. S.; SILVA, M. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, v. 120, p. 206-210, 2011.

IRIEMENAM, N. C.; SANYAOLU, A. O.; OYIBO, W. A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A. F. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v.59, p. 9-14, 2010.

KEISER, P. B., NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p. 208–217, 2004.

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

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

LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M.. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis, **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014.

LEVINE, N.D. Nematode parasites of domestic animals and of man. **Minnesota: Burgess Publishing Company**, p. 477, 1980.

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

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, E. R.; CARLOS, D.; LOURENÇO, E. V.; SORGI, C. A.; SILVA, E. V.; RAMOS, S. G.; UETA, M. T.; ARONOFF, D. M.; FACCIOLI, L. H. Counterregulation of

Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 571–578, 2009.

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

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

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A., 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.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANÍBAL, F. F.; SILVA, E. V. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COSTA-CRUZ, J. M.; FACCIOLI, L. H. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 72-79, 2011.

MAHMOUD, A. A. F. Strongyloidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 949-952, 2006.

MAIA, T. M. C.; VASCONCELOS, P. R. L.; FAUTH, S.; MOTTA NETO, R. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 19, p. 118-21, 2006.

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

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. P.; ZORNELLA-EZAVENTO, 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.

MEJIA, R.; NUTMAN, T. B. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 25, p. 458-463, 2012.

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: Edufu, 2005, 273p.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 1, p.507-624, 1948.

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

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011. p. 523-527

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; PEREIRA, A. T. M.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.1185-1195, 2006.

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

NOZAIS, J. P.; THELLIE, M.; DATRY, A.; DANIS, M. Disseminated strongyloidiasis. **Presse Medicines**, v. 30, p. 813-818, 2001.

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

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

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

REQUENA-MÉNDEZ, A.; CHIODINI, P.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; GOTUZZO, E.; MUÑOZ, J. The laboratory diagnosis and follow up of Strongyloidiasis: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2002, doi:10.1371/journal.pntd.0002002, 2013.

REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.

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.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.

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

RODRIGUEZ, C. D.; IGUAL, A. R.; OLTRA, A. C.; SANCHEZ, S. P.; BUSTAMANTE, B. M.; PARRA, G. F.; NAGORE, E. E. Agricultural occupation in strongyloidiasis. A case-control study. **Revista Clínica Espanhola**, v. 201, p. 81-84, 2001.

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

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E.E.; 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.

ROXBY, A. C., GOTTLIEB, G. S.; LIMAVE, A. P. Strongyloidiasis in transplant patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1411-1423, 2009.

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

SAFDAR, A.; MALATHUM, K.; RODRIGUEZ, S. J.; HUSNI, R.; ROLSTON, K. V. Strongyloidiasis in patients at comprehensive câncer center in the United States. **Cancer**, v.100, p.1531-1536, 2004.

SAID, T.; NAMPOORY, M. R. N.; NAIR, M. P.; HALIM, M. A.; SHETTY, S. A.; KUMAR, A. V.; MOKADAS, E.; ELSAYED, A.; JOHNY, K. V.; SAMHAN, M.; AL-MOUSAWI, M. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 1014-1015, 2007.

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

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **International Parasitology**, v.20, p.57-62, 1990.

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

SATO, Y.; INOUE, F.; KIYUNA, S.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of three antigen preparations from *Strongyloides stercoralis* larvae in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 84, p. 403-406, 1990.

SHÄR, 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, e2288. doi:10.1371/journal.pntd.0002288, 2013.

SHERDING, R. G.; JOHNSON, S. E. **Doenças dos intestinos**. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. Roca. São Paulo, 1998. 771-803.

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



SIEGEL, M. O.; SIMON, G. L. Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1581. doi:10.1371/journal.pntd.0001581, 2012.

SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; PINHO, J. R.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKEK, R. C.; PAULA, F. M. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 141, p. 716-721, 2014.

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

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M.; Diagnóstico da estromgiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35 p. 173-184, 2006.

SUDRÉ, A. P., SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G. M.; PERALTA, R. H. S.; 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. 1117-1123, 2007.

TSUJI, N.; OHTA, M.; FUJISAKI, K.,. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v.83, p. 99-102, 1996.

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

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

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.